



RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes



Universidad
Nacional
de Quilmes

Iñigo, Sabrina

Avances en el conocimiento del rol de PFT1 y su regulación en la promoción de la floración



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Iñigo, S. (2017). *Avances en el conocimiento del rol de PFT1 y su regulación en la promoción de la floración.* (Tesis de doctorado). Bernal, Argentina: Universidad Nacional de Quilmes. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/414>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Avances en el conocimiento del rol de PFT1 y su regulación en la promoción de la floración

TESIS DOCTORAL

Sabrina Iñigo

sabrinainigo@gmail.com

Resumen

Las plantas florecen en cierto momento del año para asegurarse que el desarrollo reproductivo ocurra en la estación más favorable. Esta transición del estado vegetativo al estado reproductivo se encuentra regulada por numerosos factores genéticos y ambientales. Entre los factores externos, la calidad de luz, la temperatura y el fotoperíodo son los más importantes para determinar el momento adecuado para que ocurra la floración.

En este trabajo se estudió el rol de PHYTOCHROME AND FLOWERING TIME 1 (PFT1) en la regulación de la floración utilizando aproximaciones genéticas y bioquímicas. Se ha propuesto que PFT1 actúa en la vía de la calidad de luz regulando la expresión de *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) en respuesta a la baja proporción de luz roja/roja lejana (Cerdán & Chory, 2003). Sin embargo, el grado de interacción entre PFT1 y los genes del fotoperíodo, y su modo de acción son hasta el momento desconocidos.

Se estudió como se integran genéticamente las vías de señalización “corriente abajo” de los fitocromos y se comprobó que existe una jerarquía en el accionar de los fitocromos B, D y E para regular la floración en respuesta a la calidad de luz, donde phyB posee un rol principal mientras que, phyD y phyE roles secundarios. Además, los genes *PFT1*, *CONSTANS* (*CO*) y *FT* no fueron capaces de alterar esta jerarquía entre los fitocromos. Se analizó el efecto de la sobreexpresión de *CO* en plantas mutantes para los fitocromos B, D y E y para el gen integrador de la vía fotoperiódica *FT* y en plantas mutantes para los dos genes integradores, *FT* y *TWIN SISTER OF FT* (*TSF*). Se determinó que los fitocromos B, D y E podrían regular negativamente a *FT* y *TSF* por un mecanismo parcialmente independiente de *CO* y que *FT* es el principal efector de la vía del fotoperíodo con una contribución minoritaria de *TSF*. *TSF* se encontraría regulando la floración por un mecanismo independiente del fotoperíodo.

Utilizando un sistema inducible por glucocorticoide, se determinó que *PFT1* es capaz de promover la floración en ausencia de *CO* y que es capaz de actuar no sólo a través del gen integrador *FT*. Además, con estos experimentos se demostró que *PFT1* es un regulador positivo de la expresión de *CO* y *FT*.

Se analizó el efecto de la temperatura en el tiempo de floración y se determinó que las plantas con mayores niveles de *PFT1* son insensibles a la temperatura, lo cual sugiere que *PFT1* podría alterar la respuesta a la calidad de luz modificando la sensibilidad a la temperatura.

Por otro lado, se determinó que la proteína *PFT1* no se encuentra regulada por factores ambientales. Analizando los niveles de *PFT1*, se encontró que la proteína presenta una muy baja estabilidad en extractos proteicos de *Arabidopsis* y que su degradación ocurre por la vía del proteasoma, tanto *in vitro* como *in vivo*. *PFT1* interacciona, tanto *in vitro* como *in vivo*, con dos proteínas que presentan posible actividad E3 ubiquitin ligasa. Se demostró que estas proteínas, FRF1 y FRF2, promueven la degradación de *PFT1* *in vivo* utilizando ensayos transitorios de agrofiltración y analizando los niveles de proteína *PFT1*: Tap en plantas mutantes para estos genes. Además, se logró asignar una función biológica a estos genes analizando el comportamiento de mutantes insercionales para estos genes y de plantas transgénicas que expresan microRNAs artificiales diseñados para silenciarlos. Se determinó que FRF1 y FRF2 son activadores de la floración y que es posible que la degradación de *PFT1* mediada por FRF1 y FRF2 sea necesaria para que *PFT1* pueda cumplir su función transcripcional.

Lugar de trabajo: Laboratorio de Biología Molecular de Plantas
Fundación Instituto Leloir

Tesis presentada para optar al título de
Doctor Mención en Ciencias Básicas y Aplicadas
de la Universidad Nacional de Quilmes

Avances en el conocimiento del rol de PFT1 y su regulación en la promoción de la floración

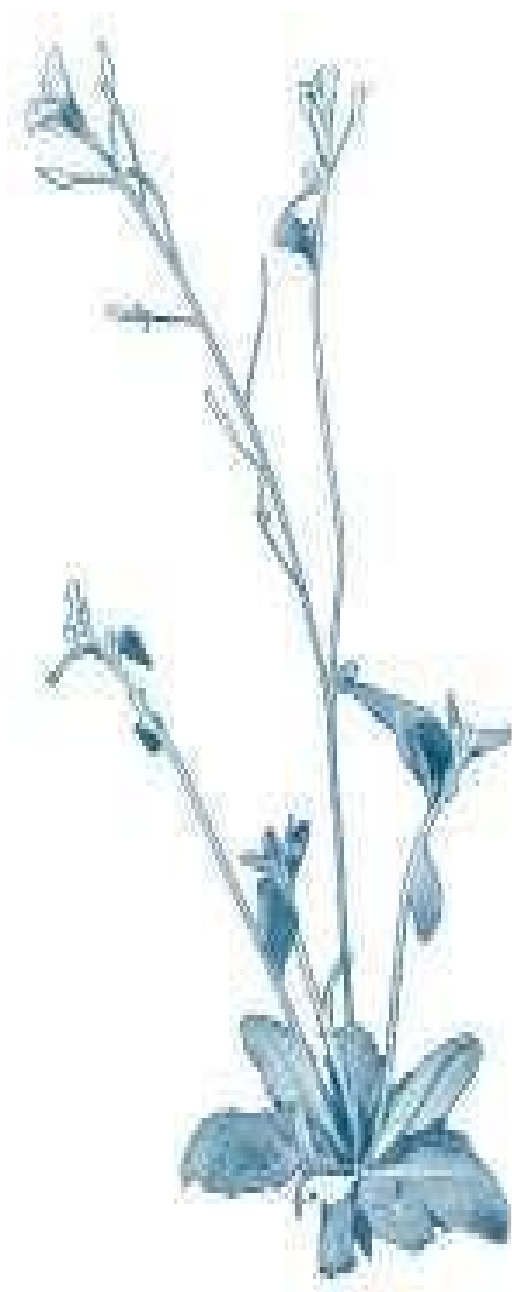
Lic. Sabrina Iñigo

Director: Dr. Pablo D. Cerdán

Codirector: Dr. Alejandro G. Pardo

**Laboratorio de Biología Molecular de Plantas
Fundación Instituto Leloir**

-Buenos Aires, 2011-



**INSTITUTO LELOIR
FUNDACIÓN**

“Si se es fiel al llamado de la vocación, los sacrificios y dificultades que uno pueda atravesar serán irrelevantes a la hora del balance final”

César Milstein

AGRADECIMIENTOS

Durante todos estos años aprendí muchas cosas pero todo esto no hubiera sido posible sin la ayuda de estas personas a quienes les debo mi agradecimiento:

Al Dr. Pablo Cerdán, por permitirme formar parte de su grupo de investigación, por su confianza para que pueda llevar a cabo este proyecto, por estar siempre dispuesto a contestar mis preguntas y por darme ánimo cuando los resultados no eran tan buenos como esperaba.

A Bárbara, Natalia y Giselle, por hacerme sentir parte del grupo desde el primer día que llegué al laboratorio, por enseñarme a trabajar con las plantas, por todos los lindos momentos que compartimos, por su amistad...A Edith y a Julieta por compartir tanto tiempo conmigo, por sus consejos y por su amistad.

A Adrián, por compartir el primer año en el laboratorio, por el legado de una parte de la línea de trabajo y por enseñarme a hacer mi primer Western!

A mis actuales compañeros de laboratorio: Mariana, Aime, Francisco y Maximiliano. Gracias por ayudarme tanto en estos últimos meses en los que tenía que combinar la escritura con el trabajo en el laboratorio, gracias por guardarme las placas, por largarme los cultivos y regarme las plantas cuando yo no podía estar. Marian, gracias por tu ayuda con las levaduras y con las columnas en el cuarto frío! Maxi, gracias por ayudarme con estadística...

A todos los que pasaron por el 208 en estos años y con quienes compartí horas de trabajo, charlas y almuerzos: Milagros, Sebastián, Maru, Mirko, Regina, Jesi, Sheila....

Al Dr. Staneloni, por compartir el día a día, por interesarse por mi trabajo y por contarme sus historias...

A Valeria Crosa del IBR por su amabilidad y por ayudarme con el diseño de los microRNAs artificiales

A toda la gente del Instituto que hace que nuestro trabajo sea más fácil: al personal técnico, de mantenimiento, droguero, biblioteca y administración.

A toda la gente de distintos laboratorios que me ayudó con el manejo de equipos, protocolos o simplemente compartiendo buenas charlas, anécdotas, mates y almuerzos y que hicieron posible que el trabajo del día a día fuera un poco más ameno. A Vero, Vera, Nati, Caro y a Andrés por los mates...

A mis grandes amigas de la facu Juli y Julita por estar siempre a mi lado, porque cuando nos juntamos parece como si nos siguiéramos viendo todos los días, por todas las charlas, los mates, las carcajadas...

A mis amigas de la escuela, Sil, Ana y Fer por su interés en mi trabajo, porque aunque cada vez nos es más difícil juntarnos se que siempre puedo contar con ustedes.

A mis amigos de la UNQ, Jorgito, Marian, Pirinchos, Cintia, Silver, Anita y Leti, gracias por estar a mi lado, compartir tantos momentos, viajes, cenas, por escucharme y siempre ayudarme en todo lo que pueden....es muy importante para mi saber que siempre están ahí...

A mi Godo, por compartir nuestras vidas, por su apoyo incondicional, su paciencia infinita, por darme ánimo cientos de veces cuando yo creía que llegar acá no era posible, por su confianza ciega, por estar siempre a mi lado, porque no habría llegado acá si no te hubieras puesto en mi camino...

A mis padres Silvia y César, porque siempre me apoyaron y alentaron en lo que elegí, por confiar en mí y por enseñarme que uno siempre puede alcanzar lo que se propone...

A mi hermana Magalí, por interesarse en mis cosas, por sus inquietudes: y cómo va la Tesis?? Y qué es lo que hacés en el laboratorio?? Por ayudarme a elegir los colores y buscarme las frases...

A mis abuelos, por preguntar siempre por mis cosas, por estar a mi lado, por su confianza y su cariño...

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	i
Unidades de medida y concentración	iii
RESUMEN	iv
I) INTRODUCCIÓN GENERAL	1
<i>Arabidopsis thaliana</i> como planta modelo	1
¿Cómo funcionan los fitocromos para controlar el desarrollo de <i>Arabidopsis</i> ?	2
Vías genéticas que controlan la floración en <i>Arabidopsis thaliana</i>	4
Control de la floración por el fotoperíodo	5
Vernalización	9
Otras vías que regulan la floración	10
Regulación de la floración en otras especies	12
Objetivos de este trabajo	14
II) MATERIALES Y MÉTODOS	15
1. Cepas bacterianas	15
1.1 <i>Escherichia coli</i>	15
1.1.1 Cepas y condiciones de cultivo	15
1.1.2 Preparación de células de <i>E. coli</i> DHS α competentes por métodos químicos	15
1.1.3 Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> BL21 <i>codon plus</i>	16
1.1.4 Transformación de <i>E. coli</i> por cambio drástico de temperatura	16
1.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	16
1.2.1 Cepas y condiciones de cultivo	16
1.2.2 Preparación de células electro competentes de <i>A. tumefaciens</i>	17
1.2.3 Transformación de Células competentes de <i>A. tumefaciens</i>	17
2. Levaduras: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
2.1 Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	18
2.1.1 Interacción de PFT1 (1-242) con distintas delecciones de FRF1 y FRF2	19
3. Material vegetal	19
3.1 <i>Arabidopsis</i>	21
4. Plásmidos y construcciones	23
4.1 Etiquetado de PFT1	23
4.2 Construcción 35S::CO:HA	24
4.3 Construcción 35S::FRF1	25
4.4 Construcción 35S::FRF2	26

Índice general

4.5 Construcción 35S::FRF2 AA	26
4.6 Construcciones GST:FRF1Δ337 y GST:FRF2Δ315	27
4.7 Construcciones MBP:FRF1Δ337 y MBP:FRF2Δ315	27
4.8 Construcciones MBP:FRF1 y MBP:FRF2	28
4.9 Diseño y obtención de microRNAs artificiales para silenciar los genes FRF1, FRF2, FRL1 y FRL2	29
4.10 Fusión de microRNAs artificiales	30
4.11 Análisis de secuencia	31
5. Metodologías generales para la obtención de las construcciones	31
5.1 Purificación de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	31
5.1.1 Método de lisis alcalina	31
5.1.2 Purificación mediante matrices de sílica comerciales	32
5.2 Preparación de insertos de ADN	32
5.2.1 Amplificación de insertos por PCR	32
5.2.2 Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa	33
5.2.3 Digestión con enzimas de restricción	34
5.3 Reacciones de ligación de ADN	34
6. Caracterización molecular de genes	35
6.1 Extracción de ADN genómico	35
6.2 Genotipificación de mutantes por PCR	35
6.3 Extracción de ARN total	35
6.3.1 Transcripción reversa	36
6.3.2 Reacciones de PCR en tiempo real	36
6.3.3 Reacciones de PCR de punto final	37
7. Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> mediante <i>A. tumefaciens</i>	38
8. Agroinfiltración de hojas de <i>N. benthamiana</i>	39
9. Estudios bioquímicos	40
9.1 Preparación de extractos proteicos totales	40
9.2 Estabilidad de PFT1 <i>in vitro</i>	41
9.3 Estabilidad de PFT1 <i>in vivo</i>	41
9.4 Cuantificación de proteínas totales	41
9.5 Electroforesis de proteínas	42
9.5.1 Tinción con <i>Coomassie Brilliant Blue</i>	42
9.5.2 Ensayos de <i>Western blot</i>	43
9.6 Preparación de proteínas recombinantes	44
9.6.1 Purificación de proteínas fusionadas a MBP	44
9.6.2 Inmunopurificación de anticuerpos α-GST:FRF2Δ315	45
9.7 Experimento de unión a columnas de afinidad	46

III) CAPÍTULO I: Disección de las señales transducidas por CO y PFT1 en la regulación de la floración	47
INTRODUCCIÓN	47
La vía del fotoperíodo en la regulación de la floración	47
FT pertenece a una pequeña familia con homólogos en plantas, hongos y animales	49
Regulación de la floración por calidad de luz	50
RESULTADOS	54
I) Existen al menos dos vías genéticas involucradas en regular la floración “corriente abajo” de los fitocromos	54
II) Los fitocromos B, D y E podrían regular negativamente a FT y TSF por un mecanismo parcialmente independiente de CO	57
III) PFT1 promueve la expresión de <i>CO</i> y <i>FT</i>	61
i) Obtención de versiones inducibles de PFT1	61
ii) La traslocación de PFT1 al núcleo promueve un incremento de los ARNm de <i>CO</i> y <i>FT</i>	63
IV) ¿Podría PFT1 jugar un rol en la respuesta a la temperatura?	64
V) PFT1 es capaz de promover la floración en forma independiente de CO	66
DISCUSIÓN	68
IV) CAPÍTULO 2: Caracterización de proteínas que controlan la actividad de PFT1	74
INTRODUCCIÓN	74
Regulación de la floración por calidad de luz	74
Generalidades del complejo MEDIATOR	74
El complejo MEDIATOR en plantas	76
Ubiquitinación de proteínas	77
RESULTADOS	79
I) Obtención de versiones etiquetadas de PFT1	79
II) PFT1 es ubicua pero los niveles son mayores en tejido reproductivo	81
III) PFT1 no parece variar en respuesta a factores ambientales	82
IV) PFT1 se degrada vía proteasoma	83
V) PFT1 interacciona con posibles E3 <i>ubiquitin ligasas</i> en sistemas heterólogos	86
VI) FRF1 es ubicuo, mientras que FRF2 es más abundante en tejidos vegetativos que en reproductivos	94
VII) FRF2 interacciona <i>in vitro</i> con PFT1	95
i) Clonado y expresión de FRF1 y FRF2 para la producción de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i>	95

Índice general

ii)	Experimento de unión a columna de afinidad	95
VIII)	FRF1 y FRF2 afectan la estabilidad de PFT1 <i>in vivo</i>	97
i)	FRF1 y FRF2 promueven la degradación de PFT1 en ensayos transitorios en <i>Nicotiana benthamiana</i>	97
ii)	El dominio RING es necesario para degradar a PFT1	99
IX)	Aproximaciones genéticas para estudiar el rol de <i>FRF1</i> y <i>FRF2</i> <i>in vivo</i>	101
i)	La expresión de <i>FRF1</i> y <i>FRF2</i> afecta los niveles de proteína PFT1 <i>in vivo</i>	107
ii)	<i>FRF1</i> y <i>FRF2</i> actúan como activadores de la floración	108
X)	El dominio activador transcripcional VP16 convierte a PFT1 en un represor de la floración	113
XI)	La degradación de PFT1 podría ser necesaria para promover su actividad transcripcional	115
DISCUSIÓN		118
V) CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS		125
VI) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		127

ABREVIATURAS

3AT	3-amino-1,2,4-triazol
3D	Estructura tridimensional
ABRC	<i>Arabidopsis Biological Resource Center</i>
AcLi	Acetato de litio
AD	Dominio activador
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADN-ss	Ácido desoxirribonucleico simple cadena
AG	AGAMOUS
ANOVA	Análisis de varianza
AP1	APETALA 1
AP3	APETALA 3
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATC	ARABIDOPSIS THALIANA RELATIVE OF CENTRORADIALIS
ATP	Adenosina trifosfato
BAP	N ⁶ -benzilaminopurina
BFT	BROTHER OF FT
BSA	Albúmina sérica bovina
CB	<i>Column buffer</i>
CCA1	CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1
CCT	CONSTANS, CONSTANS-LIKE, TIMING OF CAB EXPRESSION 1
CDF	CYCLING DOF FACTOR
CHE	CCA1 HIKING EXPEDITION
CO	CONSTANS
Col	Columbia
COP1	CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1
cry1	Criptocromo 1
cry2	Criptocromo 2
DBD	Dominio de unión a ADN
DC	Día corto
DEX	Dexametasona
Dil	Dilución
DL	Día largo
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DN	Día neutro
dNTPS	Desoxirribonucleótidos trifosfato
D.O.	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
E	Eficiencia
E1	Enzima activadora de ubiquitina
E2	Enzima conjugadora de ubiquitina
E3	Enzima ligadora de ubiquitina
EBS	EARLY BOLTING IN SHORT DAYS
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELF3	EARLY FLOWERING 3
EODFR	Tratamiento con pulsos de luz roja lejana al final del día (<i>End of day far red light treatment</i>)
EODR	Tratamiento con pulsos de luz roja al final del día (<i>End of day red light treatment</i>)
ES	Error estándar
FD	FLOWERING LOCUS D
fkf1	flavin-binding kelch repeat F-box 1
FLC	FLOWERING LOCUS C

FLM	FLOWERING LOCUS M
FRI	FRIGIDA
FT	FLOWERING LOCUS T
GA	Giberelina
GFP	Proteína verde fluorescente
GI	GIGANTEA
GST	Enzima glutatión S transferasa de <i>Schistosoma japonicum</i>
GR	Dominio de unión a glucocorticoide de rata
H	Histidina
HA	Hemaglutinina del virus de influenza humana
Hd1	Heading date 1
Hd3	Heading date 3a
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperacinetanosulfónico
HIR	Respuesta de alta irradiancia
HIS3	Histidina 3
IgG	Inmunoglobulina G
IPTG	Isopropil-1-tio- β -D-galactósido
L	Leucina
<i>LacZ</i>	Gen que codifica para la enzima β -galactosidasa de <i>Escherichia coli</i>
LB	Luria-Bertani
LC	Luz continua
LHY	LATE ELONGATED HYPOCOTYL
LFY	LEAFY
lkp2	lov kelch protein 2
Log (10)	Logaritmo en base 10
MBP	Proteína de unión a maltosa
MES	Ácido 2-(N-morfolina)-etanosulfónico
MFT	MOTHER OF FT AND TFL1
MS	Murashige y Skoog
Nº	Número
NHS	N-hidroxisuccinamida
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pBS	vector de clonado pBlueScript
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PEPB	Fosfatidiletanolamina
PFT1	PHYTOCHROME AND FLOWERING TIME 1
phyA	Fitocromo A
phyB	Fitocromo B
phyC	Fitocromo C
phyD	Fitocromo D
phyE	Fitocromo E
PIFs	PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS
PIPES	Ácido 1,4-piperazinedietanosulfónico
PP2A	PROTEIN PHOSPHATASE 2A Subunit A3
Ppd-H1	Photoperiod H1
PRC2	Complejo de represión Polycomb
PRR	PSEUDO RESPONSE REGULATOR
R	Luz roja
RGA	DELLA REPRESSOR OF GA1-3
RING	<i>Really interesting new gene</i>
RL	Luz roja lejana
SC	Medio sintético completo
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SMF	SCHULAFMUTZE

SNZ	SCHNARCHZAPFEN
SOC1	SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1
SVP	SHORT VEGETATIVE PHASE
T	Triptofano
Ta	Temperatura de <i>annealing</i>
TAP	TANDEM AFFINITY PURIFICATION
TCA	Ácido tricloroacético
Tev	Virus del Tabaco Etch
TFL1	TERMINAL FLOWER 1
Tm	Temperatura de <i>melting</i>
TOC1	TIMING OF CAB EXPRESSION
TOE	TARGET OF EAT
Tris	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
TSF	TWIN SISTER OF FT
U	Uracilo
Ub	Ubiquitina
UFO	UNUSUAL FLORAL ORGANS
URA3	Uracilo 3
UV	Ultravioleta
VIN3	VERNALIZATION INSENSITIVE 3
VP16	Dominio activador del virus del herpes simplex humano tipo 1
vWF-A	Factor tipo <i>von Willebrand</i>
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indoil- β -D-galactósido
ztl	zeitlupe

Nota aclaratoria:

Para referirse a un gen del tipo salvaje se utiliza letra mayúscula e itálica.

Para referirse a un gen mutado se utiliza letra minúscula e itálica.

Para referirse a una proteína y a una apoproteína de un fotorreceptor se utiliza letra mayúscula.

Para referirse a un fotorreceptor se utiliza letra minúscula.

Unidades de medida y concentración:

°C	Grados centígrados	μ g	Microgramo
cm	Centímetro	min	Minuto
Da	Dalton	ml	Mililitro
g	Gramo	μ l	Microlitro
KDa	KiloDaltons	mM	milimolar
Kb	Kilobases	μ M	Micromolar
kV	Kilovoltios	N	Normal
L	Litro	pb	Pares de bases
M	Molar	p/v	Peso en volumen
MDa	MegaDalton	r.p.m	Revoluciones por minuto
μ FD	Micro Faraday	v/v	Volumen en volumen
mg	Miligramo		

Avances en el conocimiento del rol de PFT1 y su regulación en la promoción de la floración

RESUMEN

Las plantas florecen en cierto momento del año para asegurarse que el desarrollo reproductivo ocurra en la estación más favorable. Esta transición del estado vegetativo al estado reproductivo se encuentra regulada por numerosos factores genéticos y ambientales. Entre los factores externos, la calidad de luz, la temperatura y el fotoperíodo son los más importantes para determinar el momento adecuado para que ocurra la floración.

En este trabajo se estudió el rol de PHYTOCHROME AND FLOWERING TIME 1 (PFT1) en la regulación de la floración utilizando aproximaciones genéticas y bioquímicas. Se ha propuesto que PFT1 actúa en la vía de la calidad de luz regulando la expresión de *FLOWERING LOCUS T (FT)* en respuesta a la baja proporción de luz roja/roja lejana (Cerdán & Chory, 2003). Sin embargo, el grado de interacción entre PFT1 y los genes del fotoperíodo, y su modo de acción son hasta el momento desconocidos.

Se estudió como se integran genéticamente las vías de señalización “corriente abajo” de los fitocromos y se comprobó que existe una jerarquía en el accionar de los fitocromos B, D y E para regular la floración en respuesta a la calidad de luz, donde phyB posee un rol principal mientras que, phyD y phyE roles secundarios. Además, los genes *PFT1*, *CONSTANS (CO)* y *FT* no fueron capaces de alterar esta jerarquía entre los fitocromos. Se analizó el efecto de la sobreexpresión de *CO* en plantas mutantes para los fitocromos B, D y E y para el gen integrador de la vía fotoperiódica *FT* y en plantas mutantes para los dos genes integradores, *FT* y *TWIN SISTER OF FT (TSF)*. Se determinó que los fitocromos B, D y E podrían regular negativamente a *FT* y *TSF* por un mecanismo parcialmente independiente de *CO* y que *FT* es el principal efector de la vía del fotoperíodo con una contribución minoritaria de *TSF*. *TSF* se encontraría regulando la floración por un mecanismo independiente del fotoperíodo.

Utilizando un sistema inducible por glucocorticoide, se determinó que PFT1 es capaz de promover la floración en ausencia de *CO* y que es capaz de actuar no sólo a través del gen integrador *FT*. Además, con estos experimentos se demostró que PFT1 es un regulador positivo de la expresión de *CO* y *FT*.

Se analizó el efecto de la temperatura en el tiempo de floración y se determinó que las plantas con mayores niveles de PFT1 son insensibles a la temperatura, lo cual sugiere que PFT1 podría alterar la respuesta a la calidad de luz modificando la sensibilidad a la temperatura.

Por otro lado, se determinó que la proteína PFT1 no se encuentra regulada por factores ambientales. Analizando los niveles de PFT1, se encontró que la proteína presenta una muy baja estabilidad en extractos proteicos de *Arabidopsis* y que su degradación ocurre por la vía del proteasoma, tanto *in vitro* como *in vivo*. PFT1 interacciona, tanto *in vitro* como *in vivo*, con dos proteínas que presentan posible actividad E3 *ubiquitin ligasa*. Se demostró que estas proteínas, FRF1 y FRF2, promueven la degradación de PFT1 *in vivo* utilizando ensayos transitorios de agrofiltración y analizando los niveles de proteína PFT1:Tap en plantas mutantes para estos genes. Además, se logró asignar una función biológica a estos genes analizando el comportamiento de mutantes insercionales para estos genes y de plantas transgénicas que expresan microRNAs artificiales diseñados para silenciarlos. Se determinó que FRF1 y FRF2 son activadores de la floración y que es posible que la degradación de PFT1 mediada por FRF1 y FRF2 sea necesaria para que PFT1 pueda cumplir su función transcripcional.

INTRODUCCIÓN GENERAL

***Arabidopsis thaliana* como planta modelo**

Arabidopsis thaliana es una pequeña planta dicotiledónea de la familia de las *Brassicaceae*. A pesar de que se encuentra relacionada con plantas de importancia económica, como el repollo, el brócoli y la colza, *Arabidopsis* no presenta importancia económica. Sin embargo, ha sido el foco de estudios genéticos, bioquímicos y fisiológicos por más de 30 años debido a las ventajas que presenta para el trabajo en laboratorio. Posee un ciclo de vida corto, da lugar a una progenie numerosa por auto polinización, requiere poco espacio para cultivarse y crece fácilmente. Posee un genoma relativamente pequeño y completamente secuenciado que puede ser manipulado por ingeniería genética mucho más sencillamente que el de otras especies. Además, hoy en día se cuenta con gran cantidad de ADNc completos y mutantes por inserción de la mayoría de sus genes. Todas estas ventajas hacen de *Arabidopsis* un organismo modelo ideal para las investigaciones biológicas ya que permiten testear hipótesis en forma rápida y eficiente y generar conocimiento acerca del comportamiento de una planta entera. A partir del conocimiento generado en una planta modelo como *Arabidopsis*, se pueden iniciar mejoras en plantas de interés agronómico.

Las plantas pueden distinguirse en plantas anuales y bianuales, las cuales florecen una única vez y mueren (monocárpicas) y en plantas perennes que viven más de dos años y en la mayor parte de los casos florecen todos los años cuando alcanzan la madurez (policárpicas).

Arabidopsis es una planta anual de día largo dado que su floración se encuentra acelerada cuando el fotoperíodo excede una cierta longitud del día. Se la considera una planta facultativa ya que su floración se encuentra promovida en días largos pero es aún capaz de florecer en un fotoperíodo de día corto. Esta característica la diferencia de las plantas fotoperiódicas estrictas para las cuales un fotoperíodo específico es condición *sine qua non* para florecer. De esta forma, las plantas utilizan a la luz y a la temperatura como fuentes de información para predecir el arribo de la estación favorable que le permita lograr un éxito reproductivo, la cual dependerá de cada especie (Jackson, 2009).

¿Cómo funcionan los fitocromos para controlar el desarrollo de *Arabidopsis*?

Frente a condiciones ambientales adversas, las plantas no tienen la posibilidad de moverse a un ambiente más favorable. Para alcanzar el éxito reproductivo, han desarrollado evolutivamente mecanismos que les permiten alterar su crecimiento y desarrollo en respuesta a las señales ambientales. Dentro de estas señales se encuentran la percepción de la extensión del día, de la temperatura y de la calidad de luz. La regulación del crecimiento de las plantas por las señales lumínicas se denomina fotomorfogénesis.

Existen tres tipos de fotorreceptores involucrados en la fotomorfogénesis: los fitocromos que absorben luz roja (R) y luz roja lejana (RL), los criptocromos que absorben luz UV-A y azul y los fotorreceptores con dominios LOV (por luz, oxígeno o voltaje), dentro de los cuales se encuentran las fototropinas (phot1 y phot2) y otra pequeña familia de fotorreceptores compuesta por zeitlupe (ztl), flavin-binding kelch repeat F-box 1 (fkf1) y lov kelch protein 2 (lkp2).

Los fitocromos existen en forma de dímeros y cada monómero contiene una apoproteína a la que se encuentra unida covalentemente un cromóforo tetrapirrólico, la fitocromobilina, capaz de presentar una isomerización del tipo *cis-trans*. Los fitocromos se encuentran en dos formas interconvertibles. Se sintetizan en la oscuridad en una forma biológicamente inactiva, capaz de absorber luz roja (Pr). La actividad biológica se obtiene luego de su fotoconversión en presencia de luz roja (660 nm) a la forma capaz de absorber luz roja lejana (Pfr). Esta reacción es reversible y la presencia de luz roja lejana (730 nm) convierte la forma Pfr en la forma inactiva Pr; como resultado se genera un fotoequilibrio dinámico de Pr y Pfr en las condiciones naturales de luz (Franklin and Quail, 2009).

La señalización mediada por los fitocromos involucra una interacción física con factores de transcripción del tipo bHLH, *PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS* (PIFs). Estas proteínas presentan múltiples funciones regulatorias controlando la fotomorfogénesis. La unión de la forma fotoactivada de los fitocromos produce una rápida fosforilación de PIF y su degradación vía proteasoma (Bauer *et al.*, 2004); (Park *et al.*, 2004); (Shen *et al.*, 2004); (Shen *et al.*, 2008). Este sistema le permite a las plantas alterar rápidamente la expresión génica en respuesta a cambios en la luz percibida del ambiente. La interacción de los fitocromos con los PIFs puede, además, conducir a una desestabilización de los fitocromos, generando un mecanismo de respuesta dual para regular el desarrollo de las plantas (Al-Sady *et al.*, 2008). Por otro lado, los PIFs se encuentran implicados en la regulación de la transcripción génica en la vía de señalización de los fitocromos (Monte *et al.*, 2004).

En *Arabidopsis* existen 5 genes que codifican para 5 fitocromos (phyA-phyE). phyB y phyD son muy similares entre sí (aproximadamente un 80% de identidad) y forman un subgrupo junto con phyE (Goosey *et al.*, 1997). Por su parte, phyA se encuentra más relacionado con phyC. La identificación de mutantes nulos deficientes en cada uno de estos fitocromos ha permitido identificar los roles individuales de cada fitocromo en *Arabidopsis* y sus funciones en el desarrollo de las plantas (Franklin & Quail, 2009).

Las plántulas germinadas en oscuridad presentan un fenotipo denominado etiolado, que se caracteriza por la presencia de hipocotilos elongados y cotiledones sin expandir, cerrados y amarillos. Luego de la germinación, inducida por las señales lumínicas, se inician una variedad de respuestas de desetiolación que garantizan la supervivencia fotoautotrófica. Dentro de estas respuestas se encuentran la inhibición del alargamiento del hipocotilo, la apertura de los cotiledones y la síntesis de clorofila. Estas respuestas se encuentran mediadas por los fitocromos y los criptocromos (cry), cry1 y cry2 (Franklin & Quail, 2009). Los fitocromos presentan roles únicos a lo largo del ciclo de vida de las plantas, pero pueden también actuar en forma redundante para regular un amplio rango de procesos, desde la germinación hasta el desarrollo reproductivo.

Analizando el fenotipo de las mutantes de fitocromos, se determinó que phyA es el encargado de mediar la desetiolación en RL continuo (Dehesh *et al.*, 1993; Nagatani *et al.*, 1993; Parks & Quail, 1993; Whitelam *et al.*, 1993), en cambio phyB es el fitocromo predominante en mediar la desetiolación en R y luz blanca (Somers *et al.*, 1991; Reed *et al.*, 1993).

Un ejemplo clásico donde se distinguen las respuestas de phyA y phyB es su comportamiento en la respuesta de escape al sombreado. Durante la fase adulta, la morfología de las plantas se encuentra también regulada por los fitocromos. La proporción de fitocromo activo (Pfr/Ptotal) se encuentra fuertemente correlacionada con la proporción de luz R/RL percibida. Cuando los niveles de la forma Pfr son bajos, las plantas elongan sus tallos y pecíolos, se inhiben las ramificaciones axilares, se promueve la senescencia de las hojas y se induce la floración. Esto le permite a las plantas poseer un mecanismo poderoso para la detección de plantas vecinas que compiten por los recursos lumínicos. Las plantas que crecen en condiciones de luz enriquecida en RL, situación que simula una alta densidad de cultivo, presentan estas respuestas de escape al sombreado que se encuentran mediadas principalmente con phyB, con alguna participación de phyD y phyE (Franklin, 2008; Halliday *et al.*, 2009).

En contraste con estos fitocromos, phyA posee una forma Pfr muy lábil a la luz, que se acumula en grandes cantidades en las plántulas etioladas. Las propiedades únicas que presenta phyA le permiten actuar como un sensor de luz RL en el modo HIR (respuesta de alta irradiancia), que tiene implicancias en la señalización de la relación de luz R/RL (Hennig *et al.*, 2000). Frente a

condiciones de baja proporción de luz R/RL, el fotoequilibrio de phyB, phyD y phyE se desplaza hacia la forma inactiva Pr, mientras que la señalización por phyA se encuentra estimulada hacia la respuesta RL-HIR. Las mutantes deficientes en phyA poseen una respuesta aumentada a la baja relación de luz R/RL, lo cual sugiere que phyA presenta un rol importante en los ambientes naturales, presentando un comportamiento antagónico al del “escape al sombreado” (Yanovsky *et al.*, 1997; Franklin, 2008).

Vías genéticas que controlan la floración en *Arabidopsis thaliana*

Todos los órganos de una planta se originan a partir de un pequeño número de células no diferenciadas llamadas meristemas. Los meristemas primarios se establecen durante la embriogénesis y forman tejidos primarios a partir de los cuales se desarrollan los órganos de las plantas. Por ejemplo, los meristemas apicales se localizan en el extremo en crecimiento de la planta adulta y producen las raíces y el tallo. El meristema apical del tallo se encuentra ubicado en el ápice de las plantas, en una zona de división y expansión celular, dando origen a las hojas y los meristemas axilares durante el desarrollo vegetativo y a los meristemas florales durante el desarrollo reproductivo. Los meristemas pueden ser determinados, es decir que se consumen luego de la formación del órgano, o indeterminados, encontrándose activos durante todo el ciclo de vida de la planta. En las plantas anuales, luego de la inducción floral, los meristemas vegetativos del tallo llevan a cabo la transición a meristemas de inflorescencia. Estos meristemas de inflorescencia se mantienen indeterminados por un tiempo generando los meristemas florales que dan lugar a las flores. Finalmente todos los meristemas se consumen y la planta muere. En cambio, las plantas perennes, han desarrollado estrategias más elaboradas para sobrevivir por varios años, formando estructuras perennes conteniendo al menos un meristema indeterminado para su crecimiento en la próxima estación (Melzer *et al.*, 2008).

Existen al menos dos tipos de información que las plantas utilizan para dar inicio a la floración. Una de ellas es ambiental e involucra los cambios en la longitud del día y en la temperatura ambiente que reflejan los cambios estacionales. En las zonas templadas, los días cortos preceden al invierno, con bajas temperaturas y deficiencia de agua. De forma similar, los días largos preceden períodos secos en algunas zonas desérticas. De esta forma, utilizando la extensión del día, las plantas pueden adaptar su crecimiento, fisiología y desarrollo anticipándose a periódicos cambios climáticos (Lagercrantz, 2009).

El otro tipo de información es endógena e involucra, por ejemplo, la transición desde un estadio juvenil a adulto que afecta muchos aspectos del desarrollo de la planta, incluyendo la competencia para florecer. Las plantas en el estadio juvenil no responden a ciertos estímulos que serían suficientes para inducir la floración en una planta adulta. Esta etapa juvenil puede ser de unos pocos días en especies como *Arabidopsis* o de varios años como en algunos árboles (Jackson, 2009).

Las rutas genéticas y bioquímicas a partir de las cuales las plantas sensan la información endógena y ambiental para inducir la floración, se denominan vías de la floración. A partir de análisis genéticos realizados en *Arabidopsis* se identificaron muchos genes involucrados en la regulación de la floración. Como resultado de estos estudios se observó que varias vías controlan la expresión de unos pocos genes clave, conocidos como genes integradores de la floración, cuya función es regular la expresión de los genes específicos de identidad del meristema floral. Se han descrito seis vías parcialmente independientes basadas en los fenotipos diferenciales que presentan las mutantes de floración bajo distintas condiciones ambientales de luz y temperatura. Estas vías son la vía del fotoperíodo, la vía autónoma, la vía de vernalización, la vía de calidad de luz, la vía de giberelinas y la vía termosensora (Ausín *et al.*, 2005).

Control de la floración por el fotoperíodo

La floración puede inducirse tanto en fotoperíodos de día largo (DL) como de día corto (DC), dependiendo de la especie. Las plantas pueden clasificarse en tres categorías basadas en su respuesta al fotoperíodo: plantas de DC, plantas de DL y plantas de día neutro (DN) que no responden al fotoperíodo.

En las plantas de DC, las noches largas inducen la floración. Sin embargo, cuando la noche larga se interrumpe con un pulso de luz, la floración no ocurre. La duración de la oscuridad también es importante en plantas de DL, aunque son menos sensibles a los pulsos de luz nocturnos. Sin embargo, cuando los días son largos y las noches son largas, las plantas no florecen. A diferencia de lo que ocurre con las plantas de DC, en las plantas de DL, si se interrumpe el día con un pulso de oscuridad las plantas florecen (Lagercrantz, 2009)..

La mayoría de las plantas de DL requiere la presencia de luz roja lejana al final del período de luz. Sin embargo, si la luz roja lejana se encuentra seguida de un pulso de luz roja la floración no se promueve. En las plantas de DC, en cambio, la calidad de luz percibida durante el período de luz no tiene mucho efecto en la floración (Figura 1) (Lagercrantz, 2009).

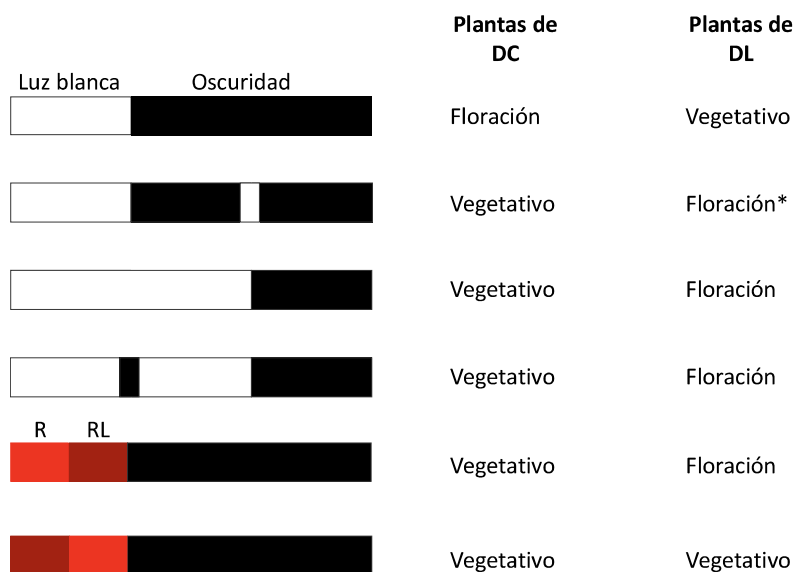


Figura 1. Esquema que representa las respuestas típicas de las plantas de DC y DL frente a distintas combinaciones de luz-oscuridad.

*Indica que en DL la floración existe pero depende de la duración del pulso de luz y del momento de la noche en que se realiza.

Para explicar cómo miden las plantas la extensión del día y de la noche se han propuesto varios modelos. El más apropiado parece ser el modelo de coincidencia externa, donde bajo ciertas condiciones un ritmo circadiano interno coincide con una señal externa, la luz, e induce la floración. Como se explicará en detalle en el Capítulo 1, *CONSTANS* (CO) es la proteína clave encargada de determinar la extensión del día en *Arabidopsis*. La expresión de CO se encuentra regulada por el reloj circadiano con un pico de expresión durante la noche en DC. Además, la proteína CO se degrada en oscuridad, por lo tanto la función de CO sólo puede cumplirse si el ARNm de CO se expresa antes de la fase de oscuridad. En realidad, esto es lo que sucede en DL, el pico de expresión del ARNm de CO coincide con la luz y la proteína es estabilizada en estas condiciones. Por lo tanto, en DL la proteína CO se acumula y promueve la transcripción de *FLOWERING LOCUS T* (FT) en el tejido vascular (Suarez-Lopez *et al.*, 2001; Yanovsky & Kay, 2002). FT es la proteína que se mueve de las hojas al meristema apical del tallo donde interactúa con factores de transcripción para inducir la floración (Corbesier *et al.*, 2007; Jaeger & Wigge, 2007; Lin *et al.*, 2007; Mathieu *et al.*, 2007; Tamaki *et al.*, 2007).

Los modelos que explican el funcionamiento del reloj circadiano incluyen al menos tres redes de retroalimentación negativas (*feedback loops*) interconectadas (Harmer, 2009). De acuerdo a los modelos planteados, CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) y LATE ELONGATED HYPOCOTYL

(LHY) juegan un rol muy importante y participan en dos de estas redes. En una de ellas regulan negativamente a TIMING OF CAB EXPRESSION (TOC1), que actúa como regulador positivo de CCA1 y LHY (Alabadí *et al.*, 2001), formando la primera red de retroalimentación. En la segunda, CCA1 y LHY promueven la transcripción de dos genes *PSEUDO RESPONSE REGULATOR (PRR)*: *PRR7* y *PRR9*, los cuales son, a su vez, reguladores negativos de CCA1/LHY. En tercer lugar, se encuentra TOC1 y otro componente hipotético Y, donde Y regula positivamente a TOC1, el cual a su vez reprime a Y. Se ha propuesto a GIGANTEA (GI) como candidato para Y, aunque esta propuesta no está exenta de controversias (Más & Yanovsky, 2009; Imaizumi, 2010).

El fotorreceptor *ztl* es necesario para mantener el ritmo circadiano promoviendo la degradación vía proteasoma de TOC1 y *PRR5*, la cual se encuentra regulada por su interacción con otras proteínas y por la luz (Más *et al.*, 2003; Kiba *et al.*, 2007; Fujiwara *et al.*, 2008). *ztl* interacciona físicamente con GI a través de la región N-terminal de su dominio LOV. Esta interacción depende de la luz azul y estabiliza a *ztl*. Como la transcripción de *GI* se encuentra regulada por el reloj, la proteína GI cicla y por lo tanto, le confiere una regulación post traduccional rítmica al fotorreceptor *ztl*. Esta interacción previene que *ztl* interaccione con TOC1 y *PRR5*, con lo cual estas proteínas se degradan más en oscuridad que en la luz (Kim *et al.*, 2007; Harmer, 2009). TOC1 y *PRR5* se encuentran reguladas negativamente por *ztl* y esta regulación es necesaria para la función del reloj circadiano y para la fotomorfogénesis temprana (Más *et al.*, 2003; Kiba *et al.*, 2007).

Recientemente, se describió a CCA1 HIKING EXPEDITION (CHE), que funciona como un regulador de CCA1 asociado a TOC1. TOC1 interacciona físicamente con CHE, el cual actúa como un represor transcripcional de CCA1, asociándose a su región promotora (Pruneda-Paz *et al.*, 2009). Dado que CHE no regula la expresión de *LHY*, y *CCA1* aún se expresa en las plantas mutantes *che*, es probable que otros factores participen en la inducción de *CCA1* y *LHY*.

El reloj circadiano regula a *CO* a nivel transcripcional, promoviendo la degradación de cuatro represores que pertenecen a la misma familia génica, CYCLING DOF FACTOR1 (CDF1), CDF2, CDF3 Y CDF5. Los CDFs poseen un pico de expresión a la mañana temprano y actúan en forma redundante para reprimir la expresión de *CO* durante el día (Fornara *et al.*, 2009). La abundancia de los CDFs se encuentra controlada por fotorreceptores del tipo LOV como *fkf1*, un fotorreceptor de luz azul que estaría involucrado en la degradación de los CDFs (Sawa *et al.*, 2007; Fornara *et al.*, 2009). En las tardes de fotoperíodos de DL, la expresión de CDF1 se encuentra fuertemente reprimida por *PRR9*, *PRR7* y *PRR5* (Nakamichi *et al.*, 2007). Además, en ese mismo momento, GI interacciona físicamente con *FKF1* y la estabiliza, promoviendo la degradación de los CDFs y la subsiguiente expresión de *CO* (Sawa *et al.*, 2007). En la noche, la degradación de GI es promovida por CONSTITUTIVE

PHOTOMORPHOGENESIS 1 (COP1), una enzima E3 *ubiquitin ligasa*. La interacción GI-COP1 requiere al factor circadiano EARLY FLOWERING 3 (ELF3) (Yu *et al.*, 2008). Por lo tanto, las plantas utilizan múltiples factores relacionados con los ritmos circadianos para controlar en forma precisa el patrón de expresión diurno de *CO* (Imaizumi, 2010).

CO también presenta una regulación a nivel traduccional. Los receptores de luz azul, *cry1* y *cry2* y el receptor de R/RL *phyA* estabilizan la proteína *CO* al final del día en DL. Sin embargo, *phyB* promueve su degradación en las primeras horas de la mañana (Valverde *et al.*, 2004). De esta forma, el fotoperíodo y la calidad de luz también afectan la expresión de *FT* a través de la estabilización de la proteína *CO*.

Una vez que *FT* se expresa, la proteína se mueve al meristema apical del tallo, donde interacciona con FLOWERING LOCUS D (FD). El complejo *FT/FD*, activa la expresión de los genes de identidad del meristema como *APETALA1* (*AP1*) y *FRUITFULL*, probablemente por unión directa a sus promotores (Abe *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005) y de otros promotores de la floración como *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* (*SOC1*) (Michaels *et al.*, 2005; Yoo *et al.*, 2005). Por lo tanto, existen genes clave que integran las vías de señalización que regulan la floración, entre ellos se encuentran *FT*, *SOC1* y *LEAFY* (*LFY*). Estos genes dirigen ciertos grupos de células en los alrededores del meristema apical de tallo para diferenciarse en meristemas florales.

LFY es también un gen de identidad del meristema floral y su transcripción se encuentra regulada por giberelinas y por DL. Las giberelinas activan al promotor de *LFY* a través de elementos *cis* que son diferentes a los utilizados para responder a la extensión del día, lo cual demuestra que *LFY* integra señales ambientales y endógenas para controlar la floración (Blázquez & Weigel, 1999; Blázquez & Weigel, 2000). A diferencia de *FT*, *LFY* no es un gen regulado por *CO*; pero sí se encuentra regulado por el gen integrador *SOC1* que, junto con *AGL24*, forman un heterodímero y activan su expresión (Lee *et al.*, 2008). *LFY* codifica para un factor de transcripción y es capaz de activar genes homeóticos florales entre ellos, *AP1*, *APETALA3* (*AP3*) y *AGAMOUS* (*AG*) (Busch *et al.*, 1999; Wagner *et al.*, 1999; Lohmann *et al.*, 2001; Lamb *et al.*, 2002).

En *Arabidopsis*, una vez que la floración comienza en el meristema apical del tallo es irreversible. Esto se debe a que muchas vías convergen e involucran la expresión de genes en este lugar. Otras especies no presentan esta irreversibilidad de la floración en sus meristemas apicales del tallo y por ejemplo, se puede revertir al estado vegetativo si no se mantiene la exposición al fotoperíodo inductivo (Amasino, 2010).

CO no es el único gen que afecta la transcripción de *FT*. Dentro de la vía del fotoperíodo, *GI* regula un microRNA, *miR172* cuyos genes blanco son genes del tipo AP2: *TARGET OF EAT1* (*TOE1*),

TOE2, *TOE3*, *SCHULAFMUTZE* (*SMF*) y *SCHNARCHZAPFEN* (*SNZ*), los cuales son desregulados post transcripcionalmente. *TOE1* es un represor de la floración, por lo tanto, miR172 induce la floración disminuyendo la represión sobre *FT* mediada por *TOE1*. Los niveles de miR172 son mayores en luz azul respecto de R y son mayores en las plantas cultivadas en DL respecto de DC, por lo tanto, miR172 promueve la floración específicamente en DL. *GI* regula la abundancia de miR172 en forma independiente del reloj circadiano. Esto indica que *GI* posee un doble rol en la regulación de la floración por el fotoperíodo, regulando a *CO* y a miR172, convergiendo ambos en la inducción de la expresión de *FT* en DL (Jung *et al.*, 2007).

Vernalización

La vernalización es un proceso por el cual las plantas requieren una exposición prolongada al frío antes de florecer. La mayoría de las especies necesita la vernalización para prevenir que la floración ocurra en otoño. La duración de la exposición al frío y la temperatura adecuada para la vernalización varía entre las distintas especies. A diferencia del fotoperíodo que se percibe en las hojas, las células del meristema apical del tallo son las encargadas de sensor el frío y vernalizarse (Amasino, 2010).

En *Arabidopsis*, las accesiones de laboratorio florecen rápidamente sin la necesidad de un tratamiento de vernalización. Ellas se eligieron como modelos de laboratorio dado que al no requerir de la vernalización presentan un ciclo de vida más corto. Este requerimiento de vernalización es causado generalmente por el gen dominante *FRIGIDA* (*FRI*) (Lee *et al.*, 1993; Clarke & Dean, 1994). Estudiando las variantes naturales de *Arabidopsis*, se encontró un segundo gen, *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*), que junto con *FRI* confiere el requerimiento de la vernalización. *FLC* codifica para un factor de transcripción del tipo MADS-box y su sobreexpresión, aún en ausencia de *FRI*, evita la floración. Por lo tanto, *FLC* es un potente supresor de la floración y el bloqueo de la floración en otoño en las accesiones que requieren de la vernalización se debe mayoritariamente a que *FRI* eleva los niveles de *FLC*. Una vez que ocurre la vernalización, disminuye la expresión de *FLC* y puede llevarse a cabo la transición floral (Michaels & Amasino, 1999; Michaels *et al.*, 2004).

La represión de *FLC*, inducida por la vernalización, involucra un complejo de represión Polycomb (PRC2). Este complejo modifica las histonas de la cromatina de *FLC* y causa un aumento en el nivel de trimetilaciones del residuo lisina 27 de la histona 3. Esta modificación en la cromatina se encuentra asociada con la inactivación a largo plazo de la expresión del gen. Un gen necesario para que PRC2 dirija la represión de *FLC* es *VERNALIZATION INSENSITIVE 3* (*VIN3*), que codifica para una proteína inducida por frío que interacciona con miembros del PRC2 (Kim *et al.*, 2009).

Otros reguladores negativos de FLC son los genes de la llamada vía autónoma. Estos genes se definieron por mutaciones que retrasan el tiempo de floración independientemente de la longitud del día y se denominan: LUMINIDEPENDENS, FCA, FY, FPA, FVE y FLK.

FLC suprime la floración reprimiendo la expresión de los activadores *SOC1*, *FT* y *FD*, uniéndose directamente a los promotores de estos genes (Hepworth *et al.*, 2002; Helliwell *et al.*, 2006; Searle *et al.*, 2006).

Las proteínas con dominios del tipo MADs actúan con frecuencia como parte de complejos multiméricos. FLC interacciona con otra proteína con dominio MADs, SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP) y esta interacción es importante para la floración, ya que la pérdida de SVP, suprime parcialmente la habilidad de FLC de reprimir la floración (Li *et al.*, 2008).

Otras vías que regulan la floración

La temperatura ambiente también puede afectar la floración, regulando principalmente la expresión de *FT*. En presencia de altas temperaturas se induce la floración en forma independiente del fotoperíodo. Esta respuesta se debe a una supresión del efecto de FLC en la floración y el mayor efector de esta vía es *FLOWERING LOCUS M (FLM)*, un gen represor de la floración del tipo MADs-box similar a *FLC*. Utilizando variaciones naturales en combinación con un análisis de mutantes y con un análisis de expresión génica, Balasubramanian *et al.* (2006) demostraron que la inducción de la floración se encuentra posiblemente asociada a alteraciones en los patrones de *splicing* de ciertos transcritos, entre los cuales se incluye a *FLM*. Esta inducción por temperatura actúa “corriente arriba” del gen integrador *FT* y depende además de giberelinas (Balasubramanian *et al.*, 2006).

Por otra parte, la floración puede ser retrasada en *Arabidopsis* en plantas cultivadas a 16°C. Esta respuesta podría ser importante para retrasar la floración durante los primeros días de la primavera si las temperaturas son bajas y lograr así un éxito reproductivo. El retraso de la floración a temperaturas subóptimas depende de dos genes de la vía autónoma, *FCA* y *FVE* y se encuentra ligado a una baja expresión de *FT*. Con estos antecedentes, se propuso la existencia de una vía termosensora capaz de regular la floración en respuesta a la temperatura ambiental por un mecanismo independiente de FLC (Blázquez *et al.*, 2003). Se propuso que SVP participa también en esta vía actuando “corriente abajo” de *FCA* y *FVE*. Se observó que la expresión de *FT* y *SOC1* se encuentra elevada en mutantes *svp* particularmente a 16°C. Por lo tanto, SVP retrasa la floración a temperaturas subóptimas reprimiendo a *FT* y a *SOC1* (Lee *et al.*, 2007).

