

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**CONTROL HORMONAL DE LA  
RESPUESTA A LA LUZ EN  
*Arabidopsis thaliana***

TESIS DOCTORAL

**MIGUEL DE LUCAS TORRES**

MADRID 2010



*Lo que nunca me enseñaron en la escuela, es que las cosas más importantes de la vida no se aprenden en la escuela*





## ***AGRADECIMIENTOS***



Me gustaría empezar agradeciéndole a Salomé la confianza depositada en mi, aún no entiendo porqué decidió llamarme pudiendo escoger entre gente con mucho mejor expediente y experiencia. Gracias por emplear tu tiempo en enseñarme desde cómo sujetar la pipeta a purificar la proteína más compleja del mundo; gracias, de alguna manera, por no dejar que me relaje ni un segundo. Se que gracias a este laboratorio he madurado, aprendido a no rendirme y la importancia de ser buen compañero.

Los resultados de ésta tesis se deben en gran medida al meticuloso trabajo de otras personas que participaron en el proyecto antes de mi llegada al laboratorio. Me gustaría agradecer a Mariana el descubrimiento de la interacción en doble híbrido entre StPIF4 y StRGA y que me sirvió como punto de partida. También agradecer a Mariela y Elena, que participaron en éste trabajo antes de que yo llegara al laboratorio y con su trabajo allanaron el mío.

No me puedo olvidar de todas las personas que me cedieron parte de su trabajo para poder desarrollar el mío, desde una cepa de *E.coli* a una planta transgénica. Me dejo en el tintero a muchos, pero principalmente quiero agradecer a Tadao Asami por cedernos el Brasinazol que he utilizado en varios de los experimentos de la tesis. A Christian Fanckhauser y la gente de su laboratorio, Severine y Patricia, me enseñásteis mucho en mi estancia en Lausanne y me dejásteis un montón de material. También quiero darle las gracias a Joanne Chory y al resto de la gente del departamento de Biología Vegetal del Salk Institute (Yvon y Ullas principalmente). Mi estancia en el Salk resultó tremendamente enriquecedora y tengo un recuerdo sensacional del trabajo en el laboratorio y de las conversaciones científicas con Joanne.

Buenos compañeros he tenido un montón, recuerdo con mucho cariño a la gente que conocí durante mi primer año: Mariela, Ashraf, Jon, Mariángeles...la gente que ocasionalmente visitó el laboratorio: Olga, Verónica, Jaime, María, Diana e Imane. Las estudiantes del módulo de técnicos de laboratorio y la gente que acaba de llegar: Isabel, Stella y Vadir. Lástima no conoceros antes, seguro habiéramos disfrutado juntos de un montón de momentos estupendos.

Gracias a Carlitos por dejar mis solicitudes de medios siempre para el final, es broma, gracias por ser tan meticuloso en tu trabajo, por tener casi todo a punto, por ser un apoyo en los momentos más complicados y por hacer del laboratorio un lugar ameno donde se trabaja con una sonrisa.

Gracias a Abelino, Abellaneda, Abelardo, Aberasturi, Abelain de Lon...Abe, por se mi cómplice en un montón de experimentos y pruebecillas que no voy a precisar. Gracias por ayudarme a imponer el Cantábrico sobre el resto los mares.

Cristinin y Anita, muchísimas gracias por aguantar todas esas "pijadas" que me vienen a la mente, por invitarme a gominolas o frutos secos, por animarme en los momentos más durillos y bajarme de las alturas cuando lo necesitaba.

Me acuerdo mucho de Juan Manuel, ese loco que correteaba por todos lados, siempre animando al personal. Me da mucha rabia que no puedas celebrar con nosotros mi tesis, te tendré que hacer una visita.

Especialmente quiero dedicarle esta tesis a Jean-Michel, muchísimas gracias por estar conmigo en los momentos más complicados, en los más divertidos, por aconsejarme en lo profesional y lo personal, por ser un amigo incondicional. Eres genial y te voy a echar un montón de menos.

No puedo dejar de mencionar a toda esa gente que forma parte de mi vida en el CNB, Rosa que me quiere como un hijo, mis compañeros de pasillo, el personal de cultivo in-vitro, del invernadero...el resto de gente que me ha tratado con amabilidad. Todos merecen figurar en la tesis.

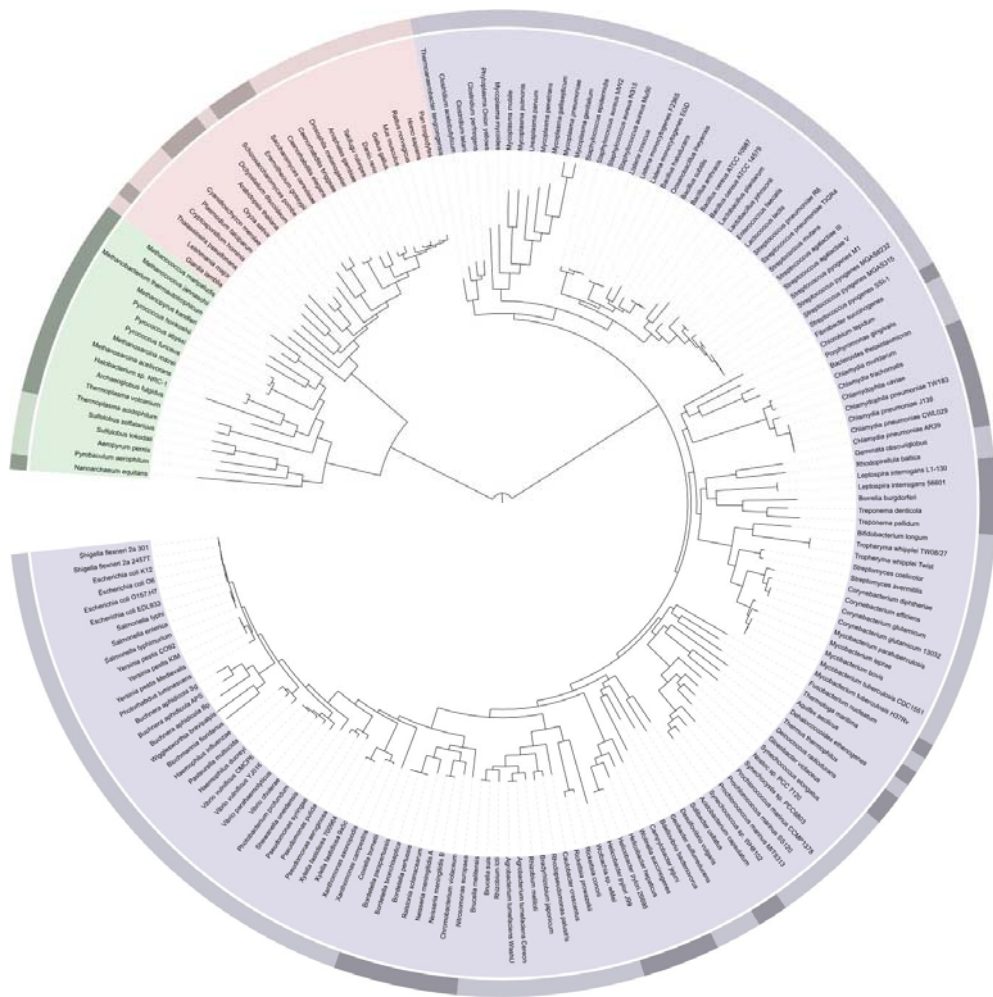
Fuera de las paredes del CNB debo agradecer los consejos de mi madre, sin su apoyo habría tirado la toalla a los quince días. Gracias porque siempre has sido un ejemplo de fortaleza y esfuerzo. Gracias a mi padre que siempre ha tenido claro el camino correcto y así me lo ha transmitido. Gracias por hacerme ver lo que merece la pena.

Quiero agradecer al resto de mis hermanos, que han sabido quitarle hierro a mis problemas. ¿Qué sería de mí sin esos hermanos crueles a la vez que cariñosos? Especialmente quiero agradecer la compañía de mi hermana María, soportarme durante estos años no ha sido tarea fácil, pero aún así siempre me has tratado con cariño y comprensión. Sin hacer muchas cuentas, creo que te debo mil cenas y otros tantos turnos de limpieza.

A todos los amigos que he dejado tantas veces plantados, tantos planes me he perdido y no me lo habéis tenido en cuenta.

Especialmente quiero darte las gracias a ti, Demel. Se que en estos años no he sido el mejor compañero: muchas veces estresado, otras tantas agotado...diciéndote que no a un montón de planes por el hecho de tener que trabajar. Pero aún así te has mantenido a mi lado, animándome y aguantando mis monólogos. Siempre me has recibido con una sonrisa, una caricia, un bocadillo de nocilla!!! Disfruto un montón a tu lado y en el futuro vamos a disfrutar infinitas veces más. Mucho!





*El árbol filogenético de los seres vivos. Muestra la relación existente entre las especies cuyo genoma ha sido mapeado por el ser humano.*



<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>19</b>
1. <b>PERCEPCIÓN DE LA SEÑAL LUMINOSA</b>	19
1.1. <b>Estructura y modo de acción de los fitocromos</b>	20
1.1.1. <b>Arquitectura de los fitocromos</b>	21
1.1.2. <b>Señalización mediada por fitocromo</b>	22
1.2. <b>Factores de transcripción que interactúan con los fitocromos (PIFs)</b>	23
2. <b>REGULADORES DEL CRECIMIENTO</b>	28
2.1. <b>LAS GIBERELINAS: METABOLISMO, FUNCIÓN Y SEÑALIZACIÓN</b>	31
2.1.1. <b>Metabolismo de las Giberelinas</b>	32
2.1.1. <b>Función de las Giberelinas</b>	33
2.1.3. <b>Señalización de las Giberelinas</b>	34
2.1.3.1. <b>Proteínas DELLA: Represores del crecimiento promovido por las Giberelinas</b>	34
2.1.3.2. <b>El Receptor de Giberelinas <b>GID1</b></b>	36
2.1.3.3. <b>Degradación de las DELLA mediada por ubiquitinación por el complejo SCF<sup>SLY1/GID2</sup></b>	38
2.1.3.4. <b>Regulación mediada por DELLA</b>	39
2.2. <b>BRASINOSTEROIDES: METABOLISMO Y SEÑALIZACIÓN</b>	40
2.2.3. <b>Metabolismo de los Brasinosteroides</b>	41
2.2.4. <b>Señalización de los Brasinosteroides</b>	43
2.2.4.1 <b>Percepción de los brasinosteroides en la membrana celular</b>	44
2.2.4.1. <b>Componentes intracelulares de la ruta de señalización de BL</b>	46
2.2.4.2. <b>Respuestas biológicas dependientes de BL</b>	48
3. <b>INTEGRACIÓN DE LAS SEÑALES HORMONALES Y LA INFORMACIÓN LUMINOSA</b>	50
<b>OBJETIVOS DEL ESTUDIO</b>	<b>55</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>59</b>
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>83</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>87</b>
1. <b>CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA INTERACCIÓN PIF4-DELLA.</b>	87
1. <b>INTERACCIÓN DEL FACTOR PIF4 Y LOS REPRESORES DELLA DE ARABIDOPSIS.</b>	87
1.1. <b>Interacción de PIF4 con las cinco proteínas DELLA de <i>Arabidopsis</i></b>	87
1.2. <b>Análisis de la interacción PIF4-DELLA, mediante experimentos de Complementación Bimolecular Fluorescente (BiFC)</b>	88
1.3. <b>Análisis de la interacción PIF4/RGA mediante Co-Immunoprecipitación con anticuerpos específicos</b>	90
2. <b>FUNCIÓN DE PIF4 EN LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE LUZ</b>	91
2.1. <b>Análisis de la estabilidad de PIF4:GFP</b>	92
2.2. <b>Fenotipos de los mutantes <i>phyBpif4</i> y <i>phyBpif4pif5</i></b>	93
3. <b>FUNCIÓN DE LA INTERACCIÓN PIF4-DELLA</b>	95
3.1. <b>Respuesta alterada de las plantas PIF4OX y <i>pif4</i> al tratamiento con GAs</b>	95
3.2. <b>Identificación de genes regulados por PIF4</b>	97
3.3. <b>Análisis de la actividad transcripcional de PIF4 por expresión transitoria en células de <i>Arabidopsis</i></b>	98

3.4. Estudio de la capacidad de unión al ADN de PIF4 mediante Ensayo de Movilidad Electroforética (EMSA)	100
3.5. Análisis <i>in vivo</i> de la actividad transcripcional de PIF4 mediante experimentos de Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP)	102
3.6. Comprobación fenotípica de la represión transcripcional mediada por las DELLA	104
<b>II. INTERACCIÓN DE LAS SEÑALES BR y GAs EN EL CONTROL DE LA ELONGACIÓN DEL HIPOCÓTILO</b>	<b>106</b>
<b>4. LOS REPRESORES DELLA EN LA INTERACCIÓN DE LAS RUTAS DE BRs y GAs</b>	<b>108</b>
5.1. Análisis de la respuesta de plantas PIF4-OX, <i>pif4</i> y <i>pif4pif5</i> al aporte exógeno de BRs y BRZ	110
5.2. Comparación de los genes de respuesta a BL y los regulados por PIF4	113
5.3. Efecto de los brasinosteroides en la expresión de pPIL1:LUC	115
<b>6. BÚSQUEDA DE INTERACTORES DE PIF4 IMPLICADOS EN LA SEÑALIZACIÓN DE BRs</b>	<b>118</b>
6.1. Análisis de la actividad quinasa de BIN2 utilizando PIF4 como sustrato	119
6.2. Interacción de PIF4 con otros intermediarios de la ruta de señalización de BRs	121
6.3. Estudios de interacción de las proteínas PIF4 y BES1 mediante ensayo doble híbrido en levadura	121
6.4. Interacción de las proteínas PIF4 y BES1 en planta	123
6.5. Fenotipo de las líneas transgénicas 35S:PIF4-HA 35S:BES1 RNAi	124
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>127</b>
1. Análisis de la Interacción PIF4-DELLA	128
3. Caracterización funcional de la interacción PIF4-DELLA	129
5. PIF4 como posible efector de la ruta de señalización de BRs	134
7. Interacción de los factores PIF4 y BES1	136
8. Control hormonal de la respuesta a la luz	137
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>143</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>147</b>
1. Artículos publicados durante el trabajo de tesis doctoral	147
2. Descripción de genes más representativos que han sido mencionados en la memoria	165
3. Lista de Oligonucleótidos Utilizados en la memoria	166
4. Tabla resumen de los genes inducidos en las plantas PIF4OX y reprimidos en las plantas <i>pif4pif5</i> .	169
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>175</b>



Reino **Plantae**

División **Magnoliophyta**

Clase **Magnoliopsida**

Orden **Brassicales**

Familia **Brassicaceae**

Género *Arabidopsis*

*Arabidopsis thaliana*

***ABSTRACT***



## ABSTRACT

Cell elongation during seedling development is antagonistically regulated by light and two different phytohormones: gibberellins (GAs) and brassinosteroids (BRs). Light induces photomorphogenesis, leading to inhibition of hypocotyl growth, whereas GAs and BRs promote etiolated growth, characterized by enhanced hypocotyl elongation. The mechanism underlying this antagonistic interaction remained unclear, its characterization being the main aim of this work.

PhyB is the main photoreceptor mediating of red (R) light induced de-etiolation. In its Pr inactive form this light receptor is localized in the cytosol. Red light absorption converts this inactive conformer into the active Pfr form that is translocated into the nucleus where it negatively interacts different bHLH transcription factors (PIFs), to inhibit expression of their downstream regulated genes. Mutations in the genes encoding these transcription factors lead to a partially de-etiolated phenotype in the dark (1), seedlings of these mutants showing shorter hypocotyls and partially open apical hook and cotyledons. A similar phenotype is also displayed by the biosynthetic and insensitive GAs and BRs mutants, hence evidencing an antagonistic function of these hormone signalling pathways and the PIF factors.

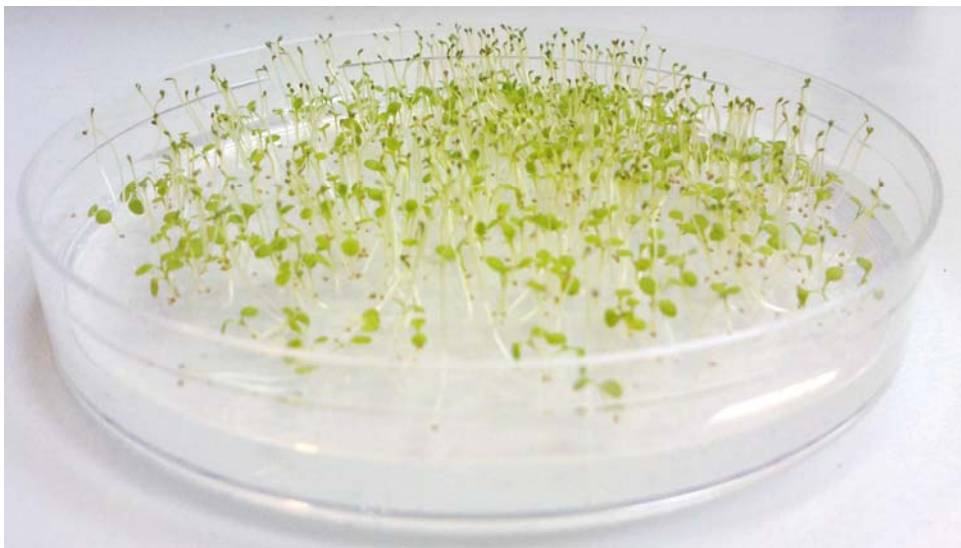
DELLA proteins are key repressors of GA signalling. In the absence of GAs, these repressors are accumulated in the nucleus of the cell. Our results demonstrate that DELLAs block PIF4 transcriptional activity by binding the DNA-recognition domain of this factor. We show that GAs abrogate such repression by promoting DELLA destabilization, and therefore cause a concomitant accumulation of free PIF4 in the nucleus. Consistent with this model, intermediate hypocotyl lengths were observed in transgenic plants over-accumulating both DELLAs and PIF4. Destabilization of this factor by phyB, together with its inactivation by DELLAs, constitutes a protein interaction framework that explains how plants integrate both light and GA signals to optimize growth and development in response to a changing environment.

Phosphorylation is the most critical post-translational modification of key molecules in a variety of signal transduction pathways in living organisms. Brassinosteroids (BRs) utilize phosphorylation events to propagate their signals and modulate activity of the BES1/BZR1 factors, with a role in BR-regulated expression. BR perception by the membrane receptor kinase BRI1, triggers the sequential phosphorylation of BRI1, BSK1 and the phosphatase BSU1. Activated BSU1 stimulates BR responses by inhibiting the GSK3 (glycogen synthase kinase 3) kinase BIN2, a negative regulator of BR signalling

that phosphorylates BES1 and BZR1, to promote degradation of these factors and their exclusion from the nucleus. In this work we show that PIF4 is also a primary target of BIN2 kinase activity. In the absence of BRs, BIN2 phosphorylates PIF4 to promote destabilization of this factor and consequently, expression of genes with a role in etiolated growth is repressed.

Our work provides evidence for multiple levels of regulation of PIF4 activity hence emphasizing the important role of this factor as a node of integration of multiple environmental signals. Coordinated control of PIF4 stability/activity by light and hormonal cues, actually allows the plant to connect environmental information with the endogenous developmental programs and thus adjust growth and development to the changing environment.





*Análisis de la segregación de las plantas PIF4:GFP. Las plantas etioladas corresponden a las que sobreexpresan el transgen, las de fenotipo silvestre las que no lo han adquirido.*

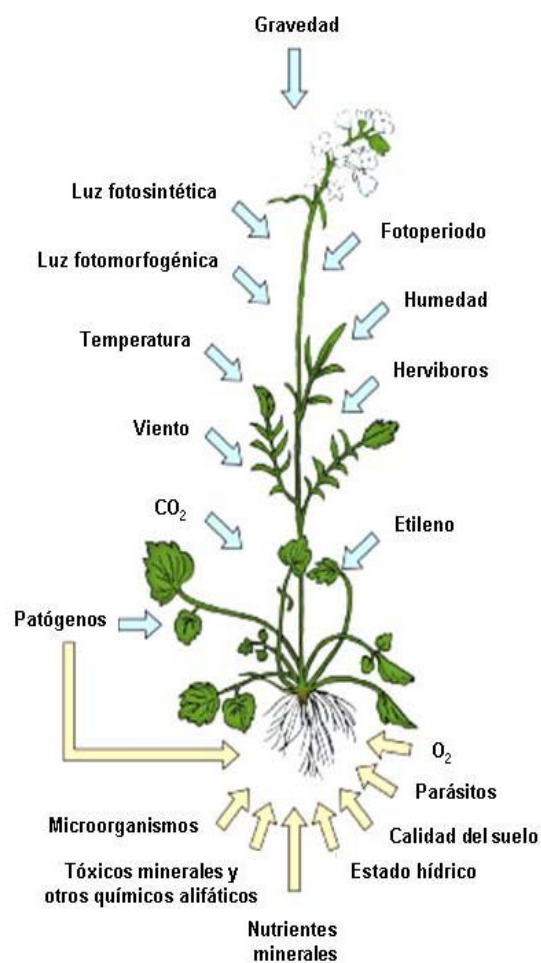
## ***INTRODUCCIÓN***



## INTRODUCCIÓN

Uno de los principales objetivos de la biología del desarrollo es llegar a comprender cuáles son los procesos que determinan la formación de los diferentes órganos y por consiguiente la forma y tamaño final de los organismos pluricelulares. En biología vegetal este aspecto es aún más importante, ya que la mayoría de órganos vegetales no se preforman en el embrión sino que se diferencian tras la germinación de la semilla, en la planta adulta. Ello permite a la planta optimizar su crecimiento y arquitectura en función de las condiciones ambientales y así adaptarse a un entorno variable.