La regulación de la floración por temperatura involucra entonces factores de transcripción del tipo MADS-box, donde FLM se encuentra asociado a las respuestas a altas temperaturas y SVP regula la floración a temperaturas subóptimas. Otra proteína del tipo MADS-box es FLC, un represor de la floración que responde a la vernalización, es decir a la exposición prolongada de las plantas al frío, en este caso a muy bajas temperaturas. Todas estas respuestas se integran en uno de los genes integradores de la floración, *FT*. Por otro lado, se demostró que la temperatura ambiente regula la floración por dos vías que pueden separarse genéticamente, una de ellas que requiere a ELF3 y se encuentra asociada al fotoperíodo y la otra que requiere a TERMINAL FLOWER 1 (TFL1) y se la relaciona con la vía autónoma. ELF3 y TFL1 presentan roles importantes y complementarios en la vía de señalización por temperatura (Strasser *et al.*, 2009).

La hormona giberelina (GA) induce la floración en *Arabidopsis*, predominantemente en DC, cuando la vía del fotoperíodo no es activa. GA actúa directamente induciendo la expresión de *LFY*, a través de un dominio en su promotor (Blázquez *et al.*, 1998; Blázquez & Weigel, 2000). GA también induce la expresión de *SOC1* (Moon *et al.*, 2003) y antagoniza la represión de los genes homeóticos a través de la proteína DELLA REPRESSOR OF GA1-3 (RGA) (Yu *et al.*, 2004).

Las condiciones de estrés también afectan la floración. El ácido salicílico induce la expresión de *FT* y promueve la floración (Martínez *et al.*, 2004). Sin embargo, el ácido nítrico, producido bajo estrés biótico y abiótico, reprime a *CO* y a *GI* y eleva la expresión de *FLC*, inhibiendo la floración (He *et al.*, 2004).

Otra vía reguladora de la floración es la vía de la calidad de luz (Cerdán & Chory, 2003) que se describirá en detalle en el Capítulo 1. Dentro de esta vía se propone que los fotorreceptores, en particular phyB, pueden regular la floración directamente como parte de su respuesta de “escape al sombreado”, modulando la expresión de *FT* en forma independiente al fotoperíodo. Esta respuesta se encuentra mediada por PHYTOCHROME AND FLOWERING TIME 1 (PFT1). Mutaciones en *PFT1*, generan un retraso en el tiempo de floración y suprimen el fenotipo de floración temprana de *phyB*. Analizando la doble mutante *phyB pft1-1*, no se observó el aumento en los niveles de *FT* característico de la mutante *phyB*, por lo tanto phyB requiere a PFT1 para regular a *FT* (Cerdán & Chory, 2003).

Recientemente, se determinó que PFT1 corresponde a la subunidad 25 del complejo MEDIATOR de *Arabidopsis* (Backstrom *et al.*, 2007), con lo cual es muy probable que posea un rol importante en la regulación transcripcional de varios procesos fisiológicos. En este sentido, un grupo de investigación independiente, describió que PFT1 actúa como un regulador positivo en la vía de señalización de jasmonato regulando las defensas de la planta frente a la infección por hongos

patógenos (Kidd *et al.*, 2009). Estos investigadores encontraron que PFT1 es necesaria para la expresión de los genes de defensa dependientes de ácido jasmónico y para la resistencia a los patógenos necróticos que infectan hojas, *Alternaria brassicicola* y *Botrytis cinerea*. Por otro lado, PFT1 es necesaria para la susceptibilidad al hongo patógeno hemibiotrófico que infecta raíz, *Fusarium oxysporum*, el cual requiere que la vía de señalización por ácido jasmónico en el hospedante se encuentre intacta para producir senescencia y necrosis (Kidd *et al.*, 2009).

Regulación de la floración en otras especies

Dada la importancia de la fotomorfogénesis en las plantas, los fotorreceptores se encuentran muy bien conservados en angiospermas. En el caso de la vía fotoperiódica que regula la floración, existe una considerable conservación en cuanto a los genes involucrados, sin embargo, subsisten diferencias entre especies e incluso entre variedades.

Una especie que se está utilizando mucho como modelo de estudio es el arroz, una planta de DC. A partir de estudios genéticos y moleculares, existe evidencia de que los genes clave de la vía fotoperiódica se encuentran conservados en plantas de DC y DL. Los genes ortólogos de *CO* y *FT* en arroz se encuentran codificados por *Heading date 1 (Hd1)* (Yano *et al.*, 2000) y *Heading date 3a (Hd3a)* (Kojima *et al.*, 2002), respectivamente. Se demostró que el ortólogo de *GI* en arroz, *OsGI*, regula positivamente a *Hd1*, y que el patrón de expresión de estos genes es muy similar al observado en *Arabidopsis*. La principal diferencia entre *Arabidopsis* y arroz parece ser la interacción entre los ortólogos de *CO* y *FT*, donde *Hd1* actúa como represor de *Hd3* en condiciones no inductivas, DL para arroz (Hayama *et al.*, 2003), pero promueve la expresión de *Hd3* y la floración en DC (Yano *et al.*, 2000).

Como se mencionó anteriormente, *FT* es la señal que se mueve de las hojas al meristema apical del tallo para inducir la floración, y por esta razón se le ha asignado la función de florígeno. Los genes relacionados a *FT* se encuentran conservados en mono y dicotiledóneas, en plantas de DC, DL y DN y se ha demostrado que los ortólogos de *FT* actúan como florígeno no sólo en arroz y *Arabidopsis* sino en *Cucurbita moschata*, *Cucurbita maxima* y en tomate (Lin *et al.*, 2007; Shalit *et al.*, 2009).

La función de *Hd1* se encuentra probablemente controlada por los fitocromos, ya que una mutante no funcional para los fitocromos (*photoperiod sensitivity 5, se5*) florece temprano en todos los fotoperíodos pero retiene el patrón de expresión de *Hd1*. Por lo tanto, en presencia de luz, *Hd1* actúa como represor de *Hd3*, mientras que en oscuridad *Hd1* actúa activando a *Hd3* y promoviendo

la floración (Izawa *et al.*, 2002). A diferencia de lo que ocurre en *Arabidopsis*, la represión de estos genes mediada por los fitocromos no ocurre a través del reloj circadiano.

Se ha descrito en arroz un componente adicional de la vía del fotoperíodo que no tiene ortólogos en *Arabidopsis*, *Early heading date 1 (Ehd1)* (Doi *et al.*, 2004). Este gen codifica para un regulador de respuesta del tipo B y promueve la floración mayoritariamente en DC, en forma independiente de Hd1. Los fitocromos regulan negativamente a *Ehd1* y *Ehd1* regula positivamente a los genes relacionados a *FT*, *Hd3a* y *RFT1*.

El gen que controla la respuesta a DL en cebada es *Photoperiod H1 (Ppd-H1)*, un gen *PRR* con gran homología a *PRR7* de *Arabidopsis*, involucrado en controlar el reloj circadiano en respuesta a las señales lumínicas. Mutaciones en el gen *Ppd-H1* generan un retraso en la floración, una disminución en la inducción de los genes ortólogos de *CO* (*HcCO1* y *HvCO2*) y evitan la inducción del gen ortólogo de *FT* en cebada (*HvFT*) (Jackson, 2009).

El gen *FD* de trigo (*TaFDL2*) presenta una función homóloga a *FD* de *Arabidopsis*. *TaFDL2* interacciona con *TaFT* (el ortólogo de *FT* en trigo) y regula la expresión de *VRN1*, un gen de trigo similar a *AP1* (Li & Dubcovsky, 2008).

La cebada y el trigo son los únicos cereales en los que se ha caracterizado molecularmente la vernalización. Se han descrito variedades de invierno que poseen un fuerte requerimiento de vernalización y variedades de primavera que florecen sin vernalizar (Kim *et al.*, 2009).

Existen al menos cuatro similitudes en la vía de vernalización de *Arabidopsis* y de los cereales:

- 1) Un represor (*FLC* en *Arabidopsis*, *VRN2* en trigo) es capaz de bloquear la floración actuando negativamente sobre un gen integrador de la floración (*FT/VRN3*).
- 2) El represor (*FLC/VRN2*) es desregulado por frío, permitiendo que *FT/VRN3* se exprese.
- 3) Para que exista una desregulación de *FLC/VRN2* es necesaria la inducción por frío de *VIN3/VRN1*.
- 4) Tanto *FLC* como *VRN1* son factores de transcripción del tipo MADS-box.

En cuanto a las diferencias encontradas entre ambas especies *FLC* y *VRN2* no son proteínas relacionadas y *VRN1* juega un doble rol en cereales, siendo un represor activado por frío “corriente arriba” de *VRN2* y un promotor de la floración, similar a *AP1* (Kim *et al.*, 2009).

Existen proteínas homólogas a *PFT1* en varias especies de plantas, entre ellas, *Vitis vinifera*, *Populus trichocarpa*, *Triticum aestivum* (trigo), *Oryza sativa* (arroz), *Physicomitrella patens*, *Pisum sativum* (arveja), *Picea sitchensis*, *Ricinus communis* y *Selaginella moellendorffii*. Sin embargo, aún no

se han asignado las funciones de estas proteínas en estas especies. Recientemente se ha utilizado el gen *TaPFT1* para diseñar y optimizar una metodología que permite detectar deleciones de genes homólogos en trigo, cuyo genoma es hexaploide (Fitzgerald *et al.*, 2010). Sin embargo, aún no se han publicado resultados respecto al efecto que produce la inactivación de los ortólogos de PFT1 en trigo.

El grado de conservación de los genes de floración entre *Arabidopsis* y distintas especies de plantas demuestra la importancia de utilizar a *Arabidopsis* como un organismo modelo. Los avances realizados hasta el momento en la comprensión de cómo se lleva a cabo la regulación de la floración se encuentran sin duda ligados a este sistema. Estos conocimientos permitirán generar nuevos descubrimientos en otras especies que contribuirán al mejoramiento de cultivos de importancia agrícola.

OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO

El presente trabajo tiene como objetivo general comprender el rol de PFT1 en la regulación de la floración utilizando como modelo de estudio a *Arabidopsis thaliana*.

Los objetivos particulares son:

- 1) Separar genéticamente las señales transducidas por CO y PFT1 en la regulación de la floración.
- 2) Estudiar el rol que cumplen dos proteínas que interaccionan con PFT1 en su actividad y en la regulación de la floración.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas bacterianas

1.1. *Escherichia coli*

1.1.1. Cepas y condiciones de cultivo

Se utilizó la cepa DH5 α para realizar las construcciones genéticas en general y la cepa BL21 *codon plus* para la preparación de proteínas recombinantes.

Las cepas se cultivaron en medio líquido LB (bacto-triptona 1% p/v, extracto de levadura 0,5% p/v, NaCl 0,5% p/v) o T-Broth (bacto-triptona 1,2% p/v, extracto de levadura 2,4% p/v, glicerol 0,4% v/v, KH₂PO₄ 17 mM, K₂HPO₄ 72 mM) a 37°C con agitación a 250 r.p.m. Los cultivos sólidos se efectuaron a 37°C en medio LB suplementado con agar-agar 2% p/v. De acuerdo a la resistencia otorgada por cada plásmido, los medios se suplementaron con ampicilina 100 μ g/ml, kanamicina 50 μ g/ml o espectinomicina 100 μ g/ml.

1.1.2. Preparación de células de *E. coli* DH5 α competentes por métodos químicos

Se utilizó el protocolo descrito en (Inoue *et al.*, 1990) con algunas modificaciones. Se sembró una colonia fresca y aislada de bacterias en 100 ml de medio LB líquido y se cultivó toda la noche a 37°C con agitación (250 r.p.m.). Se utilizaron 2, 4 y 10 ml de ese cultivo para inocular 3 recipientes conteniendo 250 ml de medio SOB (bacto-triptona 2% p/v, extracto de levadura 0,5% p/v, NaCl 0,05% p/v, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM). Se cultivaron las células a 18°C y 250 r.p.m hasta que alcanzaron una D.O._{600nm} de 0,4-0,6. Se transfirieron los cultivos a un baño de hielo y se incubaron por 10 minutos. Las células se centrifugaron a 2000 g por 10 minutos a 4°C, y se resuspendieron en 80 ml de *buffer* Inoue frío (PIPES 10 mM, CaCl₂ 15 mM, KCl 250 mM, MnCl₂ 55 mM; pH 6,7 esterilizado por filtración). Las células se centrifugaron nuevamente a 2000 g por 10 minutos a 4°C y se resuspendieron en 20 ml *buffer* Inoue frío. Se agregaron 1,5 ml de DMSO, se mezcló por inversión y se incubó en hielo por 10 minutos. Las células se alicuotaron en fracciones de 200 μ l y se congelaron en nitrógeno líquido inmediatamente. Se guardaron a -80 °C hasta su utilización.

1.1.3. Preparación de células competentes de *E. coli* BL21 *codon plus*

Se sembró una colonia fresca y aislada de bacterias en 100 ml de medio LB líquido y se cultivó por aproximadamente 3 horas a 37°C con agitación (250 r.p.m.) hasta que las células alcanzaron una D.O._{600nm} de 0,4-0,6. El cultivo se transfirió a un baño de hielo y se incubó por 10 minutos. Las células se centrifugaron a 2000 g por 10 minutos a 4°C y se resuspendieron en 10 ml de CaCl₂ 0,1 M frío. Las células se centrifugaron nuevamente a 2000 g por 10 minutos a 4°C y se resuspendieron en 2 ml de CaCl₂ 0,1 M por cada 50 ml de cultivo original. Se alicuotaron en fracciones de 200 µl y se congelaron en nitrógeno líquido inmediatamente. Las células se guardaron a -80°C hasta su utilización.

1.1.4. Transformación de *E. coli* por cambio drástico de temperatura

Se agregaron 10-500 ng del ADN de interés o del producto de ligación a 200 µl de células competentes (DH5α o BL21) mantenidas en hielo y se incubaron por 10 minutos en hielo. La transformación se efectuó con un golpe de calor a 42°C durante 90 segundos. Las células transformadas se mantuvieron en hielo y se les agregaron 800 µl de medio LB para su recuperación. Se incubaron a 37°C y a 250 r.p.m por 60 minutos. Para seleccionar las células transformadas, se sembraron 100-300 µl de la suspensión bacteriana en medio LB sólido suplementado con el antibiótico correspondiente.

1.2. *Agrobacterium tumefaciens*

1.2.1. Cepas y condiciones de cultivo

Se utilizó la cepa GV3101 de *A. tumefaciens* que posee resistencia genómica a rifampicina (100 µg/ml) y resistencia plasmídica (pTiC58) a gentamicina (25 µg/ml). Las células se cultivaron en medio YEP (bacto-triptona 1% p/v, extracto de levadura 1% p/v, NaCl 0,5% p/v) suplementado con gentamicina (25 µg/ml) y el antibiótico correspondiente con la resistencia otorgada por cada plásmido a 28°C con agitación a 250 r.p.m. Los cultivos sólidos se efectuaron a 28°C en medio LB suplementado con agar-agar 2% p/v.

1.2.2. Preparación de células electro competentes de *A. tumefaciens*

Se sembró una colonia fresca y aislada de bacterias en 2 ml de medio LB líquido y se cultivó durante 6 horas a 28°C con agitación (250 r.p.m.). Se utilizaron 100 µl de este cultivo para inocular 100 ml de medio fresco LB suplementado con glucosa 0,1% p/v y gentamicina y se cultivó toda la noche 28°C hasta que las células alcanzaron una D.O._{600nm} de 1-1,5. Se transfirió el cultivo a un baño de hielo y se incubaron por 30 minutos. Las células se centrifugaron a 4000 g por 20 minutos a 4°C y se lavó el pellet con 10 ml de HEPES 1 mM (pH 7). Este procedimiento se realizó tres veces, manteniendo las células en un baño de hielo por 30 minutos durante cada centrifugación. Se realizó una nueva centrifugación y las células se lavaron con 10 ml de glicerol 10% v/v. Se centrifugó nuevamente y se resuspendió el pellet en 750 µl de glicerol 10% v/v. Las células se alicuotaron en fracciones de 45 µl y se congelaron en nitrógeno líquido inmediatamente. Se guardaron a -80°C hasta su utilización.

1.2.3. Transformación *A. tumefaciens* por electroporación

Se agregaron 100 ng del ADN de interés a 45 µl de células electro competentes mantenidas en hielo. La transformación se efectuó bajo las siguientes condiciones: capacitancia 25 µFD, resistencia 200 ohms y voltaje 2,5 kV. Las células transformadas se mantuvieron en hielo y se les agregaron 950 µl de LB para su recuperación. Se incubaron a 28°C por 120 minutos a 250 r.p.m. Para seleccionar las células transformadas, se sembraron 100-300 µl de la suspensión bacteriana en medio LB sólido suplementado con gentamicina y el antibiótico correspondiente a la resistencia conferida por el plásmido introducido.

2. Levaduras: *Saccharomyces cerevisiae*

Se utilizó la cepa Mav203 (*ProQuest System, Invitrogen*) cuyo genotipo es: *MAT α, leu2-3, 112, trp1-901, his3Δ200, ade2-101, gal4Δ, gal80Δ, SPAL 10::URA3, GAL1::lacZ, HIS3_{UAS} GAL1::his3@LYS2, can1, cyh2*.

Para el crecimiento de rutina, las células se cultivaron en medio YDPA líquido (extracto de levadura 1% p/v, bacto-triptona 2% p/v, glucosa 2% p/v, sulfato de adenina 0,01% p/v) a 28°C y 220 r.p.m. Los cultivos sólidos se efectuaron a 37°C en medio YDPA suplementado con agar-agar 2% p/v.

Para la selección de levaduras de acuerdo a la auxotrofia conferida por cada plásmido, se utilizó un medio sintético completo (SC) que contiene una base nitrogenada libre de aminoácidos

(0,17% p/v), glucosa 2% p/v como fuente de carbono y una solución *dropout* que contiene los aminoácidos esenciales y ácidos nucleicos. En esta solución se omiten histidina, leucina, triptofano y uracilo, los cuales se agregan al medio de cultivo de acuerdo a la auxotrofia correspondiente. Los cultivos sólidos se efectuaron a 28°C en medio SC suplementado con agar-agar 4% p/v. El medio se suplementó con uracilo (U) 0,32 mM, histidina (H) 1,6 mM, leucina (L) 1,6 mM o triptofano (T) 0,64 mM de acuerdo a la auxotrofia otorgada por cada construcción.

2.1. Transformación de *S. cerevisiae*

Se sembró una colonia fresca y aislada de levaduras en 5 ml de medio YDPA líquido y se cultivó toda la noche a 28°C con agitación (250 r.p.m.). Se utilizó este cultivo para inocular 50 ml de medio fresco hasta que alcance una D.O._{600nm} de 0,3. Se cultivaron las células a 28°C y 200 r.p.m hasta que alcanzaron una D.O._{600nm} de 1. Las células se centrifugaron a 3000 g durante 5 minutos y se resuspendieron en 25 ml de agua estéril. Se centrifugó nuevamente y se resuspendió en 1 ml de AcLi 100 mM. Las células se centrifugaron a máxima velocidad por 15 segundos, se removió el AcLi y se resuspendieron hasta un volumen final de 500 µl en AcLi 100 mM. La suspensión celular se vortexeó y se alicuotó en fracciones de 50 µl. Se centrifugaron las células y se eliminó el AcLi.

Se agregó a las células la siguiente mezcla de transformación:

240 µl PEG (50% p/v)

36 µl AcLi 1 M

50 µl ADN-SS (2 mg/ml) (Previamente hervido por 5 minutos)

0,1-10 µg de ADN plasmídico

Agua estéril hasta completar 360 µl finales

Se vortexeó vigorosamente hasta que el pellet se mezcló completamente (1 minuto). Se incubó a 28°C por 30 minutos. Se efectuó un golpe de calor a 42°C por 30 minutos. Se centrifugó a 8000 g por 15 segundos y se eliminó la mezcla de transformación. Se resuspendió el pellet con 1 ml de agua estéril. Se sembraron 100-300 µl de la suspensión en medio SC suplementado con los correspondientes aminoácidos o bases nitrogenadas y se incubaron a 28°C por 3-5 días para recuperar las levaduras transformadas.

2.1.1 Interacción de PFT1 (1-242) con distintas delecciones de FRF1 y FRF2

Para comprobar la interacción entre dos proteínas por medio del sistema de doble híbrido, se transformaron cepas Mav203 con los plásmidos conteniendo las versiones delecionadas de los genes *FRF1* o *FRF2* y de PFT1 (1-242), cada una de ellas fusionadas al dominio activador de Gal4 (AD) o al dominio de unión a ADN (Gal4 DBD). Las levaduras transformadas se seleccionaron en medio SC suplementado con histidina y uracilo (SC-L-T). Como control se transformaron las levaduras con los vectores vacíos y con una construcción y el otro vector vacío. Una vez que se obtuvieron las colonias se repicaron 4 de ellas a los medios selectivos: SC -L-T, SC -L-T-U-H y SC-L-T-U + 3-amino-1,2,4-triazol (3AT) 25 mM, necesario para titular el nivel basal de expresión del gen *HIS3*.

Para el ensayo de activación del gen reportero *lacZ*, las colonias se replicaron a una membrana de nitrocelulosa colocada en la superficie de una placa con medio YDPA sólido y se incubó por 24 horas a 28°C. Una vez crecidas las colonias en la membrana de nitrocelulosa, se la removió de la superficie de la placa de YDPA y se la sumergió en nitrógeno líquido por 30 segundos. La membrana congelada se colocó con las colonias hacia arriba en una placa de petri conteniendo 2 filtros de papel *Whatman* cortados del tamaño de la membrana y saturados con solución de X-gal. Se removió el exceso de la solución de X-gal y las placas se incubaron a 37°C con una cierta inclinación para que la solución de X-gal no se acumulara en la membrana. Se observó la aparición de colonias azules a partir de las 4 horas de incubación y durante 24 horas.

Solución X-gal por cada placa: 10 µl de X-gal (10 mg de X-gal disuelta en 100 µl de DMF)
60 µl de 2-mercaptoetanol
10 ml de *buffer Z*

Buffer Z: Na₂HPO₄-H₂O 16,1 g/L, NaHPO₄-H₂O 5,5 g/L, KCl 0,75 g/L, MgSO₄-7H₂O 0,246 g/L. Se ajustó a pH 7 y se esterilizó por filtración.

3. Material vegetal

Se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana*, accesión Columbia (Col). En todos los casos las semillas se esterilizaron entre 8 y 18 hs con los gases liberados al agregar 3 ml de HCl 10 N a 100 ml de hipoclorito de sodio concentrado. Una vez esterilizadas, se sembraron en placas de medio Murashige y Skoog (MS)-agar 0,8% p/v bajo condiciones de esterilidad. Para la selección de las plantas transgénicas el medio MS-agar se suplementó con sacarosa 2% p/v y kanamicina 50 µg/ml o gentamicina 100 µg/ml.

Cuando se cultivaron las líneas transgénicas que presentaban la fusión inducible por glucocorticoide (GR), el medio MS se suplementó con dexametasona (DEX) 1 μM o etanol 0,0096% v/v a modo de control.

Una vez sembradas las semillas se mantuvieron en oscuridad y a 4°C por aproximadamente 3 días. Las placas se incubaron en cuarto de cultivo o cámaras de cultivo a temperatura controlada (en general 23°C) y con fotoperíodo de día largo (DL), 16 horas de luz/ 8 horas de oscuridad, o en luz continua (LC). La intensidad de luz fue de 80 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ producida por tubos blancos fluorescentes.

Para los experimentos de floración las plántulas se transplantaron durante el quinto día de haber sido expuestas a la luz y se cultivaron en mezcla 1:1:1 de vermiculita: perlita: tierra fértil (o turba). El tiempo de floración se determinó analizando el número total de hojas (hojas de roseta + hojas caulinares) presentes en cada planta al momento de la floración.

Cuando no se efectuaron experimentos de floración o cuando las plántulas transgénicas se seleccionaron de acuerdo a su resistencia a antibióticos, el trasplante se realizó luego de 7-10 días de comenzada la exposición a la luz.

Los experimentos de floración en los que las plantas se incubaron en presencia o ausencia de DEX se realizaron en cajas magentas (*Sigma*, N° V8505) con tapas que permiten el intercambio gaseoso (*Sigma*, N° C0542) o en placas de petri de 14 cm de diámetro con MS agar +/- DEX, en donde se colocaron una a una las semillas manteniendo una cierta separación entre ellas. Se controlaron las condiciones de esterilidad y las placas se mantuvieron cerradas en cámaras de cultivo desinfectadas para evitar la contaminación. Se determinó el número total de hojas cuando ya todas las plantas de una misma placa (o magenta) habían florecido.

Para los experimentos de agroinfiltración se utilizaron plantas de *Nicotiana benthamiana* del tipo salvaje. Las semillas se esterilizaron por 3 horas y se sembraron en placas de MS-agar. Luego de 48 horas de incubación a 4°C y en oscuridad se incubaron en un cuarto de cultivo a 23-25°C en DL o LC. Las plántulas se transplantaron en macetas conteniendo vermiculita: perlita: tierra fértil (o turba) 1:1:1 y se utilizaron para los experimentos luego de 4-5 semanas de realizado el trasplante.

Medio MS:

<u>Solución B:</u>	CaCl ₂ 2H ₂ O	0,88% p/v	<u>Solución KH₂PO₄:</u>	1,7% p/v
	NH ₄ NO ₃	3,3% p/v	<u>Solución MgSO₄ 7H₂O:</u>	3,7% p/v
	KNO ₃	3,8% p/v		
<u>Solución Fe-EDTA:</u>	FeSO ₄ 7H ₂ O	0,278% p/v		
	Na ₂ EDTA	0,373% p/v	pH 4-4,8	

Solución de micronutrientes 1000X: H_3BO_3 0,62% p/v, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2,23% p/v, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,86% p/v, KI 0,083% p/v, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,025% p/v, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,0025% p/v, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,0025% p/v

Preparación de 1 litro de medio MS- agar 0,8% p/v:

- ✓ Solución B: 50 ml
- ✓ Solución Fe-EDTA: 10 ml
- ✓ Solución KH_2PO_4 : 10 ml
- ✓ Solución $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 10 ml
- ✓ Solución de micronutrientes: 1 ml

La mezcla se lleva a pH 5,5-5,8.

3.1. *Arabidopsis*

Las combinaciones de mutantes utilizadas se obtuvieron por cruzamiento bajo polinización manual. Se analizó cada una de las mutaciones en una segunda generación F2. En la tabla 1 se muestra un listado de los genes estudiados y la denominación de cada una de las mutantes, ya sean insercionales de T-DNA o mutaciones puntuales.

Gen		Mutante insercional
PHYB	AT2G18790	<i>phyB-9</i> : EMS142
PHYD	AT4G16250	<i>phyD-201</i> : SALK_027956
PHYE	AT4G18130	<i>phyE-201</i> : SALK_040131
CO	AT5G15840	<i>co-9</i> : SAIL_24_H04
FT	AT1G65480	<i>ft-10</i> : GABI_290E08
TSF	AT4G20370	<i>tsf-1</i> : SALK_087522
PFT1	AT1G25540	<i>pft1-1</i> (Cerdán and Chory, 2003)
FRF1	AT1G15530	<i>frf1-1</i> : SALK_048290
FRF2	AT4G34040	<i>frf2-1</i> : SAIL_870_B03
		<i>frf2-2</i> : GABI_587C07

Tabla 1. Listado de genes y mutantes insercionales utilizados durante este trabajo.

En la tabla 2 se muestran los oligonucleótidos iniciadores y las condiciones de PCR utilizadas para genotipificar cada una de las inserciones de T-DNA utilizadas en este trabajo y que permitieron obtener las múltiples combinaciones de mutantes que se mencionarán a lo largo de esta Tesis. La selección de las plantas mutantes *phyB-9* se realizó incubando las placas en luz roja y seleccionando y transplantando las plantas que presentaron alargamiento del hipocotilo y cotiledones cerrados en

esta condición, señales características de mutantes *phyB*. En los casos en que fue necesario la mutación *phyB-9* se confirmó utilizando la técnica de dCAPS (Neff *et al.*, 1998), empleando los siguientes oligonucleótidos iniciadores:

ID 13 *phyB-9* 1: AGCTAGTGGAAGAAGCTCGATGAGGCCTTG

ID 14 *phyB-9* 2: ACCGTCACATTTCTACTAAGTCCATGGTACT

La enzima utilizada para digerir el producto de PCR fue Styl

Oligonucleótidos iniciadores: secuencia de 5' a 3'	Mutación genotipeada	Condiciones de PCR	Producto de amplificación obtenido (pb)
ID 45 <i>phyD1</i> : GCTCGCAAAGTCGAACCCACCAAGCATATA ID 46 <i>phyD2</i> : CGCGATTCTCCACAGGGTTGATGTTGGAAT ID 77 LB1: GGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTG	<i>phyD-201</i>	Ta: 60°C por 20 segundos Extensión: 72° por 30 segundos	Homocigota: 380 Heterocigota: 380 y 453
ID 47 <i>phyE1</i> : ATATCGCACAAAGGCTGCGTCCGCATA ID 48 <i>phyE2</i> : CAGATATTCCTCAGGCTGCTCGGTTCTTGT ID 77 LB1: GGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTG	<i>phyE-201</i>	Ta: 65°C por 20 segundos Extensión: 72° por 30 segundos	Homocigota: 330 Heterocigota: 330 y 412
ID 418 <i>co-9</i> 1: GTAGCTCGTCTGTGGTACGCTGCAGTTT ID 843 <i>co-9</i> 4: GATGATGCCTCTCTATGCACAGCCTGT ID 49 LB3: TAGCATCTGAATTCATAACCAATCTCGATACAC	<i>co-9</i>	Ta: 58°C por 20 segundos Extensión: 72° por 30 segundos	Homocigota: 200 Heterocigota: 200 y 300
ID 815 <i>ft-103</i> : GATGAATCTCTGTTGTGGAATATTTGAAAACCTG ID 141 <i>ft-10</i> 2: CTAGGACTTGGAAACATCTGGATCCACCA ID 140 GABI RB2: TTTCTCCATATTGACCATCATACTCATTGC	<i>ft-10</i>	Ta: 57°C por 20 segundos Extensión: 72° por 30 segundos	Homocigota: 220 Heterocigota: 220 y 297
ID 31 <i>pft1</i> 1.4: CAGAGGAACCTGTTTCTACTGTTGAGCT ID 32 <i>pft1</i> 1.5: CGTTACTTGTTGAGCTTGGCCTGAAGGA ID 33 <i>pft1</i> 1.3: TCCCGGACATGAAGCCATTATATGTA	<i>pft1-1</i>	Ta: 50°C por 20 segundos Extensión: 72° por 40 segundos	Homocigota: 490 Heterocigota: 490 y 563
ID 721 <i>gTSF3</i> : GTGGCAGGTATATCAGTCACCAACCTGTA ID 846 <i>gTSF6</i> : TGTGTGTGCATGTTATATCATAGCTTGCA ID 77 LB1: GGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTG	<i>tsf-1</i>	Ta: 55°C por 20 segundos Extensión: 72° por 30 segundos	Homocigota: 335 Heterocigota: 220 y 335
ID 308 <i>frf1-1</i> 1: GGGTGGAGGTATGATTTTGACCCTAGTGAT ID 309 <i>frf1-1</i> 2: AATGGAAGCAAGCTCAGCAATACCACTTT ID 77 LB1: GGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTG	<i>frf1-1</i>	Ta: 58°C por 20 segundos Extensión: 72° por 30 segundos	Homocigota: 400 Heterocigota: 400 y 570
ID 65 <i>frf2-1</i> 1: 1AACGCTCCAGGACAGAAACCAGCGAA ID 66 <i>frf2-1</i> 2: ATTTCAAGTGAAGCTCCCTAATGAAGTTTACTGAGT ID 49 LB3: TAGCATCTGAATTCATAACCAATCTCGATACAC	<i>frf2-1</i>	Ta: 58°C por 20 segundos Extensión: 72° por 30 segundos	Homocigota: 250 Heterocigota: 250 y 468
ID 65 <i>frf2-1</i> 1: AACGCTCCAGGACAGAAACCAGCGAA ID 66 <i>frf2-1</i> 2: ATTTCAAGTGAAGCTCCCTAATGAAGTTTACTGAGT ID 554 GABI PCR: CCCATTTGGACGTGAATGTAGACAC	<i>frf2-2</i>	Ta: 58°C por 20 segundos Extensión: 72° por 30 segundos	Homocigota: 320 Heterocigota: 320 y 468

Tabla 2. Oligonucleótidos iniciadores utilizados para genotipificar las inserciones de T-DNA por PCR para la obtención de plantas mutantes homocigotas de cada uno de los genes y de sus combinaciones por cruzamiento y análisis de la descendencia.

4. Plásmidos y construcciones

4.1. Etiquetado de PFT1

Se obtuvieron versiones etiquetadas del clon genómico de *PFT1* en vectores binarios. Las etiquetas utilizadas fueron: TAP (*Tandem Affinity purification*), 3XHA, VP16, GR y GR-HA. Se realizaron los siguientes procedimientos para la obtención de las construcciones:

A) Se utilizaron los siguientes plásmidos contruidos previamente en el laboratorio para generar las versiones etiquetadas de PFT1

- 1) DNA 5: contiene el clon genómico de *PFT1* clonado en un vector binario pPZP 212E-9, al cual se le ha agregado manteniendo el marco de lectura un sitio EcoRI justo antes del ATG (Figura 2a). El vector pPZP212E-9 es un derivado del pPZP212 (Hajdukiewicz *et al.*, 1994) al que se le ha eliminado el sitio de restricción EcoRI.
- 2) DNA 6: contiene el clon genómico de *PFT1* clonado en un vector binario (pPZP 212E-9) en el que se le ha agregado manteniendo el marco de lectura un sitio EcoRI justo antes del codón STOP (Figura 2b)

Ambos plásmidos contienen resistencia a espectinomicina para su selección en bacterias y resistencia a kanamicina para la selección de las plantas transformadas.

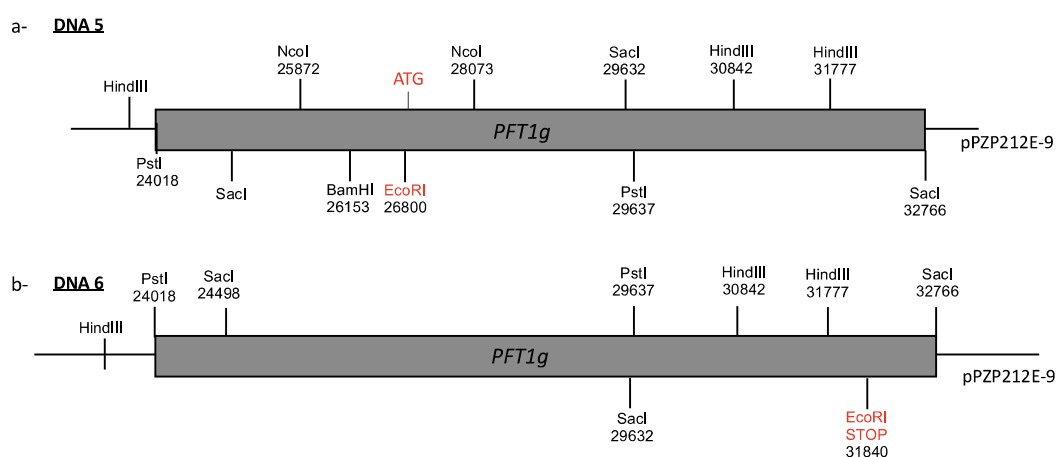


Figura 2. Esquema de los vectores utilizados para fusionar las etiquetas a *PFT1* genómico y generar las proteínas de fusión tanto al N-terminal como a C-terminal de PFT1. Numeración de acuerdo al BAC F2J7 (*accession number*: AV528-220)

B) A continuación se muestran los oligonucleótidos iniciadores utilizados para amplificar cada una de la etiquetas generadas por mutagénesis *in vitro*, para su posterior clonado en DNA 5 y DNA 6 en el sitio EcoRI, (Tabla 3). Todas las construcciones fueron confirmadas por secuenciación.

Oligonucleótido iniciador	ADN molde para la PCR	Construcción obtenida
ID 129 NTAP-E1 GTGAATTCATGGTGGTCGACAACAAGTT ID 130 NTAP-E2 GTGAATTCCTCCCTCCACTAGACAGTGCGC	Ntapi (Accession number AY436345)	Ntap:PFT1g pPZP212E-9
ID 127 CTAP-E1 GTGAATTCATGGAGAGCAGCAGATGGAA ID 128 CTAP-E2 GTGAATTCGCGGGCTTTGTTAGCAGCCG	Ctapi (Accession number AY436343)	PFT1g:Tap pPZP212E-9
ID 133 VP16-E1 GTGAATTCATGGCCCCCGACCGATGT ID 134 VP16-E2 GTGAATTCACCCACCGTACTCGTCAATTC	Plásmido conteniendo el dominio activador de VP16 cedido por el Dr. Javier Palatnik (IBR, Rosario)	PFT1g:VP16 pPZP212E-9
ID 76 3XHA-Eco-5 GTGAATTCGTCGACTACCCATACGACGT ID 78 3XHA-Eco-3 GTGAATTCCTGCATAGTCCGGGACGTC	CHF5	PFT1g:HA pPZP212E-9
ID 171 Eco-GR1 GTGAATTCATGGAAGCTCGAAAAACAAAGAAA ID 172 EcoGR2 GTGAATTCCTTTTGTGAAACAGAAGCTT	GR pBluescript (Wagner <i>et al.</i> , 2004)	GR:PFT1g pPZP212E-9 PFT1g:GR pPZP212E-9
PCR1 ID 5213HA-GR-1 TTCATCAAAAAGG GGAGTCGACTACCCATACGAC ID 783XHA-Eco-3 GTGAATTCCTGCATAGTCCGGGACGTC	PFT1g:HA pPZP212E-9	
PCR2 ID 171 Eco-GR1 GTGAATTCATGGAAGCTCGAAAAACAAAGAAA ID 522 3HAGR-2 GGTAGTCGACTCCTTTTGTGAAACAGAAG	PFT1g:GR pPZP212E-9	PFT1g:GR-HA pPZP212E-9
PCR3 ID 171 Eco-GR1 GTGAATTCATGGAAGCTCGAAAAACAAAGAAA ID 783XHA-Eco-3 GTGAATTCCTGCATAGTCCGGGACGTC	Producto de PCR 1 + producto de PCR2	

Tabla 3. Oligonucleótidos iniciadores utilizados para amplificar las etiquetas que luego fueron clonadas en DNA 5 o DNA 6. Incluyen sitio EcoRI (subrayado) para clonado.

4.2. Construcción 35S::CO:HA

Se amplificó el ADNc más largo de CO con los siguientes oligonucleótidos iniciadores utilizando como molde el ADNc de CO obtenido en el ABRC (*Arabidopsis Biological Resource Center*), ADNc C105432 clonado en pUNI 51

ID 80 Constans 2: CGGGATCCTTCTTTTCAGATACCAGCTC	Amplifica 52pb “corriente arriba” del ATG, incluye sitio BamHI (subrayado) para clonado
ID 79 Constans 1: GGCCTCGACGAATGAAGGAACAATCCCAT	Incluye sitio Sall (subrayado) para clonado, excluye el codón Stop

El ADNc obtenido (1171 pb) se clonó en los sitios BamHI y Sall del vector binario CHF5 que contiene un promotor constitutivo 35S y el terminador de la subunidad menor de la rubisco. Tiene resistencia a espectinomicina para su selección en bacterias y resistencia al herbicida DL-fosfinotripcina (*Duchefa*, N° P0159) para seleccionar las plantas transformadas.

El vector contiene a partir de su sitio Sall la etiqueta HA, que deriva de los aminoácidos 98 a 106 de la molécula de hemaglutinina del virus de influenza humana. Esta etiqueta consiste de tres epitopes separados por aminoácidos espaciadores y un codón stop. Se obtuvo la construcción 35S::CO:HA, la cual fue confirmada por secuenciación.

4.3. Construcción 35S::FRF1

Esta construcción se obtuvo en nuestro laboratorio antes del comienzo de esta Tesis y consiste en el ADNc de *FRF1* con su región 5' no codificante clonada en el vector binario CHF3 en el sitio SacI. Este vector deriva del pZP212 pero contiene un promotor constitutivo 35S y un terminador. Posee resistencia a espectinomicina para su selección en bacterias y resistencia a kanamicina para la selección de las plantas transformadas.

Para su construcción se amplificó la región 5' no codificante y 633 pb desde el ATG con los siguientes oligonucleótidos iniciadores, utilizando como molde un ADNc de *FRF1* obtenido en el ABRC:

ID 10 At2g15530-1	<u>GGCGTCGAC GAGCTCGAAAAAGAGACTAA</u>	Incluye sitios Sall y SacI (subrayados) para clonado
ID 12 At2g15530-3	CACCAGAAAAATAATGACTAGGG <u>GATCCTT</u>	Alínea en el sitio BamHI (subrayado) del ADNc de <i>FRF1</i>

El ADNc obtenido (914 pb) se clonó en los sitios Sall y BamHI del vector pBluescript II SK (+) (pBS, *Accession number* X52329). Luego se subclonó en este vector un fragmento del FRF1Δ153 como BamHI–NotI, obtenido de uno de los clones del doble híbrido (pEXPad FRF1Δ153). El ADNc completo de *FRF1* se subclonó en el vector binario CHF3 en el sitio SacI, obteniéndose la construcción 35S::FRF1, la cual fue confirmada por secuenciación.

El vector binario CHF3 contiene un promotor constitutivo 35S y el terminador de la subunidad menor de la rubisco. Tiene resistencia a espectinomicina para su selección en bacterias y resistencia a kanamicina para seleccionar las plantas transformadas

4.4. Construcción 35S::FRF2

Se obtuvo en el ABRC el ADNc de *FRF2* (ADNc S67415 clonado en pUNI51). Se subclonó en los sitios EcoRI y Sall del vector pBS y se confirmó por secuenciación. Luego se subclonó el fragmento en el vector CHF3 en los sitios XmaI y Sall, obteniéndose la construcción 35S::FRF2.

4.5 Construcción 35S::FRF2 AA

Se realizó esta construcción para mutageneizar por PCR los aminoácidos de unión al ligando metálico en las posiciones 4 y 5 del dominio RING H2 finger de la proteína FRF2, cambiando las histidinas por alaninas.

Para ello se realizaron las siguientes amplificaciones:

PCR1

ID 1509 Ring BamHI	CTCCCTTTGTTCTCGAGCAGGATCGAGTT
ID 1508 Ring mut A antisense	ACGCAGGCAGTTGCAAATTCAGCACCATC

ADN molde: 35S::FRF2

PCR2

ID 1507 Ring mut A sense	GATGTGGTGCTGAATTTGCAACTGCCTGCG T
ID 342 CHF3 ter	CAGTAGGATTCTGGTGTGT

ADN molde: 35S::FRF2

PCR3

ID 1509 RING BamHI	CTCCCTTTGTTCTCGAGCAGGATCGAGTT
ID 342 CHF3 ter	CAGTAGGATTCTGGTGTGT

ADN molde: mezcla de productos de PCR1 y PCR2

El fragmento obtenido (1367pb) se subclonó en los sitios BamHI y Sall de 35S::FRF2 reemplazando la región 3' que contiene la secuencia que codifica para el RING H2 finger por el RING mutageneizado. Se obtuvo la construcción 35S::FRF2 AA la cual fue confirmada por secuenciación.

4.6 Construcciones *GST:FRF1Δ337* y *GST:FRF2Δ315*

A partir de los clones obtenidos en el *screening* de doble híbrido realizado en *S.cerevisiae*, pEXPAD FRF1Δ337 y pEXPAD FRF2Δ315, se subclonaron los fragmentos *FRF1Δ337* y *FRF2Δ315* como fragmentos Sall+NotI en el vector pGEX-4T-2 (*GE Healthcare*, Accession number U13854). Estas construcciones se confirmaron por secuenciación y permitieron tener los fragmentos *FRF1Δ337* y *FRF2Δ315* fusionados a la enzima glutatión S transferasa de *Schistosoma japonicum* (GST). De este modo, se pueden obtener las proteínas recombinantes GST:FRF1Δ337 y GST:FRF2Δ315 en *E.coli* y purificarse por cromatografía de afinidad utilizando una resina de glutatión agarosa.

4.7 Construcciones *MBP:FRF1Δ337* y *MBP:FRF2Δ315*

Se amplificaron por PCR los fragmentos *FRF1Δ337* y *FRF2Δ315* utilizando como molde para la reacción las construcciones realizadas en el plásmido pGEX-4T-2 mencionadas anteriormente en la sección 4.6. Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos iniciadores:

- | | | |
|----|---|--|
| 1) | ID 833 5-FRF1Δ337 Sall 2 GCGTCGACACTCCAGATGTGAGATCATCAG | Incluye sitio Sall
(subrayado) para
clonado |
| | ID 788 3-FRF1 HindIII GCAAGCTTCTACGGCGTCTTAATGCTTCGGT | Incluye sitio HindIII
(subrayado) para
clonado |

El fragmento obtenido (1125 pb) se clonó en los sitios Sall y HindIII del vector pMal c2 (*New England Biolabs*), que posee resistencia a ampicilina para su selección en bacterias. Se obtuvo la construcción *MBP:FRF1Δ337* que fue confirmada por secuenciación. Las fusiones a MBP permiten producir proteínas de fusión en forma recombinante en *E.coli* que pueden purificarse por cromatografía de afinidad utilizando una resina de amilosa (*New England Biolabs*, E8021S).

- | | | |
|----|---|--|
| 2) | ID 779 5-FRF2Δ315 Eco CGTGGATCCCCAGGAATTCACCGGT | Incluye sitio EcoRI
(subrayado) para
clonado |
|----|---|--|

ID 780 3-FRF2XbaI GCGTCTAGATTTATGTCGATAAAGCCACAGTCTT Incluye sitio XbaI (subrayado) para clonado

El fragmento obtenido (1111 pb) se clonó en los sitios EcoRI y XbaI del vector pMal 2c, obteniéndose la construcción *MBP:FRF2*Δ315 que fue confirmada por secuenciación.

4.8 Construcciones *MBP:FRF1* y *MBP:FRF2*

Se amplificaron por PCR los ADNc de *FRF1* y *FRF2* sin su región 5' y 3' no codificante utilizando como molde de la reacción las construcciones *35S::FRF1* y *35S::FRF2*, respectivamente. Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos iniciadores:

1) ID 908 5-FRF1 Sall GCGTCGACATGAAATCCAATGCAAGGGCCA Incluye sitio Sall (subrayado) para clonado

ID 788 3-FRF1 HindIII GCAAGCTTCTACGGCGTCTTTAATGCTTCGGT Incluye sitio HindIII (subrayado) para clonado

El fragmento obtenido (2115 pb) se clonó en los sitios Sall y HindIII del vector pMal c2, obteniéndose la construcción *MBP:FRF1* que fue confirmada por secuenciación.

2) ID 556 5-FRF2 SacI EcoRI GCGAGCTCGAATTCATGCAAGGTCCACGAAGCA Incluye sitio EcoRI (subrayado) para clonado

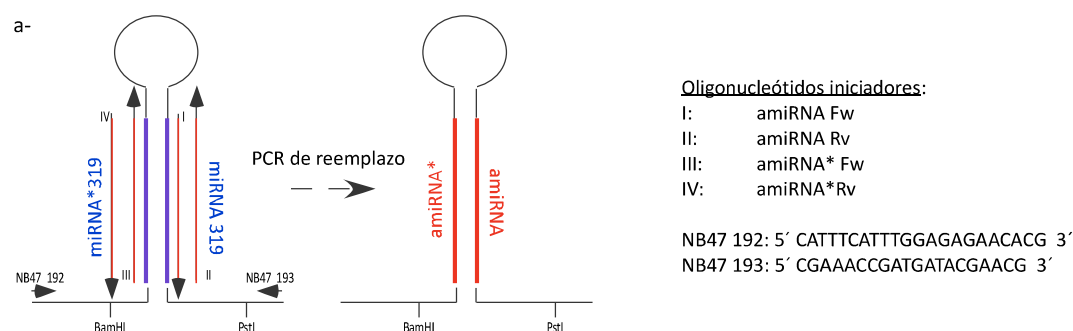
ID 909 3-34040 Sall GCCGTCGACTTATGTCGATAAAGCCACAGTCTT Incluye sitio Sall (subrayado) para clonado

El fragmento obtenido (2024 pb) se clonó en los sitios EcoRII y Sall del vector pMal 2c, obteniéndose la construcción *MBP:FRF2* que fue confirmada por secuenciación.

4.9 Diseño y obtención de microRNAs artificiales para silenciar los genes *FRF1*, *FRF2*, *FRL1* y *FRL2*

Se utilizó el sitio web *MicroRNA Designer* (WMD2, <http://wmd2.weigelworld.org/cgi-bin/mirnatools.pl>) para el diseño de los amiRNAs y de los oligonucleótidos iniciadores utilizados en la PCR constructiva de reemplazo, de acuerdo a las indicaciones provistas por el sitio (Ossowski *et al.*, 2008).

El procedimiento de clonado consiste en reemplazar el precursor miRNA 319 (clonado en el vector CHF3 denominado NB47) por el amiRNA diseñado a través de solapamiento por PCR. Para ello se realizaron 4 PCRs diferentes por cada amiRNA diseñado de acuerdo a lo mostrado en la Figura 3.



b-

Reacción de PCR	Oligonucleótido iniciador Fw	Oligonucleótido iniciador Rv	ADN Molde	Tamaño del producto amplificado (pb)
A	NB47 192 (ID 716)	IV	NB47	89
B	II	III	NB47	174
C	I	NB47 193 (ID 717)	NB47	71
D	NB47 192	NB47 193	Producto de A + producto de B + producto de C	286

Figura 3. Reemplazo por PCR constructiva del miRNA 319 para la obtención de amiRNAs específicos.

a- Esquema de la estructura del precursor miRNA319 representado en su forma de horquilla en el que se muestran donde se encuentran ubicados los oligonucleótidos iniciadores que se utilizan para realizar las PCRs constructivas y de reemplazo. Se indica la denominación general de los oligonucleótidos utilizados y la secuencia de NB47 192 y de NB47 193 que se utilizaron para todas las PCRs de reemplazo realizadas, ya que alinean en el vector NB47.

b- Se muestra el esquema general para cada una de las PCRs realizadas con los oligonucleótidos necesarios y el tamaño del producto amplificado.

Los fragmentos obtenidos luego de la PCR D, se clonaron en los sitios BamHI y PstI del vector pUC19 (*Accession number* L09137) y se secuenciaron. Una vez confirmada la secuencia, los fragmentos se subclonaron en el vector binario CHF3, obteniéndose las construcciones amiRNax CHF3, donde x corresponde al amiRNA V, A, B, C, D o E. Cada uno de los fragmentos se subclonó también en el vector binario CHF1, que difiere del CHF3 sólo en que confiere resistencia a gentamicina para la selección de las plantas transformadas.

En la siguiente tabla (Tabla 4) se muestran los oligonucleótidos iniciadores utilizados para generar los amiRNAs V, A, E, C, D y E.

Oligonucleótidos iniciadores para PCRs constructivas de reemplazo		Denominación del amiRNA	Genes silenciados por estos amiRNA
ID 692 I amiR V	gaTAAGTTGGTCGTCCTGAAGCTtctctcttttgattcc	amiRNA V	FRF1 y FRF2
ID 693 II amiR V	aAGCTTCAGGACGACCAACTTAtcaaagagaatcaatga		
ID 694 III amiR* V	gaGATTTCAGGACGAGCAACTTTtcacaggtcgtgatatg		
ID 695 IV amiR* V	gaAAAGTTGCTCGTCCTGAATCTtctacatatattcct		
ID 696 I amiR A	gaTACTAGGAAATAAAGACCACCTctctcttttgattcc	amiRNA A	
ID 697 II amiR A	gaGGTGGTCTTTATTTCTAGTAtcaaagagaatcaatga		
ID 698 III amiR* A	gaGGCGGTCTTTATTACCTAGTTtcacaggtcgtgatatg		
ID 699 IV amiR*A	gaAACTAGGTAATAAAGACCGCCTctacatatattcct		
ID 700 I amiR B	gaTCTTAAGCTACTTGAAGCATGtctctcttttgattcc	amiRNA B	
ID 701 II amiR B	aCATGCTTCAAGTAGCTTAAGATcaaagagaatcaatga		
ID 702 III amiR* B	gaCACGCTTCAAGTACCTTAAGTtcacaggtcgtgatatg		
ID 703 IV amiR* B	gaACTTAAGGTACTTGAAGCGTGtctacatatattcct		
ID 704 I amiR C	gaTGATTTAGAAGCATAACGTACTctctcttttgattcc	amiRNA C	
ID 705 II amiR C	gaGTACGTTATGCTTCTAAATCAtcaaagagaatcaatga		
ID 706 III amiR* C	gaGTCCGTTATGCTTGTAATCTtcacaggtcgtgatatg		
ID 707 IV amiR* C	gaAGATTTACAAGCATAACGGACTctacatatattcct		
ID 708 I amiR D	gaTTTTGCAGGATGCACGACGTAtctctcttttgattcc	amiRNA D	FRL1 y FRL2
ID 709 II amiR D	gaTACGTCGTGCATCCTGCAAAAtcaaagagaatcaatga		
ID 710 III amiR*D	gaTAAGTCGTGCATCGTGCAAAAtcacaggtcgtgatatg		
ID 711 IV amiR*D	gaATTTGCACGATGCACGACTTAtctacatatattcct		
ID 712 I amiR E	gaTACATCAAGTCGCATGTCTGTtctctcttttgattcc	amiRNA E	
ID 713 II amiR E	gaACAGACATGCGACTTGATGTAtcaaagagaatcaatga		
ID 714 III amiR* E	gaACCGACATGCGACATGATGTTtcacaggtcgtgatatg		
ID 715 IV amiR*E	gaAACATCATGTCGCATGTCGGTtctacatatattcct		

Tabla 4. Oligonucleótidos iniciadores utilizados para la obtención de los amiRNAs. En mayúscula se muestra la secuencia correspondiente a cada amiRNA.

4.10 Fusión de microRNAs artificiales.

Una vez clonados cada uno de los amiRNAs en los vectores CHF3 y/o CHF1, se utilizaron los siguientes oligonucleótidos para realizar fusiones de dos amiRNAs por PCR constructiva y obtener dos amiRNAs fusionados en *tándem*:

PCR1:

ID 776 amifusion Fw TTGTATTCCTGC**GG** **GG**CTCCTAGGAATATA

ID 313 1233 Rv AGCGGATAACAATTTACACAGGA Alínea en el vector pUC19

ADN molde: amiRNA C y amiRNA E

PCR2:

ID 777 amifusion Rev TATATTCCTAGGA**AGCC** **CC**GCAGGGAATACAA

ID 312 1224 Fw CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC Alínea en el vector pUC19

ADN molde: amiRNA V y amiRNA A

En rojo se muestran los cambios de base realizados para mutageneizar los sitios internos de BamHI y PstI

Se mezclaron los productos obtenidos en PCR1 y PCR2 y se realizó una nueva amplificación con los oligonucleótidos iniciadores 1224 y 1233. Los fragmentos obtenidos se clonaron en los sitios BamHI y PstI del vector pUC 19 y se secuenciaron. Una vez confirmada la secuencia los fragmentos se subclonaron en el vector binario CHF3 y en el vector CHF1, obteniéndose las construcciones VC CHF3, VC CHF1, AE CHF3 y AE CHF1.