Las plantas son organismos sésiles y, al crecer fijas en el suelo, se ven sometidas a multitud de condiciones adversas a lo largo de su ciclo de vida. Así pues, en estos organismos, la activación de los diferentes programas de desarrollo es el resultado de la integración de numerosas señales endógenas y medioambientales, que al modular el propio programa genético intrínseco, determinarán el porte y arquitectura final de la planta (Fig. 1).



**Figura 1:** Esquema de los diferentes factores medio-ambientales que afectan el desarrollo de la planta

## 1. PERCEPCIÓN DE LA SEÑAL LUMINOSA

La luz incidente es un factor decisivo en el desarrollo de la planta. Las plantas además de utilizar la luz como fuente de energía para la fotosíntesis, perciben cambios en la proporción rojo (R)/rojo lejano (FR) ó en las horas de luz a lo largo del día y las utilizan como fuente de información de la presencia de otras plantas ó de la estación anual, optimizando así su crecimiento y desarrollo en función de dichas condiciones. La luz afecta todos los procesos de desarrollo, desde la germinación de la semilla hasta la floración, teniendo un efecto especialmente notorio durante el desarrollo del brote tras la germinación, estimulando la apertura y desarrollo de las hojas embrionarias ó cotiledones y la diferenciación de los cloroplastos,

inhibe el crecimiento del tallo, e induce la expresión de multitud de genes con una función en fotosíntesis.

La estrecha adaptación que exhiben las plantas a las condiciones de luz incidente se manifiesta también en respuestas como el síndrome de huída de la sombra (*shade avoidance*) o el control fotoperiódico de la floración y es el resultado de una regulación coordinada en la que están implicadas diferentes familias de fotorreceptores. Con ellos las plantas pueden percibir y responder a los cambios en la irradiancia, calidad espectral, dirección y periodicidad de la luz circundante (2).

La combinación de estudios fisiológicos, bioquímicos y genéticos ha permitido identificar cuatro principales familias de fotorreceptores implicados la percepción de la luz en el espectro rojo/rojo lejano, azul y UV: los fitocromos (3), los criptocromos (4) y fototropinas (5), y los receptores de luz UV.

### **1.1. Estructura y modo de acción de los fitocromos**

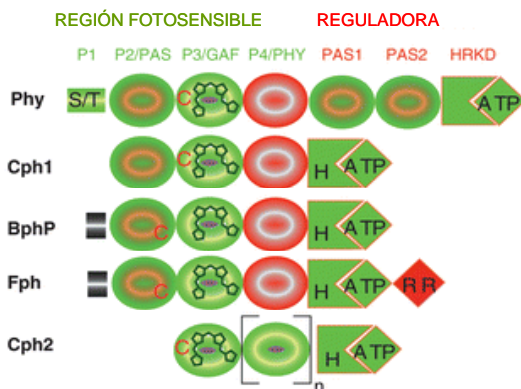
La primera evidencia experimental de la existencia estos fotorreceptores se obtuvo en 1959, al demostrar la presencia en cotiledones de brotes crecidos en oscuridad de un pigmento fotoreversible, con máximos de absorción a 660 y 735 nm (6). Dicho pigmento oscilaba de forma reversible entre 2 formas alternativas, con máximos de absorción en el espectro de luz roja (**R**) y rojo lejano (**FR**), lo que permitiría a la planta sensar la proporción de ambas radiaciones en la luz incidente. Posteriormente, se confirmó que estos fotorreceptores se encontraban presentes en todas las plantas superiores y también en *cianobacterias* (Cph1 y Cph2) (7), e incluso se han identificado moléculas muy similares en organismos no fotosintéticos, como algunos hongos y bacterias heterotróficas (Fph, BphP) (8).

En *Arabidopsis*, existen cinco genes (PHY A-PHY E) que codifican las moléculas de fitocromo (9) y que, según su estabilidad en presencia de luz se agrupan en dos clases principales: los fitocromos Tipo I (foto-lábiles), que se acumulan en plántulas etioladas y se degradan rápidamente tras la exposición a la luz; y los Tipo II (foto-estables), que son relativamente estables en ambientes iluminados (10). En *Arabidopsis*, PhyA es el único fitocromo Tipo I, y el resto (PhyB-E) son fitocromos Tipo II (11, 12)

### 1.1.1. Arquitectura de los fitocromos

Los fitocromos existen como homodímeros en solución. Cada monómero consiste en un péptido de unos 125KDa, al que se une covalentemente un cromóforo tetrapirrólico lineal denominado fitocromobilina, que es sintetizado en el cloroplasto. La arquitectura de estos fotorreceptores, independientemente del taxon en que se han identificado, consiste en una región N-terminal fotosensible, que presenta tres dominios conservados, un dominio P2 o PAS, un dominio P3 o GAF y un dominio P4 o PHY, y una región C-terminal reguladora, que incluye un dominio histidina-quinasa (HKRD) característico (13) (Figura 2).

En plantas superiores, la región N-terminal incluye además un dominio adicional P1 conservado, que está implicado en la inhibición de la fotoconversión en la oscuridad (14), y dos dominios PAS, importantes para la traslocación del fotorreceptor al núcleo una vez activado (15). Los dominios PAS y GAF son también característicos de otras moléculas señalizadoras. Los dominios LOV de las fototropinas, por ejemplo, son también dominios PAS (16) y el dominio GAF está presente en reguladores del metabolismo de nucleótidos cíclicos de cianobacterias y mamíferos (17).

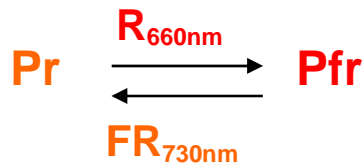


**Figura 2:** Estructura de los fitocromos conocidos. Adaptado de Rockwell y *col.*, 2006.

De este modo, la estructura canónica típica de los fitocromos y “*phytochrome related proteins*” consiste en una región N-terminal PAS-GAF-PHY fotosensible, unida a una región C-terminal reguladora, comprendida por un módulo HKRD (“*histidine kinase-related domain*”).

Los fitocromos oscilan entre dos conformaciones espectralmente distintas, interconvertibles y con distinta estabilidad relativa: una isoforma capaz de absorber luz roja, denominada **Pr**, que es convertida en la isoforma **Pfr**, capaz de absorber luz en el espectro rojo lejano (11). Al menos para PHYB, la forma considerada activa es la forma **Pfr**, ya que la mayoría de respuestas fisiológicas se observan en respuesta a luz roja. La molécula de fitocromo es sintetizada en su forma **Pr** (“*red absorbing form*”, con un máximo de absorción a 660 nm) y es convertida a la forma **Pfr** (“*far red*

*absorbing form*”, con un máximo de absorción a 730 nm) tras absorber luz roja (R) (Figura 3). La irradiación con luz en el espectro rojo lejano (FR), revierte la forma Pfr de nuevo a la forma Pr. Existen evidencias que indicarían que las formas Pfr, Pr y la fotoconversión entre ambas, son capaces de inducir diferentes tipos de respuestas fisiológicas (Fig. 3), la acumulación relativa de ambas formas estando determinada, en último término, por la proporción relativa de luz roja (R) y rojo lejano (FR) de la luz incidente (18).



**Figura 3:** Espectro de absorción de las formas Pr y Pfr de la molécula fitocromo.

### 1.1.2. Señalización mediada por fitocromo

Los fotorreceptores fitocromo se localizan en el citosol en oscuridad y migran rápidamente al núcleo en presencia de luz (19, 20). Dicha translocación al núcleo, precisa de la conversión de la forma Pr inactiva a la forma Pfr activa (21) y según la molécula de fitocromo se requieren diferentes calidades de luz para su inducción (22). PhyA, por ejemplo, se transloca al núcleo en respuesta a luz FR continua ó pulsos de luz R, mientras que el resto de fitocromos lo hacen en luz R o luz blanca (19, 22). La translocación al núcleo de PhyA, por otra parte, es mucho más rápida que la del resto de fitocromos (19, 22). Una vez en el núcleo, los fitocromos se agrupan formando pequeños agregados (*“speckles”*) subnucleares (22), cuya función parece estar relacionada con su actividad señalizadora (23). Se piensa que los agregados nucleares representan sitios donde ocurre la interacción con otros factores nucleares y su posterior degradación, aunque esta hipótesis no está claramente demostrada (24). Sin embargo, se ha podido demostrar que la región C-terminal de estos fotorreceptores es necesaria para que se formen estos agregados, y en concreto los dominios PAS y HKRD (25).

En *Arabidopsis*, se ha demostrado que más de 2500 genes (10% del genoma) estarían regulados por la acción de los fitocromos (26). Gracias a la caracterización de mutantes con una sensibilidad alterada a distintos tipos de luz, se ha avanzado enormemente en la caracterización de los mecanismos moleculares subyacentes a la señalización mediada por estos fotorreceptores. Mediante estudios de expresión génica en estos mutantes, se han identificado multitud de genes regulados por la acción de los fitocromos (27-30), identificándose, por ejemplo, numerosos factores de transcripción esenciales para la transducción de la señal luminosa (HY5, LAF1, ó

HFR1) o genes con una respuesta temprana, como CCA1 (*circadian clock associated 1*) y LHY (*late elongated hypocotyl*) (30-33)

Uno de los resultados más notables y que ha representado un avance muy significativo en el conocimiento del modo de acción de los fitocromos, ha sido el descubrimiento de que en su forma Pfr biológicamente activa, estos fotorreceptores interactúan en el núcleo con un grupo de factores de transcripción de la familia basic helix-loop-helix (bHLH), a los que se denominó "**Phytochrome Interacting Factors**" (**PIFs**), por esta interacción.

## 1.2. Factores de transcripción que interactúan con los fitocromos (PIFs)

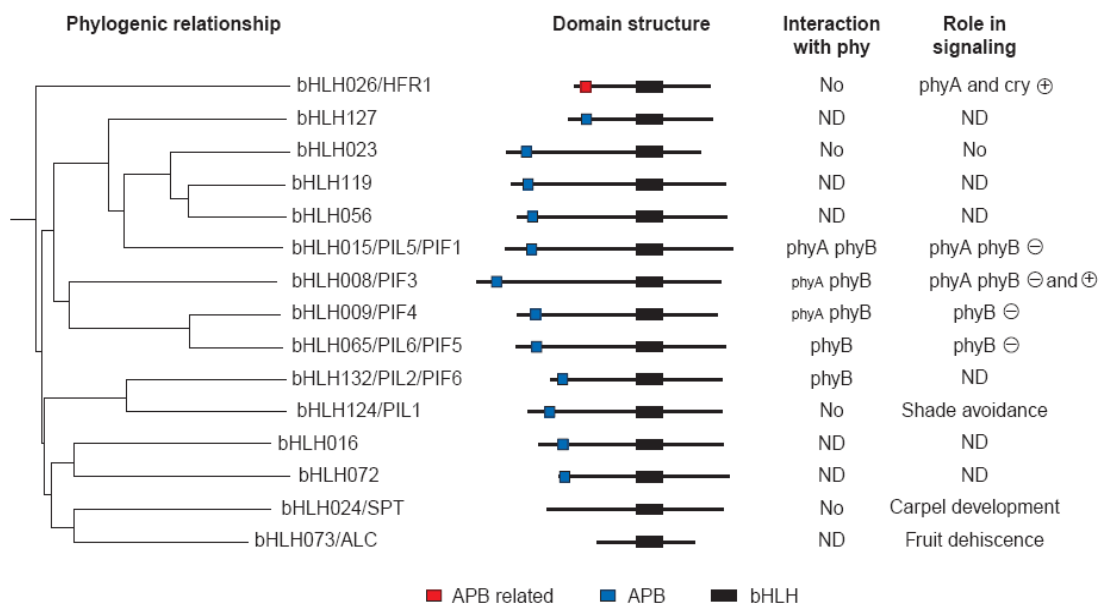
Los factores **PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS** (**PIFs**), se agrupan en la subfamilia 15 de la familia de factores de transcripción "basic-helix-loop-helix" (bHLH), habiéndose identificado para varios de estos factores una función en distintos procesos de desarrollo mediados por los fitocromos (34). En el genoma de *Arabidopsis* se han identificado más de 150 factores de la familia bHLH (34), pero sólo los que se agrupan en la subfamilia 15 estarían implicados en la regulación de distintos procesos mediados por luz (Fig. 4). Una característica principal de estos factores es la presencia en su región N-terminal de un dominio conservado (dominio APB), responsable de su interacción con la forma Pfr activa de PhyB (35, 36).

**PIF3** es primer miembro identificado de esta subfamilia y se aisló en un cribado de doble híbrido en levaduras, utilizando como cebo la región C-terminal de PHYB (37). Posteriormente, se demostró que PIF3 interactúa tanto con el dominio C-terminal de PHYB como con el de PHYA, y en estudios con la proteína fitocromo completa, se observó que la interacción es mucho mayor con la forma Pfr biológicamente activa de PHYA/B, que con la forma Pr inactiva (35, 37, 38).

Un segundo miembro de la familia, **PIF4**, fue aislado mediante una combinación de abordajes genéticos y de genética reversa (39). La secuenciación del genoma de *Arabidopsis*, por otra parte, ha permitido identificar otros genes que comparten similitud a nivel de secuencia aminoacídica con el factor PIF3, que se han denominado **PIF1**, **PIF5**, **PIF6** y **PIF7** (1, 36, 40). A pesar que estos factores comparten dominios bHLH muy similares, muestran divergencias fuera de este dominio y sólo un pequeño grupo de ellos interactúa con la forma Pfr de PhyA, en tanto que otros interactúan preferentemente con PhyB y un número reducido muestra la misma afinidad por PhyA que por PhyB (40, 41). Así por ejemplo,

**PIF1/PIL5** interacciona tanto con PhyA como con PhyB, mientras que **PIF4** interacciona exclusivamente con PhyB (39, 40).

La región bHLH de ésta subfamilia de factores de transcripción está muy conservada y se compone de dos regiones claramente diferenciadas: una región básica de ~15 aminoácidos implicada en la unión al ADN, y una región ácida ó HLH de ~60 aminoácidos, implicada en la dimerización de estos factores y en la interacción con otras proteínas. A través de la región básica estos factores se unen a motivos E-box (5'-CANNTG-3') presentes en la región promotora de sus genes diana (39, 40, 42). Algunos PIFs forman heterodímeros con otros miembros de la subfamilia, como por ejemplo PIF3 que además de homodimerizar, forma heterodimeros con PIF4 (34), y se une a motivos G-box (5'-CACGTG-3') en el ADN (42). PIF3 y PIF4 heterodimerizan también con el factor HFR1, un miembro atípico de esta subfamilia que carece de la región básica (43) e impide la unión al ADN de estos factores (44).

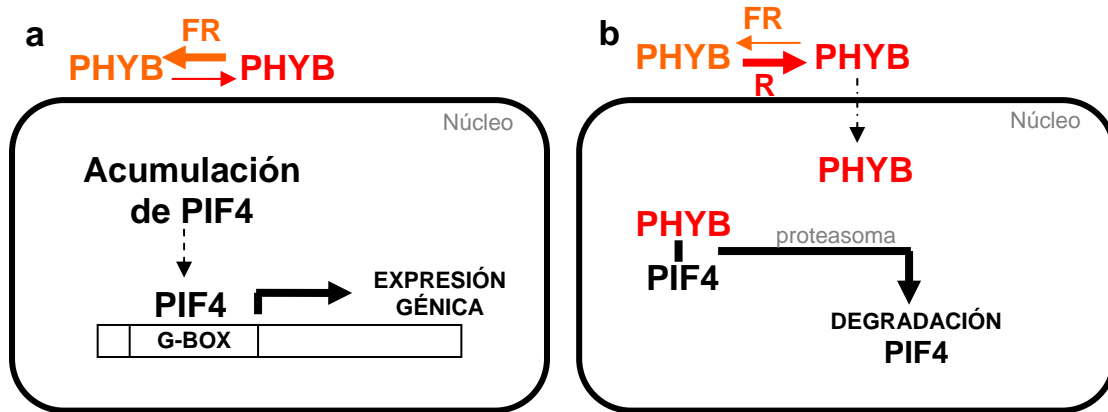


**Figura 4:** Árbol filogenético de los miembros de la subfamilia PIF de bHLH de *Arabidopsis*. En la figura se detalla la presencia o ausencia del dominio APB, la capacidad de interacción con fitocromo y la función de estos factores. Adaptado de Duek y col., 2005.

Como se mencionó anteriormente, casi todos estos factores de transcripción muestran en la zona N-terminal un dominio conservado APB (*Active Phytochrome Binding*), implicado en la interacción con la forma Pfr de PhyB (36, 45, 46). Sin embargo, en algunos de estos factores no se ha podido demostrar una interacción directa con fitocromo, a pesar de presentar el dominio APB. Se incluirían en este grupo los factores bHLH56, bHLH72, bHLH16 y bHLH127, que podrían interaccionar indirectamente con fitocromo, al heterodimerizar con otros miembros de la familia.



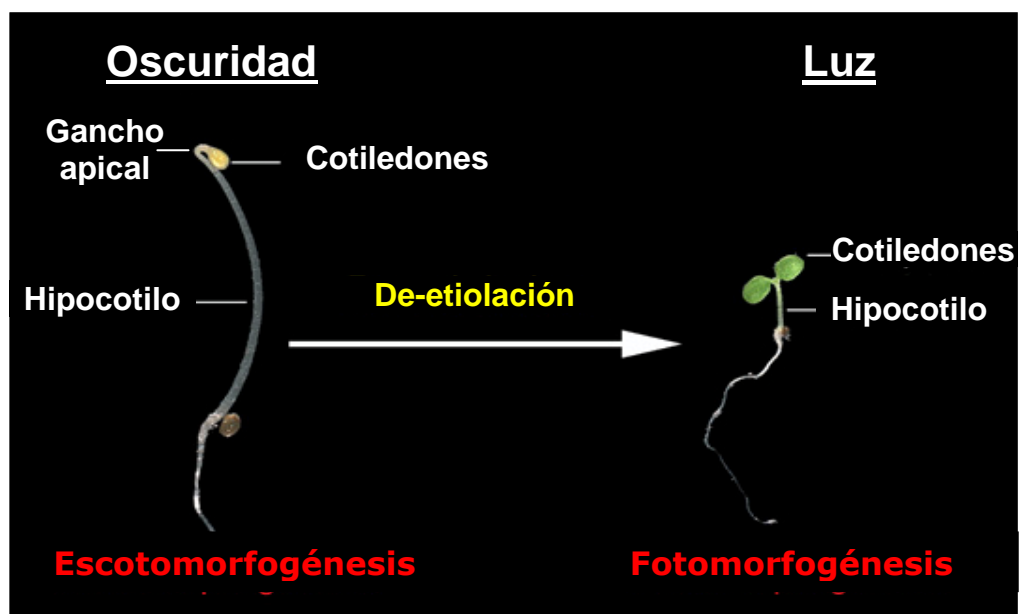
Resultados obtenidos en laboratorios independientes demostrarían que la interacción con las formas Pfr de PhyA y/o PhyB induce una rápida (tras pocos minutos) fosforilación y degradación de los factores PIF (47-52), lo que sugiere que éste podría ser un paso importante en la ruta de señalización mediada por fitocromo (Fig. 5).



**Figura 5:** Esquema representativo del modo de acción de los fitocromos. a) En ambientes enriquecidos en luz roja lejana (FR), PHYB se encuentra inactivo y no es translocado al núcleo, lo que permite la acumulación de los factores PIF. B) En luz roja (R), PHYB es activo, se transloca al núcleo e interacciona con los PIFs, señalizando su degradación por el sistema proteasoma

### 1.3. Función biológica de los PIFs

Dependiendo de si la planta germina en oscuridad ó en la luz, se inducen programas muy distintos de desarrollo del brote (Fig. 6). En oscuridad se induce un programa de desarrollo conocido como **escotomorfogénesis**.



**Figura 6:** Esquema de las principales diferencias que se observan en brotes germinados en oscuridad o en presencia de luz. En oscuridad la planta se etiola y se alarga de forma exagerada el hipocotilo. Los cotiledones se mantienen cerrados y no se sintetiza clorofila. En la luz, se observa una inhibición del crecimiento del hipocotilo. Los cotiledones se abren y expanden y se diferencian los cloroplastos que empiezan a acumular clorofila, induciéndose la expresión de numerosos genes con una función en fotosíntesis.

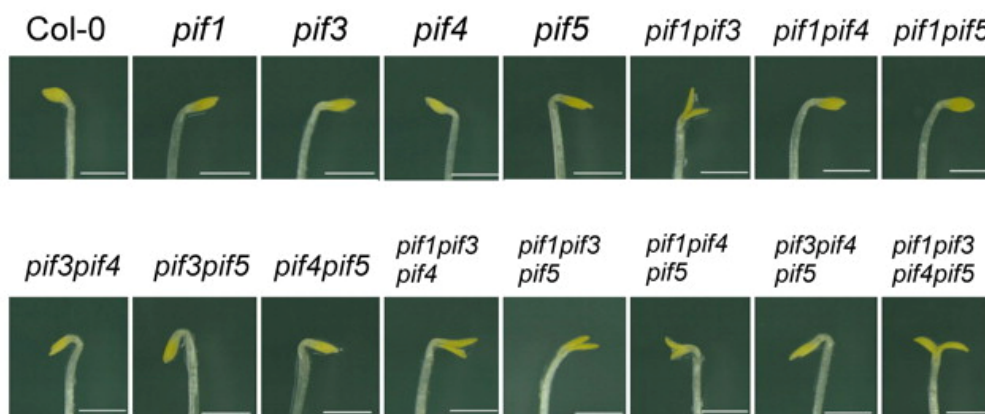
El hipocotilo o tallo embrionario se alarga de forma exagerada, se inhibe el desarrollo de los cotiledones que se mantienen cerrados y de color amarillo pálido debido a la ausencia de clorofila y se observa un gancho apical destinado a proteger el meristemo apical, al ganarse paso el brote a través de la tierra. La luz, por el contrario, induce un patrón de desarrollo conocido como **fotomorfogénesis**. En presencia de luz se inhibe el crecimiento del hipocotilo, los cotiledones se abren y expanden adquiriendo un color verde intenso debido a la acumulación de clorofila y se induce la expresión de multitud de genes fotosintéticos. Los factores PIF ejercen un importante papel regulador durante el desarrollo escotomorfogénico del brote. Aunque originariamente se creía que actuaban como represores de la ruta de señalización de los fitocromos, más recientemente se ha visto que juegan un importante papel en la activación de numerosos genes que determinan el patrón etiolado de crecimiento.

Mutantes *pif3*, causados por la inserción de un T-DNA en la región 5'- no codificante de este gen, muestran una respuesta hiposensible a la luz roja, lo que sugería que PIF3 regula positivamente el proceso de fotomorfogénesis (Fig. 7) (37). Sin embargo, posteriormente se han identificado otros alelos de *pif3* que presentan hipocotilos más cortos y cotiledones más abiertos que la planta silvestre, lo que indicaría que este factor actúa en realidad como un regulador negativo de la fotomorfogénesis (53, 54). PIF3, por otra parte, regula positivamente el desarrollo de los cloroplastos, ya que los mutantes *pif3* se caracterizan por presentar un menor contenido de clorofila que las plantas silvestres (53, 54).

El mutante *pif4* muestra a su vez una respuesta hipersensible a luz roja, y se caracteriza por presentar hipocotilos cortos y cotiledones más abiertos que las plantas silvestres y niveles normales de clorofila (Fig. 7)(39). En estas condiciones, el fenotipo del mutante *pif5* es también similar (Fig. 7)(55) y ambos mutantes exhiben un fenotipo normal en luz roja lejana. PIF4 y PIF5, de hecho, interaccionan selectivamente con la forma Pfr de phyB, pero no se unen a phyA. Ello indicaría que ambos factores funcionan en una ruta específica de señalización de phyB, implicada en el control de la expansión celular. Curiosamente, la mutación *phyB* elimina el fenotipo hipersensible a luz roja de los mutantes *pif4*, lo que indujo a pensar que PIF4 funcionaría como un regulador negativo de la ruta de señalización de phyB (39).

Se ha demostrado que todos los factores PIF, excepto HFR1, interaccionan con APRR1/TOC1 en ensayos doble híbrido (46). Tanto los niveles de transcrito como los de las proteínas PIF4 y PIF5 están regulados por luz y el reloj circadiano, lo que indicaría que estos factores ejercen un papel importante en el control del crecimiento en función de los ritmos día-noche en *Arabidopsis* (46, 51, 55).

La función de PIF7 en la elongación del hipocotilo es prácticamente imperceptible, en tanto que la función biológica de PIL2/PIF6 es aún desconocida (1, 56). En muchos casos, la redundancia funcional entre estos factores hace que sea difícil asignar una función específica a cada una de estas proteínas.



**Figura 7:** Fenotipo de los diferentes mutantes PIF en oscuridad. Adaptado de Shin y col., 2009.

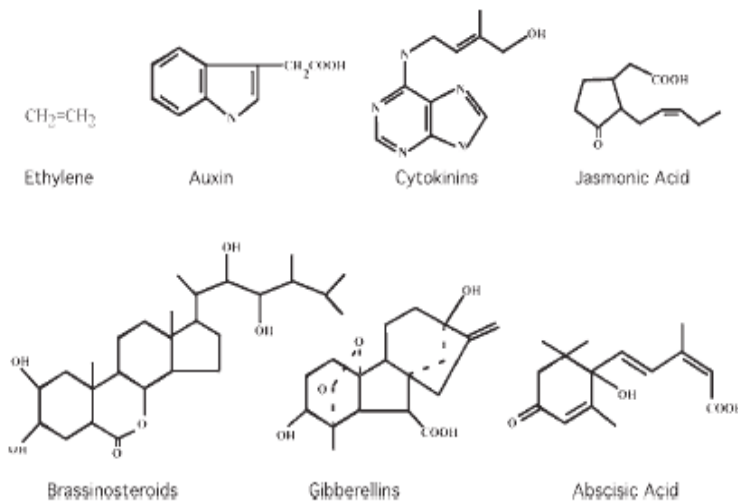
Respecto a la función de HFR1, este factor de transcripción carece de una región básica canónica, lo que indicaría que no es capaz de unirse al ADN. Recientemente se ha descrito que su principal función reside en prevenir una excesiva respuesta a la oscuridad, mediante la formación de heterodímeros transcripcionalmente inactivos con PIF4 y PIF5 (44).

En el momento en que se inició este trabajo, estaba ampliamente aceptado que los factores PIF actuarían como reguladores negativos en la ruta de señalización de phyB. Sin embargo, resultados posteriores han demostrado que estos factores funcionan como activadores del programa de desarrollo escotomorfogénico, induciendo la expresión de numerosos genes con una función en expansión celular.

Cabe destacar, por otra parte, que la luz no actúa como una señal totalmente autónoma, sino que los programas de desarrollo activados por esta señal son integrados con los inducidos en respuesta a variaciones diurnas y cambios estacionales de temperatura, así como con los propios programas de desarrollo de la planta, de manera que el crecimiento y desarrollo final de la planta es el resultado de la suma de todos estos factores. Ello permite una estricta regulación espacio-temporal de los genes implicados bien sea en diferenciación y/o expansión celular y una enorme plasticidad en la arquitectura de la planta, según las condiciones ambientales en que se desarrolle. Una función esencial en este proceso de integración es llevada a cabo por las hormonas vegetales o fitohormonas, entre las que cabría destacar las auxinas, giberelinas, ácido abscísico, brasinosteroides y el jasmonato. Estos reguladores actúan a bajas concentraciones, regulando multitud de facetas del crecimiento y desarrollo vegetal.

## 2. REGULADORES DEL CRECIMIENTO

A diferencia de los mamíferos, el modelo de desarrollo vegetal es tremendamente plástico. En plantas, cada célula es prácticamente "pluripotente", debido a que es capaz de revertir su diferenciación e iniciar la formación de nuevos tejidos en respuesta a señales hormonales endógenas. Se conocen como hormonas vegetales aquellas sustancias que son sintetizadas en un determinado lugar de la planta y se translocan a otros tejidos para, a muy bajas concentraciones, regular el crecimiento, desarrollo ó metabolismo de la planta. Entre las hormonas vegetales más representativas se incluyen las Auxinas, las Citoquininas (CK), los Brasinólidos (BL), las Giberelinas (GA), el Etileno (ET), el Ácido Abscísico (ABA), los Jasmonatos (JA) y el Ácido Salicílico (SA) (Fig. 8), aunque existen también otras moléculas implicadas en señalización como són el Óxido Nitroso (NO), la glucosa y la Strigolactona, también conocida como "hormona de ramificación" producida por la ruta de los genes MAX.



**Figura 8:** Estructura molecular de las diferentes hormonas

La ruta de biosíntesis de la mayoría de estas hormonas, a excepción de las auxinas, es conocida en la actualidad. También se dispone de gran cantidad de información acerca de las rutas de señalización activadas por estas hormonas, y se han identificado los receptores de las principales hormonas vegetales, lo que ha hecho evidente que algunas de estas señales comparten estrategias comunes de señalización y que aunque cada hormona activaría una vía principal de señalización, existe un grado importante de regulación cruzada ("cross-talk") entre las diferentes vías.

Una estrategia frecuente de señalización consiste en la degradación hormona-dependiente de un elemento clave en la ruta, una vez es ubiquitinado por una proteína E3-ligasa específica, que señala su degradación por el sistema 26S proteasoma. Dicho elemento puede ser un activador, como el factor ETHYLENE

INSENSITIVE (EIN3) implicado en la activación de los genes regulados por etileno, pero más a menudo es un represor, como las proteínas Aux/IAA, DELLA o JAZ, implicadas en las rutas de señalización de Auxinas, Giberelinas y Jasmónico respectivamente. Otras hormonas como los Brasinosteroides, las Citoquininas o el Etileno, transmiten la señal al unirse a un receptor quinasa en la membrana, responsable de activar una cascada de fosforilación en el interior de la célula, que termina con la fosforilación en el núcleo del factor transcripcional responsable de activar los genes de respuesta a estas hormonas.

El **Etileno** fue una de las primeras fitohormonas descubiertas. Hace algo más de un siglo, fue descrito por *Dimitri Neljubov* como el componente activo de las lámparas de gas que provocaba envejecimiento y caída de las hojas en plantas que eran crecidas próximas a estos sistemas de iluminación (57). Posteriormente, en 1930, *Gane* demostró que las plantas producen etileno por sí mismas (58). El etileno es una hormona gaseosa implicada en multitud de procesos, entre los que se incluye la inhibición de la germinación de semillas, el desarrollo de raíces secundarias y parte aérea de la plántula, la promoción de la caída de los pétalos y las hojas, la inducción de la maduración de frutos climactericos, la inducción de la senescencia de órganos y la activación de distintas respuestas a estrés biótico y abiótico (59). La producción de etileno se activa en respuesta a señales internas durante el desarrollo de la planta y también en respuesta a estímulos ambientales, como el ataque por patógenos, la herida y tratamientos con quitina, ó el estrés causado por hipoxia, niveles elevados de ozono, o las bajas temperaturas.

El término **Auxina**, deriva del griego "*auxein*" que significa crecimiento. Dicho término fue utilizado para identificar el primer grupo de fitohormonas descritas en el libro "*The power of movement in plants*" publicado por *Francés y Charles Darwin* en 1880, en el que se reportaba que el ápice de coleótilos de gramíneas era capaz de sintetizar algún tipo de sustancia que determinaba que los brotes se curvaran hacia la luz. Si el ápice se mantenía descubierto se observaba dicha curvatura, pero si se cubría con un material opaco no se observaba ninguna respuesta. De aquí concluyeron que cuando las plantas están expuestas a iluminación lateral, alguna sustancia se transmite desde la parte superior a la inferior, haciendo que el hipocotilo se curve.

Las Auxinas son probablemente unas de las hormonas vegetales que más se han estudiado, en parte debido a que participan en prácticamente todos los aspectos del crecimiento y desarrollo de la planta. El lugar exacto de biosíntesis de estas hormonas es aún tema de debate, aunque la caracterización de distintos enzimas biosintéticos revelaría que existen al menos dos rutas independientes de síntesis de estas hormonas (60-62). Una vez sintetizadas, las

Auxinas son transportadas a través un sistema polar de transporte a toda la planta, lo que contribuye a generar puntos localizados de máxima concentración, que definen el lugar de inicio de nuevos órganos.

Las **Citoquininas** fueron descubiertas en 1955 como factores que promovían la proliferación celular y el crecimiento de la planta (63, 64). Hoy sabemos que son reguladores muy importantes del crecimiento y desarrollo vegetal, que actúan en multitud de tejidos y bajo diversas condiciones ambientales. Estas hormonas participan en el control de procesos como el de la diferenciación de la raíz y las hojas, el patrón de diferenciación vascular, la biogénesis del cloroplasto, la fotomorfogénesis, intervienen en la determinación de la dominancia apical, las respuestas de gravitropismo, en la senescencia de los órganos y funcionan como señalizadores del estado nutricional de la planta (65-69).

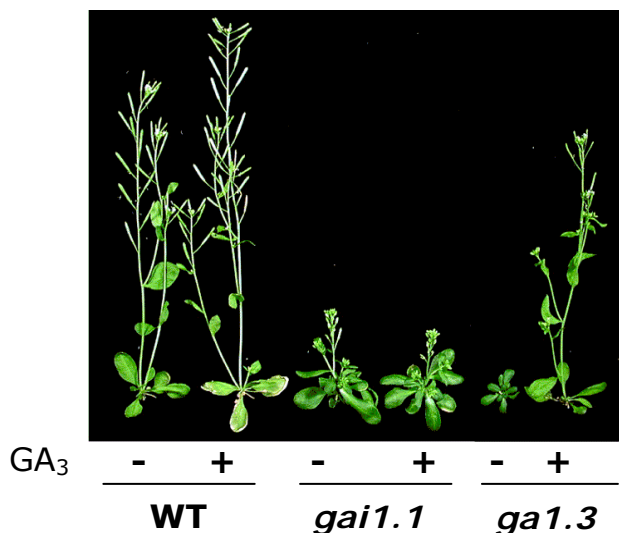
Los **Jasmonatos** (JA) regulan diversas facetas del desarrollo y defensa de la planta. Estos lípidos y sus derivados bioactivos (JAs) ejercen una función crítica en el control de las respuestas de defensa frente a un extenso número de agresores bióticos, particularmente insectos herbívoros y patógenos necrótrofos (70-72). También se ha demostrado que el JA está involucrado en las respuestas de defensa inducidas tras irradiación con luz UV, ó tratamientos con ozono y, dependiendo de la especie vegetal, es necesario para el correcto desarrollo de los órganos reproductores masculino y femenino (73). En general, esta hormona promueve defensa y reproducción, e inhibe los procesos de división celular y la fotosíntesis. Ello hace que juegue papel esencial en la optimización del estado de salud ó "*fitness*" de la planta, regulando el balance entre crecimiento y defensa.

El **Ácido Abscisico** (ABA) es una hormona cuya síntesis se induce en respuesta a estreses abióticos causados por situaciones de sequía, salinidad y bajas temperaturas, y ejerce un papel muy importante durante la germinación de la semilla y en la regulación de la apertura de los estomas (74-76). Estudios fisiológicos en numerosas especies vegetales han evidenciado que la acumulación de niveles basales de ABA conducen a una mayor tolerancia a diferentes tipos de estrés abiótico en plantas no estresadas (76). Esta acumulación de ABA debe ir seguida de la percepción de la hormona y la consecuente activación de la ruta de señalización que conduce a la expresión de genes con una función protectora.

## 2.1. LAS GIBERELINAS: METABOLISMO, FUNCIÓN Y SEÑALIZACIÓN

Las **Giberelinas** son hormonas vegetales con un papel principal en el control del crecimiento de la planta. Mutantes deficientes en la síntesis de estas hormonas se caracterizan por presentar un fenotipo enano, hojas de color verde oscuro, y un retraso en la floración, y por producir semillas de difícil germinación. La identificación de los enzimas responsables de la síntesis o inactivación de estas hormonas, ha puesto de manifiesto que los genes que codifican estas enzimas están regulados por retroalimentación negativa y positiva, respectivamente, dicha regulación siendo fundamental para la homeostasis de giberelinas en la planta. Por su parte, la combinación de estudios bioquímicos y genéticos ha permitido identificar distintos intermediarios de la ruta de señalización, lo que ha permitido revelar la importancia de un grupo de proteínas denominadas **DELLA**, que actúan como represores nucleares de los genes activados en respuesta a dichas hormonas.

Las proteínas DELLA desempeñan un papel fundamental en la ruta de señalización de las giberelinas (GAs). Funcionan como represores nucleares y son rápidamente degradados en presencia de giberelinas (77). Se diferencian de otros miembros de la familia GRAS por presentar un dominio conservado (dominio DELLA) en su región N-terminal, el cuál es necesario para la degradación dependiente de GAs de estos represores.



**Figura 9:** Fenotipo de los mutantes *gai1.1* y *ga1.3*. El primero es insensible a GAs ya que produce una forma truncada de la proteína DELLA GAI, que no es reconocida por el receptor GID1 y ubiquitinada para su degradación. El segundo es un mutante biosintético, cuyo fenotipo enano es revertido tras el aporte exógeno de GAs.

Mutaciones en el dominio DELLA convierten estas proteínas en represores constitutivos, resistentes a la degradación, y provocan un fenotipo enano que no es revertido en respuesta al tratamiento con GAs (Fig. 9) (78). GID1, codifica el receptor de estas hormonas y es una proteína soluble que se acumula en el citosol (79). Estudios en diferentes laboratorios han demostrado que el complejo GID1-GA se

une al dominio DELLA y provoca un cambio de conformación en estas proteínas. Ello favorece su interacción con la proteína F-box SLEEPY1 (SLY1), una de las subunidades del complejo E3 ligasa SCF<sup>SLY/GID2</sup>, y la poliubiquitinación de estos represores, lo que señala su degradación por el sistema 26S proteasoma (80) (Fig. 12).

### 2.1.1. Metabolismo de las Giberelinas

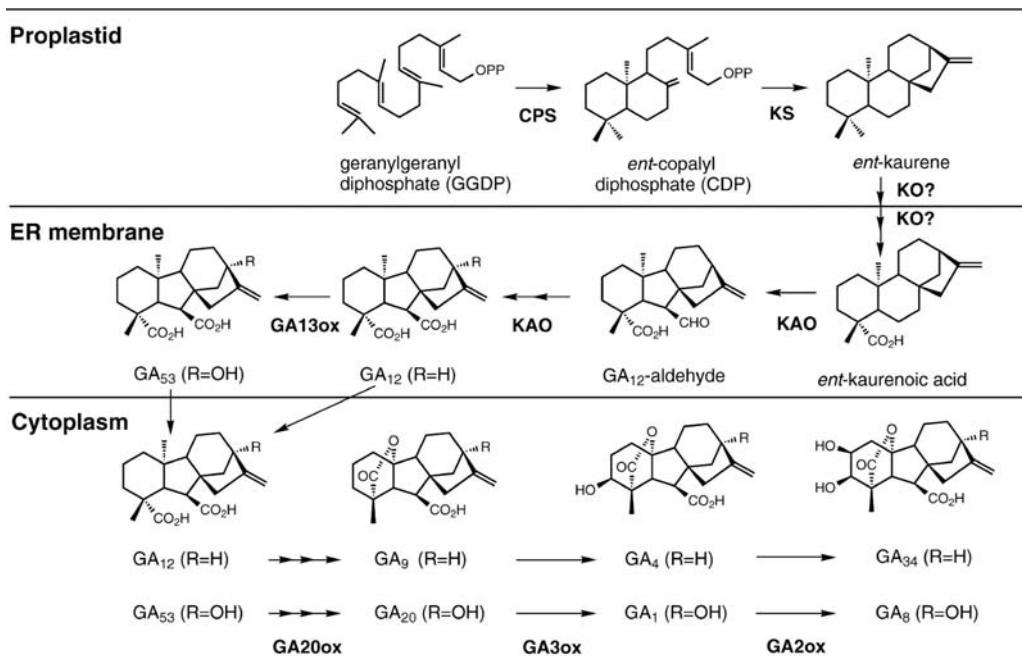
En plantas, se han identificado más de un centenar de moléculas de GAs ([http://www.plant-hormones.info/gibberellin\\_nomenclature.htm](http://www.plant-hormones.info/gibberellin_nomenclature.htm)) aunque sólo un pequeño número de éstas, por ejemplo GA<sub>1</sub> y GA<sub>4</sub>, corresponden a formas biológicamente activas de estas hormonas (81). El resto de estas moléculas corresponden a precursores o catabolitos inactivos. La concentración de GAs activas en un determinado tejido es función de la expresión relativa de los enzimas biosintéticos y de aquellos implicados en su inactivación, al convertir las moléculas bioactivas en productos menos activos o inactivos. Los genes que codifican los enzimas responsables de últimos pasos de síntesis y los enzimas de inactivación, están regulados en función de los niveles de giberelinas, lo que es clave para la homeostasis de estas hormonas (82).

La ruta de síntesis de GAs ha sido extensamente estudiada en diferentes especies vegetales. Técnicas de purificación convencional, utilizando semillas en germinación de calabaza, conjuntamente con cribados funcionales de bibliotecas de expresión y aproximaciones moleculares destinadas a identificar un número de mutaciones que causaban un bloqueo en la síntesis de estas hormonas (83, 84), permitieron identificar varios de los genes implicados en la síntesis ó inactivación de GAs. Más recientemente, la secuenciación de los genomas de *Arabidopsis* y arroz, junto con la obtención de colecciones de mutantes de inserción en estas especies, permitió un notable avance en la identificación de la mayoría de genes implicados en la homeostasis de estas hormonas. Sin embargo, quedarían por identificar los enzimas responsablesde catalizar algunos de los pasos de síntesis, por lo que dicha lista es aún incompleta.

Según la localización subcelular de los enzimas implicados, en plantas superiores, se puede dividir la ruta de síntesis en 3 etapas principales (85):

1. Biosíntesis del ent-kaureno en proplástidos.
2. Conversión del ent-kaureno en GA<sub>12</sub> por acción de citocromo P450 monooxigenasas localizadas en los microsomas.
3. Formación de giberelinas de 20 y 19 átomos de carbono, y degradación de las GAs bioactivas en el citosol.





**Figura 10:** Esquema representativo del metabolismo de GAs. Los enzimas implicados en la síntesis y degradación de GAs bioactivas se localizan en 3 puntos principales: los plastidios, los microsomas y el citosol. Adaptado de Olszewski *y col.* 2002

Los últimos pasos de síntesis que conducen a la formación de GAs bioactivas, están catalizados por los enzimas GA 20-oxidasa (GA20ox) y GA 3-oxidasa (GA3ox) (82). Enzimas GA 2-oxidasa (GA2ox), por otra parte, inactivan las GAs activas para dar lugar a catabolitos con menor o carentes de actividad. El balance de giberelinas activas es mantenido mediante mecanismos de retroalimentación implicados en reprimir la expresión de los enzimas *GA20ox* y *GA3ox* y promover la de los enzimas *GA2ox*. En *Arabidopsis*, los enzimas que catalizan estas reacciones están codificados por varios genes independientes, los cuales se caracterizan por mostrar distintos patrones específicos de expresión ó por ser activados en respuesta a señales exógenas distintas.