4.11 Análisis de secuencia

Los análisis y la comparación de las secuencias obtenidas se realizaron utilizando el sitio web BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*): <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

5. Metodologías generales para la obtención de las construcciones

5.1 Purificación de ADN plasmídico de *E.coli*

5.1.1 Método de lisis alcalina

Se sembró una colonia bacteriana en 5-10 ml de LB suplementado con el antibiótico correspondiente y se cultivó toda la noche con agitación (200 r.p.m) a 37°C. Las células se cosecharon por centrifugación a máxima velocidad por 1 minuto y se resuspendieron en 100 µl de solución I (Tris-HCl 50 mM pH8, EDTA 20 mM, NaCl 50 mM). Se agregaron 2 µl de ribonucleasa A (100 µl/ml) y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Se agregaron 200 µl de solución II (NaOH 0,2 N, SDS 1% p/v) y se mezcló por inversión. Se agregaron 150 µl de solución III (acetato de

postasio 3 M, ácido acético glacial 11,5% v/v), se mezcló por inversión y se incubó a -20°C por 10 minutos. Se centrifugó a 13000 g durante 30 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante en un nuevo tubo y se agregó 1 ml de etanol absoluto frío. Se mezcló por inversión y se incubó a -20°C por 10 minutos. Se centrifugó a 13000 g durante 15 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 500 µl de etanol 70%, dos veces. Se secó y se resuspendió en 50 µl de *buffer* TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8) o agua bidestilada.

5.1.2 Purificación mediante matrices de sílica comerciales

Se sembró una colonia bacteriana en 5-10 ml de LB suplementado con el antibiótico correspondiente y se cultivó toda la noche con agitación (200 r.p.m) a 37°C. Las células se cosecharon por centrifugación a máxima velocidad por 1 minuto y se resuspendieron en 250 µl de solución P1 (Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM). Se agregaron 2 µl de ribonucleasa A (100 µl/ml) y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Se agregaron 250 µl de solución II (NaOH 0,2 N, SDS 1% p/v), se mezcló por inversión y se agregaron 300 µl de solución N3 (cloruro de guanidinio 4 M, acetato de potasio 0,5 M, pH 4,2) mezclándose nuevamente por inversión. Se incubó en hielo 5 minutos y se centrifugó a 13000 g durante 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se colocó dentro de la columna que contiene la matriz de sílica (*Epoch Life Science*, Nº 1920-250). Se centrifugó a 5000 g por 1 minuto y se lavó con 400 µl de *buffer* PB *miniprep* (cloruro de guanidinio 5 M, Tris-HCl 20 mM pH 6,6, etanol 38% v/v). Se centrifugó a 5000 g por 1 minuto y se lavó con 400 µl de *buffer* PE (NaCl 20 mM, Tris-HCl 2 mM pH 7,5, etanol 80% v/v). Se centrifugó a 5000 g por 1 minuto y se realizó una nueva centrifugación a máxima velocidad para remover el etanol. Se secó y se agregaron 30 µl de *buffer* EB (Tris-HCl 10 mM pH 8,5). Se centrifugó a máxima velocidad y se repitió el procedimiento de elución, obteniéndose el ADN en un volumen final de 60 µl.

5.2 Preparación de Insertos de ADN

5.2.1 Amplificación de insertos por PCR

La amplificación de fragmentos de ADN que luego se utilizaron para clonado se realizó utilizando las enzimas *Pfx* ADN polimerasa (*Invitrogen*) o *Pfu* ADN polimerasa, de acuerdo al protocolo sugerido y con los *buffers* suministrados. En cada reacción se utilizaron 50 ng de ADN como molde y 1 µM de cada oligonucleótido iniciador. El ciclado se realizó de la siguiente manera:

Desnaturalización inicial:	94°C	5 minutos
Ciclado (35 a 40 ciclos)	94°C	20 segundos
	Ta	30 segundos
	68°C	30 segundos cada 500 pb de fragmento amplificado
Extensión final	68°C	10 minutos

Para el cálculo de la temperatura de *annealing* (Ta), en todos los casos se calculó la temperatura de *melting* (Tm) de cada oligonucleótido iniciador utilizando los sitios Web http://proligo2.proligo.com/Calculation/calculation_frame_new.html y <http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer> y se utilizó una Ta 5°C menor que la del oligonucleótido con menor Tm.

Los productos de las reacciones de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa 1-2% p/v dependiendo del tamaño del producto esperado en *buffer* TBE 0,5x o TAE 1x, conteniendo 1 µg/ml de bromuro de etidio para su visualización por exposición a luz UV en un transiluminador.

TBE 5x: Tris base 5,4% p/v, ácido bórico 2,75% p/v, Na₂EDTA 0,372% p/v

TAE 50x: Tris base 24,6% p/v, ácido acético glacial 5,71% v/v, Na₂EDTA 1,86% p/v

5.2.2 Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa

Los productos de PCR de interés se identificaron por electroforesis en geles de agarosa en *buffer* TAE 1x. Se cortaron del gel las bandas correspondientes a los productos de interés y se purificaron utilizando matrices de sílica comerciales (*Epoch Life Science*, Nº 1920-250). Para ello, se determinó el peso del taco de agarosa y se lo solubilizó con *buffer* QG (3000 µl/g de agarosa) incubando a 55°C hasta que se disolvió completamente. La solución se colocó dentro de la columna que contiene la matriz de sílica y se centrifugó a 5000 g por 1 minuto para adherir el ADN a la sílica. Se lavó con 400 µl de *buffer* PB *miniprep* y se centrifugó a 5000 g por 1 minuto. Se lavó con 400 µl de *buffer* PE y se centrifugó a 5000 g por 1 minuto. Se realizó una nueva centrifugación a máxima velocidad para remover el etanol, se secó y se agregaron 30 µl de *buffer* EB. Se centrifugó a máxima velocidad y se repitió el procedimiento de elución, obteniéndose el ADN en un volumen final de 60 µl.

Se comprobó la eficiencia de la purificación por electroforesis en gel de agarosa.

5.2.3 Digestión con enzimas de restricción

Las digestiones de plásmidos e insertos para clonado y los mapeos de restricción se realizaron con enzimas comerciales de acuerdo con las condiciones especificadas por la empresa proveedora (*New England Biolabs*). Los cortes que implicaron el uso de más de una enzima de restricción y cuyas condiciones de incubación eran incompatibles, se realizaron en forma secuencial, purificando el ADN por precipitación con acetato de sodio y etanol (Sambrook *et al.*, 1989) luego de cada reacción. Las reacciones se incubaron entre 6 y 16 horas a la temperatura correspondiente para cada enzima y se utilizaron de 3 a 5 unidades de enzima por μg de ADN.

Una vez comprobada la eficiencia de la digestión por electroforesis en gel de agarosa, se precipitó y purificó el ADN. Para ello se completó el volumen final de cada digestión con *buffer* TE hasta alcanzar los 100 μl . Se agregó un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se vortexó y se centrifugó a 13000 g durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa que contiene el ADN y se le agregó acetato de sodio a una concentración final de 0,3 M y 3,5 volúmenes de etanol absoluto frío. Se incubó a -80°C por 30 minutos y se centrifugó a 13000 g durante 30 minutos a 4°C . El precipitado se lavó 2 veces con 400 μl de etanol 70% v/v y se dejó secar a temperatura ambiente. El ADN se resuspendió en 10 μl de *buffer* TE o agua bidestilada. Se comprobó la eficiencia de la precipitación por electroforesis en gel de agarosa.

5.3 Reacciones de ligación de ADN

Las reacciones de ligación de plásmidos e insertos se realizaron con la enzima T4 ADN ligasa con el *buffer* suministrado y de acuerdo con las condiciones especificadas por la empresa proveedora (*New England Biolabs*, Nº M0202S). Se utilizaron 25-50 ng de plásmido, relaciones molares de inserto:plásmido 3:1, un volumen final de 10 μl y 10 unidades de enzima por reacción. Las reacciones se incubaron a $16-18^{\circ}\text{C}$ durante toda la noche.

El producto de ligación se utilizó para transformar células *E.Coli* DH5 α competentes y la suspensión bacteriana se sembró en placas de medio LB sólido suplementado con el antibiótico correspondiente. Cuando se utilizaron los plásmidos pBS y pUC19 se seleccionaron las colonias blancas que contenían el inserto de interés. Para ello, antes de sembrar las bacterias se le agregaron al medio LB sólido conteniendo el antibiótico, 40 μl de X-gal (20 mg/ml en DMF) como sustrato y 60 μl de IPTG (60 mM) como inductor.

6. Caracterización molecular de genes

6.1 Extracción de ADN genómico

Cada muestra de hoja de *Arabidopsis thaliana* se tomó utilizando un tubo *Eppendorf* y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido. La muestra se maceró utilizando émbolos apropiados para estos tubos (*Kimble/Kontes*, Nº KT749521-1590) que se encontraban previamente esterilizados por lavados con HCl 0,1% v/v y autoclavados. Se agregaron 200 µl de solución *Sucrose prep* (NaCl 300 mM, sacarosa 300 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,5) (Berendzen K *et al.*, 2005) y se resuspendió con el émbolo. Las muestras se hirvieron por 10 minutos y se centrifugaron a 8000 g durante 5 minutos.

Se utilizaron 2 µl de cada una de estas preparaciones para las reacciones de PCR.

6.2 Genotipificación de mutantes por PCR

La genotipificación de las mutantes insercionales de T-DNA (Tabla 1) se realizó utilizando la enzima *Taq* ADN polimerasa, con el *buffer* suministrado (Composición 10x: Tris-HCl 100 mM pH 9, KCl 500 mM, tritón x-100 1% v/v). Cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl con 2 µl de ADN como molde, *buffer* de reacción 1x, 1 µM de cada oligonucleótido iniciador (Tabla 2), MgCl₂ 1,5 mM y 200 µM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP). El ciclado se realizó de la misma forma que para la amplificación de insertos por PCR (sección 5.2.1) pero utilizando una temperatura de extensión de 72°C. Se utilizaron las Ta mencionadas en la Tabla 2 y los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa 2%.

6.3 Extracción de ARN total

Se extrajo ARN total de plántulas de *Arabidopsis* cultivadas en LC a 23°C durante 8 días. Se tomaron las muestras pesando 100 mg de material vegetal y congelándolo inmediatamente en nitrógeno líquido. Se maceró el tejido congelado en presencia de nitrógeno líquido utilizando morteros y el ARN se purificó utilizando el sistema *Plant total RNA Mini Kit* (*Real Biotech Corporation*, RBC Nº YRP50) siguiendo el protocolo suministrado. Se cuantificó el ARN total utilizando el equipo *Nanodrop* y se utilizó 1 µg de ARN total para su visualización por electroforesis en gel de agarosa 1,5% en *buffer* TBE 0.5x. A la muestra a sembrar se le agregaron 10 µl de *buffer* TE y 5 µl de *buffer* de siembra (glicerol 50% v/v, azul de bromofenol 0,001% p/v). La muestra se calentó a 65°C por 5 minutos y se sembró en el gel. Se visualizó el estado del ARN en un transiluminador UV.

Este mismo procedimiento se realizó con las muestras obtenidas de distintos tejidos de plantas Col cultivadas en DL a 23°C por 6 semanas.

Para la medición de la expresión de genes en las líneas transgénicas *pft1-1 PFT1g:GR*, se cultivaron las plántulas en LC a 23°C durante 8 días. Durante el día 8 las plántulas se rociaron con solución de DEX 1 µM o con una solución de etanol 0,0096% v/v cada una hora y se colectaron las muestras para la extracción de ARN total luego de 3 horas de comenzada la inducción.

En todos los casos se procesaron al menos 3 réplicas biológicas de cada muestra.

6.3.1 Transcripción reversa

Se utilizó 1 µg de cada uno de los ARNs purificados como molde para la reacción de síntesis de ADNc, utilizando la enzima M-MLV transcriptasa reversa (*Invitrogen*, N° 28025-013) y siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante. La reacción se incubó a 37°C durante 2 horas, se inactivó la enzima calentando a 75°C por 15 minutos y se agregaron 90 µl de H₂O MiliQ estéril, de modo tal de obtener cada ADNc en 100 µl de volumen final. En el caso de las muestras que se utilizaron para medir la expresión de *FT*, *CO* y *TSF*, al ADNc obtenido se le agregaron 20 µl de H₂O MiliQ, obteniéndose este ADNc en 30 µl de volumen final.

6.3.2 Reacciones de PCR en tiempo real

Se utilizaron 3 µl de cada ADNc (Sección 6.3.1) para llevar a cabo reacciones de PCR en tiempo real utilizando el equipo *Mx3005p Stratagene*. Las concentraciones finales de cada reactivo por reacción (25 µl) fueron: *buffer* de reacción (*Invitrogen*) 1x, MgCl₂ 3 mM, dNTPs 400 µM de cada uno, oligonucleótidos iniciadores 0,1 µM, *Silver green* 10x 0,76 µl, *Rox* 5x 0,3 µl (*Invitrogen*, N° 12223-012), *Taq platinum ADN polimerasa Brasil* (*Invitrogen*, N° 10966030) 1 unidad. Las condiciones de ciclado y los oligonucleótidos iniciadores para el estudio de la expresión de cada gen se muestran en la Tabla 5.

Para el análisis de los resultados se utilizó el método del ΔC_t . Para ello se realizó para cada gen una curva de calibración de C_t en función del Log (10) del N° de copias, de la cual se obtuvo la eficiencia (E) de la reacción que se utilizó en la siguiente fórmula:

Expresión del gen de interés relativo a la expresión del gen de referencia = $E_{(ref)}^{C_t(ref)} / E_{(gen)}^{C_t(gen)}$

En todos los casos se analizaron al menos tres réplicas biológicas y se realizaron tres réplicas técnicas de cada una de ellas.

6.3.3 Reacciones de PCR de punto final

Para las reacciones de PCR de punto final se utilizaron 3 µl de ADNc. Las condiciones de PCR fueron iguales a las realizadas para la genotipificación de mutantes (Sección 6.2), utilizando los oligonucleótidos iniciadores y las condiciones de PCR que se muestran en la Tabla 5. El número total de ciclos para cada gen varió según la siguiente lista:

<i>UBQ10</i>	30 ciclos
<i>FRF1</i>	35 ciclos
<i>FRF2</i>	40 ciclos
<i>FRL1</i>	35 ciclos
<i>FRL2</i>	40 ciclos

Los productos obtenidos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 2% en buffer TBE 0,5x

Oligonucleótidos iniciadores: secuencia de 5' a 3'	Expresión del gen	Condiciones de PCR en tiempo real	Condiciones de PCR de punto final
ID 529 UBQ10 1: TCAATTCTCTACCGTGATCAAGATGCA ID 530 UBQ10 2:GGTGTGAGAACTCTCCACTCAAGAGTA	UBQ10	Ta: 55°C por 40 segundos Extensión: 72° por 35 segundos	Ta: 55°C por 20 segundos Extensión: 72° por 30 segundos
ID 1037 PP2A 1: GTCGACCAAGCGGTTGTGGAGA ID 1038 PP2A 2:ACGCCAACGAACAAATCACAGA	PP2A	Ta: 55°C por 40 segundos Extensión: 72° por 35 segundos	
ID 1622 FT-F W: CTGGAACAACCTTTGGCAAT ID 1623 FT-R W: TACACTGTTTGCCTGCCAAG	FT	Ta: 50°C por 40 segundos Extensión: 72° por 35 segundos	
ID 1126 CO-RT1: CAATGGTTCCATTAACATAACGCATA ID 1127 CO-RT2: CTTATCTCTGCATATGCCTCTCGAA	CO	Ta: 55°C por 40 segundos Extensión: 72° por 35 segundos	
ID 167 FRF1 RT1: GGAAGGAATCAAATCATTCTGAGATACGT ID 168 FRF1 RT2: TCACCTTCTACATACTTCTCTGACAAATG	FRF1	Ta: 55°C por 40 segundos Extensión: 72° por 35 segundos	Ta: 55°C por 20 segundos Extensión: 72° por 30 segundos
ID 65 frf2-1 1: AACGCTCCAGGACAGAAACCAGCGAA ID 169 FRF2 RT 2: ACCCATCTGATTGGTATTTTGCAGATATT	FRF2	Ta: 55°C por 40 segundos Extensión: 72° por 35 segundos	Ta: 55°C por 20 segundos Extensión: 72° por 30 segundos
ID 1129 FRL1 RT1: GTTGACAACATGACATATGAGGAGCTGTT ID 1130 FRL1 RT2: GCATTGACTATGAAAGTCGTGTCCACAT	FRL1	Ta: 55°C por 40 segundos Extensión: 72° por 35 segundos	Ta: 55°C por 20 segundos Extensión: 72° por 30 segundos
ID 170 FRL2 RT1: GGTAGGTTTCTCTCTTCAACAATCGTCTCC ID 1128 FRL2 RT2: CTGCAAGTCATTATCACCAAGACTGTGAAT	FRL2	Ta: 55°C por 40 segundos Extensión: 72° por 35 segundos	Ta: 55°C por 20 segundos Extensión: 72° por 30 segundos

Tabla 5. Oligonucleótidos iniciadores utilizados para la medición de los niveles de ARNm de los genes mostrados por PCR en tiempo real y/o PCR de punto final.

7. Transformación de *Arabidopsis thaliana* mediante *A. tumefaciens*

Se utilizó el método de *floral dip* (Clough & Bent, 1998), que consiste en sumergir plantas adultas de *Arabidopsis* con sus flores abiertas en una suspensión de *A. tumefaciens* conteniendo la construcción que se quiere insertar en la planta en un vector binario.

Se sembró una colonia fresca y aislada de *A. tumefaciens*, conteniendo la construcción que se desea insertar en la planta, en 100 ml de medio YEP suplementado con gentamicina y el antibiótico correspondiente a la resistencia del plásmido. Se cultivó a 28°C con agitación por 48 horas. Transcurrido este tiempo se cosecharon las células por centrifugación a 4000 g por 10 minutos a 4°C. El pellet se resuspendió con 100 ml de una solución de sacarosa 5% p/v y se colocó en un recipiente adecuado para realizar la inversión de las plantas. Se completó el volumen del recipiente con sacarosa 0,5% p/v y se agregó un surfactante: *Silwet -77* 0,02% v/v. Se sumergieron las flores de las plantas a transformar en esta solución durante 30 segundos. Las plantas

transformadas se colocaron en forma horizontal, se cubrieron con film adherente y se incubaron a 20°C y en oscuridad hasta el otro día. Al día siguiente, las plantas se colocaron en un cuarto con fotoperíodo de DL a 23°C hasta que produjeron vainas. Se cosecharon las semillas de las plantas transformadas (T1) y luego se seleccionaron durante la próxima generación de acuerdo a la resistencia otorgada por el T-DNA en la planta. En todos los casos los experimentos se realizaron con líneas transgénicas homocigotas que presentaron inserciones de T-DNA en un sólo *locus*. Este procedimiento se realizó para transformar plantas Col y *pft1-1* con las distintas construcciones generadas en los vectores binarios (Sección 4). Se obtuvieron las siguientes líneas de plantas transgénicas:

- | | |
|-----------------------------|--|
| ▪ Col <i>PFT1g:Tap</i> | ▪ Col <i>35S::CO:HA</i> |
| ▪ Col <i>Ntap:PFT1g</i> | ▪ Col <i>35S::FRF1</i> |
| ▪ <i>pft1-1 PFT1g:Tap</i> | ▪ Col <i>35S::FRF2</i> |
| ▪ <i>pft1-1 Ntap:PFT1g</i> | ▪ Col <i>amiRNA V CHF3</i> |
| ▪ Col <i>PFT1g:HA</i> | ▪ Col <i>amiRNA A CHF3</i> |
| ▪ <i>pft1-1 PFT1g:HA</i> | ▪ Col <i>amiRNA B CHF3</i> |
| ▪ Col <i>PFT1g:VP16</i> | ▪ Col <i>amiRNA C CHF3</i> |
| ▪ <i>pft1-1 PFT1g:VP16</i> | ▪ Col <i>amiRNA D CHF3</i> |
| ▪ Col <i>PFT1g:GR</i> | ▪ Col <i>amiRNA E CHF3</i> |
| ▪ Col <i>GR:PFT1g</i> | ▪ Col <i>amiRNA VC CHF3</i> |
| ▪ <i>pft1-1 PFT1g:GR</i> | ▪ Col <i>amiRNA AE CHF3</i> |
| ▪ <i>pft1-1 GR:PFT1g</i> | ▪ <i>pft1-1 PFT1g:Tap amiRNA VC CHF1</i> |
| ▪ <i>pft1-1 PFT1g:GR-HA</i> | |

8. Agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana*

Se sembró una colonia fresca y aislada de *A. tumefaciens* conteniendo la construcción que se deseaba agroinfiltrar en 10 ml de medio LB líquido suplementado con antibióticos y se cultivó a 28°C con agitación (200 r.p.m.) toda la noche. Se utilizaron 50 µl del cultivo crecido para inocular 10 ml de LB fresco suplementado con antibióticos, MES 10 mM pH 5,6 y acetosiringona 150 µM y se cultivó toda la noche a 28°C con agitación. Las células se centrifugaron a 10000 g por 15 minutos a 4°C y se resuspendieron en una solución de MES 10 mM pH 5,6, MgCl₂ 10 mM y acetosiringona 150 µM hasta alcanzar una D.O._{600 nm} de 1 (aproximadamente 10 ml de solución). La suspensión celular se incubó a temperatura ambiente por 3 horas y luego se agroinfiltraron las hojas de *N. benthamiana* en la cara abaxial con una jeringa de 1 ml sin aguja.

En caso de agroinfiltrar con más de un cultivo de *A. tumefaciens* la agroinfiltración se realizó utilizando igual volumen de cada una de las suspensiones bacterianas.

En todos los casos se co-infiltró con pBiN61-*p19* (35S::*p19*), que codifica para un supresor del silenciamiento génico lo cual permite lograr una correcta expresión del gen de interés (Voinnet *et al.*, 2003).

Luego de tres días de realizada la agroinfiltración, se tomaron las muestras de las hojas infiltradas y se las congeló rápidamente en nitrógeno líquido.

9. Estudios bioquímicos

9.1 Preparación de extractos proteicos totales

Para la extracción de proteínas de plántulas de *Arabidopsis*, las semillas se cultivaron en DL a 23°C por 10 días en medio MS agar 1,2% p/v. Se tomaron las muestras pesando el material vegetal y colgándolo inmediatamente en nitrógeno líquido. Se maceró el tejido congelado en presencia de nitrógeno líquido utilizando un mortero y lo se transfirió a un tubo manteniéndolo en hielo. Se agregó *buffer* de extracción de proteínas (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Nonidet (NP40) 0,1% v/v, glicerol 10% v/v) de acuerdo al material vegetal pesado de modo tal que la concentración fuera 1 mg de tejido/μl de *buffer*. Se vortexeó y centrifugó inmediatamente a 13000 g por 15 minutos a 4°C y se trasvasó el sobrenadante a un nuevo tubo. Se continuó con la centrifugación hasta que el sobrenadante se encontró libre de restos vegetales. Se congeló una alícuota del sobrenadante para la cuantificación de las proteínas totales por el método de *Lowry* (ver sección 9.4) y al resto se le agregó un volumen de *loading buffer* 2x (solución Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 con SDS 0,4% p/v: 25% v/v, glicerol 20% v/v, SDS 4% p/v, 2-mercaptoetanol 2% v/v, azul de bromofenol 0,001% p/v) y se calentó a 100°C por 5 minutos.

El mismo procedimiento se realizó para la extracción de proteínas de hojas de *N. benthamiana*. En este caso las hojas agroinfiltradas se maceraron en presencia de nitrógeno líquido en un mortero y se les agregaron 500-1000 μl del *buffer* de extracción de proteínas. Se realizaron sucesivas centrifugaciones hasta que se obtuvo un sobrenadante límpido. Se tomaron muestras para la cuantificación de proteínas totales y al resto del sobrenadante se le agregó un volumen de *loading buffer* 2X y se calentó a 100°C por 5 minutos.

9.2 Estabilidad de PFT1 *in vitro*

Para los estudios de estabilidad de PFT1 *in vitro*, se prepararon los extractos proteicos totales y una vez obtenido el sobrenadante (según sección 9.1) se lo dividió en volúmenes iguales de acuerdo a las condiciones que se querían ensayar y se lo incubó a temperatura ambiente. Se tomaron las muestras a los tiempos indicados y las reacciones se detuvieron inmediatamente mediante el agregado de un volumen de *loading buffer* 2x y calentando a 100°C por 5 minutos.

Este procedimiento se realizó con un *cocktail* de inhibidores de proteasas para extractos celulares de plantas (*Sigma*, Nº P9599) y con un inhibidor de proteasoma MG132 (*Sigma*, Nº C2211). En el ensayo con el inhibidor de proteasoma, el extracto proteico se incubó en presencia de MG132 (10 µM o 50 µM final) o DMSO 1% v/v (control) por 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrida la incubación, cada extracto se dividió en dos volúmenes iguales y a uno de ellos se le agregaron ATP y DTT en concentraciones finales de 10 mM cada uno y se continuó incubando a temperatura ambiente. Se colectaron las muestras a los distintos tiempos y se detuvieron las reacciones. En el ensayo con el *cocktail* de inhibidores de proteasas, el extracto proteico se incubó con 3% v/v de los inhibidores y se incubó a temperatura ambiente. Se colectaron las muestras a los distintos tiempos y se detuvieron las reacciones.

9.3 Estabilidad de PFT1 *in vivo*

El ensayo de estabilidad con MG132 se realizó *in vivo*. Para ello se cultivaron semillas de las plantas transgénicas *pft1-1 PFT1g:Tap* en DL a 23°C durante 10 días en medio de cultivo MS suplementado con sacarosa 1% p/v. Durante el día 10, luego de dos horas de comenzado el día, las plántulas se cubrieron con H₂O MiliQ conteniendo MG132 100 µM o DMSO 2% v/v (control). Luego de 4 horas de incubación en esta condición, se tomaron las muestras de las plántulas pesando igual masa de tejido y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Se prepararon extractos proteicos totales según sección 9.1.

9.4 Cuantificación de proteínas totales

Para la cuantificación de las proteínas totales presentes en los extractos proteicos de *Arabidopsis* o *N. benthamiana* se utilizó la técnica de *Lowry* (Lowry *et al.*, 1951). Para ello, se colocaron en cada pocillo de una placa de ELISA 3 µl de cada extracto proteico total y se llevó a un volumen final de 20 µl con agua. En cada medición se realizó una curva de estándar con 0, 3, 6, 9, 12,

15 y 18 µg de BSA. A cada punto de la curva se le agregó 3 µl de *buffer* de extracción de proteínas y se llevó a un volumen final de 20 µl con agua. Tanto los puntos de la curva como las mediciones de los extractos de plantas se realizaron por duplicado y en la misma placa de ELISA.

A cada pocillo se le agregaron 100 µl de solución A y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Luego se agregaron 10 µl de solución B y se mezcló vigorosamente. Se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 minutos y se midió la absorbancia a 655 nm en un lector de placa. A partir de los datos obtenidos en la curva estándar se obtuvieron los µg/µl de proteína total presentes en cada extracto proteico de *Arabidopsis* o *N. benthamiana*

Solución A:

- 10 ml Na_2CO_3 2% p/v disuelto en NaOH 0,1 N
- 0,1 ml Tartrato de sodio 1% p/v
- 0,1 ml Sulfato de cobre 1% p/v

Solución B: Reactivo de *Folin*, dilución ½

9.5 Electroforesis de proteínas

Se utilizaron geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) de 10 cm x 10 cm y de 1 mm de espesor de acuerdo con el método de *Laemmli*. Se utilizó el sistema de armado *Mini protean 3*, *Bio-Rad* y se siguieron los protocolos publicados en *Current Protocols in Molecular Biology*, sección 10.2a (Ausubel *et al.*, 2001).

Se armaron geles al 8-10% y las muestras a analizar se prepararon agregando un volumen de *loading buffer* 2x y calentándolas durante 5 minutos a 100°C antes de la siembra. Como marcadores de peso molecular se utilizaron 6 µl del *kit* de calibración de bajo peso molecular para SDS-PAGE (*GE Healthcare*, N° 17-0446.01) para los geles teñidos con Coomassie Brilliant Blue y 6 µl de Marcador pre-teñido *BenchMark* (*Invitrogen*, N° 10748-010) o *Full Range Rainbow* (*Amersham Biosciences*, N° RPN 800) para los ensayos de *Western blot*. La electroforesis se realizó a 20 mA constantes y utilizando *buffer* Tris-glicina-SDS 1x (Tris base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% p/v).

9.5.1 Tinción con Coomassie Brilliant Blue

Una vez finalizada la electroforesis en gel de poliacrilamida, el gel se incubó en la solución de tinción (*Coomassie Brilliant Blue* R250 0,25% p/v, ácido acético glacial 10% v/v, metanol 45% v/v) durante 30-60 minutos en agitación y a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se

descartó esta solución y se realizaron sucesivos lavados con una solución para destañar (metanol 30% v/v, ácido acético glacial 10% v/v) en agitación y a temperatura ambiente.

9.5.2 Ensayos de *Western blot*

Una vez finalizada la electroforesis en gel de poliacrilamida, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa Hybond-ECL (*Amersham Biosciences*, Nº RPN303D) utilizando el sistema de transferencia de *Bio-Rad*. La transferencia se llevó a cabo a 80-100 volts durante 60 minutos, en baño de hielo y con agitación constante del *buffer* de transferencia (Tris base 3% p/v, glicina 14,4% p/v, metanol 20% v/v).

Una vez finalizada la transferencia, la membrana se tiñó con solución de rojo *ponceau* (rojo *ponceau* 0,2% p/v, ácido acético glacial 1% v/v) que permite visualizar la proteína rubisco y monitorear la eficiencia de transferencia. Se lavó la membrana con *buffer* PBS (NaCl 0,8% p/v, KCl 0,02% p/v, Na₂HO₄ 0,144% p/v, KH₂PO₄ 0,024% p/v) y se incubó con la solución de bloqueo (Leche en polvo descremada 5% p/v en PBS-T, *buffer* PBS con Tween 20 0,1% v/v) durante 1 hora en agitación y a 4°C. Transcurrida la incubación, se eliminó la solución de bloqueo y se incubó con el anticuerpo correspondiente en agitación y a 4°C durante 6 horas o toda la noche. Las condiciones fueron diferentes de acuerdo al anticuerpo utilizado:

PAP: complejo soluble peroxidasa anti peroxidasa (*Sigma*, Nº P1291) permite la detección de las proteínas etiquetadas con TAP. Permite la detección de las proteínas en un sólo paso sin utilizar un anticuerpo secundario. Este anticuerpo se incubó en la solución de bloqueo y se utilizó una dilución 1/1000. Luego de la incubación se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS-T y las proteínas se detectaron utilizando como sustrato para la peroxidasa el *kit* de quimioluminiscencia ECL de *Amersham Biosciences* (RPN2109) o *Millipore* (WBKLSO100).

Anti-HA peroxidasa: anticuerpo monoclonal producido en rata y conjugado a peroxidasa (*Roche* 3F10, Nº 2013819). Permite la detección de las proteínas sin utilizar un anticuerpo secundario. Este anticuerpo se incubó en PBS-T y se utilizó una dilución 1/500. Transcurrida la incubación se realizó un sólo lavado con PBS-T durante 5 minutos y las proteínas se detectaron por quimioluminiscencia.

Anti-peroxirredoxina: anticuerpo policlonal producido en conejo. Este anticuerpo se incubó en la solución de bloqueo y se utilizó una dilución 1/500. Luego de la incubación se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS-T. Se incubó nuevamente con solución de bloqueo y se agregó como anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (*Sigma*, Nº A0545)

dilución 1/6000. Se incubó con el anticuerpo secundario durante 1 hora y luego se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS-T. Las proteínas se detectaron por quimioluminiscencia.

9.6 Preparación de proteínas recombinantes

Se sembró una colonia fresca y aislada de bacterias BL21 *codon plus* conteniendo el plásmido con la construcción que se desea expresar en 100 ml de medio T-Broth suplementado con el antibiótico correspondiente y se cultivó toda la noche y en agitación a 37°C. Se utilizaron 10 ml de ese cultivo crecido para inocular 1000 ml de medio T-Broth fresco suplementado con antibiótico y se cultivaron a 37°C con agitación (250 r.p.m) hasta que las células alcanzaron una D.O._{600nm} de 0,4-0,6. Se guardó una alícuota de estas células y el resto del cultivo se indujo con IPTG 0,5 mM. Las células se cultivaron a 37°C con agitación durante 5 horas. Transcurrido este tiempo se centrifugaron las células a 6000 g por 20 minutos a 4°C y se guardó el precipitado a -80°C hasta su utilización.

Para la preparación de proteínas con fusión a MBP, el precipitado se resuspendió en 50 ml de *column buffer* (CB) (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM), se agregó lisozima (1 mg/ml) y se sonicó la suspensión por 5 minutos con pulsos de 10 segundos y un descanso de 20 segundos entre pulsos. Se centrifugó la suspensión a 13000 g por 30 minutos a 4°C. Se tomó una alícuota del sobrenadante y del pellet y se les agregó *loading buffer* para su análisis en un gel SDS-PAGE.

En el caso de la preparación de proteínas de fusión a GST, se realizó el mismo procedimiento pero como *buffer* de lisis se utilizó: Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, Tween 1% v/v, glicerol 10% v/v, 2-mercaptoetanol 20 mM, Imidazol 20 mM pH 8, el mismo *buffer* de lisis que se utiliza para la preparación de proteínas de fusión a HIS.

9.6.1 Purificación de proteínas fusionadas a MBP

Se utilizó una columna de polipropileno de 1.5 cm de diámetro y 12 cm de largo, se cargó con 1 ml de resina de amilosa (*New England Biolabs*, N° E8021S) y se lavó con 8 volúmenes de CB. Se cuantificó la cantidad de proteína total presente en el sobrenadante obtenido luego del sonication (sección 9.6) utilizando el reactivo de Bradford (*Bio-Rad*) y se lo diluyó con CB hasta una concentración de 2,5 mg/ml. Se sembró este sobrenadante en la columna. Una vez que todo el volumen atravesó la columna, se lavó con 12 volúmenes de CB. Luego se procedió a eluir la proteína de fusión, utilizándose 10-15 ml de CB conteniendo maltosa 10 mM. Se colectaron fracciones de 1 ml, se analizaron en un gel SDS-PAGE y se guardaron a -80°C con glicerol 15% v/v. Este

procedimiento se realizó dos veces, ya que la fracción colectada luego del sembrado de la columna se volvió a sembrar luego de la elución de las proteínas.

La columna se regeneró de acuerdo a las especificaciones del fabricante y se reutilizó.

Todo el procedimiento se llevó a cabo en un cuarto a 4°C para evitar la degradación de la proteína de interés.

9.6.2 Inmunopurificación de anticuerpos α -GST:FRF2 Δ 315

Se juntaron las fracciones purificadas correspondientes a la proteína MBP:FRF2 Δ 315 y se dializaron toda la noche utilizando como *buffer* de diálisis NaHCO₃ 0,2 M, NaCl 0,5 M pH 8,3. De esta forma se eliminó el *buffer* Tris que contenían las fracciones luego de su elución en la columna de afinidad de amilosa. Se cambió el *buffer* y se dializó durante 3 horas más. Las fracciones se concentraron utilizando un centrífugo y lavando con el *buffer* de diálisis, hasta que se obtuvo un volumen final de 1 ml. Se lavaron 300 μ l de una resina de *Sepharose* activada por esterificación con N-hidroxisuccinamida (NHS) con 10 volúmenes de HCl 1mM frío. Luego se mezcló con 1 ml de la proteína disuelta en el *buffer* de acoplado (NaHCO₃ 0,2 M, NaCl 0,5 M) y se incubó a 4°C y en agitación toda la noche. Una vez finalizado el acoplamiento de la proteína, se bloquearon los grupos de la resina que no reaccionaron, incubándola con Tris-HCl 0,1 M pH 8,5 a temperatura ambiente y en agitación por 2 horas y 30 minutos. Se trasvasó la resina con la proteína acoplada a una columna de 0,5 cm de diámetro y 4 cm de largo. La resina se lavó con 3 volúmenes de Tris-HCl 0,1 M pH 8,5 y luego con 3 volúmenes de acetato de sodio 0,1 M, NaCl 0,5 M pH 4,5. Este ciclo de lavados se repitió 6 veces y luego se lavó con PBS. Se centrifugaron 3 ml de anticuerpo α -GST:FRF2 Δ 315 a 13000 g durante 30 minutos y a 4 °C. A partir de aquí se trabajó en un cuarto a 4°C. Se cargó la columna con el sobrenadante obtenido de la centrifugación del anticuerpo y se lavó con PBS + NaCl 0,5 M. La elución del anticuerpo se realizó con glicina 0,1 M pH 2,5. Se colectaron 3 fracciones de 1 ml cada una en tubos que contenían 65 μ l de Tris-HCl 1 M pH 9,5. Se concentraron las fracciones 1 y 2 en un centrífugo, centrifugando a 5000 g y a 4°C. Cuando se obtuvo una fracción de 200 μ l, se diluyó con 3 ml de PBS y se repitió el procedimiento. Se obtuvieron 150 μ l finales con una concentración de 2,17 μ g/ μ l y se alicuotaron en fracciones de 30 μ l cada una. La columna se lavó con PBS y se guardó en PBS con etanol 20% v/v.

9.7 Experimento de unión de PFT1 a columnas de afinidad

Se prepararon extractos proteicos totales a partir de 500 mg de tejido de plántulas *pft1-1 PFT1g:Tap* cultivadas en DL a 23°C durante 10 días y se sembraron en la columna que contenía la proteína MBP:FRF2Δ315 acoplada a la resina de *Sepharose* descrita en la sección anterior (9.6.2). Una vez sembrada se lavó la columna con PBS y luego con PBS + NaCl 0,5 M. La elución se realizó con glicina 0,1 M pH 2,5. Se colectaron 3 fracciones de 1 ml en tubos que contenían 65 µl de Tris-HCl 1 M pH 9,5. Estas fracciones se precipitaron con un volumen de TCA al 20% v/v incubándose por 30 minutos en hielo, y luego centrifugando a 13000 g por 30 minutos. Cada precipitado se lavó dos veces con 500 µl de acetona fría y se dejó secar. Cada fracción se resuspendió en 50 µl de *loading buffer* y se calentó por 5 minutos a 100 °C. Las fracciones obtenidas se analizaron por *Western blot*.

En forma análoga, se ensayó la interacción del extracto proteico de plántulas *pft1-1 PFT1g:Tap* con la proteína MBP:FRF2Δ315 unida a la resina de amilosa y con MBP como control. Para esto, se prepararon las proteínas recombinantes MBP:FRF2Δ315 y MBP a partir de un cultivo de 100 ml de *E. coli* BL21 tal como fue descrito en la sección 9.6. Cada extracto proteico total de *E. coli* se sembró en una columna conteniendo la resina de amilosa. Cada columna se lavó y una vez que cada proteína se encontraba pegada a cada columna, se dividió el extracto proteico de *Arabidopsis* en volúmenes iguales (500 µl) y se sembró cada uno en una columna, una conteniendo MBP:FRF2Δ315 y la otra MBP. Se colectó la primera fracción luego de cada siembra (Ft) y cada columna se lavó con NaCl 0,1 M, para eliminar proteínas que podrían pegarse en forma inespecífica, y luego con 4 ml de CB, colectándose fracciones de 1 ml. Una vez lavadas las columnas se procedió a eluir la proteína con CB + maltosa 10 mM. Se colectaron 4 fracciones de elución en la columna con MBP:FRF2Δ315 y 3 fracciones en la columna con MBP. Todas las fracciones colectadas se precipitaron con TCA 20% v/v y luego se resuspendieron en 50 µl de *loading buffer*, calentándose por 5 minutos a 100°C. Las fracciones obtenidas se analizaron por *Western blot*.

CAPÍTULO 1: Disección de las señales transducidas por CO y PFT1 en la regulación de la floración

INTRODUCCIÓN

La vía del fotoperíodo en la regulación de la floración

Los principales componentes de la vía del fotoperíodo se han identificado con aproximaciones genéticas. Dichos componentes son: CO, GI, phyA, cry2, FD y FT. La pérdida de funcionalidad de estos genes por mutación, suele producir un retraso en la floración bajo fotoperíodos inductivos (día largo, DL), pero no en días cortos (DC). Las proteínas GI y CO juegan un papel central en la vía del fotoperíodo y actúan en este orden para regular la transcripción de *FT*, específicamente en DL. La expresión de *CO* se encuentra regulada por el reloj circadiano de forma tal que su pico de expresión se encuentra hacia el final del día en DL y durante la noche en DC. Además, la proteína CO es estabilizada por los fotorreceptores phyA y cry2 y sus niveles caen rápidamente en oscuridad cuando es degradada vía proteasoma (Valverde *et al.*, 2004). De esta forma, CO media la activación de la transcripción de *FT* al final del día sólo en DL (Suarez-Lopez *et al.*, 2001; Yanovsky & Kay, 2002).

A pesar de que la activación de *FT* por CO es rápida (Samach *et al.*, 2000), durante muchos años no se ha podido demostrar una interacción directa de CO con las regiones regulatorias de *FT* (Ben-Naim *et al.*, 2006; Wenkel *et al.*, 2006). Se ha propuesto que CO requiere de otras proteínas para facilitar la capacidad de unión a ADN del dominio CCT (por su conservación en CONSTANS, CONSTANS LIKE y TIMING OF CAB EXPRESSION) (Turck *et al.*, 2008), y que estas proteínas son capaces de reclutar a CO al ADN como parte de un complejo transcripcional por interacción directa proteína-proteína (Wenkel *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2008). Sin embargo, se demostró recientemente, utilizando una combinación de estudios de análisis de expresión en células y ensayos de unión a ADN *in vitro*, que CO posee el potencial de activar la transcripción y es capaz de unirse directamente al ADN. Se encontró que CO se une al ADN a través de un elemento de secuencia única que contiene el motivo TGTG(N2-3)ATG. Este motivo se encuentra presente en *tándem* en el promotor de *FT* y es suficiente para la unión y actividad de CO (Tiwari *et al.*, 2010). Por lo tanto, CO puede unirse directamente al promotor de *FT* en los sitios de respuesta a CO (CORE) y a través de interacciones con los factores nucleares Y y las proteínas activadoras del complejo NF-Y/HAP en los sitios CCAAT, actuando entonces como factor de transcripción y como coactivador transcripcional (Blackman & Michaels, 2010).

En otro trabajo reciente (Adrian *et al.*, 2010), se analizó la región promotora de *FT* para definir la mínima región necesaria para mediar la respuesta a la longitud del día y se identificaron varias regiones clave que juegan un papel en el estado de la cromatina de *FT* y en la actividad de su promotor. Se identificaron tres regiones regulatorias putativas, bloques A-C y mediante un análisis funcional de estas regiones se encontró que el bloque que posee 5,7 Kb “corriente arriba” del inicio de la traducción contiene las regiones regulatorias necesarias para mediar la expresión de *FT* y es crucial para la regulación de *FT* por CO. Los autores proponen un modelo en el cual CO actúa a través de la región próxima del promotor pero requiere interactuar con un complejo activador que se asocia con la región distal del promotor de *FT*. Esta interacción con otro complejo activador podría favorecer la afinidad de CO por el ADN y su unión a la región próxima del promotor (Adrian *et al.*, 2010).

Durante muchos años se ha propuesto que el estímulo del fotoperíodo se produce en las hojas. En algunas especies como *Lolium temulentum*, una sola hoja expuesta a condiciones de DL es suficiente para inducir la floración, pero esto no ocurre si esta hoja es removida al poco tiempo de realizado el estímulo. Estas observaciones sugieren la existencia de una sustancia que se genera en la hoja y es transportada al meristema apical del tallo para inducir la floración. En 1937, el científico ruso Mikhail Chailakhyan denominó a esta sustancia como florígeno. Recientemente, se ha propuesto a FT como la señal de iniciación de la floración en *Arabidopsis* (florígeno) y se ha observado que su función se encuentra conservada en varias especies. FT es una de las señales que se produce en las hojas bajo condiciones inductivas de fotoperíodo y se mueve al meristema apical del tallo, donde interacciona con factores de transcripción (FD) y promueve el desarrollo reproductivo (Abe *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005; Corbesier *et al.*, 2007; Jaeger & Wigge, 2007; Lin *et al.*, 2007; Mathieu *et al.*, 2007; Tamaki *et al.*, 2007).

Dado que FT responde a muchos estímulos, como por ejemplo la longitud del día, la vernalización y la calidad de luz (Suarez-Lopez *et al.*, 2001; Yanovsky & Kay, 2002; Cerdán & Chory, 2003; Halliday *et al.*, 2003; Searle *et al.*, 2006), se lo conoce como uno de los genes integradores de la floración en el cual convergen varias de estas vías de señalización. Además de FT, *TWIN SISTER OF FT (TSF)* y *SOC1* son genes integradores y juegan papeles centrales promoviendo la floración.

TSF es una proteína muy similar a FT con un 81,3% de identidad. El patrón de expresión de FT y TSF en el floema es similar. Sin embargo, a diferencia de FT, TSF se expresa también en el meristema apical. A partir de un análisis de expresión se observó que TSF, al igual que FT, responde rápidamente a la variación en los niveles de CO y es reprimido por FLC y EARLY BOLTING IN SHORT DAYS (EBS) (Yamaguchi *et al.*, 2005). Las mutantes *tsf* florecen sólo un poco más tarde que las

plantas del tipo salvaje. En cambio, la doble mutante *ft tsf* florece mucho más tarde que la mutante *ft* en condiciones de DL, mostrando un efecto aditivo entre estos genes. *FT* y *TSF* parecen actuar independientemente el uno del otro e independientemente de *LFY*, actuando ambos “corriente arriba” de *SOC1* (Yamaguchi *et al.*, 2005).

SOC1 es un gen que codifica para un factor de transcripción del tipo MADs box y es el gen que se induce más tempranamente en el meristema durante la transición floral a través de la acción de FT y FD. Sin embargo, *SOC1* no es el único efector de FT y TSF, ya que por ejemplo, FT y FD activan directamente el gen de identidad del meristema floral *AP1* y esto contribuye al desarrollo del primordio floral. Mutaciones en *SOC1* generan un fenotipo de floración tardía tanto en condiciones de DL como en DC. Se ha demostrado que *SOC1* se encuentra “corriente abajo” de CO en la vía fotoperiódica (Samach *et al.*, 2000), aunque este efecto parece ocurrir vía FT (Yoo *et al.*, 2005). Como gen integrador, *SOC1* también responde a la vía de vernalización, siendo el blanco de *FLC*, el cual reprime su expresión uniéndose directamente a su promotor (Helliwell *et al.*, 2006). En cuanto a su mecanismo de acción, ensayos de inmunoprecipitación de cromatina mostraron que *SOC1* se une directamente al promotor de *LFY* y que una mutación en el MADs Box genera una supresión de la función de *SOC1* y pérdida de unión al promotor de *LFY*. Además, *SOC1* necesita interactuar con *AGL24* (otro gen integrador de la floración, también tipo MADs box) para generar un heterodímero y activar la expresión de *LFY* (Lee *et al.*, 2008).

FT pertenece a una pequeña familia con homólogos en plantas, hongos y animales

Existe una pequeña familia de seis genes similares a *FT* los cuales podrían tener funciones relacionadas con la inducción de la floración. Las proteínas codificadas por estos genes contienen dominios de unión a fosfatidiletanolamina y por ello se las conoce como PEPB por *phosphatidyl ethanol binding proteins*. La función fisiológica de estas proteínas se ha estudiado ampliamente en animales y se propone que actúan en cascadas de señalización mediando interacciones proteína-proteína (Turck *et al.*, 2008).

En *Arabidopsis*, la familia de proteínas PEPB comprende a FT, TSF, BROTHER OF FT (BFT), ARABIDOPSIS THALIANA RELATIVE OF CENTRORADIALIS (ATC), MOTHER OF FT AND TFL1 (MFT) y TFL1.

TFL1 posee un efecto antagonista a FT en la regulación de la floración. Las mutantes de pérdida de función florecen temprano, tanto en DL como en DC y forman una flor terminal similar a la de las plantas sobreexpresantes de *FT* (Bradley *et al.*, 1997). Una hipótesis sugiere que TFL1 actúa

como competidor de FT en el ápice para prevenir que FT convierta el meristema apical del tallo en meristema floral (Ahn *et al.*, 2006; Turck *et al.*, 2008). Análogamente a FT, la proteína TFL1 también es una señal móvil y se encuentra distribuida a lo largo del meristema (Conti & Bradley, 2007).

Los homólogos más similares a *TFL1* son *BFT* y *ACT* pero sus roles en el desarrollo de las plantas no se encuentran claros. No se han descrito alelos mutantes para *BFT* y las mutantes *act* no muestran un fenotipo de alteración en el tiempo de floración o en el desarrollo de las flores (Turck *et al.*, 2008).

MFT se encuentra igualmente relacionado con FT y con TFL1 y es capaz de promover levemente la floración cuando es sobreexpresado (Yoo *et al.*, 2004). Sin embargo, la mutante *mft1* no presenta un fenotipo de floración tardía muy marcado cuando se la compara con plantas del tipo salvaje (Turck *et al.*, 2008).

Regulación de la floración por calidad de luz

La calidad de luz es una señal clave que provee a las plantas información sobre la presencia de plantas vecinas, competidoras. La luz reflejada por la vegetación verde es pobre en longitud de onda roja (R) y azul pero se encuentra enriquecida en luz roja lejana (RL). La alteración en los niveles de luz R/RL es percibida por una familia de fotorreceptores, los fitocromos y es una señal que regula el desarrollo vegetativo y la transición hacia la floración. El descenso de la proporción de luz R/RL genera en las plantas una serie de respuestas de “escape al sombreado” (*shade avoidance*), que involucra cambios fenotípicos como el aumento de la elongación del tallo y de los pecíolos, la disminución de la expansión de las hojas y la disminución de las ramificaciones. Si la disminución de la relación de luz R/RL persiste, se altera considerablemente el desarrollo de las plantas y se acelera la transición hacia la floración, lo cual favorece la posibilidad de lograr un éxito reproductivo en un ambiente desfavorable (Halliday *et al.*, 2003; Adams *et al.*, 2009).

De los cinco fitocromos presentes en *Arabidopsis* (phyA-phyE), al menos tres de ellos (phyB, phyD y phyE) tienen un rol importante en la percepción de la relación de luz R/RL y en el inicio de la respuesta de escape al sombreado. El rol de phyB consiste en percibir la reducción de la relación de luz R/RL, mientras que phyA y cry1 se encuentran modulando la sensibilidad a esta señal (Casal, 2000).

A partir del análisis fisiológico de mutantes nulas para los fitocromos B, D y E, se encontró que phyB es el fotorreceptor principal involucrado en estas respuestas. Las mutantes de *phyB* presentan una elongación constitutiva de tallo y pecíolos, un fenotipo de floración temprana y una respuesta atenuada a la baja relación de luz R/RL en comparación con las plantas del tipo salvaje. Las

mutantes nulas de *phyD* y *phyE* no tienen un fenotipo evidente. Sin embargo, su deficiencia es más evidente en ausencia de *phyB*. Se observó que las dobles mutantes *phyB phyD* y *phyB phyE* presentan una mayor elongación y florecen más temprano que la mutante simple *phyB* (Aukerman *et al.*, 1997; Devlin *et al.*, 1998; Devlin *et al.*, 1999). Estos resultados sugieren que *phyD* y *phyE* contribuyen también al control de la respuesta de escape al sombreado (Franklin *et al.*, 2003). Sin embargo, la contribución relativa de cada fitocromo puede ser modificada por las condiciones ambientales, tales como la temperatura del ambiente (Halliday & Whitelam, 2003).

Se conoce poco acerca de los eventos de señalización que ocurren “corriente abajo” de los fitocromos en la regulación de la floración por calidad de luz. Sin embargo, se han encontrado mayores niveles de ARNm de *FT* en las mutantes *phyB*, lo cual sugiere que existe una regulación de *FT* por parte de *phyB* (Cerdán & Chory, 2003; Halliday *et al.*, 2003).

Para encontrar genes involucrados en la regulación de la floración por parte de los fitocromos, se realizó un *screening* genético en *Arabidopsis* (Cerdán & Chory, 2003). En este *screening* se utilizaron líneas de T-DNA activadas obtenidas en el ABRC a las cuales, una vez inducida la germinación, se las expuso a un pulso de cinco minutos de luz roja durante 24 horas. Luego de cuatro días de tratamiento se seleccionaron las plantas que poseían signos de respuesta exagerada a la luz roja tales como, hipocotilos cortos o cotiledones parcialmente abiertos y se analizó su fenotipo de floración. Durante este trabajo se aisló y caracterizó la mutante *pft1-1*. Estas mutantes muestran una pequeña respuesta en la inhibición del largo de hipocotilo bajo luz R y RL. Se observó que son más cortas en R y más altas en RL que las plantas del tipo salvaje. Esta respuesta requiere que *phyA* y *phyB* se encuentren activos.

Los niveles de proteína *phyA* y *phyB* no se alteraron en las mutantes de *pft1-1*, lo cual sugiere que PFT1 actúa “corriente abajo” de estos fotorreceptores. Además, dicha mutante tiene respuesta normal a la luz azul, con lo cual PFT1 es específico del accionar de los fitocromos y no un regulador general de la respuesta a la luz (Cerdán & Chory, 2003).

Además del fenotipo de hipocotilo, las mutantes *pft1-1* presentan un fenotipo de floración tardío cuando son cultivadas en condiciones de DL. *pft1-1* florece tarde y suprime el fenotipo de floración temprana de la mutante *phyB* tanto en DL como en DC, por lo cual PFT1 es esencial para la regulación de la floración por medio del *phyB* (Cerdán & Chory, 2003). Sin embargo, el aumento en la longitud de los pecíolos en mutantes *phyB* no se vio afectado en la doble mutante *phyB pft1-1*.

Para estudiar la naturaleza de la supresión del fenotipo de floración temprana de *phyB* por *pft1-1*, se analizaron los niveles de ARNm de *FT* en plantas del tipo salvaje (Col), *phyB*, *pft1-1* y *phyB pft1-1*. En DL, la expresión de *FT* fue sustancialmente mayor en las mutantes *phyB* que en las

plantas Col. Al analizar los niveles de ARNm de *FT* en plántulas de 26 días cultivadas en DC, nuevamente se observó un aumento de la expresión en mutantes *phyB* comparadas con plantas Col. Además, los niveles de ARNm de *FT* fueron bajos en las mutantes *pft1-1* y en las *phyB pft1-1* en todas las condiciones analizadas, lo cual concuerda con el modelo propuesto que PFT1 actúa “corriente abajo” de *phyB* regulando la expresión de *FT* (Cerdán & Chory, 2003).