### 2.1.1. Función de las Giberelinas

Estudios de hibridación *in-situ* utilizando sondas correspondientes a los genes metabólicos, ó fusiones de los promotores de estos genes a distintos genes reporteros, han permitido establecer cuales son los sitios principales de biosíntesis de estas hormonas. Así, se ha demostrado que las GAs se sintetizan a niveles muy elevados en semillas en germinación, donde promueven el crecimiento del embrión y contribuyen a superar la resistencia física impuesta por el endospermo y la testa, permitiendo la profusión de la radícula (86),(87).

Durante el desarrollo del brote, las GAs promueven la elongación del tallo embrionario, y la expansión de los cotiledones y la síntesis

de estas hormonas en las células de la endodermis es también necesaria para el crecimiento de la raíz (88, 89). En plantas adultas, se observan niveles elevados de expresión de los genes biosintéticos en los tejidos en rápido crecimiento, como el meristemo apical, las hojas en expansión, los pecíolos y los entrenudos en elongación (90, 91). Estos genes se expresan también a niveles elevados en los estambres y pétalos de las flores (92).

Factores como la luz, la temperatura, las propias GAs u otros reguladores del crecimiento, como las citoquininas y el etileno, afectan los niveles transcripcionales de estos genes (82), modificando tanto los niveles de GAs, como el tipo de GAs sintetizadas. Aparte de un incremento en los niveles de GAs bioactivas, en muchos casos, se observa también un incremento en la sensibilidad a estas hormonas, aunque se desconoce que mecanismos moleculares estarían implicados en esta respuesta incrementada.

### **2.1.3. Señalización de las Giberelinas**

Las GAs promueven el crecimiento y elongación celular al revertir la acción represora de las proteínas DELLA y señalar su degradación por el sistema proteasoma. Estas hormonas son percibidas por los receptores AtGID1, proteínas solubles localizadas en el citosol. La unión de la hormona al receptor AtGID1, promueve la interacción de este receptor con los represores DELLA e induce un cambio de conformación en dichos represores que favorece su interacción con el complejo E3 ubiquitin ligasa SCF<sup>Sly1/GID2</sup> que es responsable de poliubiquitinar estos represores, señalizando así su degradación por el 26S proteasoma (Fig. 14) (93-95).

#### **2.1.3.1. Proteínas DELLA: Represores del crecimiento promovido por las Giberelinas**

Los intermediarios de la ruta de señalización de GAs, DELLAs, GID1, y SLY1 se identificaron en un cribado de mutantes con una respuesta alterada a la aplicación exógena de estas hormonas (Fig. 9 y 12). El primer gen DELLA se identificó al caracterizar la mutación semidominante *gai1.1*, causante de un fenotipo enano y de hojas color verde oscuro, similar al de las plantas deficientes en GAs, pero que no revierten por aplicación de estas hormonas. Mutaciones en genes ortólogos se han identificado también en trigo (*Rht1*), maíz (*d8*), arroz (*slr1*), cebada (*sln1*), vid (*Vvgai*) y tomate (*procera*) (96-98). Estos genes codifican proteínas que comparten similitud con los factores de transcripción tipo GRAS, específicos de plantas, y se diferencian de otros miembros de esta familia por que contienen un dominio conservado en su región N-terminal, conocido como dominio DELLA por la secuencia de residuos conservada D-E-L-L-A presente

en este dominio. La mutación *gai1-1* esta causada por una deleción de 17 aminoácidos en el dominio DELLA y deleciones similares se observan también en las mutantes *Rht* de trigo y *dB* de maíz, que al igual que la mutación *gai1-1* causan un fenotipo enano insensible a GAs (99).

Las proteínas DELLA presentan un número de dominios conservados, que podrían jugar un papel importante en su función (Fig. 11) (100):

- motivos poliméricos Ser/Thr (poly S/T) que pueden ser dianas de fosforilación o glicosilación
- Repeticiones tipo cremallera de leucinas (LHR), que pueden mediar la interacción con otras proteínas.
- Domino de localización nuclear (NLS)
- Dominio SH2 o putativo dominio de unión a fosfotirosina.

### DELLA



**Figura 11:** Estructura de las proteínas DELLA

La similitud de secuencia de las proteínas DELLA con factores de transcripción de la familia STAT sugería que podrían tener una función en regulación transcripcional (101). Sin embargo, mutaciones en los genes *SLR1* de arroz y *SLN1* de cebada que causan una pérdida de función del gen, generan un fenotipo alargado característico de una respuesta constitutiva a GAs. En *Arabidopsis*, se aisló también una segunda proteína DELLA, codificada por el gen *RGA*, en un cribado de mutantes con capacidad de revertir el fenotipo enano de los mutantes *gai1-3* deficientes en GAs (Fig. 12). La mutación *rga-24* así identificada, corresponde a una pérdida de función génica y causa una respuesta constitutiva a GAs (103). Ello indujo a postular que las DELLA actuarían como represores de la respuesta a GAs, y que el dominio DELLA sería necesario para revertir la actividad represora de estas proteínas. Fusiones a GFP de las DELLA confirmaron que estas proteínas se acumulan en el núcleo en ausencia de GAs, pero son rápidamente degradadas tras el tratamiento con estas hormonas. Dicha degradación no se observa en las proteínas mutantes con alteraciones en el dominio DELLA, las cuáles actúan por tanto como represores constitutivos de la respuesta a GAs (103).



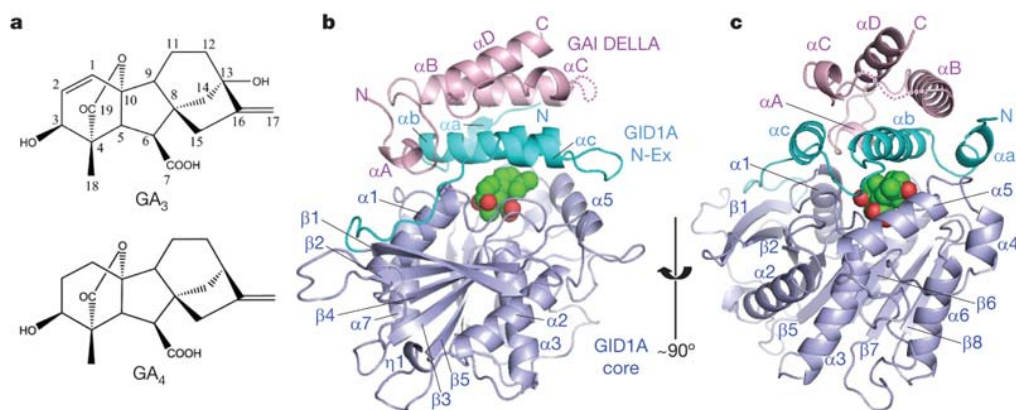
**Figura 12.** Fenotipo del mutante biosintético *ga1-3* y del mutante *rga-24* en el fondo *ga1-3 (rga-24 ga1-3)*. La mutación *rga-24* revierte parcialmente el fenotipo enano del mutante *ga1-3*. Adaptado de Silverstone y col. 2001.

En *Arabidopsis* estos represores están codificados por una familia génica compuesta por 5 miembros: GAI (*Gibberellin Insensitive*), RGA (*Represor of ga1-3*), RGL1 (*RGA-Like1*), RGL2 (*RGA-Like2*) y RGL3 (*RGA-Like3*) (86, 99, 102-104). Mientras que las mutaciones *gai-t6* ó *rga-24*, por sí solas, no tienen ningún efecto acusado, la combinación de ambas mutaciones recupera casi completamente el fenotipo enano de los mutantes *ga1-3*, aunque no restituye los defectos en germinación de estos mutantes ó los de desarrollo de la flor (78, 105, 106). Estudios posteriores han demostrado que la proteína DELLA RGL2 tiene una función principal en el control de la germinación, en tanto que RGL1 jugaría un papel importante en el desarrollo de la flor.

### 2.1.3.2. El Receptor de Giberelinas GID1

La identificación del gen *GID1* de arroz, como un receptor soluble de GAs, constituyó un importantísimo avance en la descripción de la ruta de señalización de estas hormonas (95). Los mutantes *gid-1* (*GA insensitive dwarf 1*) acumulan niveles muy elevados de GAs y también de la proteína DELLA SLR1, y se caracterizan por presentar un fenotipo muy enano que no se recupera al tratar exógenamente con la hormona(95).

*GID1* codifica una proteína que comparte similitud con las lipasas bacterianas sensibles a hormona e *in-vitro* une GAs bioactivas pero no los precursores inactivos de estas hormonas. En ensayos doble híbrido *GID1* interacciona con SLR1 de forma dependiente de GAs, lo que corroboraría su capacidad de unir GAs y su función como receptor de estas hormonas (94, 95, 107). Mediante la utilización de un abordaje de mutagénesis dirigida, se han determinado los residuos de la proteína *GID1* directamente implicados en la unión de GAs. Así, se ha podido establecer que los mismos residuos implicados en la unión de la hormona son también necesarios para la interacción con SLR1, lo que confirmaría la interacción con este represor DELLA precisa de una unión previa de las GAs al receptor *GID1* (107).



**Figura 13:** Estructura terciaria del complejo  $GA_3$ -GID1-SLR1. Adaptado de Murase y col., 2008.

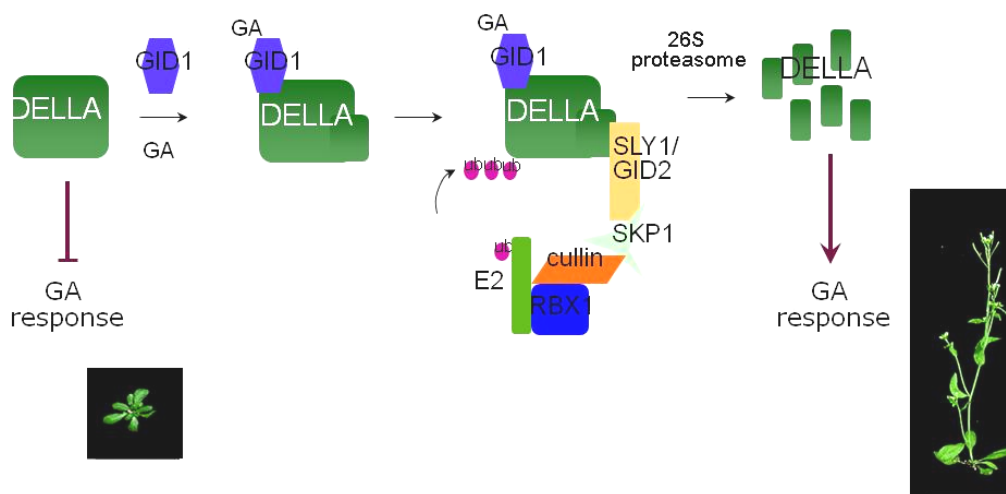
En *Arabidopsis* existen 3 genes con una función redundante, *AtGID1a*, *AtGID1b* y *AtGID1c*, que codifican el receptor GID1 (79). Ello hace que en esta especie modelo no se hayan podido aislar mutantes enanos similares al mutante *gid-1* de arroz. Las proteínas codificadas por éstos genes unen GAs bioactivas con una afinidad muy similar a la proteína *OsGID1* de arroz, la sobre-expresión del gen *OsGID1* recuperando el fenotipo enano del tripe mutante *gid1a gid1b gid1c*. En levadura, estas proteínas interactúan con las cinco proteínas DELLA de *Arabidopsis*, lo que confirmaría que todas ellas codifican formas funcionales del receptor (79).

Mutaciones simples o dobles en estos genes no causan ningún fenotipo notable y sólo la mutación de los 3 genes *gid1a gid1b gid1c* produce un fenotipo enano incluso más extremo que el del mutante *ga1-3*, lo que es indicativo de una función redundante de estos genes (93, 108). La expresión de estos genes, por otra parte, se reprime tras la aplicación de GAs, evidenciando que estos genes estarían regulados por un proceso de retroalimentación negativa, similar al observado para los genes de biosíntesis de GAs (93, 109)

De manera similar a como se observó en arroz, las GAs incrementan más de 100 veces la afinidad de unión de las proteínas GID1a,b,c a los represores DELLA (79, 93). La región N-terminal de las proteínas DELLA, que incluye los motivos DELLA y VHYNP, es esencial para la interacción con GID1. En cambio, los dominios poly S/T o el dominio C-terminal GRAS no son necesarios para dicha interacción (93, 94). En células de levadura, el receptor GID1 promueve, en presencia de GAs, una fuerte interacción de las proteínas SLY1 y RGA, fusionadas respectivamente a los dominios de unión al DNA (GAL4 BD) y de activación (GAL4 AD) del factor GAL4 (93). Este resultado, reforzaría los resultados obtenidos en estudios similares con las proteínas de arroz y demostraría que la unión del complejo GA-GID1 al represor RGA, promueve su interacción con la proteína SLY, responsable de poliubiquitinar este represor.

### 2.1.3.3. Degradación de las DELLA mediada por ubiquitinación por el complejo SCF<sup>Sly1/GID2</sup>.

Las proteínas F-box *Sly1* y *GID2*, se identificaron gracias a las mutaciones *sly1.2* y *sly1.10* de *Arabidopsis* y *gid2.1* de arroz, que al igual que *gid-1* causan un fenotipo enano que no responde a la aplicación de GAs (80, 109). Estas proteínas actúan como reguladores positivos de la ruta de señalización de GAs, y se ha demostrado que forman parte del complejo SCF (Skp1/cullin/F-Box) E3 ligasa, responsable de ubiquitinar las proteínas DELLA y señalar su degradación por el sistema 26S proteasoma (80). Se ha visto que la subunidad F-box de estos complejos es la responsable de unir de forma específica la diana de ubiquitinación, favoreciendo así la transferencia del péptido ubiquitina desde la E2 ubiquitina conjugasa a dicha proteínas. Los mutantes *gid1-2* y *sly1.10* son incapaces de ubiquitinar las proteínas DELLA y en consecuencia, acumulan niveles muy elevados de estos represores. Ello hace que mutaciones que causan una pérdida de función de las DELLAs, revierta el fenotipo enano característico de estas plantas (110).



**Figura 14:** Modelo de señalización de GAs. En ausencia de GAs, las proteínas DELLA se acumulan en el núcleo y bloquean la señalización de la hormona. En presencia de GAs, el complejo GA-GID une las proteínas DELLA e induce un cambio de conformación de estas proteínas. Ello hace que estos represores sean ahora reconocidos por el complejo E3 ligasa SCF<sup>Sly1/GID2</sup> que los ubiquitina, señalizando así su degradación por el 26S proteasoma. Adaptado de Davière y col., 2008.

La interacción directa entre las proteínas *Sly1/GID2* y *DELLA*, ha sido confirmada en ensayos doble híbrido y también en ensayos de co-inmunoprecipitación. Estos resultados apoyarían una función de *Sly1* en reclutar específicamente las *DELLA* al complejo E3 ligasa SCF<sup>Sly1/GID2</sup>, mediando así su poliubiquitinación y posterior degradación por el sistema 26S proteasoma (Fig. 14).

Aunque se ha demostrado que dicha interacción está mediada por la región C-terminal (dominio LSL) de *Sly1* (truncado en las

proteínas mutantes *sly1.2* y *sly1.10*) y el dominio C-terminal GRAS de las proteínas DELLA (110, 111), la unión simultánea del complejo GA-GID1 al dominio DELLA causa un fuerte incremento en la afinidad de dicha interacción (111). Ello hace que los represores DELLA mutados en este dominio, como la proteína *gai1-1*, sean unidos con muy baja afinidad por la proteína SLY1 y sean estables también en presencia de GAs. Curiosamente, el mutante *gar2.1*, identificado en un cribado de mutantes que recuperasen el fenotipo enano de *gai1-1*, mostró corresponder a una mutación en el dominio LSL de la proteína SLY1. Esta mutación hace que SLY1<sup>gar2</sup> una con alta afinidad los represores DELLA, independientemente de su interacción con complejo GA-GID1, causando así un fenotipo alargado característico de una respuesta constitutiva a GAs (111).

#### 2.1.3.4. Regulación mediada por DELLA

Aunque la función de las proteínas DELLA como represores de los genes de respuesta a GAs está bien establecida, se desconoce su modo de acción. Estos represores carecen de un dominio claro de unión al ADN, aunque su semejanza con miembros de la familia GRAS, como SHORTROOT (SHR) o SCARECROW (SCR), para los que se ha demostrado una unión a la región promotora de sus genes diana (104), sugiere que podrían actuar como reguladores transcripcionales.

Intentos independientes destinados a demostrar que las DELLA unen directamente DNA resultaron fallidos, por lo que se dedujo que estas proteínas reprimirían la expresión génica indirectamente, al unirse a otros factores transcripcionales. El análisis de genes de respuesta temprana a GAs, inducidos tras tratamientos cortos con dexametasona de plantas que expresan la proteína *rga-Δ17* bajo control de un sistema DEX-inducible, ha permitido identificar un grupo de 14 genes cuya expresión se induce en respuesta a la acumulación de RGA. Entre estos genes se encuentran enzimas biosintéticos de GAs (GA20ox2 y GA3ox1), los receptores de GAs GID1a y GID1b, la E3 ligasa "XERICO", varios factores de transcripción (MYB, bHLH137, bHLH154 y WRKY27) y una E2 conjugasa cuya función no ha sido descrita.

Experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) demostrarían que RGA se asocia a las regiones promotoras de alguno de estos genes, aunque la baja eficiencia de la inmunoprecipitación parece sugerir que lo haría de forma indirecta, mediante la asociación con otros factores nucleares.

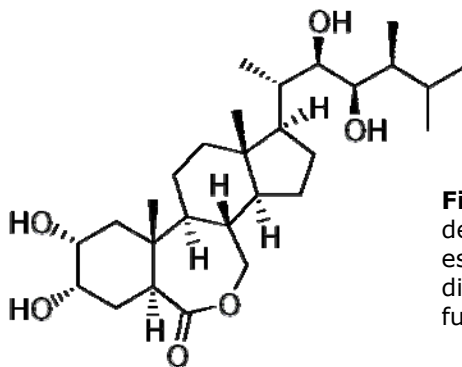
Como ocurre en los mutantes *ga1.3*, las plantas que sobreexpresan la E3 ligasa XERICO, poseen niveles elevados de ABA.

Así, los represores DELLA inducirían la acumulación de ABA, al inducir la expresión de XERICO.

## 2.2. BRASINOSTEROIDES: METABOLISMO Y SEÑALIZACIÓN

Los **Brasinólidos (BL)** se identificaron en 1979, al aislar un esteroide con capacidad promotora del crecimiento a partir de extractos de polen de *Brassica napus* (112). Hasta la fecha se han identificado más de 60 análogos a este esteroide, conociéndose este grupo de hormonas vegetales como **Brasinoesteroides (BR)** (113). Estos compuestos, se han descrito en más de 50 especies, incluyendo angiospermas, gimnospermas, pteridófitos, briófitos y algas verdes, y realizan multitud de funciones biológicas como la regulación de la diferenciación vascular, etiolación, desarrollo reproductivo y de la expansión celular.

Los **BR** son moléculas similares a las hormonas esteroideas animales, con una estructura compuesta por un esqueleto colesterol al que se unen distintos radicales hidroxilo y grupos funcionales. El número y modificación en estos grupos funcionales determina la actividad de la molécula (114) (Fig. 15).



**Figura 15.** Estructura de la molécula de Brasinólido. Compuesta por un esqueleto colesterol al que se le unen distintos radicales hidroxilo y grupos funcionales.

Al igual que las hormonas esteroideas animales, los brasinosteroides son esenciales para el correcto crecimiento, reproducción y desarrollo de la planta. Mutantes deficientes o insensibles a estas hormonas son enanos, de color verde oscuro y fertilidad reducida, y muestran un evidente retraso en el desarrollo (115).