En cuanto a los niveles de expresión de *CO*, se encontraron mayores niveles de ARNm de *CO* en mutantes *phyB* cultivadas en condiciones de DL que en plantas Col y menores niveles en la mutante *pft1-1*. Sin embargo, en condiciones de DC, no fue posible encontrar niveles elevados de ARNm de *CO* en mutantes *phyB*. Lo mismo sucedió al analizar los niveles de ARNm de *SOC1*, no se encontró correlación entre los niveles de ARNm de *SOC1* con el tiempo de floración, tanto en *phyB* como en *pft1-1*. La falta de correlación entre los niveles de ARNm de *CO* y *SOC1* con el tiempo de floración de *phyB* y *pft1-1* sugieren que *phyB* regula los niveles de ARNm de *FT* por un mecanismo dependiente de PFT1 que no involucra cambios en los niveles de ARNm de *CO* y *SOC1* (Cerdán & Chory, 2003).

Existe evidencia que demuestra que PFT1 regula la floración “corriente abajo” de *phyB* y por una vía independiente de la del fotoperíodo. En primer lugar, tanto la mutante *pft1-1* como la doble mutante *phyB pft1-1* responden fuertemente al fotoperíodo y PFT1 es capaz de regular los niveles de ARNm de *FT* por un mecanismo que no involucra a *CO*. Estas observaciones sugieren claramente que es poco probable que PFT1 tenga un rol en la vía del fotoperíodo. En segundo lugar, se analizó el efecto que produce el tratamiento con pulsos de luz roja lejana (EODFR) o luz roja (EODR) al final del día en mutantes *pft1-1*. El pulso EODFR mimetiza la respuesta de escape al sombreado, que incluye una aceleración del tiempo de floración. El tratamiento con EODFR fue menos efectivo para promover la floración en las plantas *pft1-1* que en las plantas Col, lo cual es consistente con un rol de PFT1 luego de la percepción de la relación de luz R/RL. Por lo tanto, PFT1 actúa “corriente abajo” de *phyB* para regular la expresión de *FT* en forma independiente del fotoperíodo, lo cual evidencia la existencia de una vía de regulación de la floración por calidad de luz (Cerdán & Chory, 2003).

Sin embargo, dado que los niveles de ARNm de *PFT1* no se ven afectados por una mutación en *phyB*, de ser cierto este modelo, *phyB* se encontraría regulando la actividad de PFT1 post-transcripcionalmente o a través de otras proteínas.

En contraste con estos resultados, publicaciones más recientes han resaltado el rol de los componentes de la vía del fotoperíodo en la regulación de la floración por calidad de luz (Kim *et al.*, 2008; Wollenberg *et al.*, 2008). La exposición continua de plantas a condiciones de luz enriquecida

en luz RL resultó en un aumento en los niveles de ARNm de *CO* y *FT*, en la estabilidad de la proteína CO y en un corrimiento de fase en GI. Además, tanto CO como GI fueron necesarios para acelerar la floración en condiciones de baja relación de luz R/RL. En este trabajo se propone a PFT1 como un regulador negativo de la señalización de los fitocromos, que actuaría “corriente arriba” de CO (Wollenberg *et al.*, 2008), en lugar de promotor directo de la floración. Este rol es consistente con los bajos niveles de ARNm de *CO* observados en la mutante *pft1-1* y con su hipersensibilidad a la luz R durante la desetiolación (Cerdán & Chory, 2003). Sin embargo, aún no se encuentra claro como se integran las diversas vías para promover la floración en respuesta a la baja relación de luz R/RL (Adams *et al.*, 2009) y dado que PFT1 es parte del complejo MEDIATOR de *Arabidopsis* (Backstrom *et al.*, 2007) no se puede descartar que posea roles más directos en la transcripción (Cerdán, 2011).

Dadas estas controversias en el rol de PFT1 en la regulación de la floración, se planteó como objetivo general de este capítulo de Tesis Doctoral separar genéticamente los distintos componentes de las vías de calidad de luz y del fotoperíodo. El objetivo particular fue separar el accionar de CO y PFT1 y determinar si PFT1 es capaz de promover la floración en forma independiente de CO.

RESULTADOS

I) Existen al menos dos vías genéticas involucradas en regular la floración “corriente abajo” de los fitocromos

En el laboratorio se combinaron las mutaciones de los fitocromos involucrados en la regulación de la floración por calidad de luz: *phyB* (*phyB-9*: EMS142 en Reed *et al.* (1993), *phyD* (*phyD-201*: SALK_027956) y *phyE* (*phyE-201*: SALK_040131) (Wollenberg *et al.*, 2008). Estas mutantes se introdujeron por cruzamiento en las mutantes insercionales nulas de los genes *PFT1* (*pft1-1*, Cerdán & Chory, 2003), *CO* (*co-9*: SAIL_24_H04) y *FT* (*ft-10*: GABI_290E08) a fin de determinar de qué forma se suprime el fenotipo de floración temprana de las mutantes de los fitocromos por las mutaciones de *pft1*, *co* y *ft*. Se obtuvieron y confirmaron por PCR las siguientes combinaciones de mutantes, todas ellas en Col (Tabla 6) junto con la doble mutante *co-9 pft1-1*.

Mutantes de fitocromos	Combinaciones con <i>co-9</i>	Combinaciones con <i>pft1-1</i>	Combinaciones con <i>ft-10</i>
	<i>co-9</i>	<i>pft1-1</i>	<i>ft-10</i>
<i>phyD</i>	<i>phyD co-9</i>	<i>phyD pft1-1</i>	
<i>phyE</i>	<i>phyE co-9</i>	<i>phyE pft1-1</i>	
<i>phyD phyE</i>	<i>phyD phyE co-9</i>	<i>phyD phyE pft1-1</i>	
<i>phyB</i>	<i>phyB co-9</i>	<i>phyB pft1-1</i>	<i>phyB ft-10</i>
<i>phyB phyD</i>	<i>phyB phyD co-9</i>	<i>phyB phyD pft1-1</i>	
<i>phyB phyE</i>	<i>phyB phyE co-9</i>	<i>phyB phyE pft1-1</i>	
<i>phyB phyD phyE</i>	<i>phyB phyD phyE co-9</i>	<i>phyB phyD phyE pft1-1</i>	<i>phyB phyD phyE ft-10</i>

Tabla 6: Mutantes insercionales de los fitocromos B, D y E combinadas con mutaciones nulas en *CO*, *PFT1* y *FT*

Con estas combinaciones de mutantes se realizaron 8 experimentos de floración independientes, cultivando las plantas en condiciones de DL y a 23°C (Figura 4).

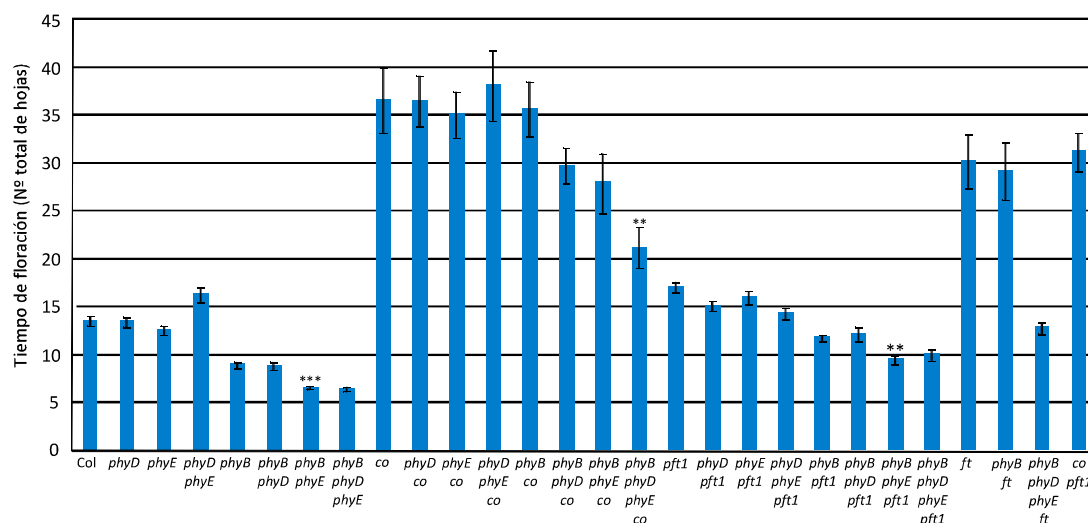


Figura 4. Existen al menos dos vías que regulan la floración “corriente abajo” de los fitocromos

Determinación del tiempo de floración de mutantes de los fitocromos B, D y E combinadas con mutaciones en *CO*, *PFT1* y *FT*. Se midió el número total de hojas al momento de la floración (hojas de la roseta + hojas caulinares) de plantas cultivadas en DL (16 horas de luz/ 8 horas de oscuridad) a 23°C. Las barras representan la media +/-ES de ocho experimentos independientes, con un total de al menos 48 plantas por cada genotipo. * Indica que las plantas *phyB phyE* florecieron estadísticamente más temprano que *phyB* ($p < 0,00003$), que las plantas *phyB phyD phyE co-9* florecieron estadísticamente más temprano que *phyB co-9* ($p < 0,001$) y que las plantas *phyB phyE pft1-1* florecieron estadísticamente más temprano que las plantas *phyB pft1-1* ($p < 0,001$), por ANOVA de un factor con contraste de Bonferroni.

A partir del análisis de estos experimentos se observó que:

⊕ Tanto *co-9* como *pft1-1* florecieron significativamente más tarde que Col ($p < 0,00001$ y $p < 0,00048$, por ANOVA de un factor con contraste de Bonferroni), lo cual concuerda con el rol propuesto para CO y PFT1 de promotores de la floración (Samach *et al.*, 2000; Cerdán & Chory, 2003).

⊕ La mutante *phyB* presentó un fenotipo de floración temprano el cual es característico de su rol como regulador negativo de la floración, en cambio, mutaciones en *phyD* y *phyE* no afectaron significativamente la floración. Por lo tanto, estos resultados confirmaron lo observado por Halliday & Whitelam (2003) y por Franklin *et al.* (2003). *phyB* tiene un rol principal en la percepción de la relación de luz R/RL y existe una jerarquía en el accionar de los fitocromos, para observar un efecto del *phyD* y del *phyE* se debe eliminar al *phyB*. El efecto de *phyD* parece ser mucho menor que el de *phyE*. Las mutantes *phyB phyD*, *phyB phyD co-9* y *phyB phyD pft1-1* no presentaron un fenotipo de floración estadísticamente significativo respecto a *phyB*, *phyB co-9* y *phyB pft1-1*. En cambio, en ausencia de *phyB*, *phyE* tiene un rol importante, ya que se observó una aceleración estadísticamente significativa del tiempo de floración en las plantas *phyB phyE* y *phyB*

phyE pft1-1 respecto de *phyB* y *phyB pft1-1*. En el *background co-9* el efecto se observó al eliminar los tres fitocromos, las plantas *phyB phyD phyE co-9* florecieron estadísticamente más temprano que las plantas *phyB co-9*.

⊕ La regulación de la floración por los fitocromos B, D y E no ocurre sólo vía CO o sólo vía PFT1. Esto se observó claramente al comparar el tiempo de floración de *phyB phyD phyE co-9* con el de *co-9*. En ausencia de CO los fitocromos B, D y E continúan actuando como represores de la floración. Lo mismo sucedió al comparar el tiempo de floración de *phyB phyD phyE pft1-1* con el de *pft1-1*. En ausencia de PFT1 los fitocromos continúan actuando como represores de la floración.

Si la señal percibida por los fitocromos B, D y E fuera transducida únicamente por la vía de CO, no se observaría diferencia al comparar el tiempo de floración de *co-9* con el de *phyB phyD phyE co-9*. Lo análogo sucedería si la regulación ocurriera sólo vía PFT1. Por lo tanto, existen al menos dos vías que regulan la floración “corriente abajo” de los fitocromos. Sin embargo, con estos resultados no se puede determinar si CO y PFT1 regulan la floración por vías separadas o si son parte de una misma vía y existe otra vía independiente diferente.

⊕ CO regula la floración no sólo vía *FT* sino también a través de otro gen integrador de la floración. Al comparar el tiempo de floración de *phyB phyD phyE co-9* con el de *phyB phyD phyE ft-10* se observó que en esta última mutante, aún en ausencia de *FT*, CO es capaz de promover la floración. El efecto de la mutación *co-9* es mayor que el de la mutación *ft-10* en el mismo *background* genético, por lo tanto CO debe encontrarse activando otro gen además de *FT*. Estos resultados indican que *FT* no es el único integrador, sino que existen otros genes integradores que promueven la floración “corriente abajo” de CO, uno de los cuales podría ser *TSF* (Yamaguchi *et al.*, 2005; Yoo *et al.*, 2005).

⊕ Si bien no puede descartarse que PFT1 sea un regulador negativo de los fitocromos (Wollenberg *et al.*, 2008), los datos obtenidos sugieren que esto no es lo que ocurre. Si PFT1 fuera un regulador negativo, se esperaría que al eliminar los fitocromos y PFT1 en las mutantes *phyD pft1-1*, *phyE pft1-1* y *phyD phyE pft1-1* las plantas florecieran más temprano que la mutante *pft1-1*. Esto no es lo que ocurrió, la combinación de las mutaciones de los fitocromos D y E con la mutación *pft1-1* presentó un fenotipo de floración tardío similar al de la mutante *pft1-1*. Estos resultados confirmarían que PFT1 es un promotor de la floración, en lugar de un regulador negativo de la vía de señalización de los fitocromos.

⊕ Estos experimentos no confirman que CO y PFT1 actúen por vías separadas para promover la floración. De ser así la doble mutante *co-9 pft1-1* debería florecer más tarde que sus parentales, observándose un efecto aditivo de estas mutaciones. Sin embargo, no se logró observar este efecto aditivo y la doble mutante *co-9 pft1-1* floreció más temprano que *co-9*. Es posible que el

tiempo de floración de la doble mutante *co-9 pft1-1* se encuentre subestimado debido a que las mutantes *co-9 pft1-1* no crecen en forma adecuada y su mortalidad es alta al momento de florecer. Por lo tanto, es probable que las plantas que sobreviven y se utilizan en los experimentos de floración sean las que florecen más temprano, lo cual puede haber introducido un sesgo en estas condiciones.

II) Los fitocromos B, D y E podrían regular negativamente a FT y TSF por un mecanismo parcialmente independiente de CO

A fin de estudiar la estabilidad de la proteína CO se clonó el ADNc de CO en un vector binario (CHF5), de forma tal de obtener la secuencia codificante de CO bajo un promotor constitutivo, 35S y con la etiqueta HA en el C-terminal de la proteína, 35S::CO:HA. Se obtuvieron plantas transgénicas homocigotas que contienen la inserción de T-DNA en un sólo *locus*. Todas las líneas se generaron en el contexto salvaje (Col) y mostraron un fenotipo de floración muy temprano (Figura 5), característico de la sobreexpresión de CO, lo cual demuestra que la fusión 35S::CO:HA es funcional *in vivo*.

Para analizar cómo se ve afectada la estabilidad de la proteína CO por los fitocromos B, D y E, una de estas líneas transgénicas sobreexpresantes de CO (35S::CO:HA) se cruzó con la mutante *phyB phyD phyE ft-10*. Este análisis se realizó en el contexto de la mutante *ft-10* para retrasar la floración ya que en el contexto Col las plantas florecen con 5-6 hojas, lo cual dificulta la obtención de buena cantidad de semillas y de material vegetal. Se intentó analizar y comparar los niveles de CO en extractos proteicos nucleares de plántulas *phyB ft-10 35S::CO:HA*, *phyB phyD phyE ft-10 35S::CO:HA*, *phyD phyE ft-10 35S::CO:HA*, *ft-10 35S::CO:HA*. Sin embargo, tras varias pruebas no pudo obtenerse cantidad de proteína suficiente para su detección por *Western blot* utilizando el anticuerpo anti-HA. Estos resultados concuerdan con lo observado por otros grupos, en las líneas sobreexpresantes de CO la activación de FT es alta, pero los niveles de proteína CO son muy bajos y difíciles de detectar. Existen pocos trabajos en los que logran detectar la proteína CO y en estos casos los *Western blot* presentados dejan entrever las dificultades que presenta la detección de la proteína (Valverde *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2008).

Dadas las dificultades mencionadas para la detección de la proteína CO, se decidió realizar experimentos de floración con las plantas que contienen las combinaciones de los fitocromos junto con la sobreexpresión de CO (Figuras 5 y 6a). Como puede observarse en la Figura 5, comparando el tiempo de floración de *phyB phyD phyE ft-10* con el de *phyB phyD phyE ft-10 35S::CO:HA*, la sobreexpresión de CO en ausencia de los fitocromos y de FT no produce efecto en el tiempo de

floración. Una posibilidad es que el ARNm de *CO* se encuentre saturado en estas condiciones, con lo cual, el rol principal de los fitocromos B, D y E sería reprimir la expresión de *CO* a nivel de ARNm y no promover la degradación de la proteína *CO*. Otra posibilidad sería que para que la sobreexpresión de *CO* tenga un efecto en la floración en ausencia de los fitocromos B, D y E sea necesario que *FT* se encuentre activo.

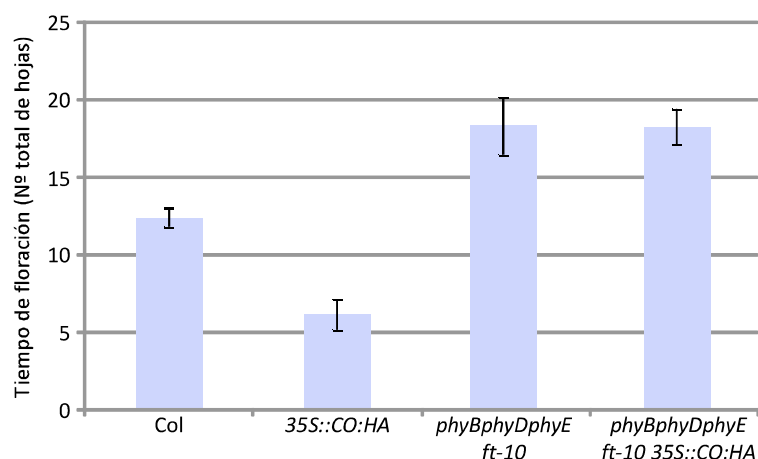


Figura 5. En ausencia de los fitocromos B, D y E y de FT la sobreexpresión de *CO* no produce efecto en el tiempo de floración

Determinación del tiempo de floración de una línea transgénica sobreexpresante de *CO* y de su combinación con la mutante de los fitocromos B, D y E y FT. Se midió el número total de hojas al momento de la floración (hojas de la roseta + hojas caulinares) de plantas cultivadas en DL a 23°C. Las barras representan la media $\pm$ ES de al menos 10 plantas por cada genotipo.

Se analizó el tiempo de floración de las distintas combinaciones de las mutaciones de los fitocromos con la sobreexpresión de *CO* (Figura 6a). En presencia de los fitocromos B, D y E se observó un aumento en el tiempo de floración, lo cual podría estar correlacionado con una disminución de los niveles de proteína *CO*. Al eliminar los fitocromos, se observó que el fitocromo B es el que presenta un mayor efecto en el tiempo de floración, nuevamente para observar los efectos de los fitocromos D y E fue necesario eliminarlos junto con el fitocromo B. Estos resultados refuerzan la idea de que existe una jerarquía en el accionar de los fitocromos y que hay algún mecanismo independiente de FT.

Los resultados mostrados en la Figura 4 indican que *FT* no es el único gen integrador y que existen otros genes capaces de promover la floración “corriente abajo” de *CO*. Sin embargo, existen controversias al respecto en la bibliografía (Yoo *et al.*, 2005). Para tratar de explicarlo, se introdujo

por cruzamiento la mutación *TSF* (*tsf-1*: SALK_087522) de modo tal de obtener la planta mutante para *FT* y *TSF* y sobreexpresante de *CO* y analizar su tiempo de floración (Figura 6b).

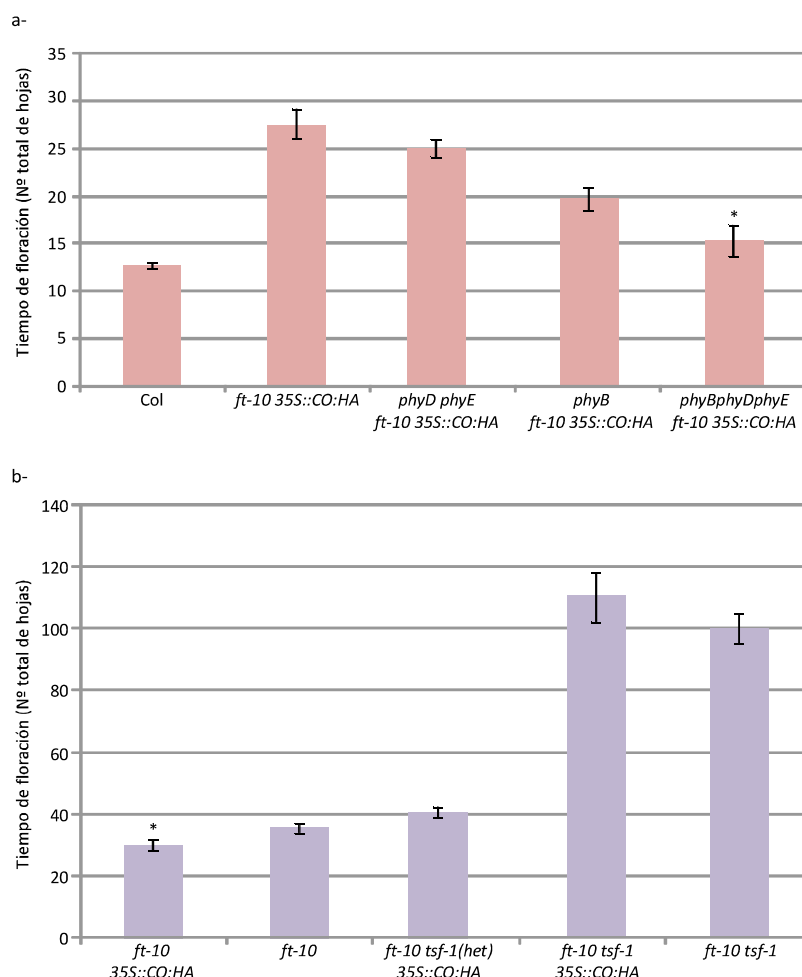


Figura 6. FT parece ser el principal efector de la vía fotoperiódica con una contribución marginal de TSF

Se midió el número total de hojas al momento de la floración (hojas de la roseta + hojas caulinares) de plantas cultivadas en DL a 23°C. Las barras representan la media $\pm$ ES de: (a) al menos 8 plantas por genotipo, (b) al menos 15 plantas por genotipo. a- *Indica que *phyB phyD phyE ft-10 35S::CO:HA* floreció estadísticamente más temprano que *phyB ft-10 35S::CO:HA* ($p < 0,05$), que *phyD phyE ft-10 35S::CO:HA* ($p < 5 \times 10^{-6}$) y que *ft-10 35S::CO:HA* ($p < 3 \times 10^{-5}$), por T-Test. b- * Indica que *ft-10 35S::CO:HA* floreció estadísticamente más temprano que *ft-10* ($p < 0,03$) y que *ft-10 tsf-1 35S::CO:HA* ($p < 1,4 \times 10^{-10}$), por T-Test. Las plantas *ft-10 tsf-1(het)35S::CO:HA* presentan la mutación *tsf-1* en heterocigosis. Cada experimento se repitió obteniéndose resultados similares.

Existen al menos tres trabajos publicados que aportan antecedentes al análisis de los resultados obtenidos. En el primero de ellos Yamaguchi *et al.* (2005) describe a *TSF* como un nuevo miembro de los genes integradores de la floración, que promueve la floración en forma redundante

a *FT* pero hace una contribución diferente en DC. Tanto *FT* como *TSF* se expresan en el floema, pero *TSF* se encuentra principalmente en hipocotilo y *FT* en cotiledones y hojas. En ese trabajo se demostró que *TSF* se induce rápidamente luego de la activación de *CO*. Además, los niveles de ARNm de *TSF* mostraron un patrón de oscilación diurno y una respuesta al fotoperíodo similar a *FT*, un pico de expresión al final del día y mayores niveles en DL que en DC. *FT* y *TSF* actuarían en forma independiente el uno del otro y de *LFY* y “corriente arriba” de *SOC1*.

En un segundo trabajo, Yoo *et al.* (2005) analiza el accionar de *CO* sobre los genes integradores *FT* y *SOC1* utilizando el alelo nulo de *ft*, *ft-10*. Anteriormente, se había descrito que *FT* y *SOC1* actuaban en forma paralela “corriente abajo” de *CO* realizando un análisis genético con el alelo débil *ft-1* (Samach *et al.*, 2000). En este trabajo (Yoo *et al.*, 2005) los autores utilizaron el alelo nulo de *ft* y encontraron que *ft-10* suprime completamente el fenotipo de floración temprana de las plantas sobreexpresantes de *CO*, mientras que *soc1-2* fue capaz de suprimir sólo parcialmente este fenotipo. Con estos resultados, los autores proponen a *FT* como el gen principal que actúa “corriente abajo” de *CO* y que *CO* es capaz de activar a *SOC1* a través de *FT* para promover la floración en *Arabidopsis*. Sin embargo, durante este trabajo no se analizó el efecto de *TSF* en la regulación de la floración “corriente abajo” de *CO*.

En un tercer trabajo, (Jang *et al.*, 2009), utilizando alelos nulos de *ft* y *tsf*, demostraron que *TSF* es parcialmente redundante a *FT* en DL, dado que su efecto en la floración es más pronunciado en el *background ft-10*. Sin embargo, en DC la doble mutante *ft-10 tsf-1* floreció de forma similar a las plantas del tipo salvaje o a las simples mutantes, lo cual indica que *FT* y *TSF* tienen poco efecto en la promoción de la floración en DC.

Para analizar la contribución de *FT* y *TSF* en la promoción de la floración “corriente abajo” de *CO*, Jang *et al.* (2009) construyeron un transgén *SUC2::CO* que sobreexpresa *CO* en las células acompañantes del floema y lo introdujeron en plantas *ft-10* y *ft-10 tsf-1*. En forma similar a los resultados obtenido en esta Tesis, las plantas *SUC2::CO ft-10* florecieron más temprano que las mutantes *ft-10* tanto en DL como en DC, pero significativamente más tarde que las plantas *SUC2::CO*. Por lo tanto, *FT* hace una contribución importante al fenotipo de floración temprano de *SUC2::CO* pero, en ausencia de *FT*, *SUC2::CO* puede aún promover la floración. Al analizar los niveles de ARNm de *TSF*, encontraron que los niveles se encontraban 24 veces más elevados en las plantas *SUC2::CO ft-10* que en las del tipo salvaje, lo cual es consistente con la idea de que *TSF* promueve la floración en *SUC2::CO ft-10*. Además, los niveles de ARNm de *TSF* fueron 2,5 veces mayores en *SUC2::CO ft-10* que en *SUC2::CO*, lo cual sugiere que altos niveles de *FT* pueden reducir la transcripción de *TSF* en *SUC2::CO*. Al analizar el tiempo de floración de las plantas *SUC2::CO ft-10 tsf-1* los autores encontraron que éstas florecen con el mismo número de hojas que las mutantes *ft-10*

tsf-1. También demostraron analizando los niveles de expresión de *SOC1* que *FT* y *TSF* no son esenciales para la expresión de *SOC1* en las hojas de las plantas del tipo salvaje.

A partir del análisis de los resultados obtenidos en la Figura 6b puede observarse que las plantas *ft-10 35S::CO:HA* florecen significativamente más temprano que las mutantes *ft-10*. Sin embargo, el efecto de la sobreexpresión de *CO* en ausencia de *FT* es pequeño en comparación con el efecto que produce la sobreexpresión de *CO* en las plantas Col (Figura 5). No obstante, las plantas *ft-10 tsf-1 35S::CO:HA*, florecieron muy tarde, presentando un tiempo de floración muy tardío similar al de la doble mutante *ft-10 tsf-1*. Además, al analizar el tiempo de floración de plantas con la mutación *TSF* en heterocigosis se observó un tiempo de floración intermedio. Estos resultados indican que *TSF* podría estar respondiendo a otros estímulos independientemente de *CO*, con lo cual el rol principal de *TSF* no parece ser responder a *CO*, siendo su respuesta al fotoperíodo minoritaria.

Por lo tanto, *CO* estaría actuando vía *TSF*, pero esta no es su contribución mayoritaria. *FT* sería el efector principal de la vía del fotoperíodo con una contribución marginal de *TSF* (Figura 6b).

Como se determinó en los experimentos mostrados en la figura 4, la ausencia de los fitocromos B, D y E tiene un efecto importante en el tiempo de floración en ausencia de *FT*. Además, se observó que este efecto sigue siendo importante cuando se sobreexpresa *CO*, ya que *phyB phyD phyE ft-10 35S::CO:HA* floreció más temprano que *ft-10 35S::CO:HA* (Figura 6a). Lo mismo ocurrió con *TSF*, la ausencia de *TSF* retrasa el tiempo de floración de *ft-10 tsf-1 35S::CO:HA* y hace nulo el efecto de la sobreexpresión de *CO*. Estos resultados sugieren que los fitocromos B, D y E podrían regular negativamente a *FT* y *TSF* por un mecanismo parcialmente independiente de *CO*. Esta hipótesis concuerda con que las plantas *phyB phyD phyE co-9* florecieron más temprano que *co-9* (Figura 4), es decir, en ausencia de los fitocromos no existe una regulación negativa sobre *FT* y *TSF* y estos genes integradores son capaces de promover la floración aún en ausencia de *CO*.

III) PFT1 promueve la expresión de *CO* y *FT*

i) Obtención de versiones inducibles de PFT1

Con la finalidad de estudiar a los genes regulados por PFT1 se generaron versiones inducibles de PFT1 fusionando su clon genómico al dominio de unión a glucocorticoide de rata (GR). Las fusiones al GR resultaron útiles para generar versiones inducibles de factores de transcripción (Simon *et al.*, 1996; Aoyama & Chua, 1997; Samach *et al.*, 2000; Wagner *et al.*, 2004). Las proteínas

que presentan esta fusión permanecen en el citoplasma y sólo se movilizan al núcleo cuando se agrega un glucocorticoide, dexametasona (DEX). La etiqueta GR posee 288 aminoácidos y se subclonó en un sitio EcoRI generado en el clon genómico de *PFT1* justo antes del ATG o justo antes del codón STOP, de forma tal que la etiqueta se encuentre fusionada al N-terminal de PFT1 o al C-terminal de PFT1 manteniendo el marco de lectura. Estas construcciones se obtuvieron en vectores binarios, que permiten su replicación tanto en *E. coli* como en *A. tumefaciens*. Se obtuvieron plantas transgénicas de *Arabidopsis* transformando plantas mutantes *pft1-1* con la fusión *GR:PFT1g* y *PFT1g:GR*. Sólo las fusiones al C-terminal resultaron activas *in vivo* y fueron capaces de complementar el fenotipo de floración tardía de la mutante *pft1-1* al ser incubadas en presencia de DEX (Figura 7). En ausencia de DEX, las plantas transgénicas *pft1-1 PFT1g:GR* presentaron el fenotipo de floración tardía de la mutante *pft1-1*. Sin embargo, al agregar el glucocorticoide al medio de cultivo las plantas recuperaron el fenotipo normal de las hojas y se aceleró su tiempo de floración, floreciendo aún más temprano que el control tipo salvaje. Por lo tanto, en presencia de DEX, PFT1 se estaría traslocando al núcleo y activando la floración.

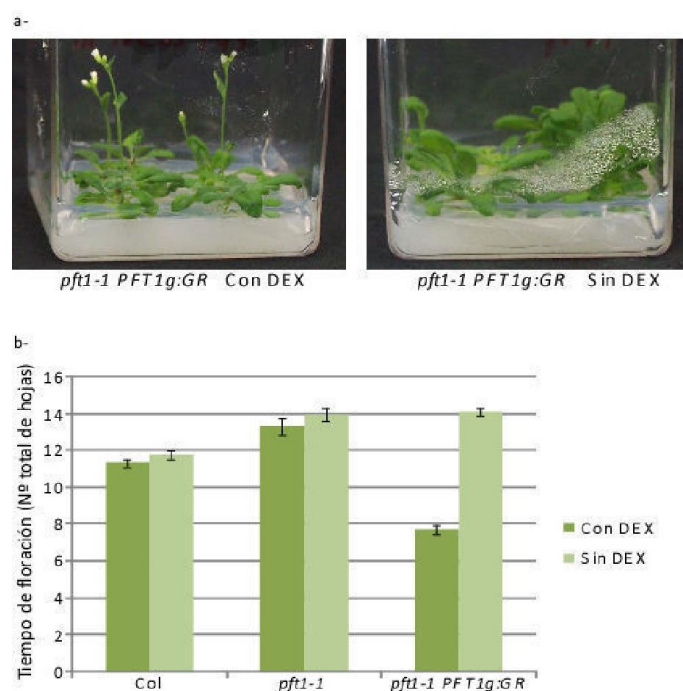


Figura 7. La fusión PFT1:GR es activa en presencia de dexametasona

a- Plantas cultivadas en medio de cultivo MS con DEX 1 μ M. Como control se agregó una solución de etanol 0,0096% v/v al medio MS (Sin DEX). b- Se midió el número total de hojas al momento de la floración (hojas de la roseta + hojas caulinares) de plantas cultivadas en DL a 23°C en medio MS +/- DEX 1 μ M. Las barras representan la media +/- ES de al menos 21 plantas de cada genotipo para cada condición de crecimiento.

De la misma forma se obtuvieron también plantas transgénicas mutantes *pft1-1* que llevan el clon genómico de *PFT1* fusionado a la etiqueta GR-HA. Esta etiqueta se generó fusionando en el mismo marco de lectura la etiqueta GR con la etiqueta HA, que contiene el epítipo de hemaglutinina del virus de influenza humana. Esta etiqueta deriva de los aminoácidos 98 a 106 de la molécula de HA y consiste en tres epítopos de HA separados por aminoácidos espaciadores, con un tamaño total de 50 aminoácidos. Esta fusión se generó en el C-terminal y permite realizar experimentos de inducción de PFT1 y a su vez detectar la proteína por *Western blot*, utilizando anticuerpos comerciales contra la etiqueta HA, o inmunoprecipitarla. Las plantas transgénicas *pft1-1 PFT1g:GR-HA* en presencia de DEX recuperaron el fenotipo de floración normal, floreciendo incluso más temprano que las plantas del tipo salvaje (Col), al igual que las plantas *pft1-1 PFT1g:GR*.

ii) La traslocación de PFT1 al núcleo promueve un incremento en los ARNm de *CO* y *FT*

Se utilizaron las líneas transgénicas *pft1-1 PFT1g:GR* para medir la expresión de los genes regulados por PFT1. Para ello se cultivaron plántulas durante 8 días en luz continua (LC) a 23°C. Durante el día 8 se rociaron las plántulas con solución de DEX 1 μ M o con una solución de etanol 0,0096% v/v cada una hora y se colectaron muestras luego de 3 horas de comenzada la inducción. Se extrajo ARN total de las plántulas tratadas y no tratadas con DEX y se analizaron los niveles de ARNm de *CO* y *FT* por RT-PCR cuantitativa (Figura 8). En las plántulas tratadas con DEX aumentó significativamente la expresión de *FT* y *CO* respecto del control, lo cual sugiere que PFT1 regula la expresión de *FT* y *CO*, ya sea en forma directa o indirecta y que su expresión se induce tan sólo luego de tres horas de iniciado el tratamiento.

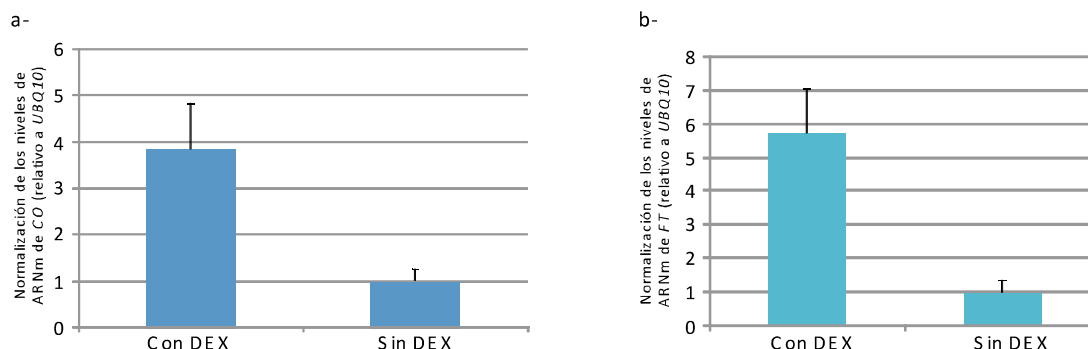


Figura 8. PFT1 regula la expresión de CO y FT

Medición de los niveles de ARNm de CO (a) y FT (b) relativo a la expresión de UBQ10 de plántulas *pft1-1 PFT1g:GR* por qRT-PCR. Plántulas cultivadas en LC a 23°C por 8 días. Durante el día 8 se comenzó el tratamiento con DEX 1 μ M o con etanol 0,0096% v/v (control: sin DEX), rociando las plántulas cada 1 hora. Se cosecharon muestras luego de 3 horas de comenzada la inducción y se extrajo ARN total. Las barras representan la media $\pm$ ES de 6 muestras independientes para cada tratamiento, todas ellas analizadas por triplicado. Las medias de las plántulas tratadas con DEX son estadísticamente diferentes de las no tratadas con (a) $p < 0,02$ y (b) $p < 0,0065$ por T-Test. El experimento se repitió obteniéndose resultados similares.

IV) ¿Podría PFT1 jugar un rol en la respuesta a la temperatura?

La mutación *pft1-1* suprime el fenotipo de floración temprana de las mutantes *phyB* (Cerdán & Chory, 2003) y el mismo efecto se observa cuando las plantas son cultivadas a temperaturas subóptimas (16°C) (Halliday *et al.*, 2003). Además, se sabe que en las mutantes *phyB* cultivadas a bajas temperaturas se encuentra exagerada la respuesta a estrés por frío (Franklin & Whitelam, 2007) y en nuestro laboratorio se observó que las mutantes *phyB* no presentan el mismo alargamiento de hipocotilo cuando son cultivadas a 16° y 23°C.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se decidió analizar si PFT1 podría tener un rol en la respuesta de las plantas a la temperatura de crecimiento. Para esto se realizó un experimento de floración cultivando las plantas en condiciones de DL a diferentes temperaturas: 16°C, 18°C, 20°C, 22°C y 24°C. Se estudió el efecto de la temperatura en el tiempo de floración de las plantas de los siguientes genotipos: *phyB*, *pft1-1*, *phyB pft1-1*, *pft1-1 PFT1g:GR* cultivadas en presencia y en ausencia de DEX, una línea transgénica sobreexpresante de *PFT1* (Col *PFT1 OX*) y Col (Figura 9). En todos los casos se observó que el tiempo de floración se retrasó cuando las plantas se cultivaron a temperaturas más bajas. Sin embargo, se observó un bajo efecto de la temperatura en el tiempo de floración de las plantas sobreexpresantes de *PFT1* y de la línea transgénica *pft1-1 PFT1g:GR* tratada con DEX. Por lo tanto, la sobreexpresión de *PFT1*, no sólo acelera el tiempo de floración sino que suprime en buena medida el efecto de la temperatura en la regulación de la floración, haciendo a las

plantas insensibles a la temperatura de crecimiento. En ausencia de DEX, las plantas *pft1-1 PFT1g:GR* presentaron un tiempo de floración similar al de las mutantes *pft1-1* en todas las temperaturas analizadas. Estos datos sugieren que PFT1 podría alterar la respuesta a la calidad de luz modificando la sensibilidad a la temperatura.

Las dobles mutantes *phyB pft1-1* mostraron un tiempo de floración menor al de la mutante *pft1-1* en todas las condiciones analizadas, tanto en estos experimentos como en los de la Figura 4. Estos resultados no concuerdan con lo observado en otros estudios (Cerdán & Chory, 2003; Wollenberg *et al.*, 2008) y aún no hemos determinado las causas de estas diferencias. No obstante, los resultados mostrados en la Figura 9 indican que esta diferencia observada en los tiempos de floración no se debe a un efecto de la temperatura de crecimiento.

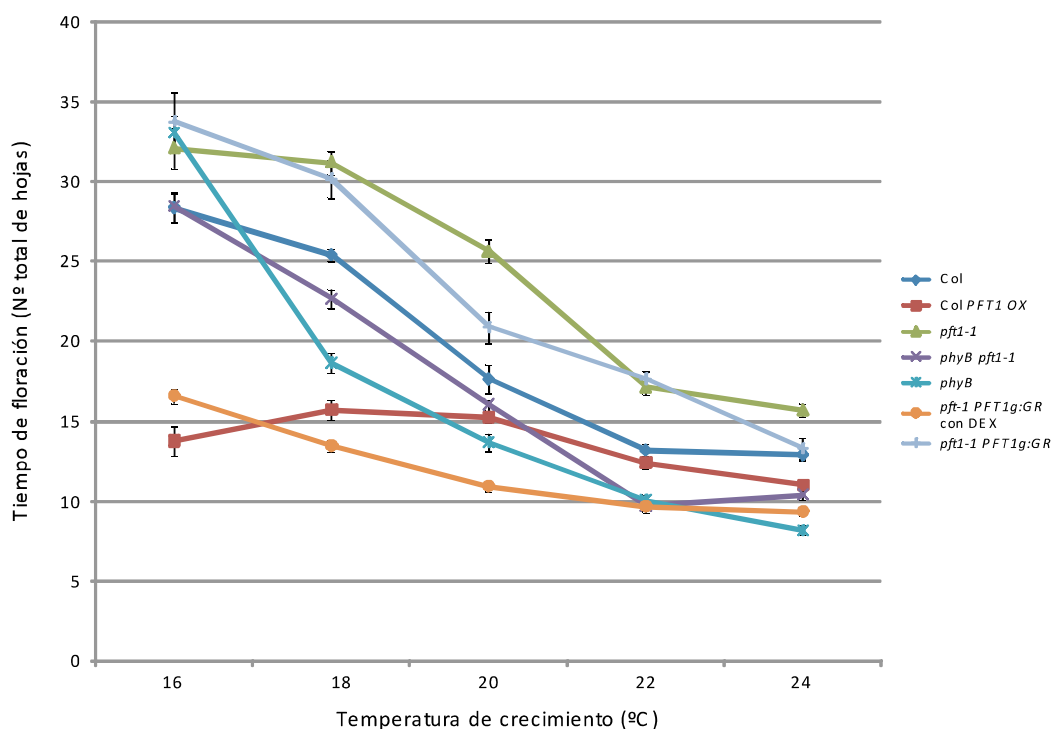


Figura 9. La sobreexpresión de *PFT1* suprime el efecto de la temperatura en la regulación de la floración

Se midió el número total de hojas al momento de la floración (hojas de la roseta + hojas caulinares) de plantas cultivadas en DL a 16, 18, 20, 22 o 24°C. Cada punto representa la media $\pm$ ES de cada genotipo a la temperatura de crecimiento indicada de al menos 8 plantas para cada genotipo en cada temperatura de crecimiento.

V) PFT1 es capaz de promover la floración en forma independiente de CO

Con la finalidad de separar el accionar de CO y el de PFT1 en la regulación de la floración y determinar si PFT1 puede regular la floración en forma independiente de CO, se utilizaron las líneas transgénicas que presentan la fusión inducible de PFT1, *pft1-1 PFT1g:GR*, y se les introdujo por cruzamiento la mutación nula *co-9*. De esta forma, luego de varias generaciones se obtuvieron las plantas *co-9 pft1-1 PFT1g:GR*. Estas plantas al ser cultivadas en ausencia de DEX son mutantes para *PFT1* y para *CO*, pero al tratarlas con el glucocorticoide, PFT1 se activa. Sí aún en ausencia de *CO*, PFT1 es capaz de promover la floración, esto significaría que PFT1 puede regular la floración en ausencia de CO, por un mecanismo independiente. Para determinarlo, se analizó el tiempo de floración de las plantas *co-9 pft1-1 PFT1g:GR* cultivadas en presencia y en ausencia de DEX (Figura 10). Como puede observarse, al incubarlas en presencia de DEX las plantas *co-9 pft1-1 PFT1g:GR* florecen significativamente más temprano que en ausencia de DEX. Por lo tanto, en presencia del glucocorticoide, PFT1 se trasloca al núcleo y es capaz de promover la floración aún en ausencia de *CO*.

Para determinar si PFT1 promueve la floración sólo a través del gen integrador *FT* o si puede hacerlo a través de otros integradores, se introdujo por cruzamiento la mutación nula *ft-10* en las líneas transgénicas *pft1-1 PFT1g:GR*, obteniéndose plantas *ft-10 pft1-1 PFT1g:GR*. Nuevamente, se analizó el tiempo de floración de estas plantas cultivadas en presencia y en ausencia de DEX (Figura 10). Como puede observarse aún en ausencia de *FT*, PFT1 es capaz de promover la floración en presencia de DEX. Estos resultados indican que PFT1 no actúa sólo vía *FT* sino que puede hacerlo a través de otros genes integradores, uno de los cuales podría ser *TSF*.

El experimento mostrado en la Figura 10 corresponde a plantas cultivadas *in vitro* en medio de cultivo MS suplementado con DEX 1 µM o etanol 0,0096% v/v, cultivadas en condiciones de LC a 23°C. Se intentó realizar este mismo experimento en tierra rociando las plantas con una solución de DEX día de por medio pero se obtuvo mucha variabilidad en los resultados de los genotipos de floración tardía. Las mutantes *pft1-1* son susceptibles a ciertos tipos de patógenos (Kidd *et al.*, 2009; Kidd *et al.*, 2010) y son difíciles de cultivar. La mutación *pft1-1* combinada con la mutación *co-9* o *ft-10* en las plantas cultivadas en ausencia de DEX produce que las plantas florezcan muy tarde. Esto ocasiona una alta mortandad de las plantas y una mayor variabilidad en su tiempo de floración que parece depender mayormente de la susceptibilidad a los patógenos. Cultivando las plantas *in vitro* y manteniendo las condiciones de esterilidad se logró cultivar las plantas en ausencia de patógenos y determinar el número total de hojas al momento de la floración de cada uno de los genotipos. El

tiempo de floración de las plantas cultivadas *in vitro* es bastante menor que el de las plantas cultivadas en tierra, esto puede deberse a que en esta condición se encuentre activada alguna vía promotora de la floración. Sin embargo, en estas condiciones de cultivo, la mutación *ft-10* presentó un tiempo de floración mucho más retrasado que el resto de los genotipos, floreciendo incluso más tarde que las mutantes *co-9*. Por lo tanto, si en estas condiciones se encuentra activa otra vía promotora de la floración, es probable que esta vía requiera a *FT* y no a *CO*, lo cual es consistente con que *FT* es un gen integrador de la floración.

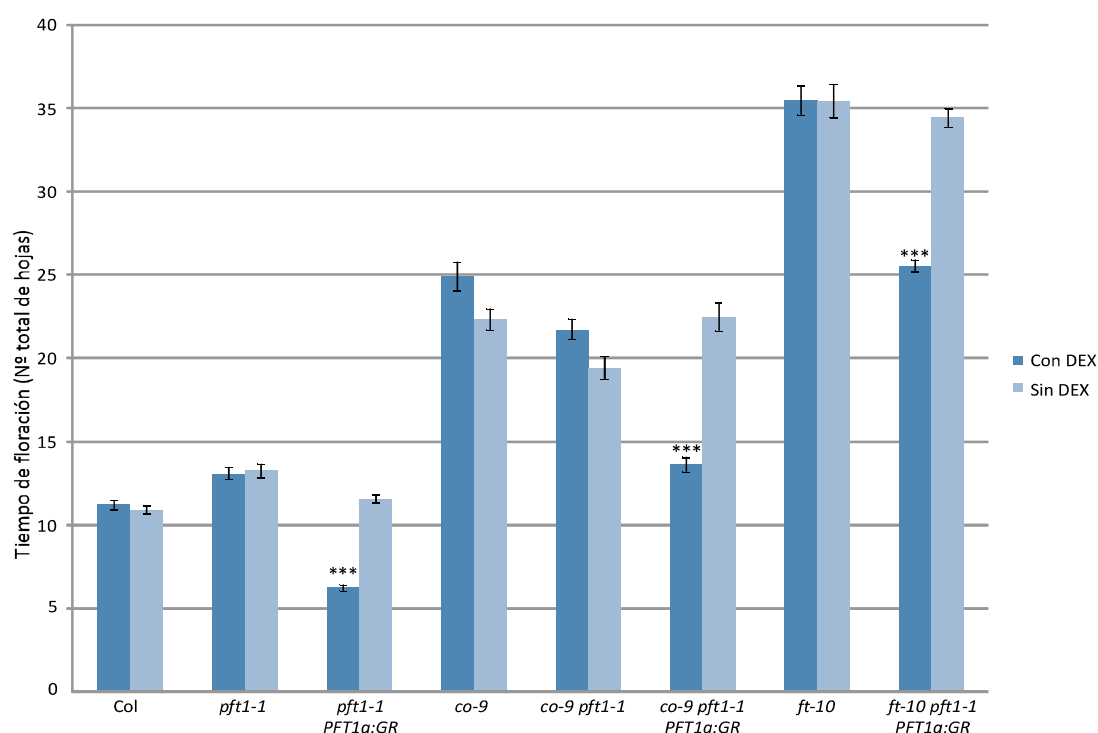


Figura 10. PFT1 promueve la floración independientemente de CO y no sólo a través de FT

Se midió el número total de hojas al momento de la floración (hojas de la roseta + hojas caulinares) de plantas cultivadas en LC a 23°C en medio de cultivo MS +/- DEX 1 µM. Las barras representan la media +/-ES de al menos 35 plantas por cada genotipo para cada condición de crecimiento. * Indica que las medias de las plantas cultivadas en presencia de DEX son estadísticamente diferentes del control con $p < 4 \times 10^{-16}$ por T-Test.

DISCUSIÓN

El objetivo general de este trabajo fue separar la vía del fotoperíodo de la vía de calidad de luz en la regulación de la floración y en particular el accionar de CO y PFT1.

Regulación de la floración “corriente abajo” de los fitocromos

Se utilizaron combinaciones de múltiples mutantes de los fitocromos involucrados en regular la floración por calidad de luz (phyB, phyD y phyE) con mutaciones nulas de los genes *CO*, *PFT1* y *FT* para determinar cómo afecta la mutación de cada uno de estos genes a la regulación de la floración mediada por los fitocromos. Tal como se esperaba, de acuerdo a lo publicado en otros trabajos, phyB resultó ser el fitocromo más importante en la percepción de los cambios de calidad de luz (Figura 4), (Halliday *et al.*, 2003). Los efectos de los fitocromos D y E en la regulación de la floración fueron mucho más suaves, sólo notorios en ausencia de phyB (Franklin *et al.*, 2003) y el efecto de phyD resultó mucho menor que el de phyE. Por lo tanto, existe una jerarquía en el sentido de que phyB es el fotorreceptor principal involucrado en regular esta respuesta y phyD y phyE poseen roles secundarios.

En otras situaciones se ha observado que la temperatura puede alterar la jerarquía entre los fitocromos (Halliday & Whitelam, 2003; Heschel *et al.*, 2007; Donohue *et al.*, 2008), por lo tanto se decidió estudiar si *CO*, *PFT1* o *FT* podían afectar la fuerza relativa de las señales modificadas por phyB, phyD y phyE. Como la jerarquía se mantuvo en las mutantes *co-9*, *pft1-1* y *ft-10*, se concluye que los genes *PFT1*, *CO* y *FT* no alteran dicha jerarquía entre los fitocromos en la señalización de la calidad de luz.

Con estos experimentos de floración (Figura 4), se demostró también que *FT* no es el único gen integrador de la vía de calidad de luz. Comparando el tiempo de floración de las mutantes *phyB phyD phyE co-9* con el de las mutantes *phyB phyD phyE ft-10* se observó que esta última mutante florece significativamente más temprano. En este caso, CO se encuentra activo y estaría promoviendo la floración a través de otro gen integrador, el cual podría ser *TSF* (Yamaguchi *et al.*, 2005).

A partir del análisis del tiempo de floración de las combinaciones de mutantes de *phyD* y *phyE* con *pft1-1*, se determinó que PFT1 no es un regulador negativo de la señalización de los fitocromos. Si PFT1 se encontrara regulando negativamente esta vía, las mutantes *phyD pft1-1*, *phyE pft1-1* y *phyD phyE pft1-1*, deberían florecer más temprano que las mutantes *pft1-1*. Sin embargo, estas mutantes presentan un fenotipo de floración tardío similar al de las mutantes *pft1-1*. Estos

resultados concuerdan con un rol de PFT1 en la activación de la floración (Cerdán & Chory, 2003), en lugar de posicionarlo como un regulador negativo del accionar de los fitocromos (Wollenberg *et al.*, 2008).

Por último, del análisis de estos experimentos se desprende que existen al menos dos vías de señalización génica involucradas en regular la floración “corriente abajo” de los fitocromos. Es decir, la regulación de la floración no ocurre sólo vía CO o sólo vía PFT1. Al eliminar cualquiera de estos dos genes junto con los tres fitocromos (B, D y E), las plantas florecieron más temprano que cuando los fitocromos se encontraban presentes; con lo cual, tanto en ausencia de CO, como en ausencia de PFT1, existe otra vía capaz de promover la floración “corriente abajo” de los fitocromos. No obstante, estos resultados preliminares, no permiten discriminar si CO y PFT1 actúan por vías separadas o si son parte de una misma vía genética y existe otra vía independiente.

Los fitocromos B, D y E estarían regulando negativamente a FT y TSF por un mecanismo independiente de CO

Se utilizaron combinaciones de mutantes de los fitocromos B, D y E en el *background* mutante *ft-10* junto con la sobreexpresión de CO (35S::CO:HA) para realizar experimentos de floración. Se observó que la sobreexpresión de CO en ausencia de los fitocromos y de FT no produce un efecto en el tiempo de floración (Figura 5). Estos resultados pueden explicarse si el ARNm de CO se encuentra saturado en estas condiciones o si en ausencia de los fitocromos B, D y E, CO requiere que FT se encuentre activo para promover la floración.

Al analizar distintas combinaciones de mutantes de los fitocromos con la sobreexpresión de CO, se observó que al eliminar los fitocromos se produce una aceleración del tiempo de floración (Figura 6a) y nuevamente se observó que phyB tiene un papel principal en este proceso, los efectos de los fitocromos D y E sólo se observaron al eliminarlos junto con el B.

Al introducir por cruzamiento la mutación *tsf-1* en las plantas *ft-10 35S::CO:HA*, se observó que las plantas dobles mutantes *ft-10 tsf-1* sobreexpresantes de CO presentaron un fenotipo de floración muy retrasado (Figura 6b), es decir, la ausencia de TSF retrasa el tiempo de floración de *ft-10 tsf-1 35S::CO:HA* y hace nulo el efecto de la sobreexpresión de CO. Además, como la ausencia de los fitocromos B, D y E tiene un efecto importante en el tiempo de floración en ausencia de FT (Figura 6a), los fitocromos B, D y E podrían regular negativamente a FT y TSF por un mecanismo parcialmente independiente de CO.

Dado que el efecto de la sobreexpresión de *CO* en ausencia de *FT* es pequeño comparado con el efecto que produce la sobreexpresión de *CO* en Col, TSF estaría regulando la floración por un mecanismo independiente del fotoperíodo y su rol principal no sería responder a *CO*.

Por lo tanto, *FT* parece ser el efector principal de la vía del fotoperíodo actuando “corriente abajo” de *CO*, y TSF produce una contribución minoritaria en esta vía (Figura 6b).

En un trabajo reciente se propone que las citoquininas promueven la floración en forma independiente de *FT*, a través de la activación transcripcional de *TSF* (D'Aloia *et al.*, 2011). La aplicación de N⁶-benzilaminopurina (BAP) fue capaz de promover la floración en plantas cultivadas en condiciones no inductivas de DC. El tratamiento con BAP no tuvo efecto en los niveles de ARNm de *FT* pero los niveles de ARNm de *TSF* aumentaron en las hojas. Además, se observó expresión de los ARNm de *SOC1* y *FD* en las hojas y en los ápices del tallo. Analizando el efecto de BAP en las mutantes nulas de los genes *FT*, *TSF*, *FD* y *SOC1*, se observó que las mutantes *tsf-1* y *soc1-2* no respondieron a BAP, mientras que la mutante *ft-10* fue capaz de formar flores luego de dos semanas de realizado el tratamiento. Por lo tanto, sólo TSF y SOC1 son esenciales para regular la floración en respuesta a citoquininas. Estos resultados sugieren que las diferencias en el control transcripcional de *FT* y *TSF* pueden ser necesarias para las respuestas en el control de la floración frente a diferentes condiciones ambientales o señales internas.

PFT1 regula la expresión de *CO* y *FT*

Se generó un sistema inducible por glucocorticoide fusionando el clon genómico de *PFT1* al receptor de glucocorticoide de rata (GR). Este sistema ha sido ampliamente utilizado para estudiar la actividad de factores de transcripción y analizar sus posibles genes blanco de acción (Simon *et al.*, 1996; Samach *et al.*, 2000; Wagner *et al.*, 2004). La aplicación de DEX activa las proteínas que contienen el dominio GR, permitiendo que la proteína de fusión se trasloque al núcleo. Se obtuvieron plantas transgénicas *pft1-1 PFT1g:GR* y estas fueron capaces de promover la floración cuando fueron incubadas en presencia de DEX. En ausencia del glucocorticoide las plantas presentaron un fenotipo de floración tardía similar al de las mutantes *pft1-1* (Figura 7). Estos resultados demuestran experimentalmente que PFT1 actúa en el núcleo para promover la floración.

Utilizando estas líneas inducibles por DEX, se analizó la expresión de los genes regulados por PFT1 en plantas tratadas y no tratadas con DEX. Se determinó que PFT1 es capaz de activar la expresión de *CO* y *FT* luego de tres horas de comenzado el tratamiento con DEX (Figura 8).

PFT1 activa la floración en forma independiente de CO y no sólo a través de FT

De acuerdo a los resultados mostrados en la Figura 4, existen al menos dos vías capaces de promover la floración “corriente abajo” de los fitocromos. A fin de determinar si estas dos vías son la vía de CO y la de PFT1, se introdujo por cruzamiento la mutación *co-9* en las plantas *pft1-1 PFT1g:GR*. En ausencia de DEX, estas plantas son mutantes de *CO* y mutantes de *PFT1*, pero al incubarlas con DEX PFT1 se vuelve activo. Se comparó el tiempo de floración de estas plantas cultivadas en presencia y en ausencia de DEX y se determinó que aún en ausencia de *CO*, PFT1 es capaz de promover la floración (Figura 10).

En forma análoga, se introdujo por cruzamiento la mutación *ft-10* en las plantas *pft1-1 PFT1g:GR* para determinar si PFT1 es capaz de activar la floración en ausencia de *FT*. Se comparó el tiempo de floración de estas plantas cultivadas en presencia y ausencia de DEX. Nuevamente, las plantas cultivadas en presencia de DEX florecieron más temprano (Figura 10). Por lo tanto, aún en ausencia de *FT*, PFT1 es capaz de promover la floración.

Los resultados indican que PFT1 es capaz de promover la floración por una vía genética independiente de CO y actúa no sólo a través del gen integrador *FT*. Una posibilidad es que PFT1, en ausencia de *FT*, se encuentre activando la floración vía *TSF*. Para testear esta hipótesis se cruzaron las plantas *ft-10 tsf-1* con las plantas *pft1-1 PFT1g:GR*, de forma tal de obtener las plantas *ft-10 tsf-1 pft1-1 PFT1g:GR*. Esta línea, a pesar de que es muy difícil de cultivar por su fenotipo de floración muy tardío, se encuentra bastante avanzada en el laboratorio y analizando su comportamiento en presencia de DEX se podrá determinar fehacientemente si PFT1 actúa o no vía *TSF*.

Con los resultados obtenidos en este trabajo, se puede plantear un modelo genético (Figura 11) que involucra una regulación negativa de los fitocromos B, D y E sobre el accionar de CO y PFT1. Estos dos genes se encontrarían regulando la floración por dos vías separadas. *CO* regula la floración en respuesta al fotoperíodo y a la calidad de luz, donde la proteína CO se encuentra estabilizada por phyA y cry2 (Turck *et al.*, 2008) pero desestabilizada por phyB (Valverde *et al.*, 2004) y posiblemente por phyD y phyE. Por otro lado, *PFT1* regularía la floración por la vía de calidad de luz y su actividad se encontraría antagonizada de alguna manera por los fitocromos B, D y E. Ambos genes, *CO* y *PFT1*, se integran a nivel de *FT* y *TSF* para promover la floración. FT y TSF se traslocan desde las células acompañantes del floema al meristema apical de tallo, donde interaccionan con FD y promueven la expresión de los genes de identidad del meristema apical (Turck *et al.*, 2008). Además, nuestros resultados indican que los fitocromos B, D y E podrían estar regulando negativamente a *FT* y *TSF* por una vía independiente de CO.

Cabe destacar que, a pesar de que la sobreexpresión de *CO* tiene efectos muy notorios sobre la floración, dichos efectos son dependientes de *FT*. Sin embargo, la inducción de *PFT1* no provoca un adelantamiento de la floración tan marcado pero es bastante más independiente de *FT*. Estos hechos son consistentes con el rol de *PFT1* como parte del complejo *MEDIATOR*, donde podría estar afectando la expresión de muchos genes además de *FT*, entre ellos *CO* y *TSF*. De hecho, con los resultados de inducción por glucocorticoide presentados en este trabajo, se observó una regulación transcripcional positiva de *PFT1* sobre *CO*. Es decir, *PFT1* es capaz de promover la floración en forma independiente de *CO*, pero también regula positivamente los niveles de ARNm de *CO*.

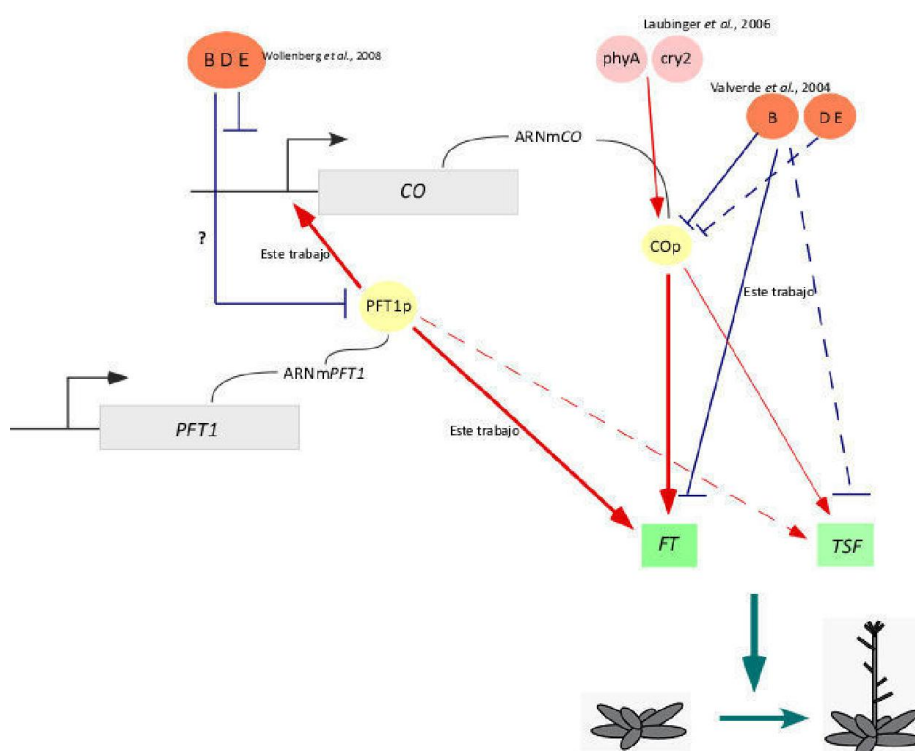


Figura 11. Separación del accionar de CO y PFT1 en la regulación de la floración

Mecanismos genéticos propuestos a partir de los resultados obtenidos en este trabajo y de trabajos publicados previamente (Cerdán & Chory, 2003; Halliday & Whitelam, 2003; Valverde *et al.*, 2004; Yamaguchi *et al.*, 2005; Laubinger *et al.*, 2006; Wollenberg *et al.*, 2008;). Las flechas rojas indican una activación de los genes. Las líneas azules indican una regulación negativa de los fitocromos B, D y E sobre los genes y las proteínas indicadas. Las flechas punteadas muestran mecanismos propuestos pero aún no corroborados. COp y PFT1p corresponden a las proteínas CO y PFT1, respectivamente.

Las plantas con mayores niveles de PFT1 son insensibles a la temperatura de crecimiento

Cuando las mutantes *phyB* son cultivadas a temperaturas subóptimas (16°C) se suprime su fenotipo de floración temprana (Halliday *et al.*, 2003). Este es el mismo efecto que produce una mutación en el gen *PFT1*, dado que las dobles mutantes *phyB pft1-1* suprimen el fenotipo de floración temprana de *phyB* (Cerdán & Chory, 2003). Además, en mutantes *phyB* cultivadas a bajas temperaturas se encuentra aumentada su tolerancia al frío (Franklin & Whitelam, 2007) y por datos obtenidos en nuestro laboratorio, se sabe que la temperatura modifica las repuestas mediadas por *phyB*, por ejemplo el alargamiento del hipocotilo. Teniendo en cuenta estos antecedentes, se decidió analizar si *PFT1* podría tener un rol en la regulación de la floración a temperaturas subóptimas. Para esto, se estudió principalmente el efecto de la temperatura en el tiempo de floración de una línea transgénica sobreexpresante de *PFT1* y de las líneas *pft1-1 PFT1g:GR* tratadas o no con DEX. No se observó efecto de la temperatura en el tiempo de floración de las plantas sobreexpresantes de *PFT1* y de las líneas transgénicas *pft1-1 PFT1g:GR* tratadas con DEX. Estas plantas suprimen el retraso en el tiempo de floración observado en las plantas cultivadas a bajas temperaturas, presentando un tiempo de floración más acelerado independientemente de la temperatura de crecimiento (Figura 9). Estos resultados son un indicio de que *PFT1* podría llegar a tener un efecto en la regulación de la floración por temperatura y que los efectos sobre la percepción de la calidad de luz podrían ser una consecuencia de alterar la respuesta a temperatura.

CAPÍTULO 2: Caracterización de proteínas que controlan la actividad de PFT1

INTRODUCCIÓN

Regulación de la floración por calidad de luz

Como se mencionó en el Capítulo 1, Cerdán & Chory (2003), describieron una vía de señalización involucrada en la regulación de la floración en respuesta a cambios en la calidad de luz. En este trabajo se describió genéticamente a *PFT1* y se definió que PFT1 actúa “corriente abajo” de phyB regulando la expresión de *FT*. Sin embargo, hasta el momento no existen evidencias que demuestren una regulación directa de phyB sobre PFT1.

PFT1 codifica para una proteína nuclear de 836 aminoácidos con un dominio vWF-A (Factor tipo *von Willebrand*) en su extremo amino terminal. El factor *von Willebrand* es una glicoproteína multimérica encontrada en el plasma sanguíneo. Los dominios vWF-A se encuentran distribuidos en todos los *phyla* y están involucrados en numerosos procesos celulares, tales como la transcripción, la reparación del ADN, el proteasoma y el transporte ribosomal y a través de membrana. Una característica particular de estos dominios es que forman parte de complejos multiproteicos. Además, muchos de ellos poseen un sitio de unión a cationes divalentes que puede mediar interacciones proteína-proteína (Ponting *et al.*, 1999; Hinshelwood & Perkins, 2000).

En la región C-terminal de PFT1 se encuentra una región rica en glutaminas. Estos dominios son componentes integrales de muchas proteínas involucradas en la regulación de la transcripción desde levaduras hasta humanos (Escher *et al.*, 2000).

Existen al menos tres evidencias que sugieren que PFT1 puede tener función de coactivador transcripcional. Posee una región rica en glutaminas, que se encuentra presente en muchos factores de transcripción, su localización es nuclear y es capaz de activar la transcripción en levaduras cuando es fusionado al dominio de unión a ADN de LexA (Cerdán & Chory, 2003). Todos estos indicios tomaron relevancia en junio de 2007 cuando se identificó a PFT1 como la subunidad 25 (AtMed25) del complejo MEDIATOR de *Arabidopsis thaliana* (Backstrom *et al.*, 2007).

Generalidades del complejo MEDIATOR

En eucariotas superiores una gran variedad de factores de transcripción de secuencia específica regula la expresión de miles de genes asegurando el desarrollo y el funcionamiento

adecuado de los organismos. La transcripción mediada por la ARN polimerasa II es un proceso elaborado de múltiples pasos que requiere un control fino del ensamblado del complejo de pre-iniciación y de más de 60 proteínas sobre el “core” del promotor. Estudios bioquímicos realizados en *Saccharomyces cerevisiae*, en mamíferos y en *Drosophila melanogaster* revelaron la existencia de un gran complejo multiproteico denominado MEDIATOR (1MDa) que juega un rol importante en este proceso. Este complejo actúa como puente entre los factores transcripcionales unidos a las regiones regulatorias de ADN y la maquinaria de iniciación de la ARN polimerasa II, de allí su nombre. El complejo MEDIATOR promueve el reclutamiento de la ARN polimerasa II, estabilizando el complejo transcripcional en el promotor (Taates, 2010).

El complejo MEDIATOR es incapaz de unirse directamente a elementos activadores (*enhancers*) o silenciadores (*silencers*) del ADN. Sin embargo, es capaz de interactuar físicamente con activadores y represores de la transcripción de genes específicos, con las subunidades de la ARN polimerasa II y con algunos factores generales de la transcripción (Bourbon, 2008). El estado de fosforilación del dominio C-terminal de la ARN polimerasa II tiene un papel importante en la interacción entre la polimerasa de levaduras y el MEDIATOR. La forma no fosforilada de la ARN polimerasa II se asocia con la unión al promotor y el complejo de iniciación de la transcripción, mientras que la forma fosforilada es responsable de la elongación activa. El complejo MEDIATOR interactúa directamente con la forma no fosforilada, lo cual explica la disociación de la ARN polimerasa II del complejo MEDIATOR observada al comenzar la elongación transcripcional (Bjorklund & Gustafsson, 2005).

La estructura 3D del complejo purificado de *S. cerevisiae* muestra que está formado por 21 subunidades distribuidas en tres módulos denominados “cabeza”, “medio” y “cola”, que rodean a la ARN polimerasa. El módulo de la “cola” incluye las subunidades Med2, Med3, Med5, Med14, Med15 y Med16, muchas de las cuales interactúan directamente con activadores y represores transcripcionales de unión a ADN. El módulo “medio” contiene las subunidades Med1, Med4, Med7, Med9, Med10, Med21 y Med31, interactúa directamente con la región C-terminal de la ARN polimerasa II y sería capaz de transferir las señales regulatorias provenientes de activadores y represores al módulo “cabeza”, a la ARN polimerasa II y a los factores generales de transcripción. El módulo “cabeza” comprende las subunidades Med6, Med8, Med11, Med17, Med18, Med19, Med20 y Med22 y juega un rol general en la transcripción.

Además de estos tres subcomplejos, existe un módulo regulatorio formado por cuatro proteínas, Med12, Med13, una quinasa dependiente de ciclina, Cdk8, y una ciclina, CycC. La actividad regulatoria de este módulo involucra la fosforilación de proteínas específicas, incluyendo activadores transcripcionales, subunidades del MEDIATOR, algunos factores generales de

transcripción y la región C-terminal de la ARN polimerasa II antes del inicio de la transcripción. Este módulo está involucrado en la regulación negativa de algunos genes. Estudios *in vitro* demuestran que el complejo MEDIATOR que contiene el módulo Med12-Med13-Cdk8-CycC se encuentra reprimiendo la transcripción basal, mientras que el “core” que no lo contiene posee un efecto estimulador. Sólo el complejo MEDIATOR que carece de este subcomplejo, es capaz de asociarse con la ARN polimerasa II (Bjorklund & Gustafsson, 2005; Bourbon, 2008).

El complejo MEDIATOR en plantas

Recién en el año 2007 se logró aislar el complejo MEDIATOR en *Arabidopsis* (Backstrom *et al.*, 2007) y se observó que a pesar de que la mayoría de las subunidades del complejo MEDIATOR de levaduras y metazoos están presentes en plantas, éstas presentan una muy baja homología de secuencia. Esta baja homología no es sorprendente si consideramos que el genoma de *Arabidopsis thaliana* codifica para cerca de 1700 factores de transcripción de los cuales más de 700 son específicos de plantas. Dentro del complejo, se identificaron 21 subunidades conservadas entre plantas y otros eucariotas y 6 subunidades específicas de plantas (Med32-Med37). Sin embargo, no se pudieron encontrar homólogos de la subunidad conservada Med1, de las subunidades específicas de levaduras Med2, Med3 y Med5 y de las subunidades específicas de metazoos Med24, Med26, Med29 y Med30. El complejo MEDIATOR de *Arabidopsis thaliana* conserva entonces las subunidades de los módulos “cabeza” y “medio”, las cuales se encuentran próximas a la ARN polimerasa II, pero carece de homólogos en la mayoría de las subunidades del módulo “cola” el cual interacciona con proteínas regulatorias de unión a ADN.

En este trabajo (Backstrom *et al.*, 2007), identificaron a *PFT1* como la subunidad AtMed25, cuya localización dentro del complejo MEDIATOR aún es desconocida. Esta subunidad Med25 se encuentra presente en el complejo MEDIATOR de mamíferos y *D. melanogaster*, pero no en *S. cerevisiae*. El dominio N-terminal de esta subunidad, que interacciona con el “core” del MEDIATOR en células humanas, se encuentra conservado en *Arabidopsis thaliana*. Sin embargo, el dominio C-terminal que en células humanas interacciona con el activador transcripcional VP16 (Mittler *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2004), se conserva en metazoos pero no en *A. thaliana*. No obstante, este dominio C-terminal de *Arabidopsis* se encuentra conservado entre diferentes plantas. Estas observaciones indican que el complejo MEDIATOR evoluciona para adaptarse a la regulación transcripcional específica de las especies incorporando nuevas subunidades o con subunidades que contienen una región conservada de interacción con el MEDIATOR y una región específica de especie que interacciona con el dominio regulador.

Ubiquitinación de proteínas

La unión covalente de la proteína ubiquitina (76 aminoácidos) a proteínas intracelulares es un mecanismo clave en la regulación de muchos procesos celulares en eucariotas. La proteína ubiquitina (Ub) se une covalentemente a la proteína sustrato a través de una unión peptídica entre su glicina C-terminal y un residuo de lisina de la proteína sustrato. El ensamblado de al menos cuatro ubiquitinas vía el residuo lisina 48 marca a la proteína para su degradación por el proteasoma 26S. Sin embargo, la monoubiquitinación o la poliubiquitinación vía el residuo lisina 63 genera una señal no proteolítica que altera la función de la proteína modificada, cambiando su estructura, sus sitios de unión, su localización celular, etc. (Deshaies & Joazeiro, 2009).

La ubiquitinación de proteínas se logra a través de una cascada enzimática que involucra la enzima activadora de ubiquitina (E1), la enzima conjugadora de ubiquitina (E2) y la enzima ligadora de ubiquitina (E3). Inicialmente, E1 hidroliza ATP para formar el intermediario E1-Ub en el cual la glicina C-terminal de ubiquitina se encuentra ligada a E1 a través de un enlace tioéster. La ubiquitina ahora activada, se transfiere a un residuo de cisteína en la enzima conjugadora E2. El intermediario E2-Ub puede unirse a la enzima E3 *ubiquitin ligasa* y conjugar ubiquitina a un residuo de lisina de la proteína sustrato o en el caso de las enzimas E3 con dominios HECT transferir la ubiquitina activada a la E3 que luego la transferirá a la proteína sustrato. En ambos casos es la enzima E3 la que confiere especificidad de sustrato y posiciona correctamente a la proteína sustrato para la conjugación de ubiquitinas (Santner & Estelle, 2010).

El proteasoma 26S es una proteasa dependiente de ATP formada por múltiples subunidades que despliegan y degradan proteínas poliubiquitinadas. Consiste en un “core” proteolítico 20S cilíndrico cubierto en cada extremo por un complejo regulatorio 19S. Este complejo 19S está compuesto por una tapa y una base. La tapa se encuentra ensamblada con al menos 8 subunidades que funcionan juntas reconociendo la proteína sustrato y removiendo las ubiquitinas. La base también consiste en varias subunidades que reconocen los sustratos ubiquitinados y los despliegan. La proteína desplegada ingresa luego en el “core” central 20S donde se proteoliza en pequeños péptidos. Por lo tanto dentro del proteasoma se producen al menos seis actividades diferentes: reconocimiento de las proteínas ubiquitinadas, desubiquitinación, desplegado de la proteína, traslocación de la proteína, proteólisis completa y/o procesamiento proteolítico. Cada una de estas actividades podría utilizarse para facilitar varios pasos en el proceso de transcripción (Collins & Tansey, 2006).

El sistema de ubiquitina-proteasoma es crítico en la biología de los eucariotas y particularmente importante en plantas. Se identificaron más de 1400 genes que codifican para el 5%

del proteoma de *Arabidopsis* y que juegan un rol importante en esta vía, en comparación con un 2,5% del proteoma en *S. cerevisiae* (Smalle & Vierstra, 2004). Aproximadamente el 90% de estos genes codifica para componentes de E3 *ubiquitin ligasas*, lo cual sugiere que cientos o miles de proteínas se encuentran reguladas por el sistema ubiquitina-proteasoma. Existen dos isoformas de la enzima E1 y más de 37 E2 en *Arabidopsis*, lo cual aumenta el nivel de especificidad debido a las diferentes combinaciones E2-E3 (Kraft *et al.*, 2005).

Las E3 *ubiquitin ligasas* de *Arabidopsis* comprenden diversas familias de proteínas o complejos proteicos que pueden distinguirse de acuerdo al dominio de interacción utilizado para la unión con la enzima E2 y a su actuación como subunidades simples o como complejos con múltiples subunidades. El dominio de interacción con E2 más abundante se encuentra en 469 proteínas RING (*Really Interesting New Gene*) caracterizadas por un motivo de 40-60 aminoácidos conocido como RING Finger. Este dominio es similar al dominio de unión a ADN Zinc Finger, en el cual residuos de cisteína y/o histidina coordinan dos átomos de zinc. Los dominios RING finger funcionan además como dominios de interacción proteína-proteína y son esenciales para catalizar la actividad E3 *ubiquitin ligasa* en las proteínas que los contienen. Las proteínas con estos dominios pueden funcionar como una subunidad simple E3 o participar como parte de un complejo E3 de múltiples subunidades.

Las E3 *ubiquitin ligasas* con dominio U-Box comprenden una subfamilia mucho más pequeña (aproximadamente 64 proteínas) caracterizadas por un dominio U-box de 70 aminoácidos, con un motivo similar al dominio RING Finger pero que no utiliza zinc para estabilizar su estructura secundaria.

La familia más pequeña de E3 *ubiquitin ligasas* es la que contiene el dominio HECT (aproximadamente 20 proteínas). Este dominio consiste en un motivo de 350 aminoácidos que contiene un sitio de unión a ubiquitina y un sitio de unión a E2. A diferencia de las E3s RING y U-Box que median la transferencia indirecta de ubiquitina desde E2 al sustrato, las E3s HECT aceptan la ubiquitina activada y la transfieren directamente a la proteína sustrato.

En plantas se encuentran al menos tres tipos de complejos de E3 de subunidades múltiples comprendidos por una proteína RING (RBX1), una proteína Culina (CUL) y una proteína adicional de reconocimiento de sustrato. El tipo de subunidad de CUL determina la proteína de reconocimiento de sustrato que se incorpora al complejo. Las tres categorías más importantes son SCF (Skp-Cullin-F-Box), CUL3-BTB y CUL4-DDB1 (Santner & Estelle, 2010).

Dado que PFT1 forma parte del complejo MEDIATOR de *Arabidopsis thaliana*, es probable que tenga un papel importante en la regulación transcripcional de *Arabidopsis* regulando varios procesos fisiológicos, entre ellos la floración (Cerdán & Chory, 2003) y la respuesta a patógenos (Kidd *et al.*, 2009). Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo general de este capítulo de Tesis Doctoral fue comprender el rol de PFT1 a nivel bioquímico. Como objetivo particular, se trató de comprender el rol que cumplen las proteínas que interaccionan con PFT1 en su actividad y en la regulación de la floración.

RESULTADOS

I) Obtención de versiones etiquetadas de PFT1

Con la finalidad de detectar la proteína PFT1 de extractos de plantas por *Western blot*, en nuestro laboratorio se generaron anticuerpos contra la región N-terminal de PFT1 (aminoácidos 1 a 242). Si bien estos anticuerpos permitieron la detección de la proteína recombinante, al utilizarlos con extractos proteicos de *Arabidopsis* se observó la presencia de muchas bandas en el *Western blot* lo cual dificultaba determinar cual correspondía a PFT1. Además, en las mutantes *pft1-1* se expresa un ARNm truncado que tiene posibilidad de dar lugar a un polipéptido de tamaño considerable que podría confundirse con la proteína PFT1.

Dadas las dificultades encontradas con estos anticuerpos, se decidió generar versiones etiquetadas de PFT1 que permiten utilizar anticuerpos comerciales para la detección de la proteína de fusión.

Se obtuvieron plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* fusionando el clon genómico de *PFT1* a distintas etiquetas (*tags*) en vectores binarios que permiten su replicación en *E. coli* y en *A. tumefaciens*. Las etiquetas se subclonaron como un fragmento EcoRI-EcoRI en un sitio EcoRI generado en marco justo antes del ATG o justo antes del codón STOP en el clon genómico de *PFT1*. De esta forma, se obtuvieron etiquetas en el N-terminal y en el C-terminal de PFT1. El clon genómico de *PFT1* utilizado posee 8748 pb y contiene una región regulatoria 5' no codificante de 2782 pb y una región 3' no codificante de 926 pb. La utilización de este clon genómico permite mantener la estructura nativa y evitar artificios propios de la sobreexpresión de genes.

Las líneas transgénicas se obtuvieron tanto en el contexto de plantas del tipo salvaje, Col como en mutantes *pft1-1*. En todos los casos, sólo las fusiones al C-terminal resultaron activas *in vivo*, complementando eficientemente la mutación *pft1-1* de floración tardía (Figura 12).

Para todos los experimentos que se describen a lo largo de este capítulo, se trabajó con líneas transgénicas homocigotas que contienen inserciones en un sólo *locus*. Se utilizaron las siguientes etiquetas:

- 1) TAP (*TANDEM AFFINITY PURIFICATION*): Esta etiqueta fue utilizada con éxito para purificar complejos proteicos en levaduras (Rigaut *et al.*, 1999; Puig *et al.*, 2001) y en plantas (Rivas *et al.*, 2002a; Rohila *et al.*, 2004; Rubio *et al.*, 2005; Rohila *et al.*, 2006). Consiste en dos *tags* fusionados en *tándem* (el péptido de unión a calmodulina y el sitio de unión a IgG de la proteína A de *Staphylococcus aureus*) separados entre sí por el sitio de clivaje de la proteasa TEV (Virus del Tabaco Etch). Esta etiqueta permite purificar complejos proteicos muy eficientemente y en condiciones nativas utilizando dos columnas de afinidad. Las fusiones *Tap:PFT1g* y *PFT1g:Tap* codifican para proteínas de 1021 y 1011 aminoácidos, respectivamente (112,31 y 111,21 KDa, aproximadamente).
- 2) 3XHA: La hemaglutinina del virus de influenza humana (HA) es una glicoproteína de superficie que se requiere para la infección del virus. La etiqueta HA deriva de los aminoácidos 98 a 106 de la molécula de HA y facilita la detección y purificación de proteínas. La etiqueta utilizada para fusionar a PFT1 consiste en tres epitopes de HA separados por aminoácidos espaciadores. La fusión *PFT1g:HA* codifica para una proteína de 886 aminoácidos, que corresponde a 97,46 KDa aproximadamente.
- 3) VP16: La proteína VP16 está asociada al tegumento del virus del herpes simplex humano y se localiza entre la cápside y la envuelta del virión. Para generar la versión etiquetada de PFT1 se utilizó el dominio activador del virus del herpes simplex humano tipo 1 (VP16). Este dominio interacciona con múltiples “blancos” dentro del complejo de iniciación de la ARN polimerasa II y se ha utilizado para demostrar la capacidad transcripcional de ciertos factores de transcripción (Busch *et al.*, 1999; François Parcy *et al.*, 2002). La fusión *PFT1g:VP16* codifica para una proteína de 915 aminoácidos, que corresponde a 100,65 KDa aproximadamente.

Las líneas transgénicas *pft1-1 PFT1g:Tap* y *pft1-1 PFT1g:HA* se utilizaron eficientemente para detectar por *Western blot* las proteínas de fusión PFT1:Tap y PFT1:HA obtenidas de extractos proteicos totales de dichas líneas utilizando anticuerpos comerciales. Para la detección de la proteína PFT1:Tap se utilizó el complejo soluble peroxidasa anti peroxidasa (PAP) (*Sigma*, Nº P1291). Para la detección de PFT1:HA se utilizó un anticuerpo monoclonal producido en rata y conjugado a peroxidasa (*Roche* 3F10, Nº 2013819). Ambos anticuerpos permiten la detección de la proteína por *Western blot* en un sólo paso sin la necesidad de utilizar un anticuerpo secundario.

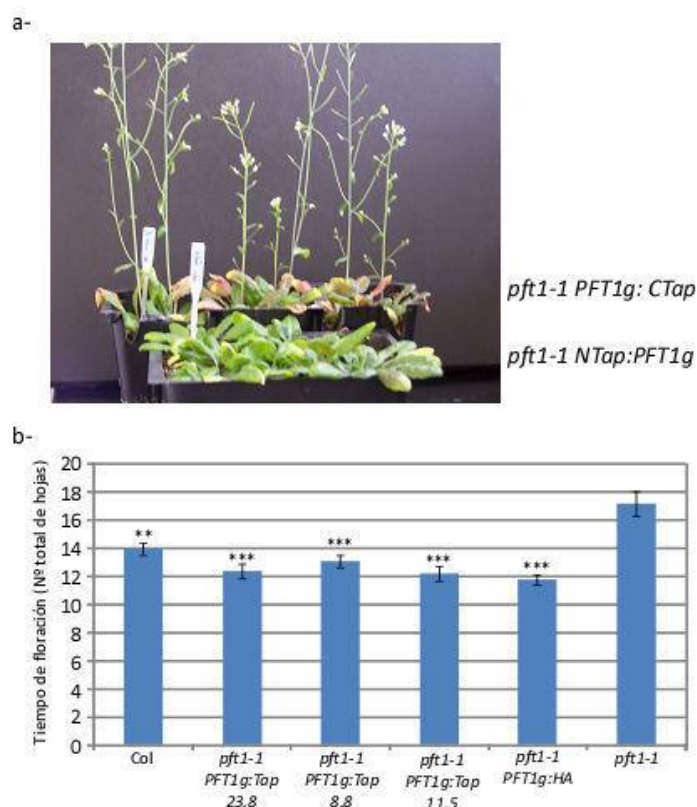


Figura 12. Las proteínas de fusión al C-terminal de PFT1 (PFT1g:tag) son activas *in vivo*

a- Complementación de la mutante *pft1-1* de floración tardía con fusiones *NTap:PFT1g* y *PFT1g:CTap*. Sólo la fusión al C-terminal complementó el fenotipo de floración tardía.

b- Experimento de floración con diferentes líneas transgénicas que presentan las etiquetas fusionadas al C-terminal (*pft1-1 PFT1g:Tap* y *pft1-1 PFT1g:HA*), Col y mutante *pft1-1*. Las plantas se cultivaron en DL a 23°C. Se determinó el número total de hojas (hojas de la roseta + hojas caulinares) al momento de floración. Las barras representan la media +/- ES (error estándar) para un n mayor que 15 para cada genotipo. Los valores indicados con * son estadísticamente significativos en comparación con los valores de *pft1-1* ($p < 0,002$ por ANOVA de un factor con contraste de Bonferroni).

II) PFT1 es ubicua pero los niveles son mayores en tejido reproductivo

Se utilizaron dos líneas independientes de *pft1-1 PFT1g:Tap* para analizar los niveles de PFT1:Tap en distintos tejidos de *Arabidopsis*. Se analizaron los niveles de la proteína de fusión en extracto proteico completo y de raíz obtenidos de plántulas de 10 días. Además, se analizó la presencia de proteína en distintos tejidos de plantas adultas ya florecidas: hoja de la roseta, hoja caulinar, tallo, inflorescencia cerrada, inflorescencia abierta y silicua. Se extrajeron proteínas totales de cada uno de los tejidos, se cuantificaron por *Lowry* y se analizaron los niveles de proteína por *Western blot*. En todos los casos se observó mayor nivel de PFT1:Tap en flores y silicuas (Figura 13a). Se cuantificó la banda principal correspondiente a PFT1:Tap (111 KDa) de cuatro experimentos

independientes utilizando el programa *ImageJ* y se normalizaron los valores obtenidos al valor de silicua (Figura 13b).

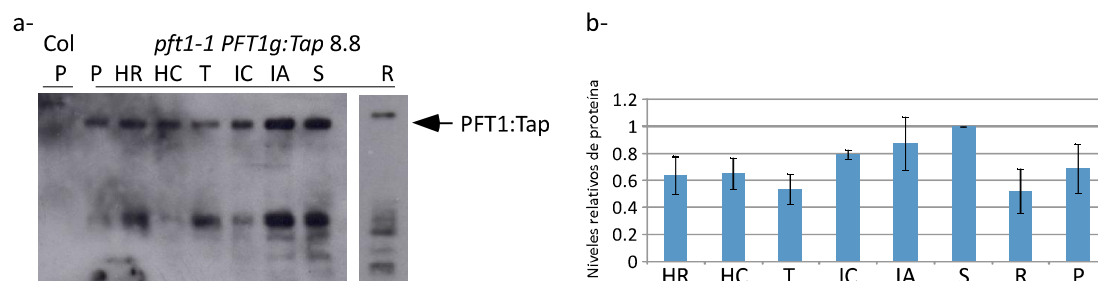


Figura 13. Determinación de los niveles de PFT1:Tap en diferentes tejidos de *Arabidopsis thaliana*

a-Análisis por *Western blot* de los niveles de PFT1:Tap. Se prepararon extractos proteicos totales de distintos tejidos de plantas *pft1-1 PFT1g:Tap* y Col y se cuantificó la cantidad de proteína total empleando la técnica de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Se sembraron 40 µg totales en cada pocillo en un gel SDS-PAGE 8%, según se indica en Materiales y Métodos. P: plántulas cultivadas por 10 días en DL a 23°C. R: raíz de plántulas cultivadas por 10 días en DL a 23°C. HR: hoja de la roseta, HC: hoja caulinar, T: tallo, IC: inflorescencia cerrada, IA: inflorescencia abierta, S: silicua de plantas cultivadas por 5 semanas en DL a 23°C. Anticuerpo PAP dil 1/1000.

b- Cuantificación de la banda correspondiente a PFT1:Tap (111 KDa) utilizando el programa *ImageJ*. Los valores se normalizaron respecto al valor de silicua. Las barras representan la media $\pm$ ES de cuatro experimentos independientes.

III) PFT1 no parece variar en respuesta a factores ambientales

Las aproximaciones genéticas sugieren que el gen *PFT1* se encuentra regulado negativamente por phyB y esta posible regulación no es a nivel de ARN mensajero (Cerdán & Chory, 2003). Para determinar si esta regulación se debe a una diferencia en la estabilidad de la proteína, se utilizaron las líneas transgénicas *pft1-1 PFT1g:Tap* y se analizaron los niveles de PFT1:Tap en plántulas cultivadas bajo diferentes condiciones de luz y temperatura. Se analizaron dos temperaturas de crecimiento, 16 y 23°C, la respuesta al fotoperíodo, la respuesta aguda a la transición luz/oscuridad y la respuesta a pulsos de luz roja y de luz roja lejana al final del día (respuesta mediada por los fitocromos). Sin embargo, en ninguna de estas condiciones se observó una regulación significativa de los niveles de PFT1 (Figura 14). Es posible que las otras proteínas que actúan junto a PFT1 sean el blanco de esta regulación o que PFT1 sea regulada en un tipo específico de tejido o por modificaciones post-traduccionales que no afecten los niveles totales de PFT1.

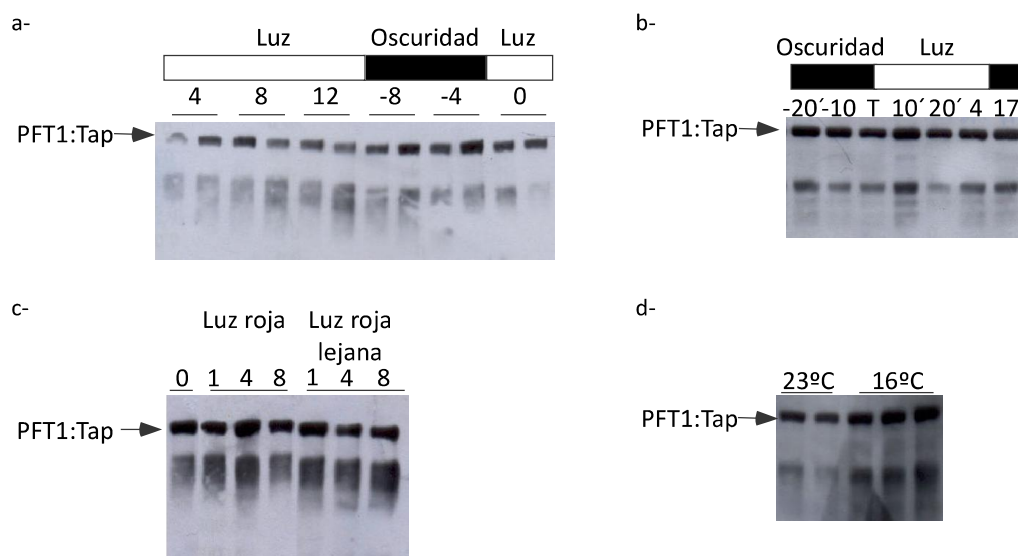


Figura 14. Determinación de los niveles de PFT1:Tap en diferentes condiciones de luz y temperatura

Análisis por *Western blot* de los niveles de PFT1:Tap. Se prepararon extractos proteicos totales de las muestras tomadas en cada una de las condiciones, se cuantificó la cantidad de proteína total y se sembraron 40 µg totales en cada pocillo en un gel SDS-PAGE 8%. Anticuerpo PAP dil 1/1000.

a- Respuesta al fotoperíodo. Plántulas cultivadas en DL a 23°C por 8 días. Durante el día 8 se cosecharon muestras de plántulas cada 4 horas durante 24 horas, por duplicado. Tiempo 0: momento en el que se prenden las luces. b- Respuesta a la transición aguda luz/oscuridad. Plántulas cultivadas en DL a 23°C por 8 días. Durante el día 8 se cosecharon muestras de plántulas 20 minutos y 10 minutos antes del pasaje oscuridad/luz, durante la transición oscuridad/luz (T) y 10 minutos, 20 minutos, 4 horas y 17 horas después del cambio oscuridad/luz. c- Respuesta a pulsos de luz roja y luz roja lejana al final del día. Plántulas cultivadas en DL a 23°C por 8 días. Durante el día 8 luego de 16 horas de luz, se expusieron a un pulso de 15 minutos de luz roja o luz roja lejana y se cosecharon muestras de plántula a tiempo 0 y a 1, 4 y 8 horas de finalizado el tratamiento de luz. d- Respuesta a la temperatura de crecimiento. Las plántulas se cultivaron en luz LC a 23°C o 16°C por 8 días y se cosecharon las muestras.

En todos los casos los experimentos se realizaron utilizando dos líneas transgénicas independientes y por duplicado, observándose resultados similares.

IV) PFT1 se degrada vía proteasoma

Bajo todas las condiciones estudiadas se observó una baja estabilidad de PFT1 en los extractos proteicos de *Arabidopsis*, observándose la presencia de productos de degradación. Se decidió estudiar la estabilidad de PFT1 en extractos proteicos totales de plántulas de las líneas transgénicas *pft1-1 PFT1g:Tap*, tanto en presencia como en ausencia de inhibidores de proteasas (Figura 15). Se utilizó un *cocktail* de inhibidores de proteasas para extractos celulares de plantas (*Sigma*, Nº P9599) que contiene seis inhibidores distintos con capacidad para inhibir serín- y cisteín-proteasas, metaloproteasas, proteasas ácidas y aminopeptidasas. Se determinó que aún en presencia de estos inhibidores de proteasas, luego de 30 minutos de incubación a temperatura

ambiente desaparece considerablemente la proteína PFT1:Tap y luego de 2 horas de incubación sólo se observan bandas correspondientes a productos de degradación.

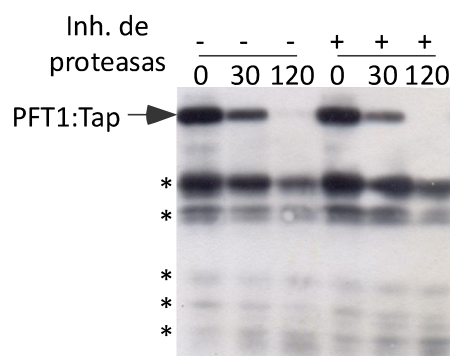


Figura 15. Los inhibidores de proteasas no impiden la degradación de PFT1:Tap en extractos proteicos totales

Análisis por *Western blot* de los niveles de PFT1:Tap. Se prepararon extractos proteicos totales de plántulas *pft1-1 PFT1g:Tap* cultivadas en DL a 23°C por 8 días. Se incubaron a temperatura ambiente en presencia y en ausencia de inhibidores de proteasas y se colectaron muestras a los 0, 30 y 120 minutos de comenzada la incubación. Las reacciones se detuvieron inmediatamente agregando un volumen de *loading buffer* e hirviendo por 5 minutos. * Corresponden a diferentes productos de degradación. Anticuerpo PAP dil 1/1000.

Dada la ineficiencia de los inhibidores de proteasas, se decidió investigar si la degradación de PFT1 ocurría vía proteasoma. Para ello, se estudió el efecto del ATP (el proteasoma depende de ATP) y de un inhibidor del proteasoma, el MG132, en la estabilidad de PFT1 utilizando extractos proteicos totales. Se realizó una cinética de degradación *in vitro* incubando el extracto proteico obtenido a partir de plántulas *pft1-1 PFT1g:Tap* a temperatura ambiente, en presencia y en ausencia de ATP 10 mM y MG132 50 μ M (Figura 16a). Los niveles de PFT1:Tap disminuyeron notablemente luego de 2 minutos de incubación en presencia de ATP (comparación calles 2 y 4 de Figura 16a) y la proteína desapareció por completo luego de 10 minutos de incubación (calle 10). La degradación de PFT1:Tap ocurrió más lentamente cuando el extracto se incubó en presencia de MG132, incluso en presencia de ATP. Aún luego de dos horas de incubación a temperatura ambiente se observó un nivel considerable de proteína en presencia de MG132 (anteúltima calle).

Para determinar la mínima concentración necesaria de MG132 para retrasar la degradación de PFT1 *in vitro*, se realizó un experimento similar incubando el extracto proteico en presencia de ATP y MG132 10 μ M, MG132 50 μ M y DMSO como control (Figura 16b). Los resultados fueron similares a los obtenidos anteriormente pero se logró determinar que 10 μ M de MG132 es suficiente para retrasar la degradación de la proteína *in vitro*.

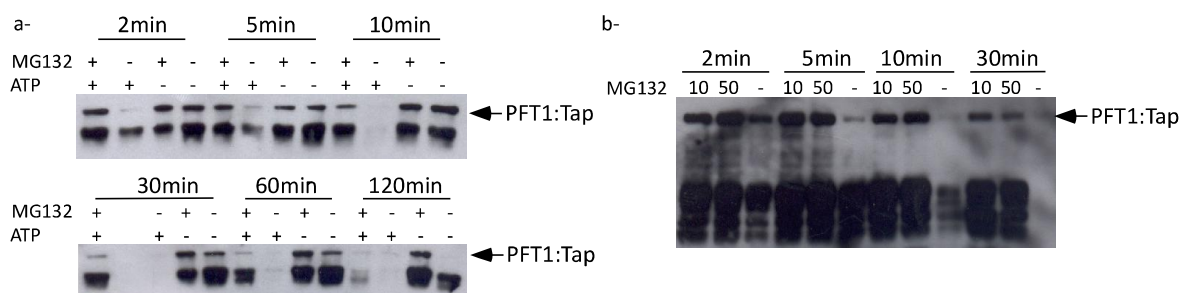


Figura 16. Cinética de degradación de PFT1:Tap *in vitro* en presencia o ausencia de ATP y MG132

Análisis por *Western blot* de los niveles de PFT1:Tap y productos de degradación. Se prepararon extractos proteicos totales de plántulas *pft1-1 PFT1g:Tap* cultivadas en DL a 23°C por 8 días. a- El extracto proteico se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente en presencia de MG132 50 μM o DMSO 1% v/v (control). Se dividió cada extracto en partes iguales y a uno de ellos se le agregó ATP (10 mM) y DTT (10 mM). Se colectaron muestras a los 2, 5, 10, 30, 60 y 120 minutos, las reacciones se detuvieron inmediatamente agregando un volumen de *loading buffer* e hirviendo por 5 minutos. b- El extracto proteico se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente en presencia de MG132 10 μM, MG132 50 μM o DMSO 1% v/v (control), se agregó ATP (10 mM) y DTT (10 mM) y se colectaron muestras a los 2, 5, 10 y 30 minutos. Anticuerpo PAP dil 1/1000. Los experimentos se realizaron por duplicado obteniéndose resultados similares.

A fin de determinar si la degradación de PFT1 vía proteasoma ocurre *in vivo*, se cultivaron plántulas *pft1-1 PFT1g:Tap* (dos líneas transgénicas independientes) en DL a 23°C durante 10 días en medio de cultivo MS suplementado con sacarosa 1% p/v. Durante el día 10, luego de dos horas de comenzado el día las plántulas se cubrieron con agua MiliQ conteniendo MG132 100 μM o DMSO 2% v/v como control. Se incubaron durante 4 horas a 23°C en esa condición, se colectaron las muestras y se compararon los niveles de PFT1:Tap en plántulas incubadas con el inhibidor de proteasoma o con DMSO (Figura 17). Los niveles de PFT1:Tap fueron considerablemente más elevados en las plántulas tratadas con el inhibidor de proteasoma, lo cual demuestra que la proteína se degrada al menos por esta vía *in vivo*.

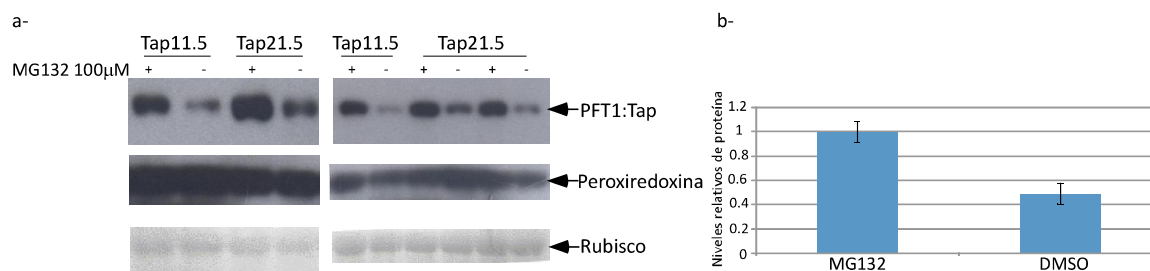


Figura 17. El inhibidor de proteasoma MG132 protege a PFT1 de la degradación *in vivo*

a- Análisis por *Western blot* de los niveles de PFT1:Tap obtenidos en plántulas de 10 días incubadas en presencia de MG132 100 μM o DMSO 2 % v/v (control) por 4 horas antes de la toma de muestras.

Se prepararon extractos proteicos totales, se cuantificó la cantidad de proteína total y se sembraron 50 μg totales en cada pocillo en un gel SDS-PAGE 8%. Anticuerpo PAP dil. 1/1000, anti-peroxisredoxina dil. 1/500 (control de carga). En la parte inferior se muestra la tinción de la membrana con colorante rojo *ponceau* que permite analizar los niveles de proteína rubisco como control de carga. Se muestran los resultados de dos experimentos independientes en cada uno de los cuales se utilizaron dos líneas transgénicas independientes *pft1-1 PFT1g:Tap* (11.5 y 21.5).

b- Cuantificación de la banda correspondiente a PFT1:Tap (111 KDa) utilizando el programa *ImageJ*. Las barras representan la media +/- ES de las 5 bandas observadas en el *Western blot*.

V) PFT1 interacciona con posibles E3 ubiquitin ligasas en sistemas heterólogos

En el laboratorio se realizó un *screening* de doble híbrido en *S. cerevisiae* con el fin de encontrar proteínas que pudieran estar interaccionando con PFT1 y pudieran estar implicadas en el proceso de degradación. Para ello se utilizó como “carnada” la región N-terminal de PFT1 (aminoácidos 1 a 242) que contiene el dominio vWF-A del cual se sabe que en muchos casos puede mediar interacciones proteína-proteína (Ponting *et al.*, 1999; Hinshelwood & Perkins, 2000) y se probó su interacción con una clonoteca de *Arabidopsis thaliana* construida a partir de inflorescencias. En este *screening* se aislaron 8 clones independientes de los cuales dos de ellos presentaron una interacción más débil y correspondían a genes que codifican para dos proteínas de función desconocida y por lo tanto no se continuó con su caracterización. De los seis clones restantes, cuatro de ellos correspondían a clones independientes del gen *FRF1* (At2g15530) y dos de ellos a clones independientes del gen *FRF2* (At4g34040) (Figura 18). Como ocurre con frecuencia, los clones no resultaron completos en la región 5'. Esto permitió determinar las regiones de *FRF1* y *FRF2* que resultaron suficientes para la interacción con PFT1.

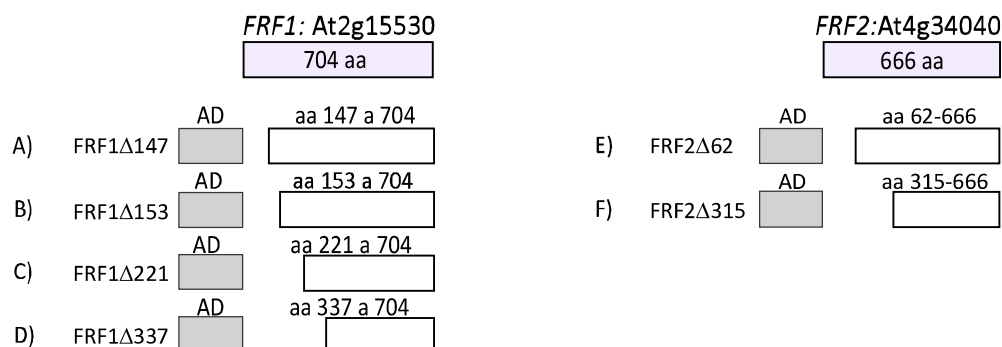


Figura 18. Esquema correspondiente a los clones obtenidos en el *screening* de doble híbrido

Los genes *FRF1* y *FRF2* presentaron deleciones en la secuencia que codifica para la región N-terminal de sus proteínas. Los fragmentos de ADN se encuentran subclonados en el vector pEXPAD (*Invitrogen*) fusionados al dominio activador (AD) del factor de transcripción GAL4 de *S. cerevisiae*. Como “carnada” se utilizó el extremo 5’ de *PFT1* que codifica para los primeros 242 aminoácidos (PFT1(1-242)) subclonado en el vector pBDleu (*Invitrogen*), fusionado al dominio de unión a ADN de Gal4 (DBD). A, B, C y D corresponden distintas deleciones del gen *FRF1*. Las proteínas codificadas por estas versiones delecionadas comienzan en los aminoácidos 147, 153, 221 y 337. E y F corresponden a distintas deleciones del gen *FRF2*, donde las proteínas comienzan en los aminoácidos 62 y 315.

Se utilizaron ensayos de doble híbrido para corroborar la interacción de PFT1(1-242) con las versiones delecionadas FRF1Δ337 y FRF2Δ315. Para ello, se fusionó cada una de las deleciones al dominio activador de Gal4 (AD) y al dominio de unión a ADN (Gal4 DBD). Las proteínas fueron capaces de interaccionar con PFT1(1-242), ya sea fusionadas al AD o al DBD, mostrando la activación de los genes reportero *lacZ*, *URA3* y *HIS3* sólo cuando las levaduras fueron transformadas con FRF1Δ337 y PFT1(1-242) o FRF2Δ315 y PFT1(1-242) (Figura 19).