A pesar de la clara semejanza estructural entre las hormonas esteroideas animales y los BRs, existen diferencias importantes en el modo de acción y función de ambas hormonas. Las hormonas esteroideas animales difunden través de la membrana plasmática y se unen a un receptor citosólico-nuclear, provocando un cambio conformacional que permite la migración de dicho receptor al núcleo, y su unión al ADN para activar la expresión génica (116). En el caso de los BR, el receptor se encuentra en la membrana plasmática y el



cambio conformacional inducido por la unión del ligando, hace que dicho receptor interactúe con un co-receptor de membrana que induce su fosforilación, iniciándose así una cascada de señalización que termina con la de-fosforilación y estabilización de un grupo de factores nucleares de transcripción, responsable de activar la expresión de los genes regulados por estas hormonas. (Fig. 18)

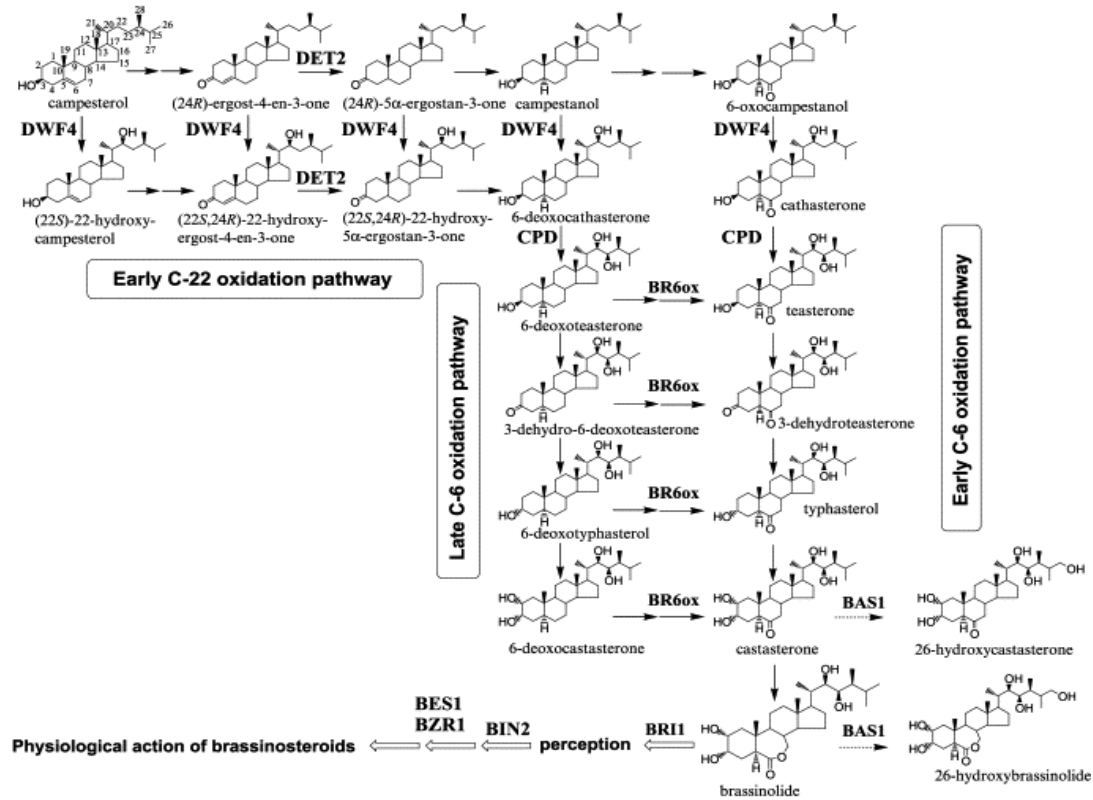
### 2.2.3. Metabolismo de los Brasinosteroides

Los brasinosteroides (BR) se han agrupado en función del número de átomos de carbono de su molécula en C<sub>27</sub>, C<sub>28</sub>, C<sub>29</sub>, dependiendo de las sustituciones presentes en el radical unido al C-24. El Brasinólido (BL), el primer BR aislado, es una molécula C<sub>28</sub> y es la molécula con mayor actividad biológica de todos los BR identificados (117).

Estudios basados en la utilización de precursores radioactivos de estas hormonas, han demostrado que existen dos rutas paralelas de biosíntesis, o de oxidación temprana y tardía del C-6 (118). Existe además una ruta de oxidación temprana del C-22, identificada en algunas especies en que la oxidación de este carbono ocurre durante un paso temprano de síntesis (119). Así, la ruta de síntesis comprendería una red compleja de pasos (Fig. 16), si bien el número total de enzimas implicados en dicha ruta no sería muy elevado.

En plantas como *Arabidopsis*, arroz y guisante, se han identificado intermediarios correspondientes a las diferentes rutas, sin embargo en tomate y tabaco, la ruta de oxidación C-6 tardía parece ser la ruta mayoritaria ya que sólo se han identificado estos intermediarios. Muchos de los enzimas biosintéticos de BL se han identificado gracias a la caracterización de mutantes deficientes en estas hormonas en *Arabidopsis*, guisante (120), tomate (121) y arroz (122). Estos mutantes presentaban un fenotipo enano robusto, de hojas redondas y cortas, color verde oscuro y reducida fertilidad, que era revertido tras la aplicación de BL.

En *Arabidopsis*, los primeros mutantes de síntesis descritos fueron los mutantes *cpd* (*constitutive photomorphogenesis and dwarfism*) y *det2* (*de-etiolated 2*), aislados gracias a que muestran un fenotipo de-etiolado con hipocotilos cortos y cotiledones abiertos en oscuridad (123, 124). En estos mutantes se expresan también en oscuridad muchos de los genes inducidos en respuesta a la luz (123, 124)



**Figura 16:** Esquema representativo de la ruta de biosíntesis de la molécula de brasionólido. Adaptado de Asami T. et al; 2005.

Los genes *CPD* y *DET2* codifican respectivamente enzimas de tipo citocromo P450 monooxigenasa (124) y esteroide 5-reductasa (125), similares a los implicados en la biosíntesis de los esteroides animales. La caracterización de la mutación *dwarf4 (dwf4)* de *Arabidopsis*, permitió a su vez identificar un segundo enzima citocromo P450 monooxigenasa (CYP90B1), que comparte un 43% de similitud con la proteína CPD. Este enzima cataliza el paso de oxidación en el C-22, ya que únicamente los precursores hidroxilados en este carbono recuperan el fenotipo mutante de *dwarf4* (126).

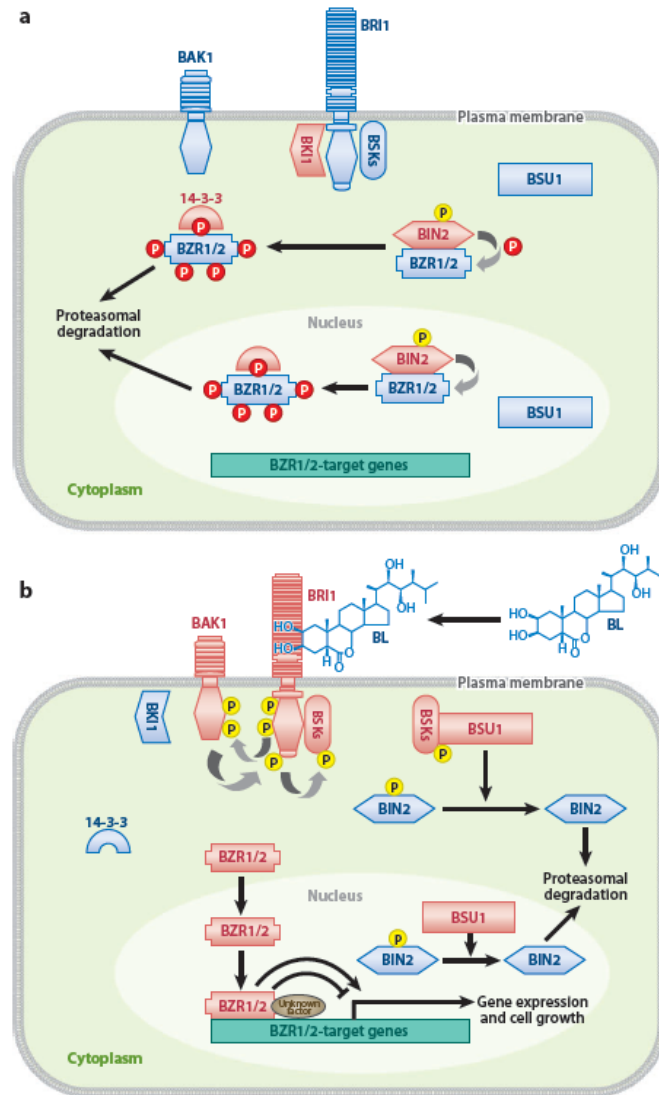
Aunque la identificación de mutantes deficientes en la síntesis de BR ha sido clave en identificación tanto de la ruta de síntesis como la función de estas hormonas, dichos mutantes se han identificado sólo en un número reducido de especies. A este respecto, la identificación del inhibidor **BRASINAZOL (BRZ)** como un compuesto capaz de inducir en *Arabidopsis* un fenotipo similar al de los mutantes deficientes en BR (127) (Fig. 17), ha sido clave ya que ha permitido el estudio de la ruta de señalización de estas hormonas en especies en las que no se habían descrito mutantes biosintéticos. Este inhibidor se une al enzima DWF4 e inhibe su actividad, bloqueando así de forma específica la ruta de síntesis de estas hormonas (128). Estudios genéticos destinados a identificar mutaciones que confieran resistencia a este inhibidor, por otra parte, han permitido identificar nuevos componentes de la ruta de transducción de la señal de estas hormonas (129, 130)

**Figura 17:** Fenotipo de los mutantes biosintéticos de BL. Planta enana, de color verde oscuro y con fertilidad reducida



#### 2.2.4. Señalización de los Brassinosteroides

La observación que los mutantes deficientes en la síntesis de BR se caracterizan por presentar un fenotipo de-etiolado en oscuridad, semejante al de brotes crecidos en la luz, permitió la búsqueda en varios laboratorios de mutantes con un fenotipo similar que no se recuperara tras la aplicación de BL. Así se identificó el mutante ***bri1*** (***Brassinosteroid Insensitive 1***), portador de una mutación en un gen receptor quinasa de membrana con 25 motivos LRR repetidos (129, 131-133). Se ha demostrado que BRI1 une directamente BRs, a través de un dominio único en esta proteína ó dominio isla localizado en la región repetida LRR extracelular de la proteína, estableciéndose así que BRI1 correspondía al receptor de BR, el segundo receptor aislado en plantas después del de etileno. La unión de BRs induce un cambio de conformación de BRI1 que causa la liberación del represor BKI, asociado al dominio C-terminal citosólico de la proteína. Ello promueve su heterodimerización con el receptor quinasa ***BAK1*** (***BRI1-Associated Receptor Kinase-1***) que funcionaría como co-receptor de estas hormonas. La heterodimerización con BAK1 induce la transfosforilación de ambas proteínas y activa una cascada de señalización que conduce, en último término, a la inactivación de ***BIN2*** (***Brassinosteroid insensitive 2***), una GSK3-like quinasa responsable de fosforilar los factores de transcripción ***BES1*** (***BRI-EMS-Suppressor-1***) y ***BZR1*** (***Brassinazole-Resistant-1***) y regular negativamente su función (134). En ausencia de BR, BIN2 fosforila estos factores de transcripción, inhibiendo su translocación al núcleo y promoviendo su degradación (130, 135). La ruta de señalización de BR, activa la fosfatasa ***BSU1*** (***BRI1 Suppressor Protein-1***), responsable de defosforilar BIN2 e inactivar esta quinasa, permitiendo la acumulación de BES1 y BZR1 en el núcleo, y la activación de los genes regulados por estas hormonas (136).



**Figura 18:** Esquema de la ruta de señalización de Brasinosteroides. **a)** En ausencia de BR, BIN2 fosforila los factores de transcripción BES1/BZR1 señalizando su degradación. **b)** En presencia de BR, BRI1 reconoce la molécula de BL, dimeriza con BAK1 y activa una cascada de fosforilaciones que termina con la activación de BSU1, una fosfatasa responsable de defosforilar BIN2, inhibiendo así su actividad quinasa. Ello permite la acumulación de los factores de transcripción BES1/BZR1 en el núcleo y la activación de los genes de respuesta a BR. Adaptado de Kim *et al.*, 2010.

### 2.2.4.1 Percepción de los brasinosteroides en la membrana celular

La caracterización de mutantes con una respuesta alterada al aporte exógeno de BL, al igual que para la ruta de GAs, ha sido esencial para la identificación de los diferentes intermediarios implicados en la transducción de la señal de estas hormonas. El mutante *bri1*, se identificó por primera vez en un cribado de mutantes que no mostraran un fenotipo de inhibición del crecimiento de la raíz en presencia de BRs y que por tanto presentarían un bloqueo en la percepción de estas hormonas ó en su correspondiente

ruta de señalización. Mutaciones en el mismo gen se identificaron también en un estudio paralelo destinado a la búsqueda de mutantes con un fenotipo de-etiolado en oscuridad, similar al de los mutantes biosintéticos *det2* y *cpd*, que no se recuperara tras el aporte exógeno de BRs.

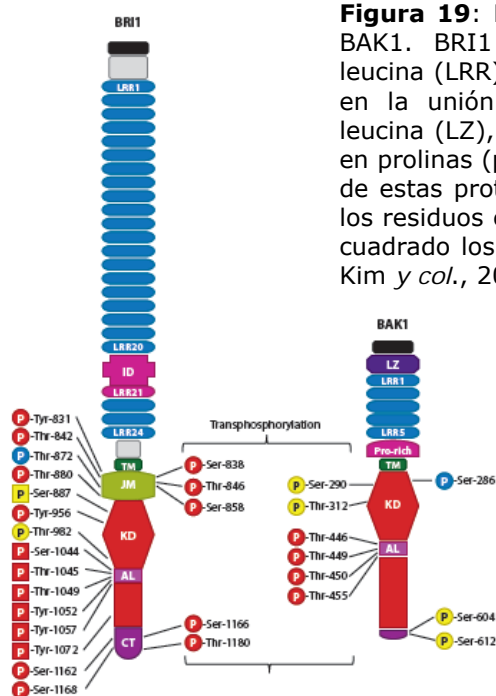
La caracterización de estas mutaciones identificó el gen **BRI1**, que codifica un receptor quinasa con un dominio extracelular repetido rico en leucinas (LRR-RLK). Genes ortólogos a este gen de *Arabidopsis* se han identificado también en arroz (*OsBRI1*), en tomate (*tBRI1/Cur13*), guisante (*LKA*), cebada (*HvBRI1*) y algodón (*GhBRI1*), lo que sugiere una ruta conservada de señalización en angiospermas (137-141). Fusiones de la proteína BRI1 a la proteína reportera GFP demostraron que esta proteína se localiza en la membrana plasmática, a la vez que estudios de expresión mostraron una expresión general en todos los tejidos de la planta (142).

La proteína BRI1 comprende un péptido señal en su extremo N-terminal, necesario para el tráfico de la proteína a la membrana, seguido de una cremallera de leucinas, dos pares de residuos cisterna conservados y 25 copias repetidas de dominios LRR, interrumpidas por una región de 70 aminoácidos, conocida como dominio "isla" situada entre las repeticiones LRR 21 y 22. A esta región, localizada en el exterior de la membrana plasmática, le sigue un dominio transmembrana y un dominio quinasa con una localización intracelular, seguido de una cola C-terminal que juega un papel importante en la regulación de la actividad quinasa de esta proteína (133). Se ha demostrado que los dominios LRRs y en particular el dominio "isla" situado entre los LRR 21 y 22 unen directamente BL, BRI1 siendo el receptor implicado en la percepción de estas hormonas (132) (Fig. 19).

En *Arabidopsis* se han identificado tres proteínas adicionales homólogas a *BRI1*, denominadas *BRL1*, *BRL2* y *BRL3* (*BRI1-Like*) (143, 144). *BRL1* y *BRL3* son muy homólogas entre sí (80%) y son más similares a *BRI1* (43% de homología) que *BRL2*. Ambos genes se expresan sólo en el tejido vascular y recientemente se ha visto que son necesarios para la diferenciación de los vasos del xilema (143, 144).

Otra proteína con una función importante en la percepción de los BL es **BAK1** (***BRI1-Associated Receptor Kinase-1***), un receptor quinasa identificado por dos laboratorios independientes, que comparte algunos dominios con *BRI1* y forma heterodímeros con esta proteína (145, 146). Al igual que *BRI1*, *BAK1* se caracteriza por presentar un patrón ubícuo de expresión y por localizarse en la membrana plasmática. En *Arabidopsis*, la pérdida de función de este gen produce una reducida sensibilidad a BL (145, 146), y estudios doble híbrido, FLIM (*Fluorescent Lifetime Imaging Microscopy*) y

FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*) han demostrado una interacción física de esta proteína con BRI1 (145-147).



**Figura 19:** Estructura de los receptores quinasa BRI1 y BAK1. BRI1 está compuesto por 25 repeticiones de leucina (LRR) y un dominio "isla" de 70 aa (ID) implicado en la unión de BL. BAK1 contiene 4 cremayeras de leucina (LZ), 5 dominios LRR repetidos, y una región rica en prolinas (pro-rich). Se indican los sitios de fosforilación de estas proteínas. Se muestran rodeados por un círculo los residuos cuya fosforilación se ha demostrado y por un cuadrado los sitios posibles de fosforilación. Adaptado de Kim *et al.*, 2010.

**BKI1** (*BRI1 Kinase Inhibitor 1*) se identificó en estudios de doble híbrido en levadura, destinados a buscar interactores de la proteína BRI1. Se trata de una proteína con 2 dominios separados, ricos en Ser y Asn, y un dominio C-terminal conservado, que se une específicamente al dominio quinasa de BRI1, actuando como un intermediario temprano de señalización o un regulador responsable de inactivar este receptor. En ausencia de BL, BKI1 se une al dominio quinasa de BRI1, impidiendo su heterodimerización con BAK1. La unión de BL a la región extracelular de BRI1, provocaría un cambio de conformación en el receptor que induce la disociación de BKI1, dejando libre el dominio responsable de la asociación con BAK1 u otros posibles sustratos, promoviendo su fosforilación y activación (148).

### 2.2.4.1. Componentes intracelulares de la ruta de señalización de BL

El gen ***BIN2*** (*BR-insensitive-2*) fue identificado en estudios independientes por diferentes grupos y codifica una quinasa tipo *glycogen synthase 3* o *shaggy*-quinasa con una función represora en la ruta de señalización de BL (149-152).

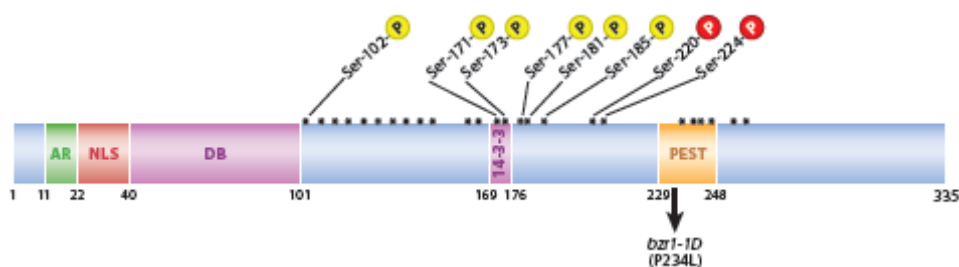
En *Arabidopsis*, copias alélicas de este gen estarían también codificadas por los genes *Shaggy*-



wt      *bin2,1+*      *bin2,1*

*like kinase theta*" (*ASKtheta*) y "*Ultracurvata 1*" (*UCU-1*). El mutante *dwarf12* está también originado por una mutación en el gen *BIN2* (150). Estos mutantes, al igual que los mutantes severos en el gen *bri1*, se caracterizan por presentar un fenotipo tremendamente enano que no se recupera tras la aplicación de BL (Fig. 20). Se vió que estas mutaciones eran originadas por una ganancia de función de la proteína, debido a su sobre-expresión ó la generación de una forma constitutivamente activa de la proteína, lo que indica que esta familia de GSK3 quinasas actúa a modo de reguladores negativos de la ruta de señalización de BR (149, 151).

Estudios posteriores, basados en estudios de interacción en levadura, demostraron que *BIN2* se une a los factores de transcripción **BZR1** y **BES1**, que actúan como reguladores positivos de la ruta de señalización de BR, al activar la expresión de numerosos genes regulados por estas hormonas. El mutante *bzr1* (*Brassinazole-Resistant-1*) se aisló en un cribado de mutantes resistentes al inhibidor de síntesis de BL, BRZ, que en presencia de dicho inhibidor mostraran un fenotipo etiolado en oscuridad (135). La mutación *bes1* (*BRI-EMS-Suppressor-1*) se aisló a su vez en un cribado de mutantes que rescataran el fenotipo enano débil causado por la mutación *bri1-1* (130). Ambos genes codifican proteínas bHLH atípicas (Fig. 21) y comparten un 88% de similitud. Las proteínas BZR1 y BES1 muestran múltiples repeticiones de la secuencia consenso "S/TxxxS/T", diana de fosforilación de las quinasas tipo GSK3.



**Figura 21:** Estructura de los factores de transcripción BZR1/BES1. Ambos factores contienen una región rica en Alaninas (AR), un dominio NLS de localización nuclear y un dominio bHLH atípico que mediaría su unión al ADN (DB). Las dianas de fosforilación de *BIN2* se han indicado con asteriscos. Se indican también los motivos de unión a proteínas 14-3-3 y un dominio PEST. Adaptado de Kim *et al.*, 2010.

La fosforilación de estas proteínas por la quinasa *BIN2* se ha demostrado en estudios *in-vitro* (134, 153). En ausencia de BRs, estas proteínas están altamente fosforiladas, lo que impide su translocación al núcleo y favorece su degradación. La aplicación de BRs, por su parte, promueve la acumulación de la forma defosforilada de estas proteínas, lo que permite su estabilización y acumulación en el núcleo (130, 135).

Otra proteína con una función importante en la ruta de señalización de BRs es la fosfatasa con dominios repetidos kelch **BSU1 (BRI1 Suppressor 1)**, identificada en un cribado de líneas de activación capaces de recuperar el fenotipo enano causado por la mutación *bri1-1* (154). Recientemente se ha demostrado que en presencia de BRs, BSU1 interacciona directamente con la quinasa BIN2 defosforilándola, lo que inhibe la actividad quinasa de esta proteína. Ello permite la acumulación de los factores BES1 y BZR1 en su forma defosforilada y la estabilización de estos factores, y por consiguiente, la activación de los genes de respuesta a BR (136).