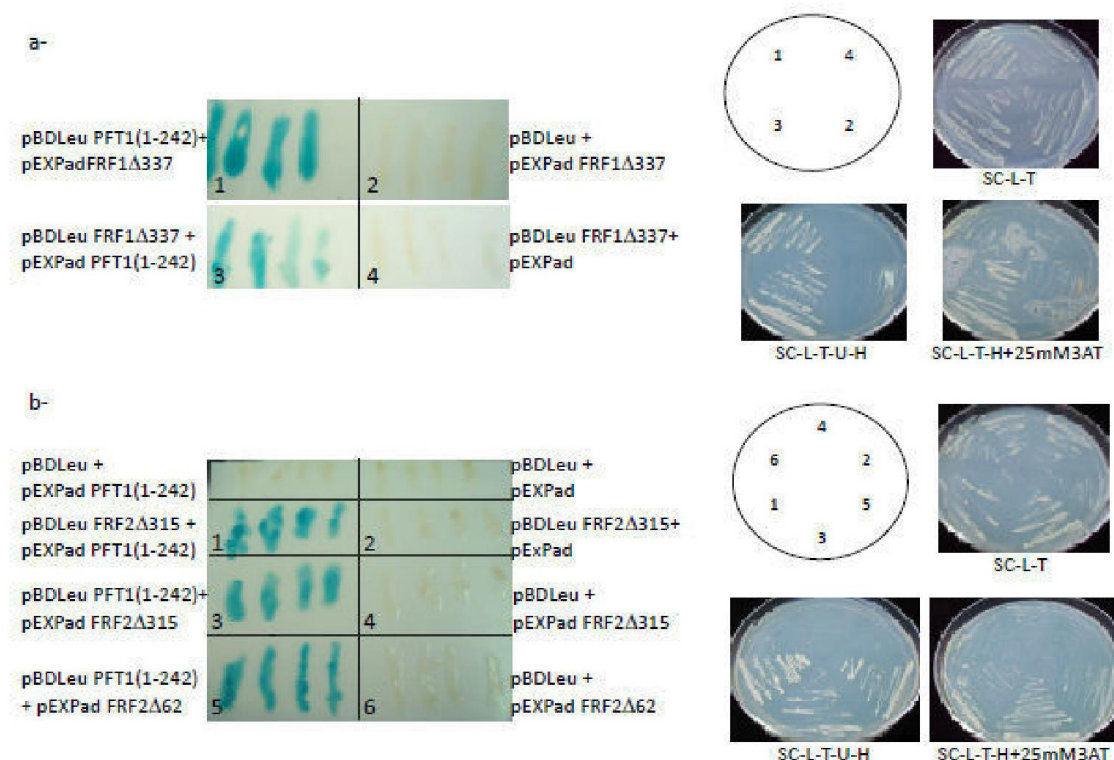


Figura 19. FRF1Δ337 y FRF2Δ315 interaccionan con PFT1 (1-242) en ensayos de doble híbrido realizados en levaduras

Activación de genes reporteros en levaduras transformadas con: **a-** 1: pBDLeu PFT1(1-242) y pEXpad FRF1Δ337, 2: pBDLeu y pEXpad FRF1Δ337 (control), 3: pBDLeu FRF1Δ337 y pEXpad PFT1(1-242), 4: pBDLeu FRF1Δ337 y pEXpad (control). Sólo 1 y 3 presentaron colonias azules en presencia del sustrato X-gal y crecimiento en medios carentes de uracilo e histidina. **b-** 1: pBDLeu FRF2Δ315 y pEXpad PFT1(1-242), 2: pBDLeu FRF2Δ315 y pEXpad (control), 3: pBDLeu PFT1(1-242) y pEXpad FRF2Δ315, 4: pBDLeu y pEXpad FRF2Δ315 (control), 5: pBDLeu PFT1(1-242) y pEXpad FRF2Δ62, 6: pBDLeu y pEXpad FRF2Δ62 (control). Sólo 1, 3 y 5 presentaron colonias azules en presencia del sustrato X-gal y crecimiento en medios carentes de uracilo e histidina.

Las deleciones FRF1Δ153, FRF1Δ221 y la proteína completa FRF1 fueron capaces de activar la expresión de los genes reporteros *lacZ*, *URA3* y *HIS3* cuando se fusionaron al dominio de unión a Gal4 aún en ausencia de PFT1 (1-242) (Figura 20), lo cual muestra la capacidad de estas proteínas de activar la transcripción en levaduras por sí mismas. Sin embargo, es necesaria la porción N-terminal que contiene los aminoácidos 1 a 337 para que esto suceda.

La deleción FRF1Δ599 no fue capaz de interaccionar con PFT1(1-242) (Figura 21) lo cual demuestra que es importante la región media de FRF1 comprendida entre los aminoácidos 337 y 599 para que ocurra la interacción y que el dominio RING ubicado en el C-terminal no es suficiente para que esto ocurra.

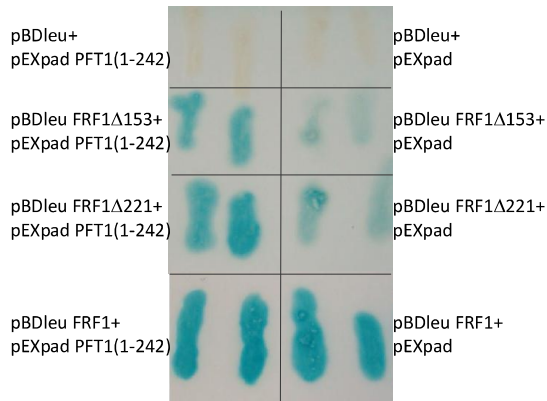


Figura 20. Autoactivación del gen reportero *lacZ*

Activación del gen reportero *lacZ* en levaduras transformadas con pBDleuFRF1Δ153, pBDleuFRF1Δ221 y pBDleuFRF1 aún en ausencia de PFT1(1-242) pEXpad (lado derecho de la figura).

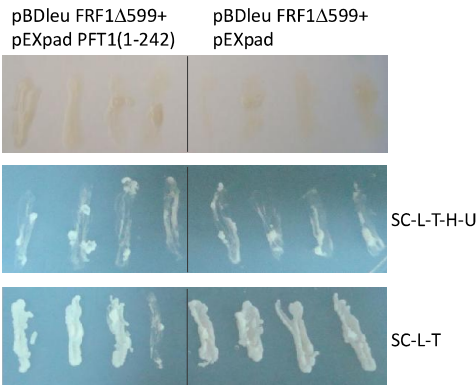


Figura 21. La delección FRF1Δ599 no interacciona con PFT1(1-242)

No se observó activación del gen reportero *lacZ* (colonias blancas en presencia del sustrato X-gal) ni crecimiento de colonias en medio selectivo cuando las levaduras se transformaron con pBDleu FRF1Δ599 y pEXpad PFT1(1-242).

A partir del análisis de secuencia de los genes *FRF1* (At2g15530) y *FRF2* (At4g34040) se observó que estos genes codifican para proteínas que presentan un 64,6% de identidad en sus secuencias y que presentan en su región C-terminal dominios RING Finger (Figura 22). Estos dominios consisten de 40 a 60 residuos ricos en cisteínas capaces de coordinar dos átomos de zinc y que pueden estar involucrados en mediar interacciones proteína-proteína. Los dominios RING más caracterizados son los C3H2C3 (o RING H2) y los C3HC4, ambos contienen histidina en la posición cuatro de unión al ligando metálico, pero difieren en la presencia de histidina o cisteína en la posición cinco. Se han descrito además dominios RING modificados que difieren en los residuos espaciadores para unir al metal o poseen sustituciones en las posiciones de unión al ligando (Stone *et al.*, 2005). Los dominios presentes en FRF1 y FRF2 son del tipo RING H2 Finger.

	10	20	30	40	50	60
At2g15530	MNPMQGP	RSIGGS	STEVNQ	VDGESI	YCT--ET	SLNTMLN
At4g34040	---MQGP	RSTGDS	STGIN	YADGE	PICTSN	SETTSNN
Prim.cons.	MNPMQGP	RSIGGS	STEVNQ	VDGESI	YCT--ET	SLNTMLN
	70	80	90	100	110	120
At2g15530	SSHAAQ	DHTWW	RFGE	SSSIP	GPSDQ	VNSIG
At4g34040	SSHVVQ	NHNW	SFGE	SSSRL	GPSDH	LSNSG
Prim.cons.	SSH22Q	2H2WW	2FGE	SSS22	GPSD2	2NS2G
	130	140	150	160	170	180
At2g15530	MVDGGV	HAGSH	IRNV	PSFL	RGS	SSNPM
At4g34040	LLPG--	-----	ESFL	RGS	SSSH	MLSHV
Prim.cons.	222GGV	HAGSH	IRNV	2SFL	RGS	SSS22
	190	200	210	220	230	240
At2g15530	GSSVQA	AGES	SSSGP	ASPF	GGWGS	SSCKR
At4g34040	GSSSQTA	EERSS	SGPG	SSLG	GLGSS	CKRKA
Prim.cons.	GSS2Q	2A2E	2SSGP	2S2G	2GG2	GSSCKR
	250	260	270	280	290	300
At2g15530	YGASS	SLSL	ATPS	QSSPN	VTNH	FRTE
At4g34040	YDASS	SLSL	SMPS	QNSPN	VNNQ	SGLE
Prim.cons.	Y2ASS	SLSL	22PS	Q2SP	NV2N	2G2E
	310	320	330	340	350	360
At2g15530	PRQPQ	ESVAF	SVSH	GGTS	SVRPT	GSGL
At4g34040	BGQP	PESV	AFSFT	QSG	SSVR--	QQQL
Prim.cons.	P2QP	2ESV	AFS2	22G2	SVRPT	GS2Q
	370	380	390	400	410	420
At2g15530	HLPAL	TRNI	HQY	AWD	ASF	SSRA
At4g34040	HLPAL	TRNI	HQF	AWD	ASF	SSRA
Prim.cons.	HLPAL	TRNI	HQ2	AW2	AS2	SSRA
	430	440	450	460	470	480
At2g15530	PVHD--	LWNF	ARG	SPG	SSV	DSLF
At4g34040	PVQDQ	FCW	SFTR	GNP	STSG	DSPF
Prim.cons.	PV2DQ	F2W2	F2RG	2P2S	2S2D	2S2F

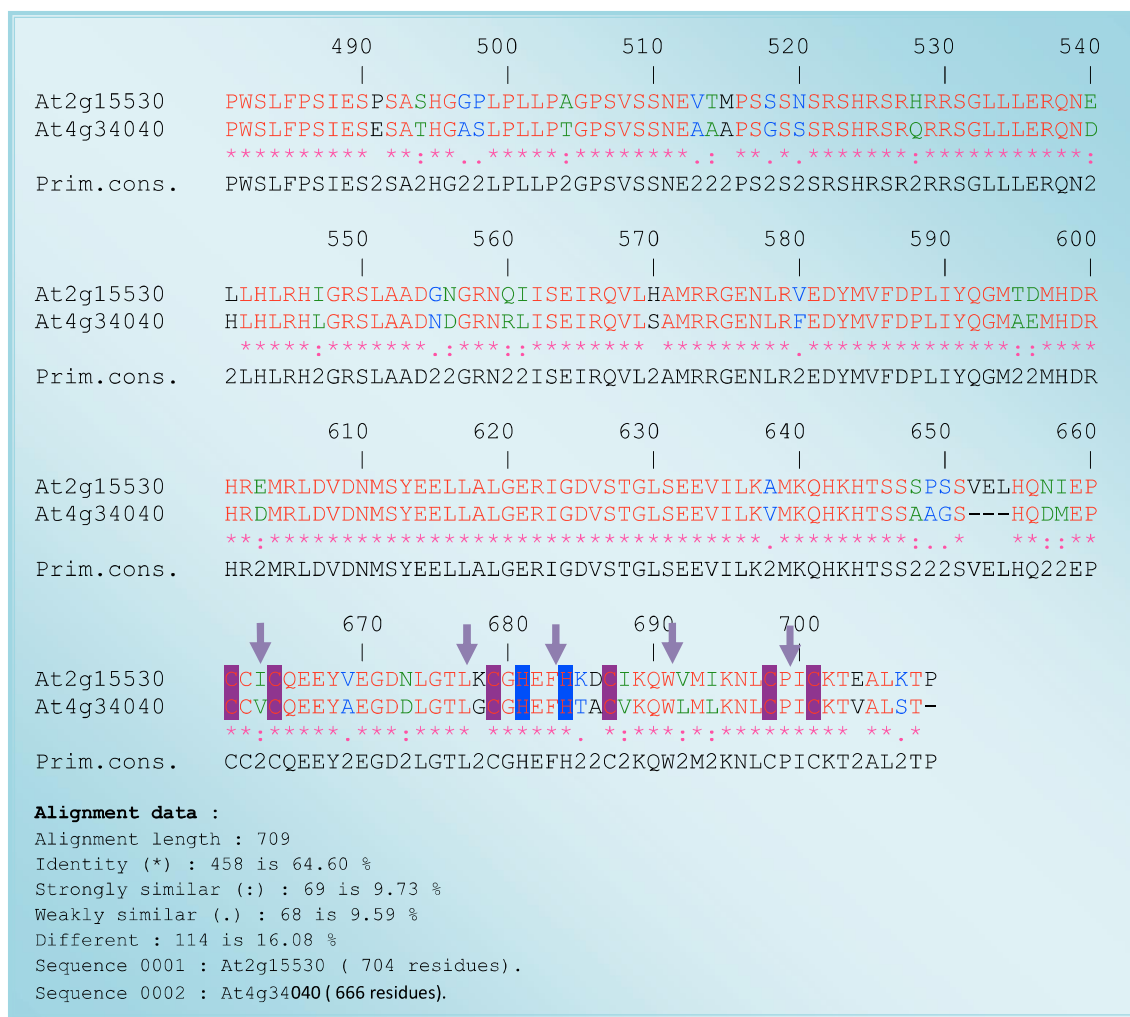


Figura 22. Alineamiento de la secuencia proteica de FRF1 y FRF2 usando el programa ClustalW

En rojo se muestran los aminoácidos conservados. Se resalta en violeta las cisteínas, en azul las histidinas y con flechas los demás aminoácidos que forman parte de la región consenso del dominio RING H2 Finger.

Estas dos proteínas presentan además homología de secuencia con otras dos proteínas tanto en la región C-terminal que contiene el dominio RING H2 como en la porción N-terminal (aminoácidos 210 a 220). Estas proteínas homólogas se encuentran codificadas por los genes At1g45180 (*FRL1*) y At5g42940 (*FRL2*) y fueron las únicas que presentaron este motivo conservado en la porción N-terminal (Figura 23).

Los RING son dominios de interacción con proteínas que se encuentran implicados en numerosos procesos biológicos, dentro de ellos se encuentra la actividad E3 *ubiquitin ligasa*. Las E3 *ubiquitin ligasas* son las encargadas de determinar la especificidad de sustrato para su ubiquitinación y posterior degradación vía proteasoma.

Teniendo en cuenta estos antecedentes y las funciones de las proteínas con dominios RING en plantas, se decidió centrar el estudio de este capítulo de Tesis Doctoral en determinar si estas proteínas se encuentran implicadas en la degradación de PFT1 y en tratar de asignar una función biológica a estos genes, focalizándose en el estudio en FRF1 y FRF2.

	10	20	30	40	50	60
At1g45180	---MQGERASLGSLSKALNFERGSTSSNAVVDQQIRWENLHNYGDNDLQDYMSSAADTNP					
AT5g42940	---MQGERASLGYLSEALNFEHGSSSSNGVIDH---WENIHS LGDNDLQDYMIANSESN					
At2g15530	MNPMQGP RSIGGSSSTEVEN---QVDGESIYCT--ETSLNTMLNPA DTGFPNNSTPSGRP					
At4g34040	---MQGPRSTGDSSTGIN-----YADGEPICSTNSETTSNNILNPVDVQFPNNTTGSGRP					
Prim.cons.	MNPMQG2R2S2GS22EA2NFE2GS4222424DT22E2ENNH4L22NDLQ222NST4SG2P					
	70	80	90	100	110	120
At1g45180	TFANSVYHEKRLQRFNIGEASS-SGTKNEGASLTEQWKIGRFEE-----QRNDKLEL					
AT5g42940	SLANSVYHEQQGLRRFSLGEASS-SGTKDEASSHNEQRMETRCFDG-----RGNEIIDL					
At2g15530	TYASSSSHAAQDHTWWRFGESSIPGPSQVNSIGIKTSHQLPQDGTTHFVGYGSEGRQT					
At4g34040	TYASSSSHVQNHNWWSFGESSRLGPSDHLNSNGSKTDRQLSDG-----YGFEEGQS					
Prim.cons.	TYA2S22HE4QG2422SFGE2SS2SG22DE4NS4GE2T44QL4FDGTHHFVGYGNE44QL					
	130	140	150	160	170	180
At1g45180	S-----PLFVQPSNGSRVVRDVNLNAEYNEHLEDMPVTVHPGHFE					
AT5g42940	D-----PVFAQPSGTNQPVQNVNLNAEYIEIHEDINPYRGRSGFIE					
At2g15530	GLNGMMVDGGVHAGSHIRNVPSFLRGSSSNPMPQHVDMSMDMDSDCNAQTSGVVIRHNS					
At4g34040	---GMLLP-----ESFLRGSSSSHMLSHVNLGKMDMIG-SGLQTSGVVIRHNN					
Prim.cons.	3LNGM222GGVHAGSHIRNVPSFL2SSS24MVQHVNLA22DE43ED422SGVVI2HNE					
	190	200	210	220	230	240
At1g45180	VNG-----LRSEFLLDNSVRAGSSVDGRRASCKRKALDASGGQSSSTGGFRE FQRGVSS					
AT5g42940	ANGPGTRVSQPGRSFEENGVTGSSVEGRRASCKRKALEGISQSSS-GGYHDFQRGESS					
At2g15530	YGSS---LGSSVQAAGESSSGPASFPFGWGSSCKRKALEGSPSHYFSGETPNRIVQTENS					
At4g34040	CETS---LGSSSQTAERSSGPGSSSLGLGSSCKRKALEGAPSHSFPGESHGCFQTENG					
Prim.cons.	4NGSGTRLGSSSQ4AEENS2GPGSSVGG22SCKRKALEGSPS2S2SG2G444FQ22E2S					
	250	260	270	280	290	300
At1g45180	SWISGPTYTSPAM-----TANDLNIS--LDHGRRGLVSSAVPN--LSPP-----TITE					
AT5g42940	SWTPGSTVFRP-----GNGLNISGSLDNGPRGMVSGTVPNFPVSAFNFPVSAIAE					
At2g15530	ASHASLSQYGASSLSLATPSQSSPNVT--NHFGRTQMFGSGGGRAVAASAFHSTRNTD					
At4g34040	AWNEGLAQYDASSLSLSMPSQNSPNVN--NQSGLPEPRFGLGGGRAVTAFAFPSTRSTE					
Prim.cons.	2W44GLTQY42SSSLSL22PSQNS2N2SGS2D4GRR24V2G4222RAVSA2AFPSTRITE					
	310	320	330	340	350	360
At1g45180	SSSRNYPVWVNPPTYQQETV--SNFAP-----SLNSPGLIPADHQQISMRYG					
AT5g42940	SSSRNICVRSNPSDHQETVNPSTFAAGTVVR---RPVPPSQLNLSRHLPADQHSLDLRPG					
At2g15530	TLSR-AGRRLNPRQPQESVAFSVSHGGTSVRPTGSLQQNLPLNSPFVDPDVRSSSITSG					
At4g34040	TISR-PGRRILNPQPPESVAFSFTQSGSSVR---QQQLPATSPFVDPDLARAIPVTGS					

```

Prim.cons. 2SSRN4G2RLNP4QPQE2VAFS4FA4GTSVRPTG23QQ3LPLNSPFVDPAD4RSIS424G

          370      380      390      400      410      420
          |        |        |        |        |        |
At1g45180 HALGNFASQNPANAPATHMPPVSR---NTFQWNTSPVAAVISSS-SATPVDRNVIHRNATR
AT5g42940 QSF--VVSRLNPSTPVSIPPGSRITMLPPFRWTGSSLVGGTSN--STAPVERN-LHLDETR
At2g15530 SNT-----GENQTNIVHLPALTRN-IHQYAWDASFSSRASNP SGIGMPAERLGPQWETPR
At4g34040 SSS-----GDGQPSMIHLPALTRN-IHQFAWSASSSSSRAN-----SMPEEGLSP-WDAPR
          : : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
Prim.cons. SS4GN22SGNP2444VHLP2L2RNMIHQFAW4ASSSSRA4S3SGS4MPVER23PHWDA2R

          430      440      450      460      470      480
          |        |        |        |        |        |
At1g45180 QR---SNTLEIPLFVPAPELRNVAHGHI SRNASG-----ARHVASSSSRTSVQPSP--S-
AT5g42940 SRSIPGNTLEIPMFA-APEVGNFARSQSSRNVTNGNLNSASSVSRGTSTSVPPPPPPSS
At2g15530 SNQ-EQPLFA-PATDMRQPVHD--LWNFARGSPGSSVD-SLFVPRAGPSSAIHTPQP---
At4g34040 INS-EQPVFFTPANETRNPVQDQFCWSFTRGNPSTSGD-SPFVPRAGSSSGIHGLQP---
          . : * : : : * : : : * : : : : : : : :
Prim.cons. S2SIEQ2T2EIPAF432P2V423A4W4FSR24PG3S3DS24FVPRAGSS2S2HPP2PPSS

          490      500      510      520      530      540
          |        |        |        |        |        |
At1g45180 SPALTPYQNNSLHNQRR--LSENFRRSLLSSLVTQQR-----AARSLAHPASPNEHV
AT5g42940 NLAWTSYQNSPHYQRRRTERSELARRSLLSSLAADATNQ RSGDHPTRLRLAPPASSDGLV
At2g15530 NPTWIPPQNAPPNNPSR--TSELSPWSLFPSIESPSASHG--GPLPLLPGAPSVSSNEVT
At4g34040 NPTWVTP-----HNQSR--ISEVAPWSLFPSIESESATHG--ASLPLLPTGPSVSSNEAA
          . : . : : * * : * : * : * : : : : . : . : . :
Prim.cons. NP2WTP2QN3P3HNQ2RTE4SELA22SL22S2ES4SA3HSGS33LPL22L2P22SSNE4V

          550      560      570      580      590      600
          |        |        |        |        |        |
At1g45180 LQSGGDNTSQVHN RASSRAGP---RQGQDATGISHSLRGLASTSRGRTRMGASEIRNILE
AT5g42940 LQPGGDN-SQMHN RAYS RAGPLFDRQGDSVVGIPHPLRALAAASRGSRMLMVSQM QNVLD
At2g15530 MPSSSNS---RSHRSRHRSGLLERQNE LLHLRHIGRSLAADNGRGRN-QI ISEIRQVLH
At4g34040 APSGSSS---RSHRSRQRSGLLERQNDHLHLRH LGRSLAADNDGRN-RLISEIRQVLS
          . . . . : : * : : : : : * : * : * : * : * : * :
Prim.cons. L2SG2D2TSQR22R2RSR222LLL222ND4L22RH42RSLAADSRGRNR44ISEIR2VL4

          610      620      630      640      650      660
          |        |        |        |        |        |
At1g45180 HMRRAG---NLRLEDVMLLNQSIMLGAADIHDRYRDMRLDVDNMTYEELL SLEERIGDVC
AT5g42940 VMRRDANNNNLRLEDVMLLNHSVLFDGATGHDRYRDMRLDVDNMSYEELLAL EERIGDVC
At2g15530 AMRRGE---NLRVEDYMVFDPLIYQGMTDMHDRHREMRLDVDNMSYEELLAL GERIGDVS
At4g34040 AMRRGE---NLRFEDYMVFDPLIYQGM AEMHDRHDMRLDVDNMSYEELLALGERIGDVS
          *** : * : * : : : : : : : * : * : * : * : * : * :
Prim.cons. AMRRGENNNNLRLED2M222P2IYQGMADMDHR2RDMRLDVDNMSYEELLAL2ERIGDV2

          670      680      690      700      710      720
          |        |        |        |        |        |
At1g45180 TGLNEETISNRLKQKYSSTRSS---QEVEPCVQEEYKEEEEIGRLEGGDFISQ
AT5g42940 TGVNEETISNRLKQRKYKSN TKSP---QDAEPCVQEEYTEGEDMTLEGGHEFISQ
At2g15530 TGLSEEVILKAMKQHKHTSSSPSSVELHQNI EPCVQEEYVEGDNLGTLKGGEFFKDC
At4g34040 TGLSEEVILKVMKQHKHTSSAAGS---HQDMEPCVQEEYAEGDDLGLGGEFFITAC
          * : * : * : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
Prim.cons. TGL2EE2I22R2KQHK22SST4SSVELHQD4EPCCVQEEY4EG2DLGTLECGHEFHQSQC

```

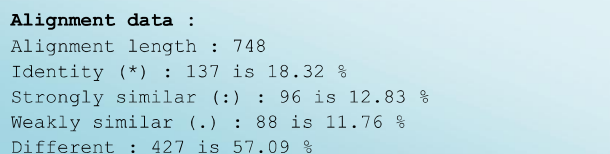


Figura 23. Alineamiento de la secuencia proteica de FRL1, FRL2, FRF1 y FRF2 usando el programa ClustalW
En rojo se muestran los aminoácidos conservados. Se resalta en violeta las cisteínas, en azul las histidinas y con flechas los demás aminoácidos que forman parte de la región consenso del dominio RING H2 Finger.

VI) *FRF1* es ubicuo, mientras que *FRF2* es más abundante en tejidos vegetativos que en reproductivos

Se extrajo ARN total de distintos tejidos de plantas del tipo salvaje (Col) cultivadas en DL a 23°C por 6 semanas para analizar si existe variación en los niveles de expresión de *FRF1*, *FRF2*, *FRL1* y *FRL2* (Figura 24). Se determinó que *FRF1* y *FRL1* presentan un patrón de expresión similar en todos los tejidos ensayados, observándose una menor expresión de *FRL1* en hoja. *FRF2* mostró una baja expresión en la fase reproductiva y *FRL2* sólo se expresó en hojas caulinares.

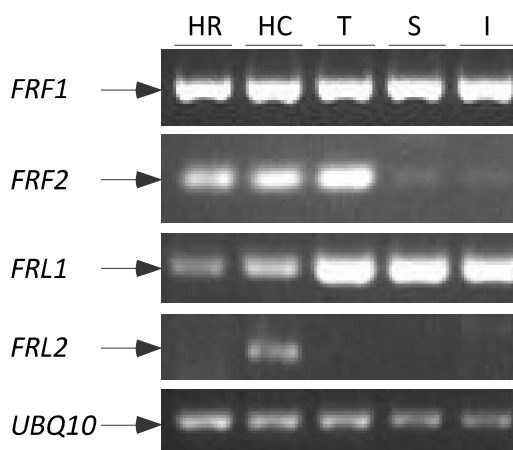


Figura 24. RT-PCR de punto final
Análisis de expresión de los genes *FRF1*, *FRF2*, *FRL1* y *FRL2* en diferentes tejidos de plantas Col relativo a la expresión de Ubiquitina (*UBQ10*). Se extrajo ARN total de diferentes tejidos de plantas cultivadas en DL a 23°C por 6 semanas. HR: Hoja de la roseta, HC: Hoja caulinar, T: Tallo, S: Silicua, I: Inflorescencia. Las muestras se tomaron por triplicado obteniéndose resultados similares.

VII) FRF2 interacciona *in vitro* con PFT1**i) Clonado y expresión FRF1 y FRF2 para la producción de proteína recombinante *E. coli***

Se comenzó clonando las delecciones *FRF1*Δ337 y *FRF2*Δ315 en el vector pGEX 4T-2 (*GE Healthcare*), a fin de obtener las proteínas recombinantes fusionadas a GST (enzima glutatión S transferasa de *Schistosoma japonicum*) en su extremo N-terminal. Se probaron varias condiciones de expresión para obtener las proteínas recombinantes, diferentes temperaturas de inducción (18, 28 y 37°C), concentración de IPTG, etc. y en ningún caso se logró obtener la proteína GST:FRF1Δ337.

Se logró obtener la proteína recombinante GST:FRF2Δ315. Sin embargo, bajo todas las condiciones ensayadas la proteína se localizó en cuerpos de inclusión y no se detectó en la fracción soluble.

Se utilizó la proteína insoluble para producir anticuerpos en conejo. Este anticuerpo permitió la detección de diluciones de la proteína recombinante por *Western blot*, pero no fue útil para detectar FRF1 y FRF2 a partir de extractos proteicos de *Arabidopsis*.

Se procedió entonces al clonado de las delecciones *FRF1*Δ337 y *FRF2*Δ315 en el vector de expresión pMAL (*New England Biolabs*) con el fin de obtener las proteínas recombinantes fusionadas a MBP (proteína de unión a maltosa). Nuevamente, sólo se pudo expresar en forma recombinante la proteína MBP:FRF2Δ315. Sin embargo, una porción importante de la proteína de fusión a MBP se localizó en la fracción soluble y se purificó utilizando una resina de amilosa (*Amilose resin, New England Biolabs*, N° E8021S).

ii) Experimentos de unión a columna de afinidad

Se utilizó la proteína purificada MBP:FRF2Δ315 para acoplarla a una resina de *sepharose* que contiene como brazo espaciador el ácido 6-aminohexanoico con el grupo carboxi-terminal activado por esterificación con N-hidroxisuccinamida (NHS) (*NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow, GE Healthcare*, N° 71-5000-14AC). Con esta resina, los ligandos que contienen grupos amino primarios se acoplan directamente a este éster activado para formar un enlace amida muy estable. Esta resina con la proteína MBP:FRF2Δ315 unida covalentemente, se utilizó para ensayar la interacción con la proteína PFT1:Tap proveniente de un extracto proteico de plántulas *pft1-1 PFT1g:Tap*. Una vez sembrada con el extracto proteico de plántulas, la columna se lavó y se eluyeron las proteínas con glicina a pH ácido (Figura 25). La proteína PFT1:Tap permaneció retenida en la columna, se observó

un desprendimiento durante el lavado pero se obtuvo mayor nivel de proteína durante la primera elución. Estos resultados indican que la proteína PFT1:Tap interacciona con MBP:FRF2 Δ 315.

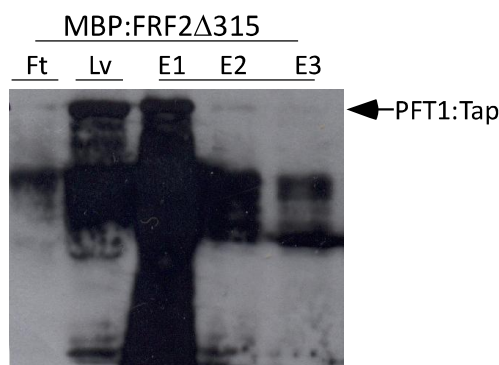


Figura 25. PFT1 interacciona *in vitro* con FRF2 Δ 315

Experimento de unión del extracto proteico de *pft1-1 PFT1g:Tap* a resina de *sephrose* activada con NHS (300 μ l de resina) conteniendo la proteína FRF2 Δ 315 unida covalentemente. Análisis por *Western blot* de la primera fracción del extracto colectada (Ft), fracciones de lavado (Lv) y de elución (E1, E2 y E3) de la columna. Las fracciones (1 ml) se concentraron mediante precipitación con TCA 20% v/v, se resuspendieron en 50 μ l de *loading buffer* y se sembraron 14 μ l de cada una en un gel SDS-PAGE 8%. El experimento se realizó por duplicado, obteniéndose resultados similares. Anticuerpo PAP dil 1/1000.

Con el fin de eluir a PFT1 como parte de su complejo proteico y en forma nativa, se ensayó la interacción de la proteína PFT1:Tap proveniente de un extracto proteico de plántulas *pft1-1 PFT1g:Tap* con extractos proteicos de *E.coli* que expresan las proteínas MBP:FRF2 Δ 315 o MBP a modo de control. El extracto proteico de *E.coli* soluble se acopló a una resina de amilosa y luego de lavar las proteínas unidas en forma inespecífica se sembró la columna de afinidad con el extracto proteico total de las plántulas. Una vez sembrada la columna con el extracto proteico de *Arabidopsis*, se lavó la columna y se eluyeron las proteínas con maltosa (Figura 26). Del análisis de las fracciones colectadas puede observarse que la proteína PFT1:Tap permanece retenida en la columna que posee la proteína MBP:FRF2 Δ 315 (1^o calle, gel superior, Figura 26) y comienza a desprenderse en el transcurso de los lavados de la columna. Se observó mayor cantidad de proteína en las fracciones de elución y ausencia de las bandas de degradación, las cuales corresponderían a productos de degradación que no contienen la región N-terminal y que podrían presentar una interacción más débil con FRF2 Δ 315. En cambio, la proteína PFT1 no quedó retenida en la columna de afinidad que contiene la proteína MBP (3^o calle, gel inferior, Figura 26), lo cual muestra que no existe interacción de PFT1:Tap con la proteína control ni con la resina. Los resultados indican que PFT1:Tap interacciona con MBP:FRF2 Δ 315, pero esta interacción parece ser débil ya que se observó

un desprendimiento importante de la proteína en las fracciones de lavado. Esto puede deberse a que las proteínas requieran para su interacción de algún otro factor que se encuentre presente en el extracto proteico de plantas y que no esté presente en el *buffer* de lavado y elución. Una posibilidad es que PFT1, debido a su dominio vWF-A presente en su región N-terminal, requiera para su interacción con otras proteínas de algún catión divalente.

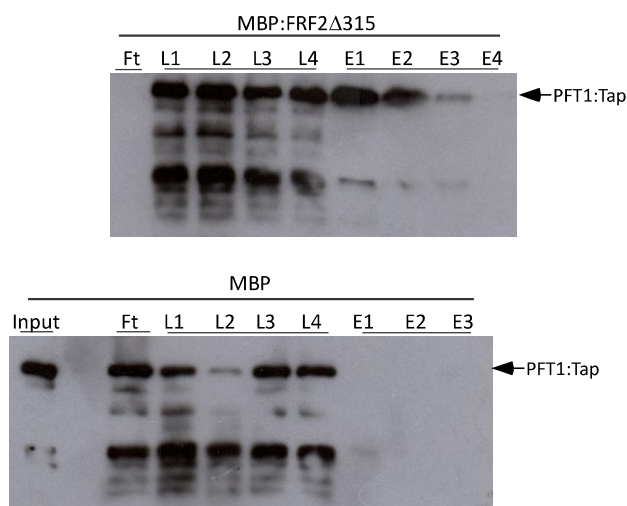


Figura 26. PFT1 Interacciona *in vitro* con FRF2Δ315

Análisis por *Western blot* de las fracciones de lavado y elución obtenidas de columnas de afinidad (resina de amilosa) con proteínas MBP:FRF2Δ315 (superior) y MBP (inferior) acopladas a cada columna conteniendo 1 ml de resina. Se sembraron en cada columna 500 μ l de extracto proteico total proveniente de plántulas *pft1-1 PFT1g:Tap* cultivadas en DL a 23°C por 10 días. LV 1, 2, 3 y 4, E 1, 2, 3 y 4 fracciones de lavado y elución de cada columna (1 ml), respectivamente. Las fracciones se concentraron mediante precipitación con TCA 20% v/v se resuspendieron en 50 μ l de *loading buffer* y se sembraron 14 μ l de cada una en gel SDS-PAGE 8%. Ft: Fracción inicial del extracto proteico de plántula que se colecta de la columna luego del sembrado.

Input: 3% del extracto proteico total que se sembró en la columna.

El experimento se realizó por duplicado, obteniéndose resultados similares. Anticuerpo PAP dil 1/1000.

VIII) FRF1 y FRF2 afectan la estabilidad de PFT1 *in vivo*

i) FRF1 y FRF2 promueven la degradación de PFT1 en ensayos transitorios en *Nicotiana benthamiana*

Para determinar si las proteínas FRF1 y FRF2 afectan la estabilidad de PFT1 *in vivo* se utilizó la técnica de agroinfiltración en *N. benthamiana*. Esta metodología permite la expresión de proteínas en forma transitoria y ha sido utilizada con éxito para la coexpresión de múltiples genes (Liu *et al.*, 2010). Para esto, se clonó la secuencia de ADN codificante de *FRF1* y de *FRF2* en un vector

binario bajo el promotor constitutivo 35S. Se transformó *A. tumefaciens* con estos vectores y se co-infiltraron hojas de *N. benthamiana* con mezclas de cultivos de *A. tumefaciens* conteniendo:

- 1) *PFT1g:Tap* + 35S + 35S::*p19*
- 2) *PFT1g:Tap* + 35S::*FRF1* + 35S::*p19*
- 3) *PFT1g:Tap* + 35S::*FRF2* + 35S::*p19*

Cada una de las co-infiltraciones se realizó utilizando igual volumen de cada cultivo y en el caso de no infiltrar con *FRF1* o *FRF2*, se infiltró con un cultivo conteniendo el vector vacío a modo de control (35S). Se utilizó el clon genómico de *PFT1* fusionado a la etiqueta Tap, con lo cual *PFT1* se expresó bajo su promotor endógeno.

p19 codifica para un supresor del silenciamiento génico (Rivas *et al.*, 2002b; Voinnet *et al.*, 2003) por lo tanto se coinfiltró siempre con un cultivo que lo contiene de modo tal de lograr una correcta expresión de los genes de interés.

Tres días después de la infiltración, se cosecharon las hojas infiltradas y se analizaron los niveles de *PFT1:Tap*, comparando los niveles obtenidos en presencia y en ausencia de *FRF1* y/o *FRF2* (Figura 27a). El mismo procedimiento se realizó infiltrando hojas de *N. benthamiana* con cultivos conteniendo el vector *PFT1g:HA* en lugar de *PFT1g:Tap* a fin de independizar los resultados de la etiqueta utilizada (Figura 27b). Los niveles de *PFT1:Tap* y *PFT1:HA* disminuyeron notablemente cuando se coinfiltró *PFT1g:Tap* (o *PFT1g:HA*) junto con 35S::*FRF1* o 35S::*FRF2*, lo cual indica que *FRF1* y *FRF2* promueven la degradación de *PFT1*. Sin embargo, dado que *PFT1* se expresa bajo su propio promotor, con estos resultados no podemos descartar que *FRF1* y *FRF2* no se encuentren afectando la transcripción de *PFT1*.

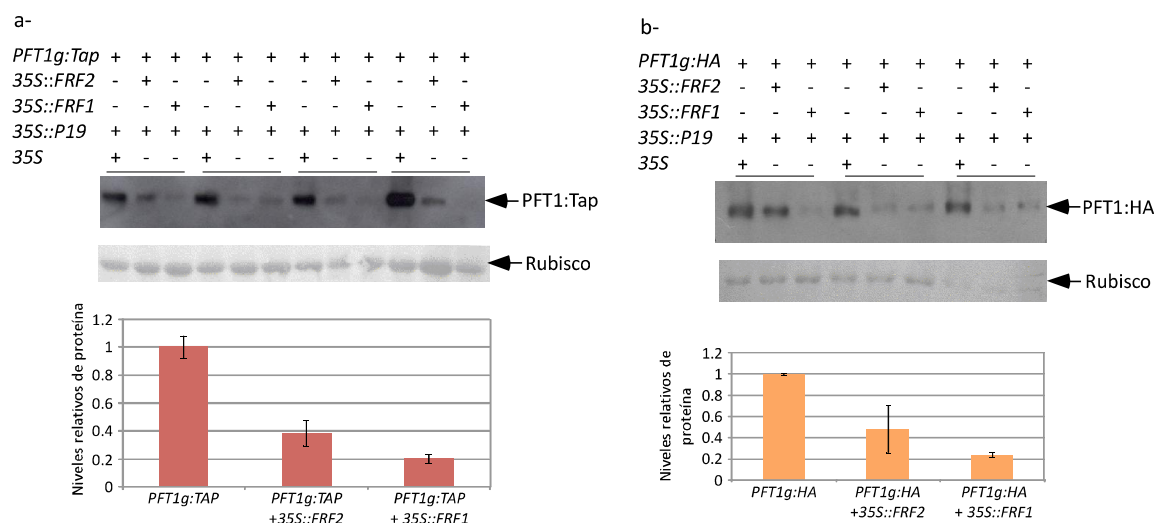


Figura 27. La co-expresión de FRF1 y/o FRF2 afecta los niveles de PFT1 *in vivo*

a- Análisis por *Western blot* de los niveles de PFT1:Tap. Se agroinfiltraron hojas de *N. benthamiana* con un supresor del silenciamiento génico (p19) y PFT1g:Tap +/- 35S::FRF1, 35S::FRF2 y 35S. Las muestras se cosecharon 3 días después de la agroinfiltración y se prepararon extractos proteicos totales. Se cuantificó la cantidad de proteína total y se sembraron 40 µg totales en cada pocillo en un gel SDS-PAGE 8%. Se muestra el resultado de cuatro agroinfiltraciones independientes. Anticuerpo PAP dil 1/1000. En la parte inferior, se muestra la tinción de la membrana con colorante rojo *ponceau* que permite analizar los niveles de proteína rubisco como control de carga.

El gráfico inferior muestra la cuantificación de la banda principal correspondiente a PFT1:Tap usando el programa *ImageJ*. Las barras representan la media +/- ES de las 4 agroinfiltraciones realizadas.

b- Análisis de los niveles de PFT1:HA en 3 agroinfiltraciones independientes. Se sembraron 50 µg de proteína total en un gel SDS-PAGE. Anticuerpo anti-HA peroxidasa dil 1/500. Se realizó el mismo procedimiento y análisis que en (a).

Los experimentos se realizaron por duplicado observándose resultados similares.

ii) El dominio RING es necesario para degradar a PFT1

Para determinar si las proteínas FRF1 y FRF2 requieren del dominio RING para promover la degradación de PFT1, se introdujeron mutaciones en el dominio RING de FRF2. Se mutaron los aminoácidos de unión al ligando metálico en las posiciones 4 y 5, cambiando las histidinas por alaninas. Los antecedentes muestran que las mutaciones en estas posiciones disminuyen notablemente la habilidad del dominio RING de promover la ubiquitinación de proteínas (Lorick *et al.*, 1999; Stone *et al.*, 2005). Las mutaciones se introdujeron por PCR en el ADNc de FRF2, y el ADNc de FRF2 mutageneizado se introdujo en un vector binario bajo el promotor constitutivo 35S, obteniéndose 35S::FRF2 AA.

Se realizaron coinfiltraciones de hojas de *N. benthamiana* con cultivos de *A. tumefaciens* conteniendo:

- 1) *PFT1g:Tap + 35S + 35S::p19*
- 2) *PFT1g:Tap + 35S::FRF1 + 35S::p19*
- 3) *PFT1g:Tap + 35S::FRF2 + 35S::p19*
- 4) *PFT1g:Tap + 35S::FRF2 AA + 35S::p19*

Se cosecharon las muestras de las hojas agroinfiltradas y se analizaron los niveles de PFT1:Tap obtenidos en presencia de FRF1, FRF2 y FRF2 AA (Figura 28a). Nuevamente, los niveles de PFT1:Tap disminuyeron notablemente en presencia de FRF1 y FRF2. Sin embargo, cuando se agroinfiltró con la proteína FRF2 con el dominio RING mutageneizado no se observó una disminución considerable en los niveles de PFT1:Tap. Los mismos resultados se obtuvieron al agroinfiltrar con *PFT1g:HA* (Figura 28b), lo cual demuestra que el efecto del RING es independiente de la etiqueta utilizada.

Por lo tanto, FRF1 y FRF2 promueven la degradación de PFT1 *in vivo* y esta degradación depende del dominio RING H2 Finger presente en estas proteínas. Estos resultados refuerzan la idea de que FRF1 y FRF2 poseen actividad E3 *ubiquitin ligasa*.

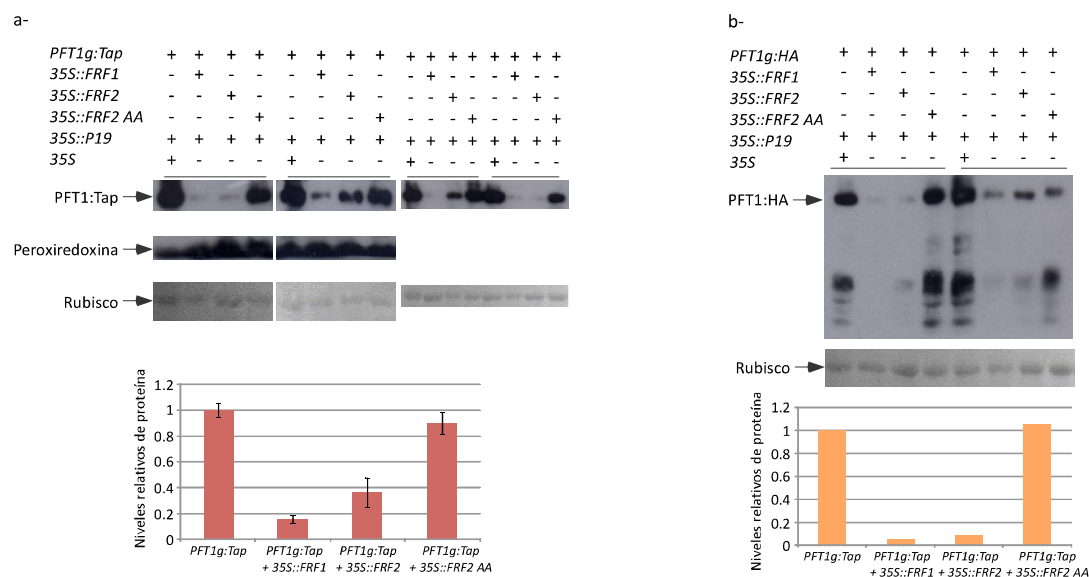


Figura 28. El dominio RING es esencial para promover la degradación de PFT1

a- Análisis por *Western blot* de los niveles de PFT1:Tap. Se agroinfiltraron hojas de *N. benthamiana* con el supresor del silenciamiento génico (p19) y *PFT1g:Tap* +/- *35S::FRF1*, *35S::FRF2*, *35S::FRF2 AA* y *35S*. Las muestras se cosecharon 3 días después de la agroinfiltración y se prepararon extractos proteicos totales. Se cuantificó la cantidad de proteína total y se sembraron 30 µg totales en cada pocillo en un gel SDS-PAGE 8%. Se muestra el resultado de cuatro agroinfiltraciones independientes. Anticuerpos PAP dil 1/1000, anti-peroxirredoxina dil 1/500 (control de carga). En la parte inferior, se muestra la tinción de las membranas con colorante rojo *ponceau*.

El gráfico inferior muestra la cuantificación de la banda principal correspondiente a PFT1:Tap usando el programa *ImageJ*. Las barras representan la media +/- ES de las 4 agroinfiltraciones realizadas.

b- Análisis de los niveles de PFT1:HA en 2 agroinfiltraciones independientes. Se sembraron 30 µg de proteína total en un gel SDS-PAGE. Se muestran las bandas correspondientes a PFT1:HA como así también sus productos de degradación. Anticuerpo anti-HA peroxidasa dil 1/500. La cuantificación de las bandas de PFT1:HA se realizó sólo para las muestras de la agroinfiltración de la izquierda.

IX) Aproximaciones genéticas para estudiar el rol de *FRF1* y *FRF2* *in vivo*

Para estudiar el rol de *FRF1* y *FRF2* *in vivo*, especialmente en la regulación de la floración, se aislaron las mutantes insercionales de T-DNA homocigotas para los genes *FRF1* (At2g15530) y *FRF2* (At4g34040) obtenidas de líneas insercionales generadas en el "SALK Institute", en "Singenta" y en el Instituto Max Planck (proyecto GABI Kat) y se generaron por cruzamiento las plantas dobles mutantes.

Se analizaron y secuenciaron tres líneas insercionales segregantes independientes para *FRF1*. En una de ellas el T-DNA se encontraba insertado fuera del gen (SALK_008745), en otra la inserción no pudo detectarse por PCR (SALK_150987) y en la tercera, que fue la utilizada para los

experimentos genéticos (SALK_048290, *frf1-1*), el T-DNA se encontraba insertado dentro de un intrón y pudo detectarse por PCR (Figuras 29a y 30a).

Para la mutación del gen *FRF2*, se obtuvieron dos líneas insercionales independientes confirmadas por secuenciación (Figura 29b). *frf2-1* corresponde a una mutante insercional obtenida en Singenta, SAIL_870_B03 y *frf2-2* corresponde a una mutante insercional obtenida en el Instituto Max Planck, GABI_587C07 (Figura 30b).

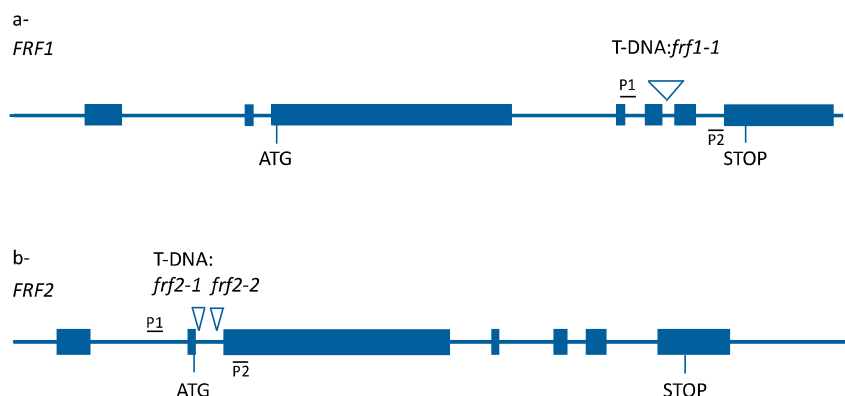


Figura 29. Esquema correspondiente a los genes *FRF1* y *FRF2* y a las inserciones de T-DNA utilizadas
Estructura de los genes *FRF1* (a) y *FRF2* (b). Las líneas representan los intrones y los rectángulos azules los exones. Se indica el lugar donde se encuentra la inserción de T-DNA confirmada por secuenciación en cada una de las mutantes. P1 y P2 corresponden a los oligonucleótidos iniciadores utilizados para el análisis por PCR de cada una de las mutaciones (Ver materiales y métodos).

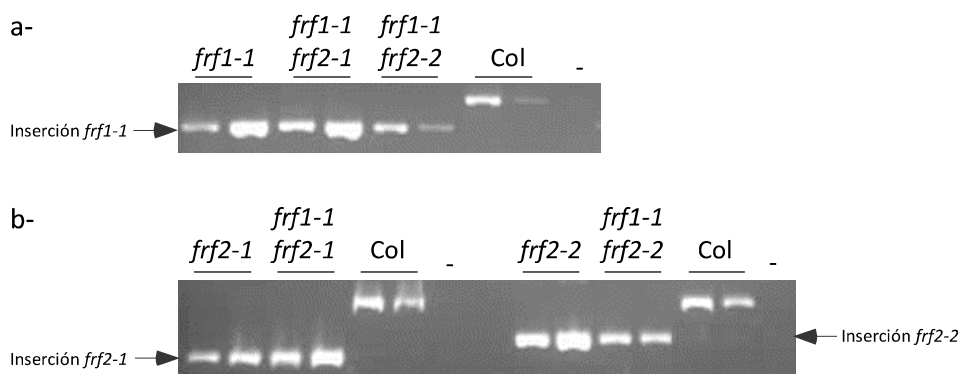


Figura 30. Genotipificación de las mutantes insercionales para los genes *FRF1* y *FRF2*
Análisis por PCR de las mutaciones *frf1-1* (a) y *frf2-1* y *frf2-2* (b) con 3 oligonucleótidos por reacción. Dos de ellos amplifican los genes salvajes (banda observada en Col, 570 pb (a) y 468 pb (b)) y uno de ellos alinea en la inserción de T-DNA y permite amplificar las inserciones en las plantas mutantes. Se muestran las bandas correspondientes a las inserciones *frf1-1* (400 pb), *frf2-1* (250 pb) y *frf2-2* (320 pb) obtenidas al amplificar el ADN genómico de cada una de las mutantes y dobles mutantes con los 3 oligonucleótidos.

Se analizó la expresión de los genes *FRF1* y *FRF2* en las mutantes insercionales obtenidas por RT-PCR de punto final y se observó que en la mutante *frf1-1* el gen continuaba expresándose en forma significativa (Figura 31a). En las mutantes para el gen *FRF2* no se observó expresión del gen (Figura 31b).

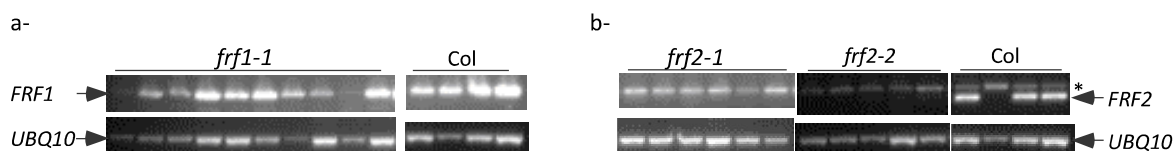


Figura 31. RT-PCR de punto final

Análisis de expresión de los genes *FRF1* (a) y *FRF2* (b) en las mutantes insercionales *frf1-1*, *frf2-1* y *frf2-2* y en plantas Col relativo a la expresión de ubiquitina (*UBQ10*). Se extrajo ARN total de 10 plantas *frf1-1*, 6 plantas *frf2-1*, 5 plantas *frf2-2* y 4 plantas Col cultivadas en DL a 23°C por 3 semanas. *Corresponde a una banda inespecífica.

Dado que el alelo *frf1-1* se expresó en forma significativa se analizó la expresión de *FRF1* y *FRF2* en la doble mutante *frf1-1 frf2-1* empleando RT-PCR en tiempo real (Figura 32).

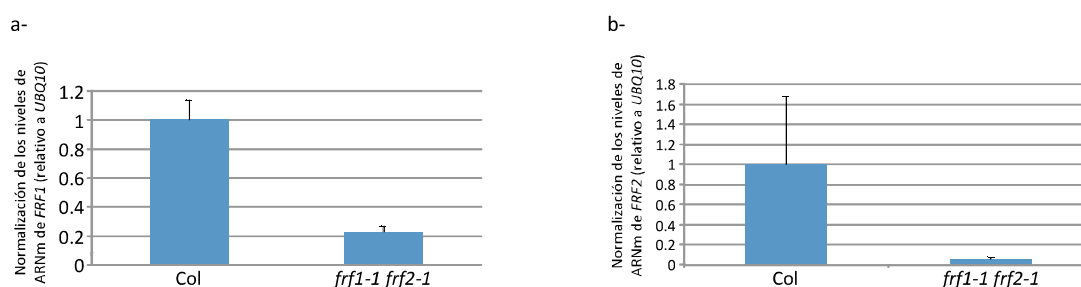


Figura 32. Cuantificación de los niveles de ARNm de *FRF1* y *FRF2* en doble mutante *frf1-1 frf2-1*

Medición de los niveles de ARNm de *FRF1* (a) y *FRF2* (b) relativo a la expresión de *UBQ10* de plántulas Col y de la doble mutante *frf1-1 frf2-1*. Se extrajo ARN total de plántulas cultivadas en LC a 23°C por 8 días. Las barras representan la media $\pm$ ES de tres muestras independientes analizadas por triplicado.

Como puede observarse en la Figura 32, el alelo *frf1-1* no es nulo ya que se expresa en más de un 20% en la doble mutante *frf1-1 frf2-1*. Debido a estos resultados se decidió emplear microRNAs artificiales (amiRNAs) dirigidos para silenciar los genes *FRF1* y *FRF2* y los genes *FRL1* (At1g45180) y *FRL2* (At5g42940). Se generaron plantas transgénicas expresándolos bajo un promotor constitutivo 35S. Esta metodología ha resultado de suma utilidad en el silenciamiento de múltiples genes de *Arabidopsis* y consiste en generar plantas transgénicas que expresen bajo un promotor constitutivo un microRNA mutageneizado de forma tal que silencie genes individuales o

grupos de genes (Schwab *et al.*, 2005; Schwab *et al.*, 2006; Ossowski *et al.*, 2008). Esta metodología produce un silenciamiento génico tanto a nivel transcripcional, como post-transcripcional.