La fosforilación de los factores BES1 y BZR1, además de promover su degradación por el sistema proteasoma, favorece su interacción con proteínas 14-3-3 citosólicas (155), que restringen la translocación al núcleo de estos factores y por tanto su actividad transcripcional (156). Ello hace que el estado de fosforilación de estas proteínas, pueda ser utilizado como un marcador bioquímico, indicativo del estado de activación de la ruta de señalización de BR (148). Se ha visto, por otra parte, que BZR1 se une a la región promotora de los genes *CPD* y *DWF4*, inhibiendo su expresión. Este factor, actuaría por tanto en un circuito de retroalimentación negativa, responsable del control homeostático de estas hormonas (157, 158). Así, los niveles de expresión de los genes *CPD* y *DWF4* constituyen excelentes marcadores de la respuesta a BR, los cuáles se han utilizado en multitud de experimentos como diagnóstico de la eficiencia de los tratamientos con estas hormonas.

#### 2.2.4.2. Respuestas biológicas dependientes de BL

Los BRs inducen el crecimiento y elongación celular al activar la expresión de un número de genes con una función en la relajación de la pared celular (159). Así, se ha visto que estas hormonas regulan positivamente la expresión de los genes *BRU1*, *TCH4*, *LeBR1*, *OsXTR1* y *OsXTR3*, que codifican *xyloglucan endotransglycosylasas/hydrolasas* (XTH o XETs) de soja, *Arabidopsis*, tomate y arroz respectivamente (160-163), involucrados en la síntesis y modificación de la pared celular. Estudios de expresión génica han demostrado que el tratamiento con BL provocaría también la expresión de otros genes involucrados en la expansión y organización de la pared celular, como expansinas, extensinas y arabinogalactanos (164).

En el papel de estas hormonas en la elongación celular influiría también la interacción con otras hormonas vegetales. Así por ejemplo, en epicotilos de alubia se ha observado que en respuesta a BL se induce la producción de etileno (165). Otros estudios han demostrado que existiría un efecto aditivo entre los BR y las GAs (166), o que existe un efecto sinérgico de estas hormonas y las auxina en el control de la elongación del tallo (167-169). En semillas



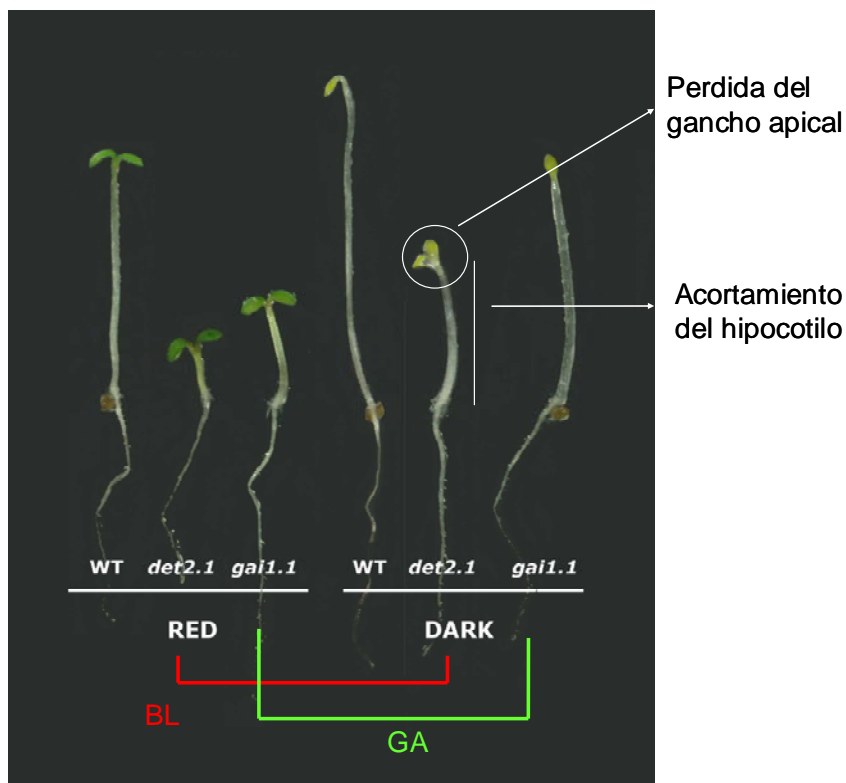
de *Arabidopsis*, se ha observado también un efecto sinérgico sobre la elongación del hipocótilo en respuesta a la aplicación combinada de BL y GA, o la de BL y auxinas (170). Así, se ha observado que tras el tratamiento con BRs se induce la expresión de un número de genes característicos de la respuesta a auxinas (171). De hecho, recientemente se ha identificado en los promotores de estos genes, un elemento que es necesario tanto para su activación por auxinas como por BR (172) o se ha observado que tanto BR como GA inducen la expresión de MER15, una XET implicada en la modificación de la pared celular (170).

Un proceso adicional de desarrollo en el que se observa una clara interacción entre las hormonas BR y GA es en la germinación. En *Arabidopsis*, los mutantes afectados en la ruta de síntesis o señalización de GAs, muestran una germinación defectuosa la cuál es parcialmente rescatada por el aporte exógeno de 24-epibrasinólido.

### 3. INTEGRACIÓN DE LAS SEÑALES HORMONALES Y LA INFORMACIÓN LUMINOSA

La **fotomorfogénesis** es el proceso de desarrollo inducido en brotes de semillas germinadas en luz. Este proceso se caracteriza por la inhibición del crecimiento del hipocotilo, la expansión de los cotiledones, la diferenciación de los cloroplastos y la expresión de multitud de genes nucleares y cloroplásticos esenciales, entre otros, para la absorción de la luz y asimilación de carbono en la fotosíntesis, la fotoprotección y la diferenciación de las hojas verdaderas. En semillas germinadas en oscuridad, en cambio, el brote sigue un proceso **escotomorfogénico** de desarrollo, con un patrón etiolado de crecimiento, que se caracteriza por un crecimiento exagerado del hipocotilo, la formación de un gancho apical, y la inhibición de la apertura y desarrollo de los cotiledones, que presentan un color amarillo pálido, debido a la ausencia de clorofila (Fig. 6) (173).

La transición entre estos dos programas alternativos de desarrollo está fundamentalmente regulada por la luz, pero se ha visto que tanto los BR (174) como las GA (175) participarían en este proceso. El papel de estas hormonas se ha hecho evidente gracias a la observación que brotes de semillas deficientes en la síntesis o señalización de estas hormonas muestran un fenotipo parcialmente de-etiolado en oscuridad (Fig.22), lo que indicaría que estas hormonas son necesarias para establecer el patrón de desarrollo etiolado.



**Figura 22:** Comparación de los fenotipos de los brotes de semillas silvestres, *det2.1* y *gai1.1*, germinadas en luz y en oscuridad. En oscuridad, ambos mutantes muestran un fenotipo parcialmente de-etiolado, caracterizado por un hipocotilo más corto y la pérdida del gancho apical

Los mecanismos moleculares implicados en la integración de estas señales se desconocen por el momento y serán objeto de este trabajo de tesis. Dicho trabajo se ha organizado en dos bloques principales: un primer bloque en que se estudia la integración de las señales luminosa y de GAs, centrándose en el papel principal de los represores DELLA en la inhibición de la elongación del hipocotilo, y un segundo bloque en el que se estudia la interacción en los BR y GA, y en particular, porqué es necesaria la activación de la ruta de BR, para una correcta elongación en respuesta a la aplicación de GA. Los resultados obtenidos en ambos bloques de trabajo han permitido definir un nexo de unión entre estas distintas señales y establecer los mecanismos moleculares implicados en su integración, lo que explicaría porqué es necesaria la acción coordinada de cada uno de estos factores, para un correcto desarrollo y adaptación de la planta al medioambiente que le rodea.





*Comparación de los patrones de crecimiento de plantas crecidas en la luz o en un ambiente sombreado.*

*Arriba una planta de tomate, abajo una planta de Arabidopsis*



**OBJETIVOS**



## OBJETIVOS DEL ESTUDIO

La transición entre escotomorfogénesis y fotomorfogénesis está regulada principalmente por la luz. En oscuridad, la actividad de la E3 ligasa COP1 mantiene bajos los niveles de una serie de factores de transcripción (HY5, HYH, HFR1, LAF1...) promotores de la fotomorfogénesis (173, 176, 177). La elongación del hipocotilo en oscuridad depende además de la actividad de los factores de transcripción **PIFs**, los cuáles se acumulan en ausencia de luz y son rápidamente degradados en la luz (178).

Al menos, dos familias de hormonas, i.e. GAs (175) y BRs (174), modulan también esta transición. Mutantes deficientes en la síntesis de ambas hormonas muestran un patrón parcialmente fotomorfogénico de crecimiento, i.e. hipocotilos cortos, cotiledones abiertos y la expresión de genes inducidos por luz, cuando se crecen en oscuridad, lo que indicaría que la señalización por estas hormonas es necesaria para el establecimiento de un patrón etiolado de crecimiento.

Así por ejemplo, se ha visto que la ruta de señalización de GAs es necesaria para una adecuada etiolación de los brotes en oscuridad (179). Ello se debe, en parte, a que las giberelinas evitan la acumulación de HY5, un factor de transcripción con una función esencial en fotomorfogénesis. Los mutantes *hy5*, crecidos en oscuridad en presencia de PACLOBUTRAZOL (PAC), muestran hipocotilos mucho más largos que las plantas silvestres. Los mutantes biosintéticos o insensibles a GAs, por otra parte, acumulan HY5 en oscuridad, lo que sugiere que las GAS antagonizarían el efecto promotor de la fotomorfogénesis de HY5 (175).

Las GAs, por otra parte, promueven la rápida degradación de los represores DELLA, al señalar su ubiquitinación por el complejo E3 ligasa SCF<sup>SLY</sup>. Mutaciones que afectan varios de los genes DELLA causan un fenotipo alargado en luz, similar al de las plantas etioladas. Por el contrario, mutantes por ganancia de función que acumulan de manera constitutiva los represores DELLA, muestran un patrón de-etiolado de desarrollo cuando se crecen en oscuridad.

A pesar de haberse demostrado de manera inequívoca que las proteínas DELLA actúan como represores de la expresión génica, no se ha podido establecer el mecanismo molecular a través del cuál ejercen dicha represión. Su similitud de secuencia con miembros de la familia GRASS de factores de transcripción indujo a pensar que podrían unirse a la región promotora de sus genes diana, al igual que los factores SHORTROOT (SHR) o SCARECROW (SCR) (180). Sin embargo, todos los intentos destinados a demostrar que estos represores son capaces de unir directamente ADN, han fallado hasta la fecha. En estudios de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) en

los que se usaron líneas transgénicas RGA-TAP en un fondo mutante *rga-24 ga1.3*, se alcanzó a identificar la región promotora de diversos genes tras la inmunoprecipitación de este represor. La baja eficiencia de amplificación génica, sin embargo, sugería que RGA posiblemente se une a dichos promotores de forma indirecta, tras su asociación con otros factores nucleares (109).

Resultados previos obtenidos en el laboratorio habían establecido que los represores DELLA interaccionan *in-vitro* con los factores de transcripción PIF3 y PIF4, con una función en la ruta de señalización de los receptores de luz fitocromos. Por tanto, el **primer objetivo** de este trabajo consistió en determinar el sentido biológico de ésta interacción y determinar si dicha interacción forma parte del mecanismo molecular de acción de estos represores que conduce a una inhibición del crecimiento en ausencia de GAs.

Los brasinosteroides ejercen también un papel importante en el proceso de etiolación. Mutantes deficientes en BRs no desarrollan un patrón escotomorfogénico correcto y muestran en oscuridad un fenotipo similar al de los brotes crecidos en luz. De hecho, estos mutantes comparten muchas de las características de plantas deficientes en GAs: son enanos, de color verde oscuro y además se caracterizan por presentar una fertilidad reducida, caracteres todos ellos revertidos por un aporte exógeno de BRs.

Curiosamente, la aplicación de BRs promueve la elongación del hipocotilo en plantas deficientes o insensibles a GAs, y recupera también en parte la deficiente germinación de dichas semillas (181). La aplicación de GAs, por otra parte, no revierte el fenotipo enano de los mutantes deficientes o insensibles a BL, aunque la aplicación conjunta de ambas hormonas produce un efecto sinérgico en el crecimiento del hipocotilo, induciendo un crecimiento mucho mayor que la aplicación de cada una de las hormonas por separado.

Estos datos demuestran la existencia de una interacción cruzada entre las rutas de señalización de GAs y BRs, e indican que es necesario que la ruta de BR esté activada para que las GAs promuevan una elongación del hipocotilo. El **segundo objetivo** de este trabajo fue pues estudiar esta interacción y determinar porqué es necesaria la activación de la ruta de BRs para una correcta respuesta a las GAs.

Para la consecución de ambos objetivos se ha llevado a cabo una combinación de abordajes bioquímicos, genéticos y genómicos que se describen en los apartados que siguen.





*Retirada de los estambres durante el proceso de cruce de una planta de Arabidopsis*

## ***MATERIALES Y MÉTODOS***



## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Material vegetal y condiciones de crecimiento

La relación de líneas de *Arabidopsis* utilizadas en esta tesis doctoral se indica en la siguiente tabla:

Nombre	Ecotipo	Nivel de expresión	Referencia
PIF4-OE	Columbia	sobre-expresión de At2g43010	(39)
<i>pif4</i>	Columbia	pérdida de función de At2g43010	(39)
<i>pif4 pif5</i>	Columbia	pérdida de función PIF4 y PIF5	(182)
PIF4:HA	Columbia	fusión C-terminal a HA	(183)
PIF4:GFP	Columbia	fusión C-terminal a GFP	este trabajo
<i>phyB-9</i>	Columbia	pérdida de función de At2g18790	(9, 184)
pRGA:GFP:RGA	Landsberg	fusión N-terminal a GFP	(78)
<i>20ox</i>	Columbia	pérdida de función de At4g25420	(185)
<i>det2.1</i>	Columbia	pérdida de función de At2g38050	(123)
<i>bes1d</i>	Columbia	mutación estable de At1g19350	(186)
<i>bzr1d</i>	Columbia	mutación estable de At1g75080	(157)
<i>gai1.1</i>	Landsberg	mutación dominante de At1g14920	(99)
<i>sly1.10</i>	Landsberg	pérdida de función de At4g24210	(187)
<i>ga1.3</i>	Landsberg	pérdida de función de At4g02780	(188)
<i>ucu1.2</i>	Landsberg	mutación dominante de At4g18710	(152)
<i>ucu1.3</i>	Landsberg	mutación dominante de At4g18710	(152)

Para el cultivo de plantas *in-vitro*, las semillas se esterilizaron en etanol al 70% suplementado con 0.1% Tween-20 durante 15 minutos, se lavaron dos veces con etanol al 100% y se dejaron secar en campana estéril. Tras la esterilización, las semillas se sembraron en placa en medio de germinación 0.5x Murashige y Skoog (Duchefa Biochemie BV, Netherlands) suplementado con 1% de sacarosa y 0,8% bacto agar (Difco). Una vez sembradas, las semillas se vernalizaron durante 2-3 días a 4°C en oscuridad, para luego ser transferidas a cámaras de cultivo en condiciones de días largos (16h luz/8h oscuridad).

#### **Tratamientos con hormonas e inhibidores biosintéticos**

El aporte exógeno de GAs se realizó utilizando la molécula bioactiva GA<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI), en el caso de los tratamientos con BRs, se utilizó 24-Epibrassinolide (Duchefa Biochemie BV, Netherlands). Para inhibir la biosíntesis de GAs se utilizó PACLOBUTRAZOL (Duchefa Biochemie BV, Netherlands) y la biosíntesis de BRs se inhibió utilizando BRASINAZOL 2001, gentilmente cedido por Tadao Asami (Universidad de Tokyo).

Las plantas pRGA:GFP:RGA utilizadas para el análisis de Co-Immunoprecipitación (apartado 1.3), se crecieron durante 5 días en medio suplementado con GAs a una concentración final de 25µM unas, y otras en medio suplementado con PAC a concentración final de 0.5µM.

En el apartado 3.1 de resultados, los mutantes *phyB*, PIF4OX y *pif4* se crecieron durante 5 días en medios con concentraciones crecientes de PAC (0, 0.025, 0.05, 0.1 y 0.2 $\mu$ M) y GAs (0, 2.5, 5 y 10 $\mu$ M)

Los cultivos celulares de células de *Arabidopsis* utilizados en el ensayo de transactivación (apartado 3.3) se pasaron a placas suplementadas con GAs a una concentración final de 25 $\mu$ M 12 horas antes de la extracción del extracto proteico que se utilizó en el ensayo.

Las plantas analizadas en el apartado 3.6 se crecieron durante 5 días en medio GM suplementado con GAs a concentración final de 10 $\mu$ M.

El análisis de la estabilidad de GFP:RGA en las plantas *det2.1* pRGA:GFP:RGA se realizó utilizando plantas de 5 días de edad crecidas en ciclos de luz/oscuridad (16h/8h) que se transfirieron a medio líquido suplementado con 25 $\mu$ M de GAs unas y 1 $\mu$ M de PAC durante 2h.

Para determinar la respuesta de las plantas PIF4OX, *pif4* y *pif4pif5* (apartado 5.1 de resultados), las plantas se crecieron durante 5 días en presencia de BRs 0.2 $\mu$ M y BRZ 0.1 $\mu$ M. El análisis de la respuesta a GAs en presencia de BRZ se realizó utilizando concentraciones de BRZ de 1 $\mu$ M y 25  $\mu$ M de GAs.

Para analizar la transcripción de PIL1 (apartado 5.3 capítulo de resultados), plantas de 5 días de edad se trataron con BRZ (1 $\mu$ M concentración final) durante 12 horas y después se procedió al ensayo en las diferentes condiciones de luz.

Las plantas del apartado 5.4 se crecieron durante 5 días en luz continua y posteriormente se trataron con BRs (1 $\mu$ M) durante 12h. Un set de plantas se mantuvo en oscuridad y otro en luz continua.

### **Medida de hipocotilos**

Para determinar la longitud de los hipocotilos tras los tratamientos, las placas se escanearon a los 3, 4 y 5 días tras la germinación y se midió la altura de los hipocotilos desde la raíz hasta el meristemo apical, con el programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

## 2. Construcciones para expresión en levaduras y transformación de plantas

En la memoria se han generado fusiones de distintos genes a la proteína fluorescente verde GFP, o al epítipo HA, y construcciones para ensayos de interacción en planta (fusiones YFP), en levadura (fusiones a los dominios AD y BD de GAL4), o la expresión de estas proteínas en *E.coli* (fusiones a GST o MaBP). Para muchas de estas construcciones se utilizó la tecnología Gateway<sup>®</sup>, desarrollada por Invitrogen. Los genes se amplificaron por PCR, utilizando oligonucleótidos específicos (en el anexo 3 se incluye un listado de todos los cebadores empleados en este trabajo) y una copia del RNA correspondiente (cDNA) o DNA genómico del ecotipo Columbia-0 de *Arabidopsis* como molde, según se especifica en la memoria. Las construcciones generadas y oligonucleótidos utilizados se describen en la siguiente tabla, en la que se especifica también el vector de destino en el que se han insertado.

CONSTRUCCIÓN	CEBADOR DIR	CEBADOR REV	VECTOR DESTINO
PIF4-NeYFP	PIF4YFP-for	PIF4YFP-rev	PBYFP1
NeYFP-PIF4	PIF4YFP-for	PIF4YFP-rev	PBYFP2
CeYFP-PIF4	PIF4YFP-for	PIF4YFP-rev	PBYFP3
PIF4-CeYFP	PIF4YFP-for	PIF4YFP-rev	PBYFP4
PIF4:GFP	PIF4YFP-for	PIF4YFP-rev	PGWB5
PIF4:HA	PIF4YFP-for	PIF4YFP-rev	PGWB14
RGA-NeYFP	RGAYFP-for	RGAYFP-rev	PBYFP1
NeYFP-RGA	RGAYFP-for	RGAYFP-rev	PBYFP2
CeYFP-RGA	RGAYFP-for	RGAYFP-rev	PBYFP3
RGA-CeYFP	RGAYFP-for	RGAYFP-rev	PBYFP4
BES1:GFP	BES1for	BES1rev	PGWB5
PIF4-AD	PIF4YFP-for	PIF4YFP-rev	PGADT7GW
PIF4-BD	PIF4YFP-for	PIF4YFP-rev	PGBKT7GW
PIF4-APB-AD	PIF4YFP-for	APB-PIF4rev	PGADT7GW
$\Delta$ NP1F4-AD	PIF4sinAPB-for	PIF4YFP-rev	PGADT7GW
PIF4-DEL3-AD	PIF4YFP-for	AtPIF4DEL3rev	PGADT7GW
PIF4-DEL4-AD	AtPIF4DEL4-for	PIF4YFP-rev	PGADT7GW
BES1-AD	BES1for	BES1rev	PGADT7GW
BES1-BD	BES1for	BES1rev	PGBKT7GW
BES1 DEL1-BD	BES1for	BES1del1rev	PGBKT7GW
BES1 DEL2-BD	BES1del2for	BES1rev	PGBKT7GW
BES1 DEL3-BD	BES1for	BES1del3 rev	PGBKT7GW
BES1 DEL4-BD	BES1del4for	BES1rev	PGBKT7GW
BIN2-AD	BIN2for	BIN2rev	PGADT7GW
BIN2-BD	BIN2for	BIN2rev	PGBKT7GW
PIF4-GST	PIF4YFP-for	PIF4YFP-rev	PDEST24
MBP-BES1	BES1for	BES1rev	PDESTH1
GST-BIN2	BIN2-for	BIN2-rev	pGEX2T

Tal y como se observa en el anexo 3, a los cebadores directos se les añadió la secuencia de nucleótidos CACC, necesarios para el clonaje direccional del producto de PCR en el vector pENTR/D-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen), gracias a la Topoisomerasa unida al vector. Dicho vector, por otra parte, incluye las regiones AttR1 y AttR2 que flanquean el fragmento introducido. Estas secuencias permitirán la posterior movilización de este fragmento al vector de destino, por

recombinación con las regiones AttL1 y AttL2 presentes en estos vectores, utilizando el enzima LR clonasa (Invitrogen).