Se diseñaron tres amiRNAs diferentes para silenciar los genes *FRF1* y *FRF2* (denominados V, A y B) y tres para silenciar *FRL1* y *FRL2* (denominados C, D y E) (Figura 33a). Además, dado que no se pudo diseñar un único amiRNA capaz de silenciar los cuatro genes juntos, se realizaron construcciones fusionando dos amiRNAs en *tándem*, de forma tal de silenciarlos con un único evento de transformación (Niu *et al.*, 2006). Estos amiRNAs se denominaron AE y VC (Figura 33b). En la Tabla 7, se muestran las plantas transgénicas homocigotas que contienen la inserción en un sólo *locus* obtenidas luego de las transformaciones con los vectores binarios que contenían los diferentes microRNAs artificiales.

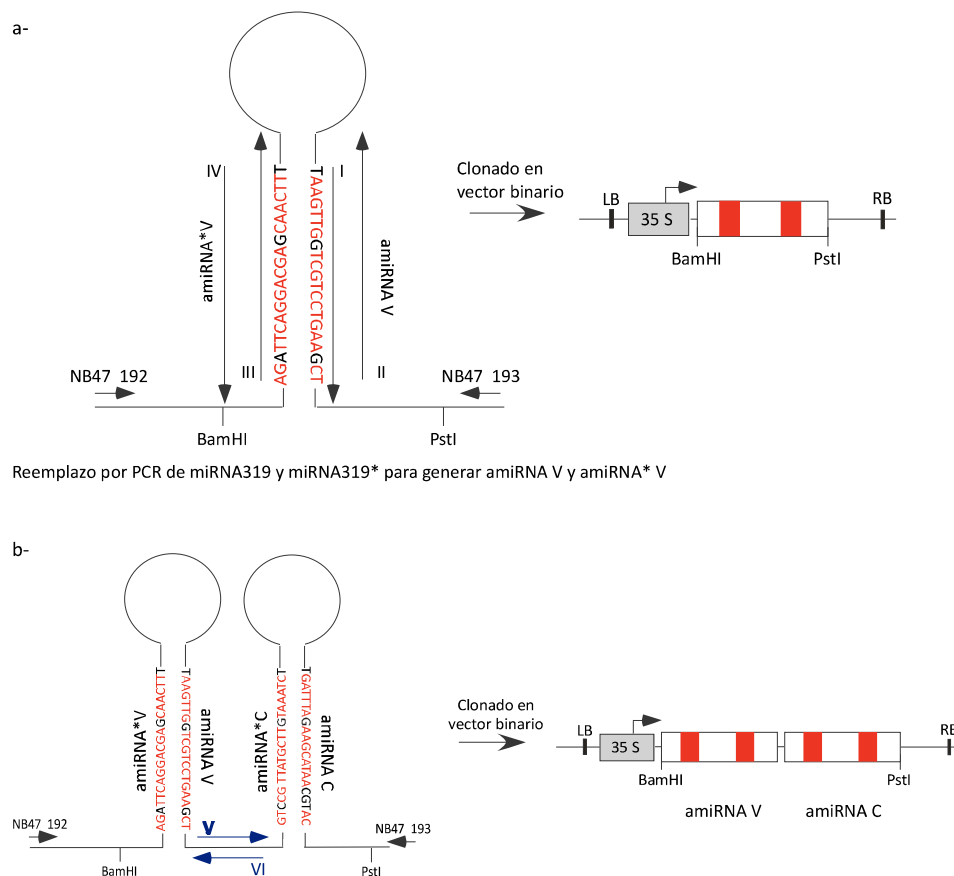


Figura 33. Obtención de microRNAs artificiales para silenciar los genes *FRF1*, *FRF2*, *FRL1* y *FRL2*

a- Estructura del pre-miRNA 319 (286 nucleótidos) representado en su forma de horquilla en el que se encuentran reemplazados el miRNA319 y el miRNA*319 por amiRNA V y amiRNA* V, a modo de ejemplo. Se indican los oligonucleótidos iniciadores utilizados para la obtención por PCR de los precursores amiRNAs, tal como se detalla en Materiales y Métodos y los sitios de clonado. Esquema representativo de la construcción obtenida luego del clonado en el vector binario. b- Esquema representativo de la construcción utilizada para fusionar dos amiRNAs en *tándem* (VC). Se indican los oligonucleótidos iniciadores V y VI utilizados para la obtención de la construcción por ligación por PCR, tal como se detalla en Materiales y Métodos.

Denominación de la planta transgénica	Nº de líneas transgénicas independientes, homocigotas con inserciones en un sólo <i>locus</i> (T3) obtenidas del total de plantas analizadas	Genes silenciados por los amiRNAs que expresan estas plantas
Col <i>amiRNA V</i> CHF3	2 (120.2 y 129.4)	<i>FRF1</i> y <i>FRF2</i>
Col <i>amiRNA A</i> CHF3	2 (3.1 y 10.2)	
Col <i>amiRNA B</i> CHF3	1 (24.6)	
Col <i>amiRNA C</i> CHF3	3 (28.1, 107.4 y 118.2)	<i>FRL1</i> y <i>FRL2</i>
Col <i>amiRNA D</i> CHF3	1 (32.1)	
Col <i>amiRNA E</i> CHF3	2 (40.5 y 41.2)	
Col <i>amiRNA AE</i> CHF3	4 (283.6, 284.7 , 286.1 y 287.5)	Fusión de 2 amiRNAs:
Col <i>amiRNA VC</i> CHF3	6 (329.2, 330.4 , 331.6, 332.4 , 333.5 y 334.7)	<i>FRF1</i> , <i>FRF2</i> , <i>FRL1</i> y <i>FRL2</i>

Tabla 7. Resumen de la denominación utilizada para las plantas transgénicas que sexpresan los amiRNAs. La numeración resaltada corresponde a las plantas utilizadas en los experimentos que se describirán a continuación.

Una vez obtenidas las líneas transgénicas que expresan los amiRNAs se analizó el nivel de ARNm de cada uno de los genes por RT-PCR cuantitativa (Figura 34). El nivel de ARNm de cada uno de los genes presentó diferencias de acuerdo a la línea transgénica utilizada. Se observó en general una disminución importante de los niveles de expresión, por lo tanto se utilizaron estas líneas transgénicas que expresan amiRNAs y la doble mutante insercional para analizar los niveles de proteína PFT1 y para realizar los experimentos de floración.

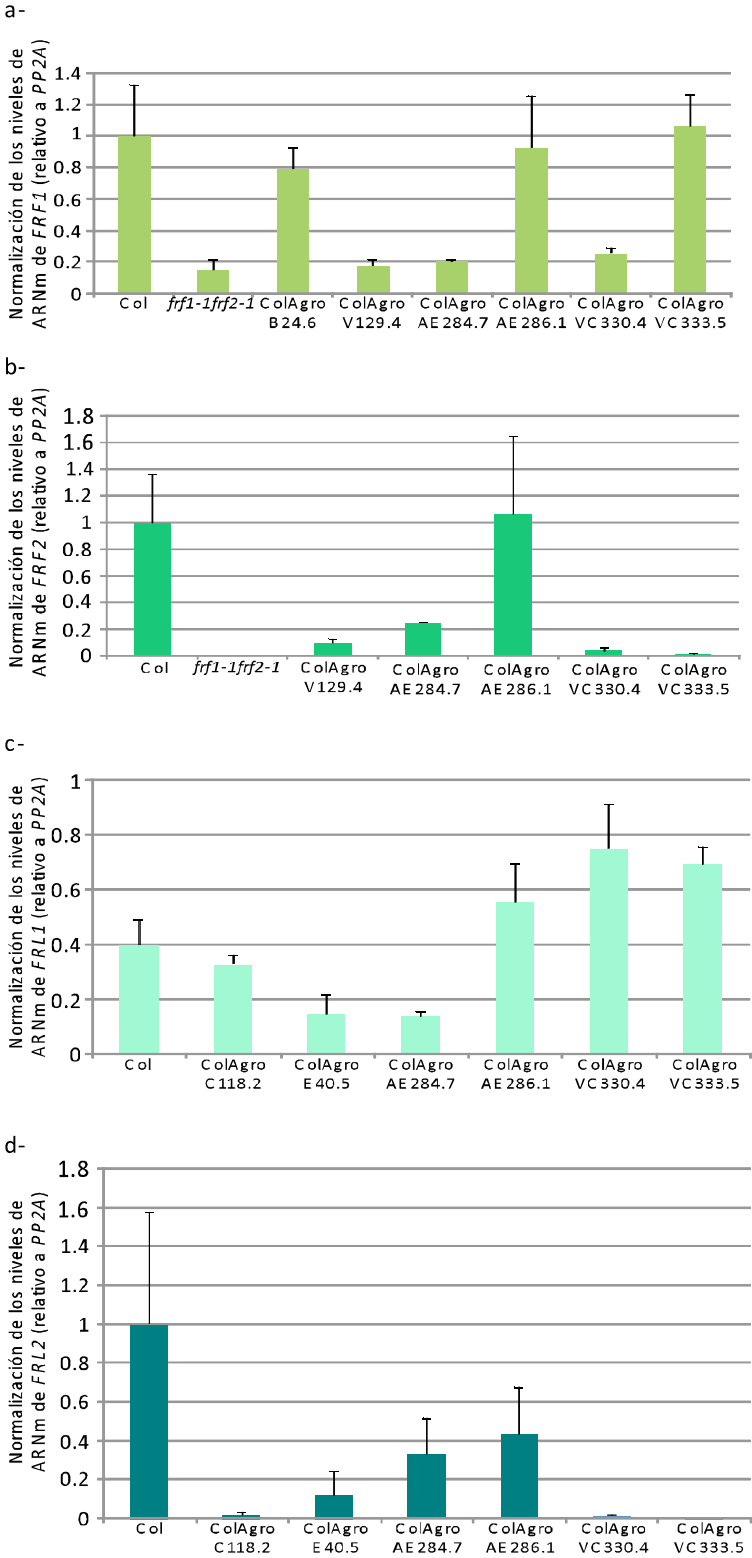


Figura 34. Cuantificación de transcritos en las líneas transgénicas que expresan los amiRNAs. Medición de los niveles de ARNm de *FRF1* (a), *FRF2* (b), *FRL1* (c) y *FRL2* (d) relativo a la expresión de *PROTEIN PHOSPHATASE 2a Subunit A3 (PP2A)* de las líneas que expresan amiRNAs y de la doble mutante por inserción de T-DNA (*frf1-1 frf2-1*) en comparación con plántulas Col. Se extrajo ARN total de plántulas cultivadas en LC a 23°C por 8 días. Las barras representan la media $\pm$ ES de tres muestras independientes analizadas por triplicado.

i) La expresión de *FRF1* y *FRF2* afecta los niveles de la proteína PFT1 *in vivo*

A partir de la doble mutante insercional *frf1-1 frf2-1* y de la línea transgénica *pft1-1 PFT1g:Tap*, se obtuvieron por cruzamiento y luego de varias generaciones plantas mutantes homocigotas para *frf1*, *frf2* y *pft1* que contenían la fusión PFT1:Tap (*frf1-1 frf2-1 pft1-1 PFT1g:Tap*). Estas líneas se utilizaron para determinar si los niveles de la proteína PFT1 eran mayores en las plantas que no expresan (o presentan baja expresión) los genes *FRF1* y *FRF2* (Figura 35). Los niveles de PFT1:Tap fueron considerablemente mayores en las plantas mutantes para *FRF1* y *FRF2*, lo cual refuerza la hipótesis de que *FRF1* y *FRF2* promueven la degradación de PFT1 *in vivo*.

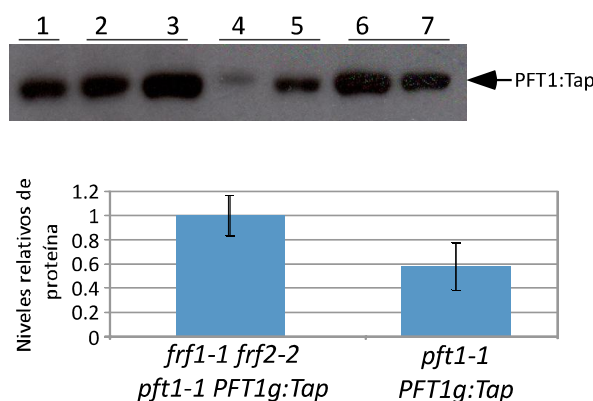


Figura 35. La disminución en la expresión de *FRF1* y *FRF2* produce un aumento en los niveles de PFT1

Análisis por *Western blot* de los niveles de PFT1:Tap. Se prepararon extractos proteicos totales de plántulas cultivadas en DL a 23°C por 10 días, se cuantificó la cantidad de proteína total y se sembraron 100 µg totales en cada pocillo en un gel SDS-PAGE 8%. Calle 1, 4 y 5: extracto proteico obtenido de plántulas *pft1-1 PFT1g:Tap*. Calle 2, 3, 6 y 7: Extracto proteico obtenido de plántulas *frf1-1 frf2-1 pft1-1 PFT1g:Tap*. Anticuerpo PAP dil 1/1000.

Cuantificación de la banda principal PFT1:Tap utilizando el programa *ImageJ*. Las barras representan la media $\pm$ ES de las bandas presentes en la placa radiográfica, 4 muestras independientes para *frf1-1 frf2-1 pft1-1 PFT1g:Tap* y 3 muestras independientes para *pft1-1 PFT1g:Tap*.

Para corroborar los resultados obtenidos, se utilizaron los amiRNAs diseñados para silenciar los genes *FRF1*, *FRF2*, *FRL1* y *FRL2* para transformar plantas *pft1-1 PFT1g:Tap*. Se obtuvieron las plantas transgénicas homocigotas con inserción en un sólo *locus* y se utilizaron estas plántulas (*pft1-1 PFT1g:Tap amiRNA VC CHF1*) para determinar los niveles de PFT1:Tap en comparación con los niveles presentes en las plántulas *pft1-1 PFT1g:Tap* que presentan los cuatro genes funcionales (Figura 36). En forma análoga a lo observado con las líneas mutantes para *FRF1* y *FRF2*, al silenciar los genes *FRF1*, *FRF2*, *FRL1* y *FRL2* se observó un incremento en los niveles de PFT1 lo cual sugiere que estas proteínas se encuentran involucradas en la degradación de PFT1.

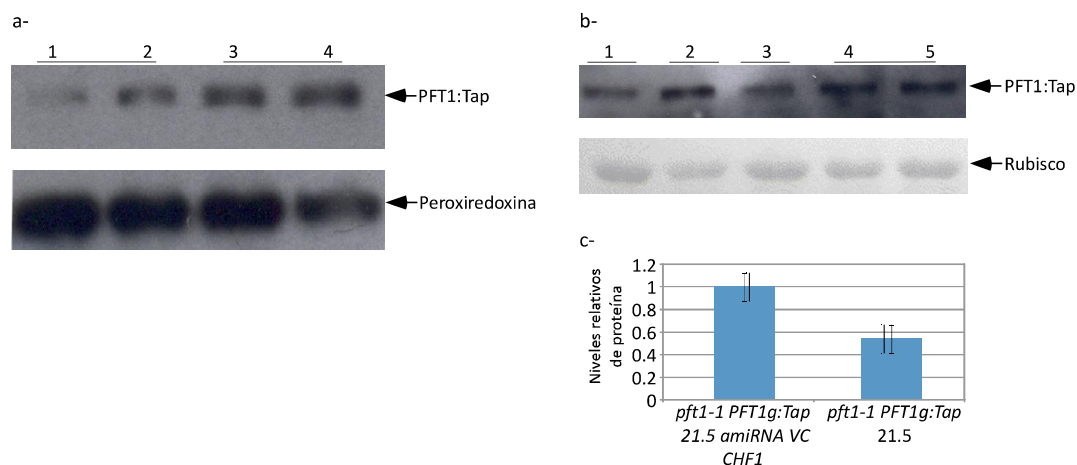


Figura 36. El silenciamiento de los genes *FRF1*, *FRF2*, *FRL1* y *FRL2* produce un aumento de los niveles de PFT1
Análisis por *Western blot* de los niveles de PFT1:Tap. Se prepararon extractos proteicos totales de plántulas cultivadas en DL a 23°C por 10 días, se cuantificó la cantidad de proteína total y se sembraron 50 µg totales en cada pocillo en un gel SDS-PAGE 8%. Se muestran dos experimentos independientes. a- Calles 1 y 2: extracto proteico obtenido de plántulas *pft1-1 PFT1g:Tap*, calles 3 y 4: extracto proteico obtenido de plántulas *pft1-1 PFT1g:Tap amiRNA VC CHF1*. Anticuerpo PAP dil 1/1000, anti-peroxirredoxina dil 1/500 (control de carga). b- Calles 1 y 3: extracto proteico obtenido de plántulas *pft1-1 PFT1g:Tap*, calles 2, 4 y 5 extracto proteico obtenido de plántulas *pft1-1 PFT1g:Tap amiRNA VC CHF1*. Anticuerpo PAP dil 1/1000. Tinción de membrana con rojo *ponceau*, muestra los niveles de proteína rubisco como control de carga. c- Cuantificación de la banda principal PFT1:Tap utilizando el programa *ImageJ*. Las barras representan la media $\pm$ ES de las bandas observadas en el *Western blot*, 4 muestras independientes para *pft1-1 PFT1g:Tap* y 5 muestras independientes para *pft1-1 PFT1g:Tap amiRNA VC CHF1*.

ii) *FRF1* y *FRF2* actúan como activadores de la floración

Como PFT1 se encuentra involucrada en regular la floración, se utilizaron las líneas mutantes insercionales de T-DNA para los genes *FRF1* y *FRF2* para caracterizar si estas mutantes presentan algún tipo de alteración en su tiempo de floración. Se cultivaron las plantas en condiciones de DL a 23°C y se determinó el número de hojas totales presentes al momento de la aparición de las primeras flores. Se realizaron cinco experimentos independientes con las mutantes insercionales *frf1-1*, *frf2-1*, la doble mutante *frf1-1 frf2-1* y una línea transgénica sobreexpresante de *FRF1* (*35S::FRF1*) (Figura 37a). En todos los casos se comparó la media del número de hojas totales con los valores obtenidos para Col y la mutante *pft1-1*. Se observó que las plantas doble mutante *frf1-1 frf2-1* florecen significativamente más tarde que Col con un fenotipo de floración tardía similar a la mutante *pft1-1*, lo cual indica que *FRF1* y *FRF2* se encuentran involucrados en regular la floración.

Dados los resultados obtenidos, se obtuvo por cruzamiento la triple mutante *frf1-1 frf2-1 pft1-1* y se realizaron experimentos de floración en DL a 23°C (Figura 37b). La triple mutante *frf1-1*

frf2-1 pft1-1 floreció significativamente más tarde que la doble mutante *frf1-1 frf2-1*. Estos resultados indican que *FRF1* y *FRF2* promueven la floración aún en ausencia de *PFT1*, con lo cual podrían estar regulando la floración por una vía independiente a la de *PFT1*. Podrían, por ejemplo, interaccionar con otros componentes del complejo MEDIATOR.

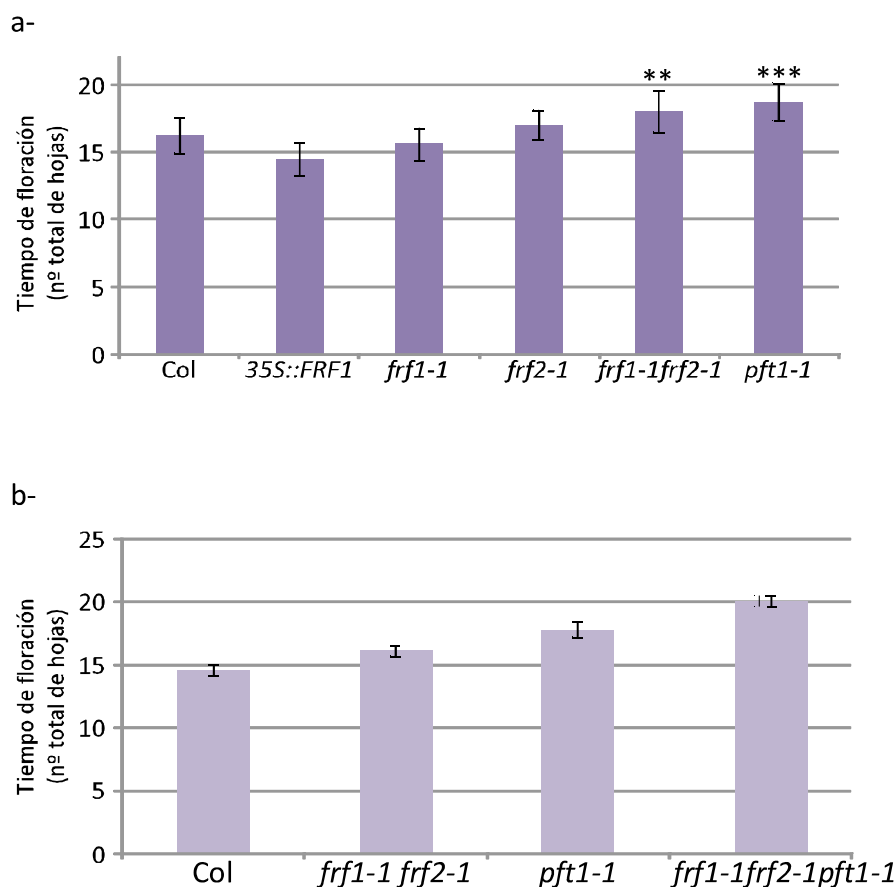


Figura 37. FRF1 y FRF2 son activadores de la floración

Se midió el número total de hojas al momento de la floración (hojas de la roseta + hojas caulinares) de plantas cultivadas en DL a 23°C. a- Las barras representan la media $\pm$ ES de cinco experimentos independientes con un total de al menos 58 plantas por cada genotipo. Los valores indicados con * son estadísticamente significativos en comparación con los valores de Col ($p < 0,01$) al analizarlos por ANOVA tipo II para experimentos repetidos con contraste de Bonferroni. b- Las barras representan la media $\pm$ ES de al menos 22 plantas por cada genotipo. Al comparar las medias por ANOVA de un factor con contraste de Bonferroni se obtuvo que los valores de *frf1-1 frf2-1 pft1-1* son estadísticamente diferentes de Col ($p < 0,0001$), de *frf1-1 frf2-1* ($p < 0,0001$) y de *pft1-1* ($p < 0,003$). Los valores de Col son estadísticamente diferentes de *pft1-1* ($p < 0,0001$) y de *frf1-1 frf2-1* ($p < 0,01$). El experimento se repitió obteniéndose resultados similares.

Dado que el alelo *frf1-1* no es nulo y presenta niveles importantes de ARNm (15-20%) (Figuras 32a y 34a), se realizó el mismo tipo de experimento utilizando las líneas transgénicas que expresan microRNAs artificiales diseñados para silenciar los genes *FRF1*, *FRF2* y/o *FRL1*, *FRL2* (Tabla 7). En primer lugar se cultivaron 19 líneas transgénicas independientes en DL a 23°C y se comparó la media del número total de hojas al momento de la floración con el valor obtenido para Col. Cuatro de las líneas contenían amiRNAs diseñados para silenciar los genes *FRF1* y *FRF2*, seis para *FRL1* y *FRL2* y nueve para *FRF1*, *FRF2*, *FRL1* y *FRL2* (Figura 38a). De las cuatro líneas que expresan amiRNAs para silenciar *FRF1* y *FRF2*, dos retrasaron la floración en forma significativa (B24.6 y V129.2). Estas líneas transgénicas contienen microRNAs artificiales diferentes diseñados para silenciar los mismos genes lo cual disminuye la posibilidad de que el resultado se deba a un silenciamiento de genes inespecíficos (*off-targets*). Con respecto a los genes homólogos a *FRF1* y *FRF2* (*FRL1* y *FRL2*), de las seis líneas transgénicas independientes analizadas, tres de ellas retrasaron la floración en forma significativa (C107.4, C118.2 y E40.5) y corresponden a dos amiRNAs diferentes. Si bien no existe evidencia de que estas proteínas *FRL1* y *FRL2* interaccionen con *PFT1*, se observó que son capaces de regular la floración, con lo cual podrían estar actuando por un mecanismo independiente al de *PFT1*.

Se construyeron dos combinaciones diferentes de amiRNAs construidos en *tándem* para silenciar los cuatro genes en un sólo evento de transformación, AE y VC. De las cuatro líneas transgénicas independientes analizadas para la combinación AE, un 50% de ellas mostró un retraso en el tiempo de floración (AE284.7 y AE286.1), mientras que para la combinación VC un 40% de las líneas analizadas mostró este fenotipo. Por lo tanto, utilizando microRNAs artificiales diferentes se logró disminuir la expresión de los genes de interés y obtener líneas transgénicas que mostraron un tiempo de floración retrasado con respecto a Col.

Se repitió el experimento de floración utilizando las líneas transgénicas que presentaron fenotipo de floración tardío estadísticamente significativo y que además habían sido utilizadas para la medición de la expresión génica por qRT-PCR (Figura 34 y Figura 38b). Se observó en todas las líneas analizadas un aumento significativo en el número total de hojas al momento de la floración. Por lo tanto, las plantas que expresan los amiRNAs diseñados para silenciar tanto a *FRF1* y a *FRF2*, como los diseñados para silenciar a *FRL1* y *FRL2* mostraron un retraso significativo en el tiempo de floración. Lo mismo ocurrió con las plantas que expresan la fusión de los dos amiRNAs y que silencian los cuatro genes. Estos resultados coinciden con lo observado en las mutantes insercionales de T-DNA *frf1-1 frf2-1* e indican que estas proteínas tienen un papel importante en la regulación de la floración.

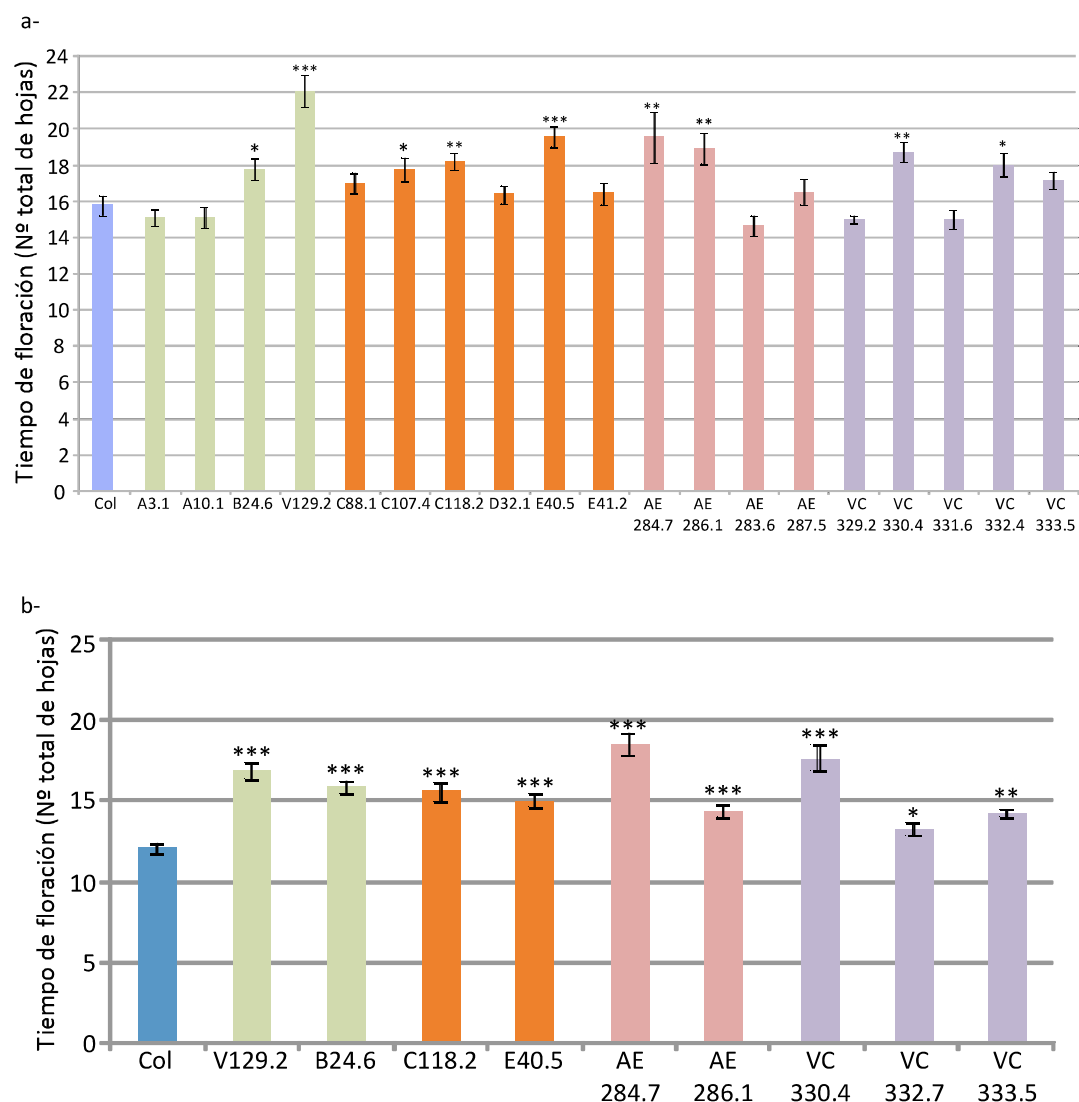


Figura 38. Medición del tiempo de floración en líneas transgénicas que expresan amiRNAs

Se midió el número total de hojas al momento de la floración (hojas de la roseta + hojas caulinares) de plantas cultivadas en DL a 23°C. Las barras representan la media $\pm$ ES de (a) al menos 10 plantas por genotipo, (b) al menos 6 plantas por genotipo. Las líneas A, V y B expresan distintos amiRNAs diseñados para silenciar *FRF1* y *FRF2* y las líneas C, D y E expresan distintos amiRNAs diseñados para silenciar *FRL1* y *FRL2*. Las líneas AE y VC expresan fusiones de 2 amiRNAs diferentes para silenciar los 4 genes.

Los valores indicados con * son estadísticamente significativos en comparación con los valores de Col ($p < 0,027$ por ANOVA de un factor con contraste de Bonferroni).

Dos líneas transgénicas que expresan diferentes fusiones de amiRNAs (AE284.7 y VC330.4) presentaron además del fenotipo de floración tardía un fenotipo particular. Estas plantas al ser cultivadas en DL a 23°C fueron más pequeñas, presentaron inflorescencias más cortas y con mayores ramificaciones que las plantas del tipo salvaje y presentaron un fenotipo característico de hojas curvadas (Figura 39). Estas dos líneas fueron, además, las que presentaron niveles más bajos de ARNm de *FRF1*, *FRF2* y *FRL2* cuando se analizaron por qRT-PCR (Figura 34) y las que mostraron fenotipo de floración más tardío (Figura 38). Dado que este efecto fenotípico se produjo con dos amiRNAs distintos, es poco probable que estos fenotipos sean producto de interacciones de los amiRNAs con genes inespecíficos (*off-targets*).

Las características presentadas por estas dos líneas transgénicas sugieren que estas proteínas podrían, además de regular la floración, tener otras funciones, lo cual es esperable dado que interaccionan con un componente del complejo MEDIATOR.

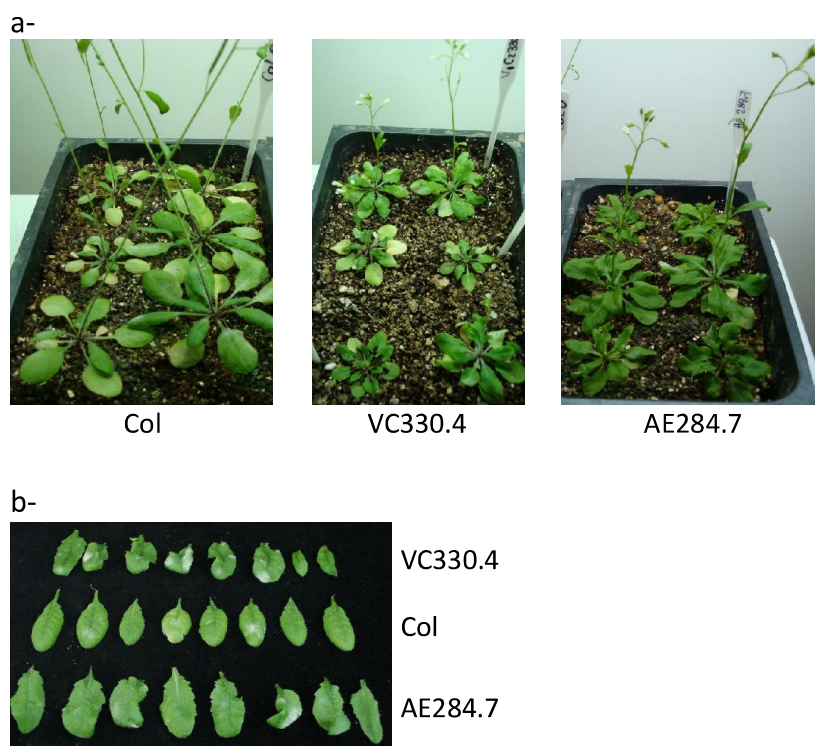


Figura 39. Fenotipo presentado por dos líneas que expresan amiRNAs diferentes

- a- Dos líneas que sobreexpresan dos fusiones amiRNAs diferentes (VC330.4 y AE284.7) presentan una morfología similar: sus inflorescencias son más cortas y ramificadas que Col y sus hojas de roseta son curvadas.
- b- Hojas de la roseta de las líneas transgénicas amiRNA VC330.4 y AE284.7 comparadas con las hojas de la roseta de Col. En VC330.4 se muestran además 2 hojas caulinares, últimas dos de la derecha.

X) El dominio activador transcripcional VP16 convierte a PFT1 en un represor de la floración

PFT1 es un activador de la floración y como las proteínas FRF1 y FRF2 median su degradación, las plantas que presentan una disminución en los niveles de ARNm de estos genes presentan un mayor nivel de proteína PFT1 (Figuras 35 y 36). Al elevar los niveles de PFT1, se esperaba observar un fenotipo de floración temprana tal como ocurre en las plantas transgénicas sobreexpresantes de *PFT1*. Sin embargo, contrariamente a lo esperado, se observó que tanto las mutantes insercionales de T-DNA de *FRF1* y *FRF2*, como las líneas transgénicas que expresan amiRNAs que silencian a *FRF1*, *FRF2*, *FRL1* y *FRL2* florecen más tarde que Col (Figuras 37 y 38). Una posibilidad es que FRF1 y FRF2 puedan regular la floración en forma, al menos parcialmente, independiente de PFT1. La otra posibilidad es que los niveles de proteína PFT1 pueden no estar correlacionados con su capacidad transcripcional, dado que en algunos casos la degradación de algunos factores de transcripción puede ser necesaria para su función (Collins & Tansey, 2006)

Como el dominio activador transcripcional del virus del herpes simplex humano tipo 1 (VP16) ha sido ampliamente utilizado para activar factores de transcripción en plantas (Busch *et al.*, 1999; Parcy *et al.*, 2002; Bensmihen, S. *et al.*, 2004; Matsuo & Banno, 2008; Hervé *et al.*, 2009; Koo *et al.*, 2010), se generaron plantas transgénicas fusionando *PFT1* genómico al dominio activador VP16, con el fin de determinar si esta fusión promovía el accionar de PFT1. La etiqueta utilizada contiene 79 aminoácidos, dentro de los cuales se encuentra el dominio ácido C-terminal del activador transcripcional de la proteína 16 del virus del herpes simplex (30 aminoácidos). Esta etiqueta se subclonó en el clon genómico de *PFT1* de forma tal de obtener la proteína con la fusión VP16 en el extremo C-terminal. Las fusiones al extremo C-terminal de PFT1 generadas en nuestro laboratorio (PFT1:Tap, PFT1:HA, PFT1:GR, PFT1:GR-HA y PFT1:GFP) fueron todas funcionales y capaces de complementar el fenotipo de floración tardía de las mutantes *pft1-1*.

Con las líneas transgénicas que contenían la fusión *PFT1g:VP16* se realizaron experimentos de floración. Estos experimentos se realizaron en el contexto de plantas del tipo salvaje, es decir plantas Col transformadas con la construcción *PFT1g:VP16* en un vector binario y en el contexto de plantas mutantes *pft1-1* transformadas con esta construcción, donde no hay expresión de *PFT1* endógeno. Se determinó el número de hojas totales al momento de la floración y se comparó con el valor obtenido para Col y *pft1-1*, respectivamente (Figura 40). Como puede observarse en el gráfico, a diferencia de lo esperado, el dominio activador VP16 no promueve el accionar de PFT1 favoreciendo una floración temprana, sino por el contrario las plantas transgénicas con la fusión al VP16 florecen más tarde respecto al control tanto en el contexto Col como en el de la mutante *pft1-1*, donde es aún más aguda esta diferencia. Esta diferencia en el tiempo de floración no puede

atribuirse a que la proteína PFT1:VP16 no sea funcional ya que existen múltiples evidencias de que las fusiones al C-terminal de PFT1 son funcionales *in vivo* (Figura 12), aún utilizando etiquetas de mayor peso molecular que el VP16. La fusión de PFT1 al VP16 no sólo no promueve el accionar de PFT1, sino por el contrario estaría convirtiendo a PFT1 en un represor de la floración, ya que el tiempo de floración de las plantas transgénicas *pft1-1 PFT1g:VP16* supera en más de un 50% al de la mutante *pft1-1*.

Estos resultados indican que el rol de PFT1 es complejo y que no se puede esperar una relación simple con la inducción de la floración. Podría ocurrir que, como parte del complejo MEDIATOR, PFT1 pueda influir en distintas vías que afecten la floración en forma antagónica y entonces, dependiendo de la vía que fuera más afectada, se observará el resultado final, promoción o inhibición de la floración.

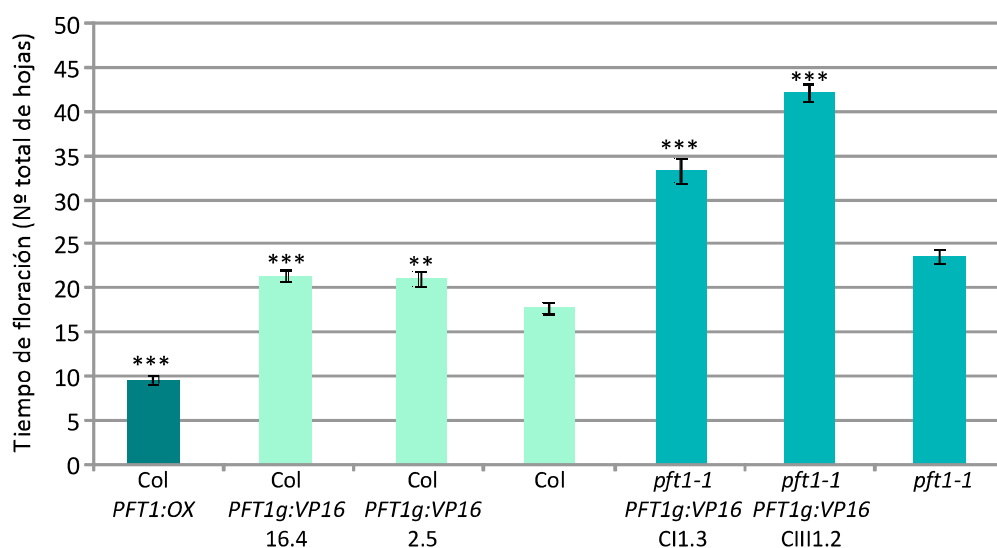


Figura 40. La fusión de PFT1 al dominio activador VP16 convierte a PFT1 en un represor de la floración

Se midió el número total de hojas al momento de la floración (hojas de la roseta + hojas caulinares) de plantas cultivadas en DL a 23°C. Se analizaron dos líneas transgénicas independientes del *background* Col y del *background pft1-1* y plantas sobreexpresantes de PFT1 (PFT1:OX). Las barras representan la media $\pm$ ES de al menos 12 plantas por genotipo. Los valores indicados con * son estadísticamente significativos en comparación con los valores de Col ($p < 0,0054$) o *pft1-1* ($p < 2,3 \times 10^{-7}$) por ANOVA de un factor con contraste de Bonferroni.

XI) La degradación de PFT1 podría ser necesaria para promover su actividad transcripcional

El rol transcripcional de PFT1 es complejo y se ha demostrado que varias proteínas F-Box de levaduras y mamíferos son capaces de promover la degradación de factores de transcripción, pero a su vez promover coordinadamente su actividad transcripcional (Kim *et al.*, 2003; Lehr *et al.*, 2003; Perissi *et al.*, 2004; Muratani *et al.*, 2005). Se decidió analizar la estabilidad de la proteína PFT1:GR-HA en extractos proteicos de plántulas *pft1-1 PFT1g:GR-HA* cultivadas en presencia o ausencia de DEX a fin de determinar si su función transcripcional tenía correlación con su baja estabilidad. Tal como se estudió en el Capítulo 1, las plantas transgénicas que presentaron fusiones de *PFT1g* al GR, en presencia de DEX, recuperaron el fenotipo normal de las hojas y se aceleró su tiempo de floración, floreciendo aún más temprano que el control tipo salvaje. En presencia de DEX, PFT1 se estaría traslocando al núcleo y sería capaz de activar la floración. Se analizó la estabilidad a temperatura ambiente de extractos proteicos obtenidos de plántulas *pft1-1 PFT1g:GR-HA* cultivadas durante 10 días en medio de cultivo MS +/- DEX 1 μ M (Figura 41). Cuando las plántulas se cultivaron en presencia de DEX, la estabilidad de PFT1 disminuyó notablemente respecto al control. El experimento se realizó con dos líneas transgénicas independientes, en una de ellas (1.5) luego de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente los niveles de PFT1:GR-HA disminuyeron considerablemente cuando las plantas se cultivaron en presencia de DEX. En la otra línea transgénica (5.1), la estabilidad de PFT1:GR-HA en presencia de DEX fue tan baja, que no logró detectarse la proteína en su forma completa aún al comienzo de la incubación.

Estos resultados indican que la degradación de PFT1 ocurre en mayor medida en el núcleo y son un indicio de que esta degradación puede ser necesaria para que pueda cumplir su función transcripcional.

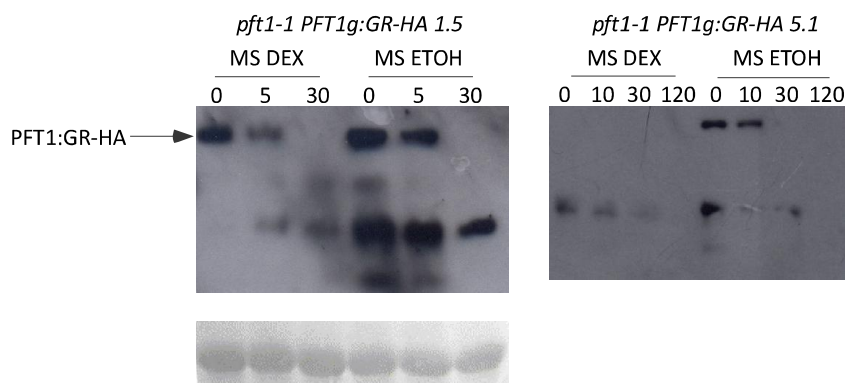


Figura 41. La degradación de PFT1 ocurre mayormente en el núcleo

Análisis por *Western blot* de los niveles de PFT1:GR-HA y de sus productos de degradación. Se prepararon extractos proteicos totales de dos líneas independientes de plántulas *pft1-1 PFT1g:GR-HA* (1.5 y 5.1) cultivadas en DL a 23°C por 10 días, en MS + DEX 1 μ M o MS + etanol 0,0096% v/v. Los extractos proteicos se incubaron a temperatura ambiente y se colectaron muestras a los 0, 5, 10, 30 y 120 minutos de comenzada la incubación. Las reacciones se detuvieron inmediatamente agregando un volumen de *loading buffer* e hirviendo por 5 minutos. Se sembraron 7 μ l de extracto proteico total en cada pocillo en un gel SDS-PAGE 8%. Anticuerpo anti-HA peroxidasa dil 1/500. En la parte inferior se muestra la tinción de una de las membranas con rojo *ponceau* que muestra los niveles de proteína rubisco como control de carga.

Para ahondar en la relación entre la degradación de PFT1 y su función transcripcional, se cultivaron plantas *pft1-1 PFT1g:HA* y *pft1-1 PFT1g:GR-HA* en presencia y ausencia de DEX y se analizó por un lado su tiempo de floración y por el otro los niveles de proteína PFT1:HA y PFT1:GR-HA (Figura 42). Como ocurrió con las líneas *pft1-1 PFT1g:GR* (Figuras 7 y 10), en presencia de DEX las plantas *pft1-1 PFT1g:GR-HA* florecieron significativamente más temprano que las plantas *pft1-1 PFT1g:HA*, lo cual indica que la traslocación de PFT1 al núcleo no sólo complementa el fenotipo de floración tardía de *pft1-1* sino que acelera su tiempo de floración. Como era de esperar no se observaron diferencias en los niveles de proteína PFT1:HA cuando las plántulas fueron cultivadas en presencia o ausencia de DEX, como así tampoco en su tiempo de floración, por lo tanto la DEX no tiene un efecto intrínseco en el tiempo de floración ni en los niveles de PFT1:HA. Sin embargo, al comparar los niveles de proteína PFT1:GR-HA obtenidos de extractos proteicos totales de plántulas cultivadas en presencia y ausencia de DEX, se determinó que en presencia de DEX los niveles de PFT1:GR-HA fueron aproximadamente un 50% menores que en ausencia de DEX.

Al comparar los niveles de proteína PFT1:GR-HA con los de PFT1:HA es que surgen hipótesis interesantes. Como se observa en la Figura 42b, los niveles de PFT1:GR-HA son bastante menores que los de PFT1:HA, independientemente de la presencia o ausencia de DEX. Este experimento se repitió con tres líneas transgénicas independientes para cada etiqueta, observándose el mismo resultado. A pesar de que los niveles de PFT1:GR-HA son más bajos, al agregar DEX su efecto en la

floración es mayor (Figura 42a), obteniéndose una relación inversa entre la floración y los niveles de proteína. Estos resultados sugieren que la degradación de PFT1 podría ser necesaria para que pueda activar la floración. De todas formas, dado que en ausencia de DEX los niveles de PFT1:GR-HA fueron menores que los de PFT1:HA, no se puede descartar que el anticuerpo utilizado detecte en forma más eficiente a la proteína PFT1:HA que a la PFT1:GR-HA, debido a la presencia de la etiqueta GR.

Como conclusión general de estos últimos experimentos, se propone que PFT1 actúa en el núcleo dónde es degradada vía proteasoma por un mecanismo que involucraría al menos a FRF1 y FRF2 y que esta degradación podría ser necesaria para que pueda activar la floración.

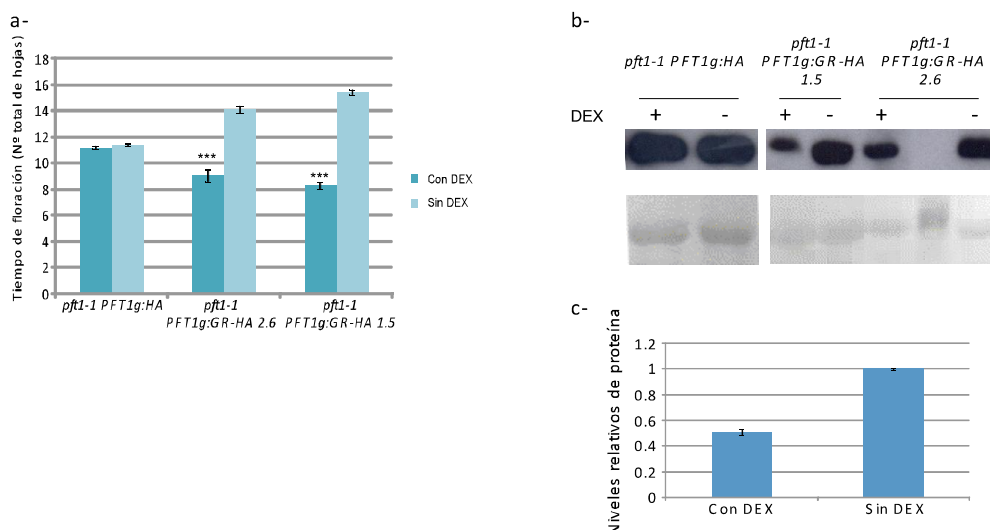


Figura 42. La degradación de PFT1 es necesaria para promover la floración

a- Se midió el número total de hojas al momento de la floración (hojas de la roseta + hojas caulinares) de plantas cultivadas en LC a 23°C en medio de cultivo MS +/- DEX 1 µM. Las barras representan la media +/- ES de al menos 25 plantas por cada genotipo para cada condición de crecimiento. * Indica que *pft1-1 PFT1g:GR-HA* cultivada en presencia de DEX floreció estadísticamente más temprano que *pft1-1 PFT1g:GR-HA* cultivada en ausencia de DEX con ($p < 4,5 \times 10^{-28}$) y que *pft1-1 PFT1g:HA* cultivada en presencia de DEX ($p < 1,7 \times 10^{-18}$) por T-Test.

b- Análisis por *Western blot* de los niveles de PFT1:HA y PFT1:GR-HA. Se prepararon extractos proteicos totales de dos líneas independientes de plántulas *pft1-1 PFT1g:GR-HA* (1.5 y 2.6) y de plántulas *pft1-1 PFT1g:HA* cultivadas en LC a 23°C por 10 días en MS + DEX 1 µM o MS + etanol 0,0096% v/v, se cuantificó la cantidad de proteína total y se sembraron 40 µg totales en cada pocillo en un gel SDS-PAGE 8%. En la parte inferior se muestra la tinción de las membranas con rojo *ponceau* que muestra los niveles de proteína rubisco como control de carga.

c- Cuantificación de la banda principal correspondiente a PFT1:GR-HA usando el programa *ImageJ*. Las barras representan la media +/- ES de las 2 bandas observadas en el *Western blot*.

DISCUSIÓN

El objetivo general de este trabajo fue tratar de comprender el rol que juega PFT1 a nivel bioquímico en la regulación de la floración. Como parte del complejo MEDIATOR de *Arabidopsis thaliana*, PFT1 se encuentra regulando la transcripción génica y es probable que regule muchos procesos fisiológicos en plantas. Como objetivo particular se estudió la función que cumplen dos proteínas que interactúan con PFT1 en su estabilidad y en la regulación de la floración.

A partir del análisis de los niveles de PFT1 en distintos tejidos de *Arabidopsis* se observó que la proteína se encuentra presente en todos los tejidos ensayados, obteniéndose mayores niveles en silicua y en inflorescencias (Figura 13). Si bien no existen indicios de que PFT1 se encuentre regulada por factores ambientales, no puede descartarse esta posibilidad, en particular una regulación por temperatura dado que en plántulas cultivadas bajo temperaturas subóptimas (16°C) se observó un leve aumento en los niveles de PFT1 (Figura 14b). Es necesario realizar estudios más completos para confirmar esta observación.

PFT1 se degrada vía proteasoma

La proteína PFT1 presenta una vida media muy corta. Durante la incubación a temperatura ambiente de un extracto proteico de *Arabidopsis* se observa la aparición inmediata de productos de degradación y luego de 30 minutos los niveles de PFT1 bajan considerablemente, aún en presencia de inhibidores de proteasas (Figura 15). Sin embargo, la estabilidad de PFT1 aumenta cuando el extracto proteico se incuba en presencia de inhibidores de proteasoma (MG132), observándose niveles considerables de proteína aún luego de dos horas de incubación a temperatura ambiente. Además, cuando el extracto proteico se incuba en presencia de ATP, la degradación se acelera notablemente, otro indicio de que la degradación ocurre vía proteasoma (Figura 16). El aumento en los niveles de PFT1 en presencia de MG132 también se observó *in vivo* (Figura 17). Estos resultados confirman que la degradación de PFT1 ocurre vía proteasoma, aunque no puede descartarse que exista otro mecanismo diferente que promueva su degradación.

PFT1 interacciona con dos posibles E3 ubiquitin ligasas

Mediante la realización de un *screening* de doble híbrido en levaduras se aislaron dos proteínas que interactúan con el dominio N-terminal de PFT1 (aminoácidos 1 al 242). Estas proteínas (FRF1 y FRF2) presentan en sus extremos C-terminal un dominio del tipo RING H2 Finger.

Algunas de las proteínas con dominios RING han sido caracterizadas en *Arabidopsis* y se encuentran involucradas en numerosos procesos celulares, como la transcripción y la transducción de señales. Se identificaron dos tipos de dominios RING (RING H2 y RING CH) y cinco tipos de dominios RING modificados (RING-v, RING-D, RING S/T, RING-G Y RING-C2). Entre las funciones atribuidas a estos dominios se encuentran la interacción proteína-proteína y la ubiquitinación de proteínas (Stone *et al.*, 2005). En *Arabidopsis thaliana*, se identificaron 469 proteínas que contienen uno o varios de estos dominios y se determinó, a partir de ensayos de ubiquitinación *in vitro* utilizando como enzima conjugadora E2 UBC8, que una buena parte de ellas presenta actividad E3 ubiquitin ligasa dependiente del dominio RING (Stone *et al.*, 2005).

Se demostró la interacción de PFT1 con FRF1/FRF2 por un método independiente del doble híbrido, utilizando la proteína PFT1:Tap proveniente de un extracto proteico de plántulas *pft1-1 PFT1g:Tap* y la proteína recombinante MBP:FRF2 Δ 315 obtenida de un extracto de *E.coli* y acoplada a dos resinas de afinidad diferentes (Figuras 25 y 26). Si bien la interacción no fue muy fuerte y se observó una importante cantidad de proteína en las fracciones de lavado, esto puede ocurrir si la interacción entre las proteínas requiere de algún cofactor presente en el extracto de plantas. Es necesario realizar nuevas aproximaciones para determinar si la presencia de algún cofactor es indispensable para esta interacción, y eventualmente la identificación del mismo.

Este experimento de unión a una columna de afinidad sólo pudo realizarse con FRF2, ya que no se logró obtener la proteína recombinante FRF1 (tanto su forma completa como su delección N-terminal) con ninguna de las dos etiquetas utilizadas para su purificación, GST y MBP. Además, tampoco fue posible demostrar la interacción a partir de ensayos de coimmunoprecipitación debido a que los anticuerpos producidos α -GST:FRF2 Δ 315 sólo reconocen la proteína recombinante. En ningún caso se logró detectar las proteínas FRF1 y FRF2 a partir de extractos de plantas con estos anticuerpos, incluso luego de su inmunopurificación.

FRF1 y FRF2 son reguladores negativos de PFT1

Utilizando la técnica de agroinfiltración en *N. benthamiana* se analizó la estabilidad de PFT1 infiltrando las hojas con cultivos de *A. thumefaciens* de forma tal de expresar en forma transitoria *PFT1* y *FRF1* o *FRF2*. Se demostró que los niveles de PFT1 disminuyeron notablemente al expresar *PFT1* en presencia de FRF1 y FRF2 y que esta alteración en los niveles de PFT1 depende del dominio RING presente en FRF1/FRF2 (Figuras 27 y 28). Resultados similares se obtuvieron al analizar los niveles de PFT1 en plantas transgénicas que presentan mutaciones insercionales en los genes *FRF1* y *FRF2* y en plantas que expresan microRNAs artificiales diseñados para silenciar los

genes *FRF1*, *FRF2*, *FRL1* y *FRL2*. En ambos casos, frente a una disminución de los niveles de *FRF1* y *FRF2*, los niveles de proteína PFT1 fueron mayores (Figuras 34 y 35). Estos resultados demuestran que *FRF1* y *FRF2* son reguladores negativos de PFT1 y sugieren fuertemente que promueven su degradación, reforzando la idea de que poseen actividad E3 *ubiquitin ligasa* dependiente del dominio RING.

FRF1 y FRF2 son activadores de la floración

Con el fin de revelar la función biológica de los genes *FRF1* y *FRF2* que codifican para proteínas capaces de interaccionar con PFT1 y promover su degradación, se obtuvieron dobles mutantes insercionales para caracterizarlos fenotípicamente. Además, se diseñaron microRNAs artificiales para silenciar estos dos genes y otros dos genes que presentan homología de secuencia (*FRL1* y *FRL2*) y se obtuvieron plantas transgénicas que los expresan. Como PFT1 se encuentra involucrada en promover la floración, se realizaron experimentos de floración con las plantas mutantes para estos genes y con las líneas transgénicas que expresan los amiRNAs. En ambos casos, se observó que las plantas con bajos niveles de ARNm de los genes *FRF1* y *FRF2* presentaron un fenotipo de floración tardía en comparación con las plantas del tipo salvaje (Figura 37a y 38). Dado que PFT1 es un activador de la floración y que las proteínas *FRF1* y *FRF2* median su degradación, las plantas que presentan una disminución en los niveles de ARNm de estos genes mostraron un mayor nivel de proteína PFT1. Al presentar un incremento en los niveles de proteína se esperaba observar un fenotipo de floración temprano tal como ocurre en las plantas transgénicas sobreexpresantes de *PFT1*. Sin embargo, se observó lo contrario. Una posibilidad sería que *FRF1* y *FRF2* promuevan la floración por un mecanismo independiente de PFT1 (Figura 37b).

En algunos casos la actividad del proteasoma es requerida para activar la transcripción. Por ejemplo, la actividad transcripcional mediada por el receptor de progesterona se encuentra inhibida por inhibidores del proteasoma, y esta inhibición concuerda con un reducido reclutamiento de la ARN polimerasa II en los promotores de los genes regulados por este receptor (Dennis *et al.*, 2005). De forma similar, al bloquear la proteólisis mediada por ubiquitina del activador de levaduras Gcn4, se bloquea la habilidad de Gcn4 de reclutar la ARN polimerasa II a los promotores, lo cual indica que la proteólisis y la ubiquitinación son importantes para la función de Gcn4 (Lipford *et al.*, 2005). Además, dos publicaciones (Kim *et al.*, 2003; Lehr *et al.*, 2003) complementan la evidencia de que Skp2, una subunidad del complejo E3 ligasa, se requiere para la ubiquitinación y degradación de Myc. Aún promoviendo su ubiquitinación y degradación, Skp2 induce la expresión de los genes de

respuesta a Myc y la entrada en fase S en células del tipo salvaje. En concordancia con estas observaciones, Myc no puede activar la expresión de sus genes en células mutantes *skp2*.

En otro trabajo (Muratani *et al.*, 2005), se demostró que la destrucción de la forma transcripcionalmente activa de Gal4 se encuentra mediada por una proteína F-Box llamada Dsg1/Mdm30. En ausencia de Dsg1, Gal4 es estable, no se ubiquitina y no puede estimular la transcripción eficientemente. Analizando el fenotipo de las levaduras mutantes para Dsg1, los autores encontraron que en ausencia de Dsg1, los genes blanco de acción de Gal4 se transcriben, pero los ARNs producidos no son capaces de traducirse. Los defectos en la traducción se encuentran relacionados con defectos en la fosforilación del dominio C-terminal de la ARN polimerasa II, que afectan el reclutamiento de factores necesarios para el procesamiento del transcripto.

Muchos activadores transcripcionales son proteínas inestables y su potencial transcripcional se correlaciona con su tasa de destrucción. Existe evidencia de que la destrucción de activadores transcripcionales mediada por el proteasoma puede encontrarse íntimamente ligada a su función (Lipford & Deshaies, 2003; Collins & Tansey, 2006; Collins *et al.*, 2009). En un modelo planteado, el activador transcripcional una vez unido al ADN, recluta la E3 *ubiquitin ligasa* que actúa como coactivador. Luego de esta unión, el activador se ubiquitina permitiendo su asociación con los factores generales de la transcripción y completando el ensamblado del complejo de preiniciación. La degradación subsiguiente del activador gatilla entonces la liberación de la ARN polimerasa II permitiendo la elongación transcripcional y la transcripción génica (Lipford & Deshaies, 2003; Muratani & Tansey, 2003). Dado que la región N-terminal de FRF1 es capaz de activar la transcripción en levaduras (Figura 20), es posible que FRF1 y FRF2 actúen como coactivadores, favoreciendo la función transcripcional de PFT1.

Consistente con este modelo, se ha demostrado recientemente (Wang *et al.*, 2010) que sólo tres subunidades del complejo MEDIATOR de levaduras, pertenecientes al módulo de la cola, funcionan como activadores transcripcionales al fusionarlos al dominio de unión a ADN de LexA. Estas proteínas de fusión resultaron inestables, a diferencia de otras subunidades pertenecientes al módulo “cabeza” y “medio” las cuales mostraron estabilidad pero no fueron capaces de activar la transcripción. Se demostró que la inestabilidad de estas proteínas Med depende del proteasoma, en particular de una proteína F-Box que forma parte de un complejo del tipo SCF con actividad E3 *ubiquitin ligasa*. Cuando se expresó la proteína de fusión en una cepa de levadura carente de esta proteína F-Box, la proteína de fusión fue estable, pero su actividad se redujo cinco veces respecto de la cepa del tipo salvaje. Estos resultados indican que la inestabilidad del activador transcripcional contribuye a la eficiencia en su actividad.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, es probable que algo similar este ocurriendo con PFT1 que forma parte del complejo MEDIATOR de *Arabidopsis thaliana*. Esta subunidad Med25 se encuentra presente en mamíferos y en *D. melanogaster* pero no en *S. cerevisiae* y aún no se conoce su localización dentro del complejo. PFT1 es capaz de activar la transcripción en levaduras cuando se fusiona al dominio de unión a ADN de LexA (Cerdán & Chory, 2003). Los resultados indican que las proteínas con dominios RING H2 Finger FRF1 y FRF2 promueven la degradación de PFT1 y que esta inestabilidad podría ser necesaria para que PFT1 pueda cumplir su función transcripcional.

En cuanto a los antecedentes en plantas consistentes con este modelo, LFY actúa activando la expresión de múltiples genes homeóticos florales integrando señales endógenas y ambientales. La activación transcripcional de *AP3* que depende de LFY requiere de la actividad de una proteína F-Box, UNUSUAL FLORAL ORGANS (UFO) que es un componente del complejo SCF que presenta actividad E3 *ubiquitin ligasa* (Chae *et al.*, 2008). En este trabajo demostraron que UFO interacciona físicamente con LFY, tanto *in vitro* como *in vivo*, y que esta interacción es necesaria para reclutar a UFO hacia el promotor de *AP3*. Además, al eliminar la actividad del proteasoma, tanto química como genéticamente, la activación transcripcional de *AP3* dependiente de LFY se vio comprometida, lo cual indica que se requiere la degradación de proteínas para promover la actividad transcripcional de LFY. Por lo tanto, la proteína F-Box funciona como un cofactor transcripcional que se asocia al ADN para regular la expresión de genes homeóticos florales. Estos resultados mostraron un nuevo mecanismo para promover el desarrollo floral a través de la degradación de proteínas y la subsiguiente activación del factor de transcripción LFY.

Otro trabajo publicado recientemente muestra un caso diferente que relaciona la proteólisis de un factor de transcripción con su actividad transcripcional. En este trabajo se describe un factor de transcripción del tipo NAC asociado a la membrana plasmática de *Arabidopsis thaliana* (NTL6) (Seo *et al.*, 2010a; Seo *et al.*, 2010b). La exposición al frío induce la activación de NTL6 a partir de un procesamiento proteolítico. Esta forma transcripcionalmente activa de NTL6 induce la expresión de los genes *PR* (relacionados a patógenos) por unión directa a sus promotores y estimula la resistencia de la planta a la infección por patógenos. El procesamiento proteolítico de NTL6 se encuentra mediado por una actividad metaloproteasa y ocurre dentro de la membrana. Por lo tanto, es necesario el procesamiento proteolítico de este factor de transcripción para que pueda cumplir su función.

La fusión de VP16 a PFT1 produce un retraso en el tiempo de floración. Dadas las diferencias observadas en los tiempos de floración, nuestros resultados indican que la fusión al VP16 estaría convirtiendo a PFT1 en un represor de la floración y no simplemente en un dominante negativo. PFT1, como parte del complejo MEDIATOR, podría encontrarse activando o reprimiendo varias vías que regulen la floración. En este sentido, Kidd *et al.* (2009) observaron que en las plantas mutantes *pft1* se encontraban elevados los niveles de ARNm de *FLC*, un represor de la floración, lo cual indica que PFT1 podría ser un represor de *FLC*. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos al fusionar PFT1 al dominio activador VP16, lo que podría estar ocurriendo es que en este contexto PFT1 promueva el accionar de *FLC* en lugar de reprimirlo y por ese motivo se observen fenotipos de floración tan retrasados.

Otra posibilidad para explicar los resultados obtenidos en el tiempo de floración es que los activadores transcripcionales fuertes pueden dar lugar a una inhibición no específica de la transcripción cuando se expresan en altos niveles. El dominio activador VP16 interacciona con múltiples factores dentro del complejo de iniciación de la transcripción de la ARN polimerasa II y con proteínas adaptadoras que median entre los dominios activadores y la maquinaria transcripcional. Se cree que en altas concentraciones el activador secuestra los factores de transcripción, bloqueando la iniciación (Matis C. *et al.*, 2001). Por lo tanto, el dominio activador VP16 puede inducir un efecto inhibitorio o estimulador en la transcripción. Nuestros resultados concuerdan con este efecto inhibitorio ya que las plantas transformadas en el contexto de la mutante de *pft1-1* presentaron un fenotipo de floración mucho más retrasado que cuando la transformación se realizó en el contexto del tipo salvaje. En este último caso la copia endógena de PFT1 sería la responsable de que la floración no se encuentre tan retrasada como en el contexto de la mutante *pft1-1* (Figura 40). Sin embargo, dado que la fusión de PFT1 al VP16 se realizó en el contexto genómico de *PFT1* y no bajo un promotor constitutivo que sobreexpresa esta proteína de fusión, no se puede asegurar que exista este efecto inhibitorio.

Por otro lado, sería interesante analizar la estabilidad de PFT1 en las líneas transgénicas que presentan la fusión *PFT1g:VP16* para determinar si el retraso en el tiempo de floración observado correlaciona con un aumento en la estabilidad de la proteína.

En este contexto, se analizó la estabilidad de PFT1:GR-HA en plantas transgénicas *pft1-1 PFT1g:GR-HA* cultivadas en presencia y ausencia de DEX. Se observó una muy baja estabilidad de la proteína en las plantas cultivadas con DEX (Figura 41), lo cual indica que la degradación de PFT1 ocurre mayoritariamente en el núcleo. Además, las plantas con la fusión GR-HA cultivadas en presencia de DEX presentaron un fenotipo de floración más acelerado que las plantas *pft1-1*

PFT1g:HA (Figuras 42a) y esta disminución en el tiempo de floración se encontró acompañada de bajos niveles de *PFT1:GR-HA* (Figura 42b y c). Por lo tanto, es probable que la baja estabilidad de *PFT1* en estas condiciones tenga correlación con su capacidad de promover la floración.

De todas formas es necesario profundizar este estudio para corroborar fehacientemente si la degradación de *PFT1* mediada por el proteasoma, a través de *FRF1* y *FRF2*, es necesaria para que *PFT1* pueda cumplir su función de activador transcripcional.

CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se estudió el rol de PFT1 en la regulación de la floración utilizando aproximaciones genéticas y bioquímicas.

Se generó un sistema capaz de inducir la traslocación de PFT1 al núcleo mediante el agregado de un glucocorticoide al medio de cultivo. Este sistema permitió determinar que PFT1 es capaz de activar la expresión de los genes *FT* y *CO* luego de tres horas de realizada la inducción y que la traslocación de PFT1 al núcleo induce la floración, generando que las plantas florezcan incluso más temprano que las plantas del tipo salvaje. Además, permitió analizar el comportamiento de las plantas *in vivo* realizando experimentos de floración con la fusión inducible de PFT1 en distintos *backgrounds* genéticos. De esta forma, se determinó que PFT1 es capaz de activar la floración en ausencia de *CO*, en parte a través del gen integrador *FT*. Si bien PFT1 es capaz de regular positivamente a *FT*, también podría actuar regulando otros genes, como por ejemplo *FLC* y posiblemente *TSF*. Estos hechos son consistentes con que PFT1 es una subunidad del complejo MEDIATOR de *Arabidopsis thaliana* y por lo tanto, presenta un rol importante en la regulación transcripcional. No se puede descartar que PFT1 pueda actuar como un regulador negativo de la señalización de los fitocromos “corriente arriba” de *CO* (Wollenberg *et al.*, 2008), pero sí se puede asegurar que PFT1 es capaz de promover la floración en forma independiente de *CO*.

En conclusión, las señales transducidas por los fitocromos se integran en los genes *CO* y *PFT1* los cuales son capaces de promover la floración en forma independiente. *CO* responde al fotoperíodo y a la calidad de luz percibida y regula la floración activando mayoritariamente a *FT*. Los resultados indican que *TSF*, es capaz de regular la floración pero actúa mayoritariamente en forma independiente del fotoperíodo, siendo minoritaria su respuesta a *CO*. PFT1 es un activador de la floración que responde a la calidad de luz en forma independiente de *CO*, activando a *FT* y a otros genes integradores de la floración. De todas formas, no se puede descartar que PFT1 y *CO* interactúen en forma directa o indirecta dado que el tiempo de floración de la doble mutante *co-9 pft1-1* resultó en todos los casos menor que el tiempo de floración de la mutante *co-9*. Si PFT1 y *CO* actuaran por vías genéticas diferentes y estas vías no interactuaran, se esperaría que la doble mutante *co-9 pft1-1* floreciera más tarde que cada una de las simples mutantes. Sería interesante realizar experimentos de inmunoprecipitación de cromatina para analizar si PFT1 se une directamente a los promotores de los genes que regula. Si bien, como parte del complejo MEDIATOR, es probable que se una a muchos genes, sería interesante correlacionar esta unión con los niveles de expresión génica y así inferir las funciones que está cumpliendo PFT1 a nivel transcripcional.

Por otro lado, se estudió el comportamiento de la proteína PFT1 y se determinó que se degrada rápidamente y que esta degradación ocurre a través del proteasoma 26S. En este sentido, se determinó que PFT1 es capaz de interactuar con dos proteínas (FRF1 y FRF2) que poseen en su región C-terminal dominios del tipo RING H2 Finger, característicos de proteínas que presentan actividad E3 *ubiquitin ligasa*. Estas proteínas interactuaron con PFT1 tanto *in vitro* como *in vivo* y fueron capaces de promover la degradación de PFT1 *in vivo*, tanto en ensayos transitorios de agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana*, como en *Arabidopsis*. Además, el dominio RING de estas proteínas resultó esencial para promover la degradación de PFT1, lo cual es un indicio de que FRF1 y FRF2 pueden presentar actividad E3 *ubiquitin ligasa* y ser las encargadas de otorgar la especificidad para que PFT1 sea ubiquitinada y degradada vía proteasoma.

Analizando el comportamiento de las mutantes insercionales para los genes *FRF1* y *FRF2* y de líneas transgénicas que expresan microRNAs artificiales que silencian estos genes, se determinó que FRF1 y FRF2 son activadores de la floración. Existe la posibilidad de que FRF1 y FRF2 promuevan la floración por un mecanismo parcialmente independiente de PFT1. Sin embargo, una posibilidad bastante concreta es que la degradación de PFT1 promovida por FRF1 y FRF2 sea necesaria para que PFT1 pueda cumplir su función de activador de la floración y que su inestabilidad se encuentre correlacionada con su capacidad transcripcional. Por lo tanto, en ausencia de las proteínas que promueven su degradación, PFT1 es más estable y no sería capaz de promover la floración. Se demostró también que la degradación de PFT1 ocurre mayoritariamente en el núcleo, dado que en plantas *pft1-1 PFT1g:GR-HA* cultivadas en presencia de DEX se observó una muy baja estabilidad de PFT1 y además, esta baja estabilidad estuvo acompañada de una aceleración en el tiempo de floración.

Los resultados obtenidos al fusionar *PFT1g* al dominio activador VP16 demuestran que el rol de PFT1 es complejo y que no debe esperarse una correlación simple con la regulación de la floración. Como parte del complejo MEDIATOR, PFT1 podría encontrarse influenciando varias vías que regulen la floración en forma antagónica y dependiendo de la vía que se vea afectada en determinada condición se observaría un efecto de adelantamiento o retraso de la floración.

A fin de comprobar que la inestabilidad de PFT1 es necesaria para que pueda activar la floración, sería interesante realizar experimentos de inducción con DEX con las líneas transgénicas *pft1-1 PFT1g:GR-HA* incorporando el inhibidor de proteasoma MG132. De esta forma se podría determinar si la activación de *FT* se encuentra disminuida en presencia de MG132, es decir, si cuando hay mayores niveles de PFT1:GR-HA disminuye la expresión de *FT* y por lo tanto se retrasa la floración.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y., Yamaguchi, A., Ikeda, Y., Ichinoki, H., Notaguchi, M., Goto, K. & Araki, T. (2005). FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science* 309(5737): 1052-1056.
- Adams, S., Allen, T. & Whitelam, G. C. (2009). Interaction between the light quality and flowering time pathways in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 60(2): 257-267.
- Adrian, J., Farrona, S., Reimer, J. J., Albani, M. C., Coupland, G. & Turck, F. (2010). cis-Regulatory Elements and Chromatin State Coordinately Control Temporal and Spatial Expression of FLOWERING LOCUS T in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 22(5): 1425-1440.
- Ahn, J., Miller, D., Winter, V., Banfield, M., Lee, J., Yoo, S., Henz, S., Brady, R. & D., W. (2006). A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators FT and TFL1. *The EMBO Journal* 25(3): 605-614.
- Alabadí, D., Oyama, T., Yanovsky, M., Harmon, F., Más, P. & Kay, S. (2001). Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* 293(5531): 880-883.
- Al-Sady, B., Kikis, E. A., Monte, E. & Quail, P. H. (2008). Mechanistic duality of transcription factor function in phytochrome signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(6): 2232-2237.
- Amasino, R. (2010). Seasonal and developmental timing of flowering. *The Plant Journal* 61(6): 1001-1013.
- Aoyama, T. & Chua, N.-H. (1997). A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *The Plant Journal* 11(3): 605-612.
- Aukerman, M. J., Hirschfeld, M., Wester, L., Weaver, M., Clacky, T., Amasino, R. M. & Sharrock, R. A. (1997). A deletion in the PHYD gene of the *Arabidopsis* Wassilewskija ecotype defines a role for phytochrome D in red/far-red light sensing. *The Plant Journal* 9(8): 1317-1326.
- Ausín, I., Alonso-Blanco, C. & Martínez-Zapater, J. M. (2005). Environmental regulation of flowering. *The International Journal of Developmental Biology* 49(5-6): 689-705.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D. & Seidman, J. G. (2001). *Current protocols in Molecular Biology*.
- Backstrom, S., Elfving, N., Nilsson, R., Wingsle, G. & Bjorklund, S. (2007). Purification of a Plant Mediator from *Arabidopsis thaliana* Identifies PFT1 as the Med25 Subunit. *Molecular Cell* 26(5): 717-729.
- Balasubramanian, S., Sureshkumar, S., Lempe, J. & Weigel, D. (2006). Potent induction of *Arabidopsis thaliana* flowering by elevated growth temperature. *PLoS Genetics* 2(7): e106.
- Bauer, D., Viczián, A., Kircher, S., Nobis, T., Nitschke, R., Kunkel, T., Panigrahi, K., Adám, E., Fejes, E., Schäfer, E. & Nagy, F. (2004). Constitutive photomorphogenesis 1 and multiple photoreceptors control degradation of phytochrome interacting factor 3, a transcription factor required for light signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 16(6): 1433-1445.
- Ben-Naim, O., Eshed, R., Parnis, A., Teper-Bamnolker, P., Shalit, A., Coupland, G., Samach, A. & Lifschitz, E. (2006). The CCAAT binding factor can mediate interactions between CONSTANS-like proteins and DNA. *The Plant Journal* 46(3): 462-476.
- Bensmihen, S., To, A., Lambert, G., Kroj, T., Giraudat, J. & Parcy, F. (2004). Analysis of an activated ABI5 allele using a new selection method for transgenic *Arabidopsis* seeds. *FEBS Letters* 561(1-3): 127-131.
- Berendzen K, Searle, I., Ravenscroft, D., Koncz, C., Batschauer, A., Coupland, G., Somssich, I. & Ulker, B. (2005). A rapid and versatile combined DNA/RNA extraction protocol and its application to the analysis of a novel DNA marker set polymorphic between *Arabidopsis thaliana* ecotypes Col-0 and Landsberg erecta. *Plant Methods* 1(1): 4.

- Bjorklund, S. & Gustafsson, C. M. (2005). The yeast Mediator complex and its regulation. *Trends in Biochemical Sciences* 30(5): 240-244.
- Blackman, B. K. & Michaels, S. D. (2010). Does CONSTANS act as a transcription factor or as a co-activator? The answer may be – yes. *New Phytologist* 187(1): 1-3.
- Blázquez, M., Ahn, J. & Weigel, D. (2003). A thermosensory pathway controlling flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics* 33(2): 168-171.
- Blázquez, M., Green, R., Nilsson, O., Sussman, M. & D., W. (1998). Gibberellins promote flowering of *Arabidopsis* by activating the LEAFY promoter *The Plant Cell* 10(5): 791-800.
- Blázquez, M. & Weigel, D. (1999). Independent regulation of flowering by phytochrome B and gibberellins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 120(4): 1025-1032.
- Blázquez, M. & Weigel, D. (2000). Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*. *Nature* 404(6780): 889-892.
- Bourbon, H. M. (2008). Comparative genomics supports a deep evolutionary origin for the large, four-module transcriptional mediator complex. *Nucleic Acids Research* 36(12): 3993-4008.
- Bradley, D., Ratcliffe, O., Vincent, C., Carpenter, R. & Coen, E. (1997). Inflorescence commitment and architecture in *Arabidopsis*. *Science* 275(5296): 80-83.
- Busch, M., Bomblies, K. & Weigel, D. (1999a). Activation of a floral homeotic gene in *Arabidopsis*. *Science* 285(5427): 585-587.
- Casal, J. J. (2000). Phytochromes, Cryptochromes, Phototropin: Photoreceptor Interactions in Plants. *Photochemistry and Photobiology* 71(1): 1-11.
- Cerdán, P. D. (2011). *Regulation of flowering time by light*.
- Cerdán, P. D. & Chory, J. (2003). Regulation of flowering time by light quality. *Nature* 423(19): 881-885.
- Chae, E., Tan, Q., Hill, T. & Irish, V. (2008). An *Arabidopsis* F-box protein acts as a transcriptional co-factor to regulate floral development. *Development* 135(7): 1235-1245.
- Clarke, J. & Dean, C. (1994). Mapping FRI, a locus controlling flowering time and vernalization response in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and general genetics* 242(1): 81-89.
- Clough, S. & Bent, A. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 16(6): 735-743.
- Collins, G., Lipford, J., Deshaies, R. & Tansey, W. (2009). Gal4 turnover and transcription activation. *Nature* 461(7265): E7-E8.
- Collins, G. A. & Tansey, W. P. (2006). The proteasome: a utility tool for transcription? *Current opinion in Genetics and Development* 16(2): 197-202.
- Conti, L. & Bradley, D. (2007). TERMINAL FLOWER1 is a mobile signal controlling *Arabidopsis* architecture. *The Plant Cell* 19(3): 767-778.
- Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Giakountis, A., Farrona, S., Gissot, L., Turnbull, C. & Coupland, G. (2007). FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science* 316(5827): 1030-1033.
- D'Aloia, M., Bonhomme, D., Bouché, F., Tamseddak, K., Ormenese, S., Torti, S., Coupland, G. & Périlleux, C. (2011). Cytokinin promotes flowering of *Arabidopsis* via transcriptional activation of the FT paralogue TSF. *The Plant Journal* doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04482.x.
- Dehesh, K., Franci, C., Parks, B., Seeley, K., Short, T., Tepperman, J. & Quail, P. (1993). *Arabidopsis* HY8 locus encodes phytochrome A. *The Plant Cell* 5(9): 1081-1088.
- Dennis, A., Lonard, D., Nawaz, Z. & O'Malley, B. (2005). Inhibition of the 26S proteasome blocks progesterone receptor-dependent transcription through failed recruitment of RNA polymerase II. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 94(4): 337-346.
- Deshaies, R. J. & Joazeiro, C. A. P. (2009). RING Domain E3 Ubiquitin Ligases. *Annual Review of Biochemistry* 78: 399-434.

- Devlin, P., Robson, P., Patel, S., Goosey, L., Sharrock, R. & Whitelam, G. (1999). Phytochrome D acts in the shade-avoidance syndrome in *Arabidopsis* by controlling elongation growth and flowering time. *Plant Physiology* 119(3): 909-915.
- Devlin, P. F., Patela, S. R. & Whitelam, G. C. (1998). Phytochrome E Influences Internode Elongation and Flowering Time in *Arabidopsis* *The Plant Cell* 10(9): 1479-1488.
- Doi, K., Izawa, T., Fuse, T., Yamanouchi, U., Kubo, T., Z., S., Yano, M. & Yoshimura, A. (2004). Ehd1, a B-type response regulator in rice, confers short-day promotion of flowering and controls FT-like gene expression independently of Hd1. *Genes and Development* 18(8): 926-936.
- Donohue, K., Heschel, M., Butler, C., Barua, D., Sharrock, R., Whitelam, G. & Chiang, G. (2008). Diversification of phytochrome contributions to germination as a function of seed-maturation environment. *New Phytologist* 177(2): 367-379.
- Escher, D., Bodmer-Glavas, M., Barberis, A. & Schaffner, W. (2000). Conservation of Glutamine-Rich Transactivation Function between Yeast and Humans. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* 20(8): 2774-2782.
- Fitzgerald, T., Kazan, K., Li, Z., Morell, M. & Manners, J. (2010). A high-throughput method for the detection of homologous gene deletions in hexaploid wheat. *BMC Plant Biology* 10(264).
- Fornara, F., Panigrahi, K., Gissot, L., Sauerbrunn, N., Rühl, M., Jarillo, J. & Coupland, G. (2009). Arabidopsis DOF transcription factors act redundantly to reduce CONSTANS expression and are essential for a photoperiodic flowering response. *Developmental Cell* 17(1): 75-86.
- Franklin, K. A. (2008). Shade avoidance. *New Phytologist* 179(4): 930-944.
- Franklin, K. A., Praekelt, U., Stoddart, W. M., Billingham, O. E., J., H. K. & Whitelam, G. C. (2003). Phytochromes B, D, and E Act Redundantly to Control Multiple Physiological Responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 131(3): 1340-1346.
- Franklin, K. A. & Quail, P. H. (2009). Phytochrome functions in *Arabidopsis* development. *Journal of Experimental Botany* 61(1): 11-24.
- Franklin, K. A. & Whitelam, G. C. (2007). Light-quality regulation of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics* 39(11): 1410-1413.
- Fujiwara, S., Wang, L., Han, L., Suh, S., Salomé, P., McClung, C. & Somers, D. (2008). Post-translational regulation of the *Arabidopsis* circadian clock through selective proteolysis and phosphorylation of pseudo-response regulator proteins. *Journal of Biological chemistry* 283(34): 23073-23083.
- Goosey, L., Palecanda, L. & Sharrock, R. (1997). Differential patterns of expression of the *Arabidopsis* PHYB, PHYD, and PHYE phytochrome genes. *Plant Physiology* 115(3): 959-969.
- Hajdukiewicz, P., Svab, Z. & Maliga, P. (1994). The small, versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation. *Plant Molecular Biology* 25(6): 989-994.
- Halliday, K., Martínez-García, J. & Josse, E. (2009). Integration of Light and Auxin Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1(6): a001586.
- Halliday, K. J., Salter, M. G., Thingnaes, E. & Whitelam, G. C. (2003). Phytochrome control of flowering is temperature sensitive and correlates with expression of the floral integrator FT. *The Plant Journal* 33(5): 875-885.
- Halliday, K. J. & Whitelam, G. C. (2003). Changes in Photoperiod or Temperature Alter the Functional Relationships between Phytochromes and Reveal Roles for phyD and phyE. *Plant Physiology* 131(4): 1913-1920.
- Harmer, S. L. (2009). The Circadian System in Higher Plants. *Annual Review of Plant Biology* 60: 357-337.
- Hayama, R., Yokoi, S., Tamaki, S., Yano, M. & Shimamoto, K. (2003). Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice. *Nature* 422(6933): 719-722.
- He, Y., Tang, R., Hao, Y., Stevens, R., Cook, C., Ahn, S., Jing, L., Yang, Z., Chen, L., Guo, F., Fiorani, F., Jackson, R., Crawford, N. & Pei, Z. (2004). Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science* 305(5692): 1968-1971.

- Helliwell, C., Wood, C., Robertson, M., James Peacock, W. & Dennis, E. (2006). The *Arabidopsis* FLC protein interacts directly in vivo with SOC1 and FT chromatin and is part of a high-molecular-weight protein complex. *The Plant Journal* 46(2): 183-192.
- Hennig, L., Buche, C. & Schafer, E. (2000). Degradation of phytochrome A and the high irradiance response in *Arabidopsis*: a kinetic analysis. *Plant, Cell and Environment* 23: 727-734.
- Hepworth, S., Valverde, F., Ravenscroft, D., Mouradov, A. & Coupland, G. (2002). Antagonistic regulation of flowering-time gene SOC1 by CONSTANS and FLC via separate promoter motifs. *The EMBO Journal* 21(16): 4327-4337.
- Hervé, C., Dabos, P., Bardet, C., Jauneau, A., Auriac, M. C., Ramboer, A., Lacout, F. & Tremousaygue, D. (2009). In Vivo Interference with AtTCP20 Function Induces Severe Plant Growth Alterations and Deregulates the Expression of Many Genes Important for Development. *Plant Physiology* 149(3): 1462- 1477.
- Heschel, M., Selby, J., Butler, C., Whitelam, G., Sharrock, R. & Donohue, K. (2007). A new role for phytochromes in temperature-dependent germination. *New Phytologist* 174(4): 735-741.
- Hinshelwood, J. & Perkins, S. J. (2000). Metal-dependent conformational changes in a recombinant vWF-A domain from human factor B: a solution study by circular dichroism, fourier transform infrared and ¹H NMR spectroscopy. *Journal of Molecular Biology* 298(1): 135-147.
- Imaizumi, T. (2010). *Arabidopsis* circadian clock and photoperiodism: time to think about location. *Current Opinion in Plant Biology* 13(1): 83-89.
- Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96(1): 23-28.
- Izawa, T., Oikawa, T., Sugiyama, N., Tanisaka, T., Yano, M. & Shimamoto, K. (2002). Phytochrome mediates the external light signal to repress FT orthologs in photoperiodic flowering of rice. *Genes and Development* 16(15): 2006-2020.
- Jackson, S. D. (2009). Plant responses to photoperiod. *New Phytologist* 181(3): 517-531.
- Jaeger, K. & Wigge, P. (2007). FT protein acts as a long-range signal in *Arabidopsis*. *Current Biology* 17(12): 1050-1054.
- Jang, S., Torti, S. & Coupland, G. (2009). Genetic and spatial interactions between FT, TSF and SVP during the early stages of floral induction in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 60(4): 614-625.
- Jung, J., Seo, Y., Seo, P., JL., R., Yun, J., Chua, N. & Park, C. (2007). The GIGANTEA-regulated microRNA172 mediates photoperiodic flowering independent of CONSTANS in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 19(9): 2736-2748.
- Kiba, T., Henriques, R., Sakakibara, H. & Chua, N. (2007). Targeted degradation of PSEUDO-RESPONSE REGULATOR5 by an SCFZTL complex regulates clock function and photomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 19(8): 2516-2530.
- Kidd, B. N., Aitken, E. A., Schenk, P. M., Manners, J. M. & Kazan, K. (2010). Plant mediator: Mediating the jasmonate response. *Plant Signaling and Behavior* 5(6): 718-720.
- Kidd, B. N., Edgar, C. I., Kumar, K. K., Aitken, E. A., Schenk, P. M., Manners, J. M. & Kazan, K. (2009). The mediator complex subunit PFT1 is a key regulator of jasmonate-dependent defense in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 21(8): 2237-2252.
- Kim, D.-H., Doyle, M. R., Sung, S. & Amasino, R. M. (2009). Vernalization: Winter and the Timing of Flowering in Plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 25(277-299).
- Kim, J., Yi, H., Choi, G., Shin, B., Song, P. & Choi, G. (2003). Functional characterization of phytochrome interacting factor 3 in phytochrome-mediated light signal transduction. *Plant Cell* 15(10): 2399-2407.
- Kim, S., Yu, X. & Michaels, SD. (2008). Regulation of *CONSTANS* and *FLOWERING LOCUS T* expression in response to changing light quality. *Plant Physiology* 148(1): 269-279.
- Kim, S. Y., Herbst, A., Tworowski, K. A., Salghetti, S. E. & Tansey, W. P. (2003). Skp2 Regulates Myc Protein Stability and Activity. *Molecular Cell* 11(5): 1177-1188.

- Kim, W., Fujiwara, S., Suh, S., Kim, J., Kim, Y., Han, L., David, K., Putterill, J., Nam, H. & Somers, D. (2007). ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilized by GIGANTEA in blue light. *Nature* 449(7160): 356-360.
- Kojima, S., Takahashi, Y., Kobayashi, Y., Monna, L., Sasaki, T., Araki, T. & Yano, M. (2002). Hd3a, a rice ortholog of the *Arabidopsis* FT gene, promotes transition to flowering downstream of Hd1 under short-day conditions. *Plant and cell physiology* 43(10): 1096-1105.
- Koo, S. C., Bracko, O., Park, M. S., Schwab, R., Chun, H. J., Park, K. M., Seo, J. S., Grbic, V., Balasubramanian, S., Schmid, M., Godard, F., Yun, D.-J., Lee, S. Y., Cho, M. J., Weigel, D. & Kim, M. C. (2010). Control of lateral organ development and flowering time by the *Arabidopsis thaliana* MADS-box Gene AGAMOUS-LIKE6. *The Plant Journal* 62(5): 807-816.
- Kraft, E., Stone, S. L., Ma, L., Su, N., Gao, Y., Lau, O.-S., Deng, X.-W. & Callis, J. (2005). Genome Analysis and Functional Characterization of the E2 and RING-Type E3 Ligase Ubiquitination Enzymes of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 139(4): 1597-1611.
- Lagercrantz, U. (2009). At the end of the day: a common molecular mechanism for photoperiod responses in plants? *Journal of Experimental Botany* 60(8): 2501-2515.
- Lamb, R., Hill, T., Tan, Q. & Irish, V. (2002). Regulation of *APETALA3* floral homeotic gene expression by meristem identity genes. *Development* 129(9): 2079-2086.
- Laubinger, S., Marchal, V., Le Gourrierec, J., Wenkel, S., Adrian, J., Jang, S., Kulajta, C., Braun, H., Coupland, G. & Hoecker, U. (2006). *Arabidopsis* SPA proteins regulate photoperiodic flowering and interact with the floral inducer CONSTANS to regulate its stability. *Development* 133(16): 3213-3222.
- Lee, I., Blecker, A. & Amasino, R. (1993). Analysis of naturally occurring late flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and general genetics* 237(1-2): 171-176.
- Lee, J., Oh, M., Park, H. & Lee, I. (2008). SOC1 translocated to the nucleus by interaction with AGL24 directly regulates leafy. *The Plant Journal* 55(5): 832-843.
- Lee, J., Yoo, S., Park, S., Hwang, I., Lee, J. & Ahn, J. (2007). Role of SVP in the control of flowering time by ambient temperature in *Arabidopsis*. *Genes and Development* 21(4): 397-402.
- Lehr, N. V. d., Johansson, S., Wu, S., Bahram, F., Castell, A., Cetinkaya, C., Hydring, P., Weidung, I., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Soderberg, O., Kerppola, T. K. & Larsson, L.G. (2003). The F-Box Protein Skp2 Participates in c-Myc Proteasomal Degradation and Acts as a Cofactor for c-Myc-Regulated Transcription. *Molecular Cell* 11(1189-1200).
- Li, C. & Dubcovsky, J. (2008). Wheat FT protein regulates VRN1 transcription through interactions with FDL2. *The Plant Journal* 55(4): 543-554.
- Li, D., Liu, C., Shen, L., Wu, Y., Chen, H., Robertson, M., Helliwell, C., Ito, T., Meyerowitz, E. & Yu, H. (2008). A repressor complex governs the integration of flowering signals in *Arabidopsis*. *Developmental Cell* 15(1): 110-120.
- Lin, M., Belanger, H., Lee, Y., Varkonyi-Gasic, E., Taoka, K., Miura, E., Xoconostle-Cázares, B., Gendler, K., Jorgensen, R., Phinney, B., Lough, T. & Lucas, W. (2007). FLOWERING LOCUS T protein may act as the long-distance florigenic signal in the cucurbits. *The Plant Cell* 19(5): 1488-1506.
- Lipford, J. R. & Deshaies, R. J. (2003). Diverse roles for ubiquitin-dependent proteolysis in transcriptional activation. *NATURE CELL BIOLOGY* 5(10): 845-850.
- Lipford, J. R., Smith, G. T., Chi, Y. & Deshaies, R. J. (2005). A putative stimulatory role for activator turnover in gene expression. *Nature* 438(3): 113-116.
- Liu, L., Zhang, Y., Tang, S., Zhao, Q., Zhang, Z., Zhang, H., Dong, L., Guo, H. & Xie, Q. (2010). An efficient system to detect protein ubiquitination by agroinfiltration in *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Journal* 61(5): 893-903.
- Lohmann, J., Hong, R., Hobe, M., Busch, M., Parcy, F., Simon, R. & Weigel, D. (2001). A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in *Arabidopsis*. *Cell* 105(6): 793-803.

- Lorick, K., Jensen, J., Fang, S., Ong, A., Hatakeyama, S. & Weissman, A. (1999). RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(20): 11364-11369.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Lewis Farr, A. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagen. *The Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Martínez, C., Pons, E., Prats, G. & León, J. (2004). Salicylic acid regulates flowering time and links defence responses and reproductive development. *The Plant Journal* 37(2): 209-217.
- Martínez-García, J., Huq, E. & Quail, P. (2000). Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science* 288(5467): 859-863.
- Más, P., Kim, W., Somers, D. & Kay, S. (2003). Targeted degradation of TOC1 by ZTL modulates circadian function in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 426(6966): 567-570.
- Más, P. & Yanovsky, M. J. (2009). Time for circadian rhythms: plants get synchronized. *Current Opinion in Plant Biology* 12(5): 574-579.
- Mathieu, J., Warthmann, N., F., K. & Schmid, M. (2007). Export of FT protein from phloem companion cells is sufficient for floral induction in *Arabidopsis*. *Current Biology* 17(12): 1055-1060.
- Matis, C., Chomez, P., Picarda, J. & Rezsö, R. (2001). Differential and opposed transcriptional effects of protein fusions containing the VP16 activation domain. *FEBS Letters* 499(1-2): 92-96.
- Matsuo, N. & Banno, H. (2008). The *Arabidopsis* transcription factor ESR1 induces in vitro shoot regeneration through transcriptional activation. *Plant Physiology and Biochemistry* 46(12): 1045-1050.
- Melzer, S., Lens, F., Gennen, J., Vanneste, S., Rohde, A. & Beeckman, T. (2008). Flowering-time genes modulate meristem determinacy and growth form in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics* 40(12): 1489-1492.
- Michaels, S. & Amasino, R. (1999). *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *The Plant Cell* 11(5): 949-956.
- Michaels, S., Bezerra, I. & Amasino, R. (2004). FRIGIDA-related genes are required for the winter-annual habit in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(9): 3281-3285.
- Michaels, S., Himelblau, E., Kim, S., Schomburg, F. & Amasino, R. (2005). Integration of flowering signals in winter-annual *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 137(1): 149-156.
- Mittler, G., Stuhler, T., Santolin, L., Uhlmann, T., Kremmer, E., Lottspeich, F., Berti, L. & Meisterernst, M. (2003). A novel docking site on Mediator is critical for activation by VP16 in mammalian cells. *The EMBO Journal* 22(24): 6494-6504.
- Monte, E., Tepperman, J., Al-Sady, B., Kaczorowski, K., Alonso, J., Ecker, J., Li, X., Zhang, Y. & Quail, P. (2004). The phytochrome-interacting transcription factor, PIF3, acts early, selectively, and positively in light-induced chloroplast development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(46): 16091-16098.
- Moon, J., Suh, S., Lee, H., Choi, K., Hong, C., Paek, N. K., SG. & Lee, I. (2003). The SOC1 MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 35(5): 613-623.
- Muratani, M., Kung, C., Shokat, K. & Tansey, W. (2005). The F box protein Dsg1/Mdm30 is a transcriptional coactivator that stimulates Gal4 turnover and cotranscriptional mRNA processing. *Cell* 120(6): 887-899.
- Muratani, M. & Tansey, W. (2003). How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4(3): 1-10.
- Nagatani, A., JW., R. & Chory, J. (1993). Isolation and initial characterization of *Arabidopsis* mutants that are deficient in phytochrome A. *Plant Physiology* 102(1): 269-277.
- Nakamichi, N., Kita, M., Niinuma, K., Ito, S., Yamashino, T., Mizoguchi, T. & Mizuno, T. (2007). *Arabidopsis* clock-associated pseudo-response regulators PRR9, PRR7 and PRR5 coordinately

- and positively regulate flowering time through the canonical CONSTANS-dependent photoperiodic pathway. *Plant and cell physiology* 48(6): 822-832.
- Neff, M., Neff, J., Chory, J. & Pepper, A. (1998). dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. *The Plant Journal* 14(3): 387-392.
- Niu, Q.-W., Lin, S.-S., Reyes, J. L., Chen, K.-C., Wu, H.-W., Yeh, S.-D. & Chua, N.-H. (2006). Expression of artificial microRNAs in transgenic *Arabidopsis thaliana* confers virus resistance. *Nature Biotechnology* 24(11): 1420-1428.
- Ossowski, S., Schwab, R. & D., W. (2008). Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs. *The Plant Journal* 53(4): 674-690.
- Parcy, F., Bomblies, K. & Weigel, D. (2002). Interaction of LEAFY, AGAMOUS and TERMINAL FLOWER1 in maintaining floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Development* 129(10): 2519-2527.
- Park, E., Kim, J., Lee, Y., Shin, J., Oh, E., Chung, W., Liu, J. & Choi, G. (2004). Degradation of phytochrome interacting factor 3 in phytochrome-mediated light signaling. *Plant and cell physiology* 45(8): 968-975.
- Parks, B. & Quail, P. (1993). hy8, a new class of *Arabidopsis* long hypocotyl mutants deficient in functional phytochrome A. *The Plant Cell* 5(1): 39-48.
- Perissi, V., Aggarwal, A., Glass, C., Rose, D. & Rosenfeld, M. (2004). A corepressor/coactivator exchange complex required for transcriptional activation by nuclear receptors and other regulated transcription factors. *Cell* 116(4): 511-526.
- Ponting, C. P., Aravind, L., Schultz, J., Bork, P. & Koonin, E. V. (1999). Eukaryotic Signalling Domain Homologues in Archaea and Bacteria. Ancient Ancestry and Horizontal Gene Transfer. *Journal of Molecular Biology* 289(4): 729-745.
- Pruneda-Paz, J., Breton, G., Para, A. & Kay, S. (2009). A functional genomics approach reveals CHE as a component of the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* 323(5920): 1481-1485.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M. & Séraphin, B. (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* 24(3): 218-229.
- Reed, J. W., Nagpal, P., Poo, D. S., Furuya, M. & Chory, J. (1993). Mutations in the Gene for the Red/Far-Red Light Receptor Phytochrome B Alter Cell Elongation and Physiological Responses throughout *Arabidopsis* Development. *The Plant Cell* 5(2): 147-157.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M. & Séraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature Biotechnology* 17(10): 1030-1032.
- Rivas, S., Mucyn, T., van den Burg, H., Vervoort, J. & Jones, J. (2002a). An approximately 400 kDa membrane-associated complex that contains one molecule of the resistance protein Cf-4. *The Plant Journal* 29(783-796).
- Rivas, S., Romeis, T. & JD., J. (2002b). The Cf-9 disease resistance protein is present in an approximately 420-kilodalton heteromultimeric membrane-associated complex at one molecule per complex. *The Plant Cell* 14(3): 689-702.
- Rohila, J., Chen, M., Cerny, R. & Fromm, M. (2004). Improved tandem affinity purification tag and methods for isolation of protein heterocomplexes from plants. *The Plant Journal* 38(1): 172-181.
- Rohila, J., Chen, M., Chen, S., Chen, J., Cerny, R., C., D., Canlas, P., Xu, X., Gribskov, M., Kanrar, S., Zhu, J., Ronald, P. & Fromm, M. (2006). Protein-protein interactions of tandem affinity purification-tagged protein kinases in rice. *The Plant Journal* 46(1): 1-13.
- Rubio, V., Shen, Y., Saijo, Y., Liu, Y., Gusmaroli, G., Dinesh-Kumar, S. & Deng, X. (2005). An alternative tandem affinity purification strategy applied to *Arabidopsis* protein complex isolation. *The Plant Journal* 41(5): 767-778.

- Samach, A., Onouchi, H., Gold, S., GS., D., Z., S.-S., Yanofsky, M. & Coupland, G. (2000). Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science* 288(5471): 1600-1602.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning*.
- Santner, A. & Estelle, M. (2010). The ubiquitin-proteasome system regulates plant hormone signaling. *The Plant Journal* 61(6): 1029–1040.
- Sawa, M., Nusinow, D., Kay, S. & Imaizumi, T. (2007). FKF1 and GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in *Arabidopsis*. *Science* 318(5848): 261-265.
- Schwab, R., Ossowski, S., Riester, M., Warthmann, N. & Weigel, D. (2006). Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 18(5): 1121-1133.
- Schwab, R., Palatnik, J., Riester, M., Schommer, C., Schmid, M. & Weigel, D. (2005). Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Developmental Cell* 8(4): 517-527.
- Searle, I., He, Y., Turck, F., Vincent, C., Fornara, F., Kröber, S., Amasino, R. & Coupland, G. (2006). The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*. *Genes and Development* 20(7): 898-912.
- Seo, P. J., Kim, M. J., Park, J.-Y., Kim, S.-Y., Jeon, J., Lee, Y.-H., Kim, J. & Park, C.-M. (2010a). Cold activation of a plasma membrane-tethered NAC transcription factor induces a pathogen resistance response in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 61(4): 661-671.
- Seo, P. J., KIM, M. J., SONG, J.-S., KIM, Y.-S., KIM, H.-J. & PARK, C.-M. (2010b). Proteolytic processing of an *Arabidopsis* membrane-bound NAC transcription factor is triggered by cold-induced changes in membrane fluidity. *Biochemical Journal* 427(3): 359-367.
- Shalit, A., Rozman, A., Goldshmidt, A., Alvarez, J., Bowman, J., Eshed, Y. & Lifschitz, E. (2009). The flowering hormone florigen functions as a general systemic regulator of growth and termination. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(20): 8392-8397.
- Shen, H., Moon, J. & Huq, E. (2004). PIF1 is regulated by light-mediated degradation through the ubiquitin-26S proteasome pathway to optimize photomorphogenesis of seedlings in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 44(6): 1023-1035.
- Shen, H., Zhu, L., Castillon, A., Majee, M., Downie, B. & Huq, E. (2008). Light-induced phosphorylation and degradation of the negative regulator PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR1 from *Arabidopsis* depend upon its direct physical interactions with photoactivated phytochromes. *The Plant Cell* 20(6): 1586-1602.
- Simon, R., Igeño, I. & Coupland, G. (1996). Activation of floral meristem identity genes in *Arabidopsis*. *Nature* 384(6604): 59-62.
- Smalle, J. & Vierstra, R. D. (2004). The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annual Review of Plant Biology* 55: 555–590.
- Somers, D., Sharrock, R., Tepperman, J. & Quail, P. (1991). The hy3 Long Hypocotyl Mutant of *Arabidopsis* Is Deficient in Phytochrome B. *The Plant Cell* 3(12): 1263-1274.
- Song, Y., Song, N., Shin, S., Kim, H., Yun, D., Lim, C., Lee, S., Kang, K. & Hong, J. (2008). Isolation of CONSTANS as a TGA4/OBF4 interacting protein. *Molecular Cell* 25(4): 559-565.
- Stone, S. L., Hauksdottir, H., Troy, A., Herschleb, J., Kraft, E. & Callis, J. (2005). Functional Analysis of the RING-Type Ubiquitin Ligase Family of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 137(1): 13-30.
- Strasser, B., Alvarez, M., Califano, A. & Cerdán, P. (2009). A complementary role for ELF3 and TFL1 in the regulation of flowering time by ambient temperature. *The Plant Journal* 58(4): 629-640.
- Suarez-Lopez, P., Wheatley, K., Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F. & Coupland, G. (2001). CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature* 410(1116-1120).
- Taatjes, D. J. (2010). The human Mediator complex: a versatile, genome-wide regulator of transcription. *Trends in Biochemical Sciences* 35(6): 315-322.
- Tamaki, S., Matsuo, S., Wong, H., Yokoi, S. & Shimamoto, K. (2007). Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice. *Science* 316(5827): 1033-1036.

- Tiwari, S. B., Shen, Y., Chang, H.-C., Hou, Y., Harris, A., Ma, S. F., McPartland, M., Hymus, G. J., Adam, L., Marion, C., Belachew, A., Repetti, P. P., Reuber, T. L. & Ratcliffe, O. J. (2010). The flowering time regulator CONSTANS is recruited to the FLOWERING LOCUS T promoter via a unique cis-element. *New Phytologist* 187(1): 57-66.
- Turck, F., Fornara, F. & Coupland, G. (2008). Regulation and Identity of Florigen: FLOWERING LOCUS T Moves Center Stage. *Annual Review of Plant Biology* 59: 573-594.
- Valverde, F., Mouradov, A., Soppe, W., Ravenscroft, D., Samach, A. & Coupland, G. (2004). Photoreceptor Regulation of CONSTANS Protein in Photoperiodic Flowering. *Science* 303: 1003-1006.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P. & Baulcombe, D. (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The Plant Journal* 33(5): 949-956.
- Wagner, D., Sablowski, R. & Meyerowitz, E. (1999). Transcriptional activation of APETALA1 by LEAFY. *Science* 285(5427): 582-584.
- Wagner, D., Wellmer, F., Dilks, K., William, D., Smith, M. R., Kumar, P. P., Riechmann, J. L., Greenland, A. J. & Meyerowitz, E. M. (2004). Floral induction in tissue culture: a system for the analysis of LEAFY-dependent gene regulation. *The Plant Journal* 39(2): 273-282.
- Wang, X., Muratani, M., Tansey, W. P. & Ptashne, M. (2010). Proteolytic Instability and the Action of Nonclassical Transcriptional Activators. *Current Biology* 20(9): 868-871.
- Wenkel, S., Turck, F., Singer, K., Gissot, L., Le Gourrierc, J., Samach, A. & Coupland, G. (2006). CONSTANS and the CCAAT Box Binding Complex Share a Functionally Important Domain and Interact to Regulate Flowering of *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 18(11): 2971-2984.
- Whitelam, G., Johnson, E., Peng, J., Carol, P., Anderson, M., Cowl, J. & Harberd, N. (1993). Phytochrome A null mutants of *Arabidopsis* display a wild-type phenotype in white light. *The Plant Cell* 5(7): 757-768.
- Wigge, P., Kim, M., Jaeger, K., Busch, W., Schmid, M., Lohmann, J. & Weigel, D. (2005). Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science* 309(5737): 1056-1059.
- Wollenberg, A., Strasser, B., Cerdán, P. & Amasino, R. (2008). Acceleration of flowering during shade avoidance in *Arabidopsis* alters the balance between FLOWERING LOCUS C-mediated repression and photoperiodic induction of flowering. *Plant Physiology* 148(3): 1681-1694.
- Yamaguchi, A., Kobayashi, Y., Goto, K., Abe, M. & Araki, T. (2005). TWIN SISTER OF FT (TSF) Acts as a Floral Pathway Integrator Redundantly with FT. *Plant Cell Physiology* 46(8): 1175-1189.
- Yang, F., DeBeaumont, R., Zhou, S. & Naar, A. M. (2004). The activator-recruited cofactor Mediator coactivator subunit ARC92 is a functionally important target of the VP16 transcriptional activator. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(8): 2339-2344.
- Yano, M., Katayose, Y., Ashikari, M., Yamanouchi, U., Monna, L., Fuse, T., Baba, T., Yamamoto, K., Umehara, Y., Nagamura, Y. & Sasaki, T. (2000). Hd1, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the *Arabidopsis* flowering time gene CONSTANS. *The Plant Cell* 12(12): 2473-2484.
- Yanovsky, M., Casal, J. & Luppi, J. (1997). The VLF loci, polymorphic between ecotypes *Landsberg erecta* and *Columbia*, dissect two branches of phytochrome A signal transduction that correspond to very-low-fluence and high-irradiance responses. *The Plant Journal* 12(3): 659-667.
- Yanovsky, M. & Kay, S. (2002). Molecular basis of seasonal time measurement in *Arabidopsis*. *Nature* 419: 308-312.
- Yoo, S., Kardailsky, I., Lee, J., Weigel, D. & Ahn, J. (2004). Acceleration of flowering by overexpression of MFT (*MOTHER OF FT AND TFL1*). *Molecules and Cells* 17(1): 95-101.
- Yoo, S. K., Chung, K. S., Kim, J., Lee, J. H., Hong, S. M., Yoo, S. J., Yoo, S. Y., Lee, J. S. & Ahn, J. H. (2005). CONSTANS Activates SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 through FLOWERING LOCUS T to Promote Flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 139: 770-778.

- Yu, H., Ito, T., Zhao, Y., Peng, J., Kumar, P. & Meyerowitz, E. (2004). Floral homeotic genes are targets of gibberellin signaling in flower development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(20): 7827-7832.
- Yu, J., Rubio, V., Lee, N., Bai, S., Lee, S., Kim, S., Liu, L., Zhang, Y., Irigoyen, M., Sullivan, J., Zhang, Y., Lee, I., Xie, Q., Paek, N. & Deng, X. (2008). COP1 and ELF3 control circadian function and photoperiodic flowering by regulating GI stability. *Molecular Cell* 32(5): 617-630.