El producto de reacción se transformó mediante choque térmico en células DH5 $\alpha$  de *E.coli* y se seleccionaron las células transformadas con el antibiótico correspondiente. Se analizaron las construcciones así obtenidas mediante digestión con enzimas de restricción y se secuenció el correspondiente inserto a fin de comprobar la ausencia de mutaciones esporádicas.

### 3. Transformación de *Arabidopsis* mediante inmersión de las flores

Para la transformación estable de plantas de *Arabidopsis* se utilizó el método de inmersión floral. Para ello, se transformaron las distintas construcciones en la cepa GV3101 de *Agrobacterium* y se seleccionaron las colonias transformadas en medio YEB (Extracto de carne 5g/L, Extracto de levadura 1g/L, Peptona 5g/L, Sacarosa 5g/L y Sulfato de Magnesio 0.48g/L. pH7.2) suplementado con rifampicina (100  $\mu$ g/mL) y el antibiótico adecuado.

A partir de una colonia positiva, se preparó un preinóculo de 10ml en medio YEB líquido suplementado con antibióticos, y se incubó durante la noche a 28°C en agitación (250 rpm). Con este precultivo se inocularon 500ml de medio YEB fresco + antibióticos + 0.2 mM acetosiringona y se incubó a 28°C en agitación hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6-0.8. Las bacterias se sedimentaron mediante centrifugación a 4000rpm durante 15 min y se resuspendieron en 200ml de medio MS+5% de Sacarosa, al que se se añadió 40  $\mu$ l del agente surfactante Silwet L-77, justo antes de la infiltración.

Las plantas se sumergieron en la suspensión de las Agrobacterias por dos veces durante 5 min, dejando secar las plantas durante 5 min entre tratamientos. Posteriormente se cubrieron con una bolsa para preservar la humedad, y se mantuvieron en un lugar poco iluminado. Al día siguiente se pasó las plantas al invernadero y a los dos días se retiraron las bolsas, cultivándolas normalmente hasta la producción de semillas.

Para seleccionar las plantas transformadas, un elevado número de semillas T0 se germinaron en medio GM (4.4g/l medio Murashige y Skoog -Duchefa-, 0.5g/l MES, 10g/l Sacarosa, 5.5g/l Plantagar -Duchefa-, pH 5.8) en presencia de claforan (250 mg/L) + el antibiótico adecuado. Las plantas resistentes al antibiótico se pasaron a tierra y analizaron por northern o western blot, para comprobar la expresión del transgén. Se seleccionaron las líneas con un único lugar de inserción (segregación 3:1) y niveles elevados de expresión, y se

crecieron hasta obtener las semillas T2, en las que se seleccionó las líneas homocigóticas.

Antibiótico	Concentración de la solución stock (mg/ml)	Concentración de trabajo (µg/ml)
<i>Claforam (Clf)</i>	250	250
<i>Higromicina (Hyg)</i>	50	15 - 20
<i>Kanamicina (Km)</i>	50	30
<i>PPT</i>	10	5 - 10
<i>Gentamicina (Gm)</i>	25	50 ler,-150 Col

#### 4. Generación de dobles y triples mutantes

A fin de estudiar la interacción genética y/o posible función de estos genes en una ruta común de regulación, se generaron dobles o triples mutantes o líneas de sobre-expresión en los fondos mutantes. Para ello, se cruzaron estas distintas líneas y se generaron semillas C2 que se crecieron para genotipar la presencia de la doble o triple mutación:

***phyB-9***: mutación puntual en el gen *phyB*. Esta mutación se genotipó por amplificación PCR (temperatura de anillamiento = 55°C y 30" de extensión) con los cebadores **69A** y **59B**. El producto de amplificación se digirió con el enzima **MnlI**, que corta sólo el DNA mutante.

***gai1.1***: codifica a una proteína mutante con una delción de 17 aminoácidos que eliminan el dominio DELLA de la proteína GAI. Esta mutación se genotipó por amplificación PCR (temperatura de anillamiento = 60°C y 1'30" de extensión) con los cebadores GA3 y GA5. El producto de amplificación (1600pb) se digirió con el enzima XhoI, que corta sólo el DNA de la planta silvestre (1300+300pb).

***sly1.10***: codifica a una proteína mutante con una delección de 23pb y una inserción de 8Kb. Esta mutación se genotipó por amplificación PCR.

- En las plantas silvestres, los cebadores SLY1.10F+263R amplifican una banda de 352pb.
- En las plantas mutantes, los cebadores SLY1.10F+263R amplifican una banda de 320pb, pero no en la planta silvestre.

***ga1.3***: codifica a una proteína mutante con una delección de 5kb. Esta mutación se comprobó según protocolos ya descritos(189)

***det2.1***: mutación puntual en el gen *DET2*. Esta mutación se comprobó según protocolos ya descritos (123).

**PIF4-OE:** La sobreexpresión de PIF4 se comprobó mediante northern blot, utilizando una sonda radioactiva correspondiente a este gen.

***pif4-101 (GARLIC 114g06):*** Línea de inserción de T-DNA, resistente a sulfadiazina. La mutación se comprobó por amplificación mediante PCR:

- En las plantas silvestres, los cebadores PD43+PD44 amplifican una banda de 1000pb.
- En las plantas mutantes, los cebadores PD44+PD14 amplifican una banda de 1100pb.

***pif5/pil6-1 (SALK\_087012):*** Línea de inserción de T-DNA, resistente a Kanamicina. La mutación se comprobó por amplificación mediante PCR:

- En las plantas silvestres, los cebadores PD30+PD31 amplifican una banda de 1440pb.
- En las plantas mutantes, los cebadores JMLB1+PD30 amplifican una banda de 720pb.

***bes1d:*** mutación puntual en el gen *BES1*, identificada en un cribado de mutantes EMS capaces de revertir el fenotipo insensible a brasinosteroides de *bri1-119*. Esta mutación se comprobó por amplificación con los cebadores BES1del2F y BES1R y digestión del producto de PCR con el enzima HpaII que corta el gen silvestre pero no el mutante.

## 5. Estudios de actividad transcripcional utilizando el gen reportero luciferasa

En este trabajo se han utilizado líneas pPIF4:LUC generadas en el laboratorio y líneas pPIL1:LUC (amablemente cedidas por Joanne Chory) en el fondo Col-0 para determinar el patrón de expresión de *PIF4* y analizar el patrón de actividad transcripcional de este factor (*PIL1* es una de las dianas primarias de la actividad transcripcional de este gen) (44, 182). Para estos estudios, se germinaron las semillas en medio GM y a los 5 días después de la germinación, las plántulas se transfirieron a una placa de microtitulación de 96 pocillos, donde se dejaron por un día adicional antes de proceder a determinar la actividad LUC en un luminómetro. A cada uno de los pocillos se añadió 175µl de medio GM sólido, suplementado con 35 µl del sustrato de Luciferasa (Promega). Para evitar la evaporación del medio y mantener las condiciones de humedad necesarias, la placa de microtitulación se cubrió con un film transparente adhesivo, que se perforó con una aguja hipodérmica para permitir el intercambio de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>.

La actividad luciferasa de las plantas se midió cada 2 h con la ayuda del luminómetro "Centro LB960, Berthold" y el programa



“Microwin”. Los datos obtenidos de cada medición se integraron y se representaron los promedios de cada medida con la ayuda del programa *Graph-pad*.

## 6. Agroinfiltración de hojas de *Nicotiana benthamiana*.

Para la agroinfiltración de hojas de *benthamiana*, se utilizaron plantas jóvenes (3-4 semanas) de *Nicotiana benthamiana* crecidas en el invernadero. Antes de infiltrar las plantas se regaron abundantemente para permitir la abertura de los estomas y se mantuvieron en condiciones de baja intensidad de luz.

Para la agroinfiltración se utilizaron cultivos frescos de *Agrobacterium tumefaciens* (cepa GV3101) transformados con la construcción de interés. Se preparó una estria fresca en medio YEB + Rif + antibiótico de las Agrobacterias y se inoculó un preinóculo de 5 ml de cultivo en medio YEB suplementado con antibióticos, en frascos Erlenmeyer de 50 ml, que se dejó crecer en agitación (200 rpm) durante toda la noche a 28 °C.

Este precultivo se utilizó para inocular un cultivo de 100 ml de medio YEB suplementado con los antibióticos + 0,2 mM de acetosiringona, en un frasco Erlenmeyer de 1 L, el cuál se creció hasta una DO600 = 0,6-0,8. Una vez alcanzada esta densidad optica, las células se sedimentaron por centrifugación durante 15 min a 4.000 g y el sedimento de células se resuspendió en el tampón MMA (Sales MS 5g/L, MES 1,95g/L, Sacarosa 20g/L, pH=5,6) suplementado con acetosiringona, hasta tener una densidad de DO600 = 2.1 o 3 (*ver siguiente párrafo*). Esta mezcla final se incubó en agitación suave a temperatura ambiente, durante una hora, para posteriormente proceder a la infiltración.

- *Para los estudios de Complementación Bimolecular Fluorescente, la mezcla final de agrobacterias que se infiltró, fue una mezcla de las células Cterminal-eYFP: Nterminal-eYFP: P19 (inhibidor de silenciamiento (190) a una DO final = 0.7:0.7:1. Dicha DO se obtuvo mezclando volúmenes idénticos de las suspensiones de agrobacterias correspondientes a cada una de las construcciones a DO600 = 2.1:2.1:3.*
- *La expresión de PIF4 y RGA para los estudios de movilidad en gel (EMSA), la mezcla final de agrobacterias que se infiltró fue 35SPIF4HA: 35SRGA: p19 o 35SPIF4HA: 35Svacío: p19 en una proporción de 0.7:0.7:1. Por tanto, en este caso se mezclaron volúmenes iguales de las agrobacterias transformadas con cada una de las construcciones a DO600 de 2.1:2.1:3.*

Tras la hora de incubación, se procedió a infiltrar con estos co-cultivos las hojas de *benthamiana*, empleando una jeringuilla de 2 ml a la que se había retirado la aguja. Para ello se tomó la hoja y se giró para exponer su cara abaxial (inferior). Sobre esta cara se apoyó la jeringuilla y se presionó con el dedo la otra cara de la hoja (el sector de la hoja a infiltrar quedaba entre el dedo y la jeringuilla), presionando suavemente la jeringuilla y empujando con delicadeza el émbolo para no perforar el tejido (la entrada del cultivo de agrobacterias es fácilmente observable por un oscurecimiento del tejido infiltrado).

Las plantas infiltradas se colocaron en una bandeja y se cubrieron con un film plástico y se dejaron en el invernadero durante 3 días, al cabo de los cuales se evaluó la expresión del transgén mediante microscopía confocal o western blot.

## **7. Análisis de la fluorescencia correspondiente a las proteínas GFP o YFP en un microscopio de fluorescencia o por microscopía confocal.**

Para la detección de la fluorescencia emitida por las fusiones GFP o la complementación de los fragmentos N- y C-terminal de la proteína eYFP, las plántulas ó fragmentos de hoja de aprox. 0.5 cm<sup>2</sup> se colocaron en un porta-objetos, se añadió agua y se cubrieron con un cubre-objetos cuidando no atrapar burbujas de aire. Las muestras así montadas se observaron en un microscopio de fluorescencia, utilizando el módulo Radiance 2100 Laser Scanning System (Bio-Rad) acoplado a un microscopio Zeiss Axiovert 200. Para la detección conjunta de GFP y la fluorescencia debida a la clorofila, se utilizó un láser de argón a una longitud de onda de 488-nm. La combinación de filtros utilizada fue: 560 DCLPXR beam splitter y HQ 515/30 emission filter para GFP, y HQ 660LP para la detección de clorofila. Las imágenes se tomaron de manera secuencial utilizando el software LaserSharp v5.0 (Bio-Rad) y se acoplaron con el programa LaserPix v.4 (Bio-Rad).

A fin de comprobar que la fluorescencia se restringía al núcleo, las muestras se incubaron en una solución 1µg/ml de DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI).

Para los tratamientos con MG132, las plántulas se incubaron durante 1h en una solución 50µM de MG132.

## 8. Extracción de RNA y análisis Northern Blot

Para la extracción de RNA, se recogió del orden de 25-100 plántulas de 5 días de edad, y se congelaron directamente en N<sub>2</sub> líquido. Las muestras congeladas se trituraron con la ayuda de un homogenizador en 400µl de tampón Z6 (8M Guanidina-HCl, 20mM MES pH 6.0, 20 mM EDTA) suplementado con 10% de β-ME. Se añadió 400µl de Fenol-Cloroformo y, tras agitar en el vortex, se centrifugaron durante 30 minutos a 13,000 rpm (4°C). Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se añadió 1/10 del volumen de Ácido Acético 1M y 1 volumen de etanol absoluto. Se mezcló bien y se dejó precipitar el RNA a -20°C durante toda la noche. A la mañana siguiente, las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 13,000 rpm y se eliminó el sobrenadante, lavando el sedimento de RNA con 500µl de etanol al 70% y agitando en el vortex hasta desprender el pellet. Los tubos se centrifugaron de nuevo durante 10 minutos a 13,000 rpm y se eliminó el sobrenadante. El sedimento se lavó con 300µl de Acetato de Sodio 3M (pH 5,2), agitando fuertemente con ayuda del vortex y se centrifugó de nuevo durante 10 minutos a 13,000 rpm. El RNA así obtenido se lavó de nuevo con 500µl de etanol al 70% y tras una última centrifugación durante 10 min a 13,000 rpm, se resuspendió en 50-100µl de H<sub>2</sub>O, midiendo su concentración a 260nm (1DO = 40 µg)

A fin de analizar los niveles de expresión del transgén, se separó 10µg de RNA total de cada una de las líneas en un gel al 1.2% de agarosa-formaldehído, que posteriormente se transfirió por capilaridad a una membrana de nylon. El RNA transferido se fijó al UV, y las membranas se hibridaron con una sonda radioactiva correspondiente a la región codificante del gen, según el protocolo descrito por Amasino *y col.* 1986. Los filtros se hibridaron a 42°C y posteriormente se lavaron con 3XSSC 0,5% SDS, a 65°C.

Los fragmentos correspondientes a las regiones codificantes de los genes PIF4 y LTP3 se amplificaron por PCR, utilizando los cebadores PIF4-YFPF/R y LTP3F/R.

## 9. Análisis de interacción doble híbrido en levadura

En la memoria se realizaron dos ensayos de interacción proteína-proteína en levadura, en los que se estudió la capacidad de interacción entre las proteínas PIF4 y DELLA, PIF4 y BES1, y PIF4 y BIN2. Las construcciones correspondientes a los ORF de estos genes en el vector pENTR/D se clonaron en los plásmidos pGADT7-GW y pGBKT7-GW (derivados de los plásmidos Clontech en los que se introdujo la región Gateway) mediante la reacción de la LR clonasa (Invitrogen). De este modo se generaron fusiones al AD- y BD- de estas proteínas, las cuales se transformaron en la cepa AH109 de

levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), utilizando el protocolo de transformación de Acetato de Litio, descrito en el manual de Clontech ([http://www.clontech.com/products/technologies.asp?pagesource=home&product\\_family\\_id=1427](http://www.clontech.com/products/technologies.asp?pagesource=home&product_family_id=1427)). Las levaduras que han incorporado los plásmidos pGADT7 y pGBKT7 se seleccionaron por su auxotrofia, en medio mínimo carente de Leucina y Triptófano. La interacción entre las distintas proteínas (PIF4/DELLA, PIF4/BES1 y PIF4/BIN2) y sus versiones truncadas, se determinó por selección en medio mínimo carente de Adenina, Histidina, Leucina y Triptófano.

## 10. Análisis Western Blot de extractos proteicos totales

Para la extracción de proteínas totales, dependiendo del experimento, se recogió de 10 a 20 plántulas crecidas *in vitro*, dos hojas jóvenes (plantas crecidas en el invernadero) o discos de 1 cm de diámetro (estudios en *benthamiana*) y se congelaron directamente en N<sub>2</sub> líquido. Las muestras congeladas se homogenizaron con el tampón de extracción (PBS 1X, 0.1% SDS, 0.1% TX-100 + 5mM  $\beta$ -ME e inhibidores de proteasas) y se centrifugaron a 4°C, durante 10 minutos a 13,000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se utilizaron 2  $\mu$ l para la cuantificación de proteínas mediante ensayo Bradford (Protein Assay Bio-Rad Lab GmbH München, Germany), por comparación con una curva patrón de BSA. Se separaron entre 25- 50 $\mu$ g de proteína total por pocillo en geles de poliacrilamida-SDS al 8-12% según el tamaño esperado de la proteína. Una vez separadas, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, utilizando un sistema semi-seco y el tampón transferencia: 1,46gr Tris; 0,73gr de Glicina; 0,3ml SDS (stock 20%) y 50ml Metanol en 250ml de H<sub>2</sub>O miliQ. Las membranas se tiñeron con Rojo Ponceau, para comprobar que los pocillos se habían cargado con cantidades iguales de proteína, y posteriormente se saturaron en medio 1xTBS 0.1% Tween20 + 10% de leche en polvo, durante un mínimo de 1 hora a temperatura ambiente. Tras tres lavados de 5 minutos con 1xTBS, 0.1% Tween20, se procedió a incubar las membranas con el anticuerpo primario.

Para el análisis de fusiones a GFP se usó un anticuerpo monoclonal anti-GFP (Roche Cat. No. 11 814 4460001) a una dilución 1/1000. Para las fusiones a HA se usó un anticuerpo monoclonal anti-HA conjugado a peroxidasa (Roche Cat. No. 12 013 819 001). Las membranas se incubaron 4 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C en 1xTBS 0.1% Tween20 con el anticuerpo primario y se lavaron 3 veces por 5 min en 1xTBS 0.1% Tween20. Tras estos lavados, a las membranas incubadas con el anticuerpo anti-GFP se les añadió el anticuerpo secundario. Las membranas incubadas con el anticuerpo HA conjugado a peroxidasa, por el contrario, se lavaron otras 3 veces por 5 min en 1xTBS, y se procedió a la detección del anticuerpo.

Los anticuerpos secundarios utilizados estaban conjugados a peroxidasa. Para la detección de las fusiones a GFP se utilizó un anticuerpo anti-mouse IgG (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) a una dilución 1/5000 en 1xTBS 0.1% Tween20. Las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario durante 2 horas a temperatura ambiente, y se lavaron 3x 5min en 1xTBS 0.1% Tween20 y 3x 5min en 1xTBS. Después de estos lavados se procedió a la detección del anticuerpo, incubando para ello las membranas durante dos minutos con la solución de quimioluminiscencia SuperSignal® West Pico Chemiluminiscent Substrate (Pierce Thermo Scientific), y exponiendo a una película de auto-radiografía entre 2 y 15 minutos.

## **11. Co-inmunoprecipitación de proteína con anticuerpos específicos**

En la memoria se realizaron dos ensayos de co-inmunoprecipitación (apartados 1.2 y 7.2 del capítulo de resultados) en los que se analizó si RGA:GFP o BES1:GFP eran capaces de co-inmunoprecipitar la proteína de fusión PIF4:HA. En cada uno de estos ensayos se utilizó un volumen de aproximadamente 50µl de semillas estériles, correspondientes respectivamente a las líneas pRGA::RGA:GFP y 35S::BES1:GFP. Las semillas se sembraron en medio GM y se crecieron distintas condiciones según se indica en los experimentos.

Para obtener un extracto de proteínas de estas plantas, las muestras (plántulas de 5 días) se homogenizaron en Tampón de Extracción (50mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 0.5% TX-100, 1mM PMSF + Inhibidores de Proteasas) previamente enfriado en hielo. Dicho extracto se centrifugó a 13.000rpm durante 10min y 4°C y se recuperó el sobrenadante de la centrifugación en un tubo nuevo que se volvió a centrifugar para terminar de eliminar los restos celulares. Se recogió el sobrenadante en un nuevo tubo y se reservaron 50 µl de la muestra que se utilizaron como control o "Input". El resto del extracto se utilizó para la reacción de inmunoprecipitación, según los pasos siguientes:

- i. Saturar la resina de agarosa anti-GFP (Sigma) con tampón 1xTBS suplementado con BSA (concentración final 5mg/ml) agitando durante 1h a 4°C en un agitador orbital. Pasado éste tiempo sedimentar la resina mediante un pulso de 5s a 10.000 rpm y retirar el sobrenadante. Lavar con 3 x 1ml del tampón 1xTBS.
- ii. Añadir el extracto de proteínas a 40µl de resina anti-GFP pre-incubada según se indica en el paso i).
- iii. Incubar durante 4h a 4°C, mediante agitación en un agitador orbital. En nuestro caso, debido a que PIF4 es una proteína

- fotosensible, se cubrió en ambos casos los tubos con papel de aluminio.
- iv. Pasado el tiempo de incubación, sedimentar la resina mediante un pulso de 20s a 10.000 rpm y tomar 50 µl del sobrenadante, que corresponderá a la fracción "unbound".
  - v. Lavar la resina 5 veces con 1mL de tampón de lavado (50mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1% TX-100 y 1mM PMSF) previamente enfriado. En cada uno de estos pasos, sedimentar la resina mediante un pulso de 10s a 10.000 rpm y retirar el sobrenadante con cuidado.
  - vi. Tras el último lavado, sedimentar la resina, retirar todo el sobrenadante y añadir 40µl de tampón TMx2. Calentar 3 min a 95°C y retirar el sobrenadante que corresponderá a la fracción "co-IP".

Cargar las muestras "Input", "unbound" y "co-IP" en un gel de poliacrilamida-SDS. Utilizar 40 µl del "Input" y "unbound" y 10 µl de la fracción "co-IP" para detectar la fusión a GFP y 10 µl del "Input" y "unbound" y 30 µl de la fracción "co-IP" para la detección de la proteína co-inmoprecipitada. Transferir el gel a una membrana de nitrocelulosa y detectar las proteínas correspondientes mediante western blot. Las proteínas GFP:RGA y BES1:GFP se detectaron con un anticuerpo anti-GFP (Roche). La co-inmuprecipitación de las proteínas PIF4 o PIF4-HA se analizó mediante inmunodetección con un anticuerpo específico frente a la proteína PIF4 (cedido por el Dr. Christian Fankhauser) o con un anticuerpo anti-HA conjugado a peroxidasa (Roche), respectivamente.

## **12. Expresión transitoria mediante bombardeo de células de *Arabidopsis***

Para los estudios de la actividad transcripcional de PIF4 se llevaron a cabo estudios de expresión transitoria en células de *Arabidopsis*, transformadas mediante bombardeo con una construcción reportera correspondiente al promotor del gen *LTP3* fusionado al gen GUS y diferentes construcciones efectoras que expresaban las proteínas PIF4, RGA, ΔRGA y del1RGA bajo control del promotor constitutivo 35S. Como control interno de transformación se utilizó la fusión 35S::luciferasa.

El día anterior al ensayo, se filtró una suspensión fresca (5 días después del subcultivo) de células de *Arabidopsis* en un papel de filtro y el filtro con las células se colocó sobre medio LT87 sólido, incubando toda la noche a 26°C. Cuatro horas antes del bombardeo, el filtro se transfirió a medio LT87+ 200 mM de manitol y transcurrido este tiempo las células se bombardearon con las partículas de oro recubiertas con las construcciones a analizar.

**Medio LT87:** 4.4g/L de sales Murashige and Skoog + vitaminas, 200mg/L glutamina, 500mg/L MES, 0.9 mg/L NAA, 0.1mg/L kinetina, 30g/L sacarosa, 8 g/L agar. Ajustar con KOH a pH 5.7.

Preparación de las partículas de oro:

1. Lavar 60µg de partículas de oro (1µm) con 1ml de etanol 100% durante 10 min con fuerte agitación
2. Sedimentar las partículas durante 15 min a temperatura ambiente y lavar con 1 ml de glicerol estéril al 50% durante 1 min con fuerte agitación.
3. Sedimentar las partículas 15 minutos a temperatura ambiente y si es necesario centrifugarlas unos segundos. Retirar el glicerol y lavar 4 veces con 1 ml 50% glicerol.
4. Resuspender las partículas de nuevo en 1 ml de glicerol 50%, agitar durante 10 min en vortex, y repartir en alícuotas de 30-40 µl en tubos eppendorf.
5. Conservar a -20°C.

Precipitación del DNA sobre las partículas de oro:

1. Sonicar las partículas durante 3 minutos y añadir el DNA disuelto en un volumen final de 10 µl. Agitar.
2. Añadir agitando en el vortex 25µl de CaCl<sub>2</sub> 2,5M y 10 µl de espermidina 0.1M. Mantener en agitación durante 15 segundos.
3. Dejar sedimentar en hielo durante 15 minutos y retirar el sobrenadante.
4. Añadir 500 µl de etanol al 100%, agitar 10 seg y dejar sedimentar las partículas durante 15 min en hielo.
5. Retirar el sobrenadante, añadir 200 µl de etanol al 100% y agitar durante 10 segundos.
6. Dejar sedimentar en hielo 15 minutos y retirar el sobrenadante.
7. Resuspender las partículas en 10 µl de etanol al 100% y mantener en hielo hasta su uso.

Bombardeo:

1. Esterilizar las membranas portadoras con etanol al 100% y extender sobre papel de filtro hasta que se sequen.
2. Agitar las partículas de oro vigorosamente en el vortex y aplicar 8 µl de la suspensión en el centro de las membranas portadoras. Dejar secar.
3. Poner en marcha la pistola y la bomba de vacío y regular la bombona de Helio a 200 Psi por encima de la resistencia de los discos de ruptura.
4. Colocar el disco de parada, la membrana portadora y el disco de ruptura humedecido en isopropanol en la pistola.
5. Situar la placa de Petri a la distancia adecuada, accionar el vacío y mantener a 0.1 atm.

6. Presionar el gatillo hasta que el disco de ruptura se rompa.
7. Romper el vacío, girar la placa de Petri 90° y disparar una segunda vez.
8. Retirar la placa, transferir los filtros a medio LT87 e incubar 24h a 26°C en oscuridad.

#### Análisis fluorimétrico de la actividad GUS.

La actividad GUS se determinó mediante el ensayo fluorimétrico descrito por *Jefferson* (1987). Se incubaron 50µg del extracto proteico en presencia del substrato 4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide (MUG) a 37°C y se determinó en el fluorímetro la fluorescencia del producto 4-methylumbelliferin generado. La actividad GUS se expresó en nmol de 4-MU liberados min<sup>-1</sup> µg<sup>-1</sup> de proteína.

1. Homogenizar unos 200 mg de células en 200 µl de tampón de extracción y centrifugar 5 minutos a 15000 rpm a 4°C.
2. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf.
3. Añadir 1-50 µl del extracto (50 µg de proteína) a 500 µl del tampón de reacción.
4. Después de 1-2 minutos, tomar 100 µl de la mezcla de reacción y mezclar con 900 µl del tampón de parada (tiempo 0). Incubar el resto de reacción a 37°C.
5. A intervalos regulares de 30 minutos, retirar 100 µl de la mezcla de ensayo y mezclar con 900 µl del tampón de parada (tiempo x).
6. Determinar la actividad GUS midiendo la intensidad de fluorescencia debida al producto 4-methylumbelliferin (MU) en el fluorímetro (Mini-Fluorimeter TKO 100, Hoefer Scientific Instrument), utilizando una longitud de excitación de 365 nm y una longitud de emisión de 460 nm. Utilizar una solución patrón de 4-MU para calibrar el aparato y referir la fluorescencia detectada a la de la solución patrón.

#### **Tampón de extracción:**

50mM fosfato sódico pH 7, 10 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 0.1% Sodium Lauryl Sarcosine, 0.1% Triton-X-100. El DTT puede ser sustituido por β-mercaptoetanol.

#### **Tampón de ensayo:**

1mM MUG en el tampón de extracción.

Disolver 22mg de 4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide (MUG) en 50 ml de tampón de extracción.

#### **Tampón de parada.**

0.2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>



### Análisis de la actividad Luciferasa:

La actividad luciferasa se determinó utilizando el mismo extracto de proteínas utilizado para el análisis de la actividad GUS. La luciferasa es un enzima muy lábil por lo que, una vez homogenizada la muestra, debe procederse rápidamente al ensayo de actividad. Se utilizó el Luciferase Assay Kit de Promega. La actividad se determinó en placas de microtitulación, añadiendo 100  $\mu$ l de sustrato (Luciferase Assay Reagent) a 20  $\mu$ l del extracto de proteína. Después de 3 segundos de incubación, se midió la luz emitida durante un periodo de 10s en un luminómetro (Orion Microplate Luminometer, Berthold).

## **13. Ensayo de movilidad electroforética (EMSA)**

### Preparación de la sonda de DNA de doble cadena

Para el ensayo de movilidad electroforética se utilizaron cebadores complementarios específicos, que incluían las secuencias de reconocimiento de la proteína. Estos cebadores se anillaron para obtener un fragmento de ADN de doble cadena y extremos protuberantes, según la siguiente reacción:

LTP3 G-BOXf o LTP3 G-BOXf_mt (100 $\mu$ M)	10 $\mu$ L
LTP3 G-BOXr o LTP3 G-BOXr_mt (100 $\mu$ M)	10 $\mu$ L
10x Tampón de Annealing (100mM Tris-HCl pH7,5, 1,5M NaCl, 10mM EDTA)	5 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	2 $\mu$ L
TOTAL	50 $\mu$ L (2 $\mu$ M ADN)

La mezcla de reacción se calentó a 95°C durante 10 min en un vaso de precipitados con agua y se dejó enfriar lentamente a temperatura ambiente. El vaso se pasó a la cámara fría y se dejó enfriar hasta 4°C. El DNA anillado se extrajo con fenol-cloroformo y se precipitó con etanol para eliminar los restos de la reacción de síntesis de los cebadores.

Para el ensayo de movilidad, se marcó radioactivamente el ADN silvestre de doble cadena (LTP3 G-BOXf/ LTP3 G-BOXr). Para ello se utilizaron 2 $\mu$ l del DNA anillado en la reacción anterior, 20  $\mu$ Ci de dCTP<sup>32</sup> y 2 U del enzima Klenow, en presencia de dATP, dGTP y dTTP fríos. La reacción se incubó durante 30 min a 37°C y el fragmento marcado se purificó en un gel de poliacrilamida-TBE al 6%

### Reacción de unión Proteína-ADN

Las proteínas utilizadas en el ensayo se purificaron a partir de extractos de hojas de *N. benthamiana* utilizando el siguiente tampón de extracción: 20 mM HEPES, pH 7.9, 0.5 M KCl, 1 mM EDTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% nonidet P-40, 1 mM DTT, + Inhibidores de Proteasas. Se retiró la fracción soluble mediante centrifugación y posteriormente el extracto proteico se dializó contra el tampón de la reacción de unión.

Para la reacción de unión ADN-Proteína las proteínas purificadas se incubaron durante 15 min en hielo, en presencia del fragmento de ADN marcado en la siguiente mezcla de reacción: 20mM Hepes pH7,9, 50mM KCl, 1mM EDTA, 50ng poly (dI-dC) y 20.000-40.000 cpm del ADN marcado, en un volumen final de 10 $\mu$ L. Para los estudios de competición se añadió un exceso (50-100x) del ADN de doble cadena wt o mutado frío. Los complejos se separaron en geles de poliacrilamida al 4% en 0,5X Tris-borato EDTA y la electroforesis se corrió a 4°C (90 min a 10V cm<sup>-1</sup>). Tras la separación, el gel se fijó en 10% acético, se secó sobre un papel de filtro y se expuso a un film de autoradiografía.

## 14. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

### Material de partida:

Para los estudios de inmunoprecipitación de cromatina se germinaron alrededor de 200 $\mu$ L de semillas en placas GM. Las plantas se crecieron en condiciones que favorecían la acumulación del factor de interés (en oscuridad) y el material se recogió en una luz verde de seguridad, a los 5-7 días de germinación.

### Fijación del material

Transferir las plántulas a tubos falcon, y lavar 2 veces con 40ml de agua Mili-Q para eliminar los restos de medio. Después del último lavado, retirar la mayor cantidad de agua posible y añadir 37ml del **Tampón de Extracción I** suplementado con **1% Formaldehído**. Aplicar vacío para facilitar la infiltración del tejido e incubar las muestras en esta solución durante 15 minutos.

Pasado este tiempo, parar la reacción añadiendo **Glicina** a una concentración final de 0.125M (2.5ml de 2M Glicina a los 37ml de solución de fijación). Aplicar vacío durante 5 minutos más. Proceder a lavar el tejido 2 veces con 40ml de agua Mili-Q y después del último lavado retirar todo el agua. Secar las plántulas sobre un papel absorbente y congelar las muestras en N<sub>2</sub> líquido.

### Extracción de la cromatina

Triturar las muestras en un mortero con N<sub>2</sub> líquido hasta obtener un polvo fino. Transferir el polvo a un tubo falcon de 50 ml al que se han añadido 30ml de **Tampón de Extracción 1** y mezclar con cuidado.

Filtrar la solución a través de dos capas de filtro Miracloth (Calbiochem, Cat. No.475855) y recoger el material en un nuevo tubo falcon de 50ml.

Centrifugar en centrífuga refrigerada a 4°C, durante 20min a 4000rpm.

Retirar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 1ml de **Tampón de Extraction 2**. Transferir la solución a un tubo eppendorf de 1.5ml y centrifugar a 4°C durante 10min a 13,000 rpm.

Retirar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 300µl de **Tampón de Extraction 3**.

En un tubo nuevo, añadir 300µl del **Tampón de Extraction 3** y sobre éste añadir con cuidado la solución obtenida en el paso anterior. Centrifugar durante 1h a 13,000 rpm y 4°C (aprovechar este paso para preparar el **Tampón de Lisis** y **Tampón de Dilución ChIP**).

Descartar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 200µl de **Tampón de Lisis**, procurando mantener la solución a 0°C.

Fragmentar la cromatina en el sonicador, hasta obtener fragmentos de DNA que oscilen entre 0.2-1Kb (en nuestro caso se usó el sonicador "Branson Sonifier 250" ajustado a un duty cycle = 50% y output control = 5, sonicando la muestra por 5 veces durante 12 segundos). Mantener la muestra en hielo durante 5 minutos entre cada paso de sonicado.

Centrifugar a 4°C, durante 5 minutos a 13,000 rpm y pasar el sobrenadante a un nuevo tubo. Guardar 10µl de esta solución (= "Input"). Analizar 2 µl en un gel de agarosa para comprobar la eficiencia de fragmentación del ADN.

#### Inmunoprecipitación

Añadir a la preparación de cromatina la resina anti-GFP ó anti-HA, previamente incubada en el **Tampón de Dilución ChIP** suplementado con BSA (5 mg/ml) durante 1h a 4°C en un agitador orbital y posteriormente lavada en el **Tampón de Dilución ChIP** (lavar 3 veces). Añadir 40µl de resina a la preparación de cromatina. Utilizar el mismo volumen de resina vacía como control negativo.

Incubar toda la noche en un agitador orbital y 4°C.

Preparar el **Tampón de Elución** (1% SDS, 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>) fresco. Sedimentar la resina mediante un pulso de 10s a 10,000 rpm y descartar el sobrenadante (contiene el ADN que no ha inmunoprecipitado con la proteína).

Lavar la resina con 1ml de los tampones siguientes:

a) **Tampón de Lavado de Baja Sal**: 150mM NaCl, 0.1% SDS, 1% TritonX-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl (pH8.1). Dos lavados, uno rápido y otro de 5 min.

- b) **Tampón de Lavado de Alta Sal:** 500mM NaCl, 0.1% SDS, 1% TritonX-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl (pH8.1). Dos lavados, uno rápido y otro de 5 min.
- c) **Tampón de Lavado LiCl:** 0.25M LiCl, 1% NP40, 1% sodium deoxycholate, 1mM EDTA, 10mM Tris-HCl (pH 8.1). Dos lavados, uno rápido y otro de 5 min.
- d) **Tampón TE:** 10mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA. Dos lavados, uno rápido y otro de 5 min.

Tras cada lavado sedimentar la resina mediante un pulso de 10s a 10,000 rpm y eliminar todo el sobrenadante.

Después de los lavados, eluir los complejos proteína-ADN retenidos en la columna con 250µl del **Tampón de Elución**. Agitar bien e incubar a 65°C durante 15 min en agitación. Sedimentar la resina y transferir el sobrenadante (eluído) a otro tubo. Repetir la elución y juntar los dos sobrenadantes. Tratar de la misma forma el "Input".

Añadir 20µL de 5M NaCl + 1µL RNAsa A (100mg/ml, Qiagen) y revertir los enlaces ADN-proteína formados durante la fijación, incubando a 65°C durante 6h.

Añadir 10µL de 0,5M EDTA, 20µl Tris-HCl 1M (pH 6.5) y 2.5µl de 10mg/ml proteinasa K e incubar durante 1h a 45°C.

Recuperar el ADN mediante extracción con fenol/cloroformo. Añadir 1 µl de glicógeno (actúa como carrier en la precipitación), 1/10 vol de Acetato Sódico 3M y 2.5 vol de Etanol.

Lavar con 70% etanol y resuspender el precipitado de ADN en 50µL de agua destilada. Usar entre 0,5 y 2µL en las reacciones de PCR para detectar el enriquecimiento entre los controles y el input.

#### **Soluciones stock:**

1. **2.0 M Sacarosa:** MW=342.30, 136.8 g en 200 ml
2. **1.0 M MgCl<sub>2</sub>:** MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, FW=203.31, 20.33 g en 100 ml
3. **20% Triton X-100:** 20 ml en 100 ml
4. **2.0M Glicina:** FW=75.07, 15.01 g en 100 ml
5. **5.0M NaCl:** 58.5 g en 200ml
6. **PIs:** Roche, 1697498 ó 1836145, 1 pastilla (para 50 ml) disolver en 1.0 ml dH<sub>2</sub>O para obtener un stock 50X y conservar a -20°C.
7. **Proteinasa K** (Analytical Biochemical): 10 mg/ml, disolver en H<sub>2</sub>O y conservar a -20°C.
8. **Glicógeno** (Roche or MBI)

<b>Tampón de Extracción 1</b>	<b>100 ml</b>	<b>200ml</b>
0.4M Sacarosa	20 ml 2M	40ml
10mM Tris-HCl pH 8	1 ml 1M	2ml
10mM MgCl	1ml 1M	2ml
5mM $\beta$ MEtOH	35 $\mu$ l 14.3M	70 $\mu$ l
0.1mM PMSF	50 $\mu$ l 0.2M	100 $\mu$ l
+ PIs	10 ml	20 ml
H <sub>2</sub> O	78 ml	156 ml

<b>Tampón de Extracción 2</b>	<b>10 ml</b>
0.25M Sacarosa	1.25 ml 2M
10mM Tris-HCl pH 8	100 $\mu$ l 1M
10mM MgCl <sub>2</sub>	100 $\mu$ l 1M
1% Triton X-100	0.5 ml 20%
5mM $\beta$ METOH	3.5 $\mu$ l 14.3M
0.1mM PMSF	5 $\mu$ l 0.2M
+ PIs	1ml
H <sub>2</sub> O	41.5ul

<b>Tampón de Extracción 3</b>	<b>10 ml:</b>
1.7M Sacarosa	8.5 ml 2M
10mM Tris-HCl pH 8	100 $\mu$ l 1M
0.15% Triton X-100	75 $\mu$ l 20%
2mM MgCl <sub>2</sub>	20 $\mu$ l 1M
5mM $\beta$ METOH	3.5 $\mu$ l 14.3M
0.1mM PMSF	5 $\mu$ l 0.2M
+ PIs	1ml
H <sub>2</sub> O	296 $\mu$ l

<b>Tampón de Lisis</b>	<b>5 ml:</b>
50mM Tris-HCl pH 8	0.25 ml 1M
10mM EDTA	100 $\mu$ l 0.5M
1% SDS	0.25 ml 20%
+ PIs (add freshly)	1ml
H <sub>2</sub> O	4.4ml
(= SDS lysis buffer)	

<b>Tampón de Dilución ChIP (500 ml)</b>	
0.01% SDS,	0.5 ml 10%
1.1% Triton X-100,	1.2 ml 0.5M
16.7mM Tris-HCl, pH 8.1,	8.35 ml 1.0M
167mM NaCl.	16.7 ml 5.0M

<b>Tampón de Lavado de Baja Sal (500 ml)</b>	
0.1% SDS,	5 ml 10%
1% Triton X-100,	25 ml 20%
2mM EDTA,	2 ml 0.5M
20mM Tris-HCl, pH 8.1,	10 ml 1.0M
150mM NaCl	15 ml 5.0M

<b>Tampón de Lavado de Alta Sal (500 ml)</b>	
0.1% SDS,	5 ml 10%
1% Triton X-100,	25 ml 20%
2mM EDTA,	2 ml 0.5M
20mM Tris-HCl, pH 8.1,	10 ml 1.0M
500mM NaCl.	50 ml 5.0M

**Tampón de Lavado LiCl (500 ml)**

0.25M LiCl (MW=42.39)	5.3 g
1% IGEPAL CA630,	5 ml
1% deoxycholic acid sodium	5 g
1mM EDTA,	1 ml 0.5M
10mM Tris, pH 8.1.	5 ml 1.0M

**Tampón TE (500 ml)**

10mM Tris-HCl, pH 8.0,	5 ml 1.0M
1mM EDTA	1 ml 0.5M

**15. Expresión y purificación de proteínas en *E.coli*.**

Para la expresión de las proteínas recombinantes PIF4-GST, MBP-BES1 y GST-BIN2, la región codificante correspondiente a estas proteínas se clonó en el vector pENTR/D (Invitrogen) y posteriormente se insertó mediante la reacción de la LR clonasa (Invitrogen) en los vectores de destino pDEST24, pGEX2TGW y pDESTH1, para generar las construcciones PIF4-pDEST24 (PIF4-GST), BIN2-pGEX2T (GST-BIN2) y BES1-pDESTH1 (MBP-BES1), respectivamente. Las construcciones así generadas se secuenciaron para comprobar que no se habían introducido mutaciones indeseadas y se transformaron en células de *E.coli* BL21.AI y *Rosseta*. Con las colonias positivas recién transformadas se inoculó un cultivo de 300 ml LB + antibiótico, y se dejó crecer a 37°C hasta alcanzar una  $DO_{600}=0.6$ . En este punto se añadió IPTG a 0.2mM (MBP-BES1 y GST-BIN2) ó 0.2% L-Arabinosa (PIF4-GST), y se incubó el cultivo durante 2 horas más a 30°C para inducir la expresión de la proteína de fusión. Se centrifugó entonces el cultivo bacteriano a 10,000 rpm durante 15 min y se resuspendió el sedimento bacteriano en tampón de lisis, siguiendo en los pasos siguientes el protocolo establecido por el fabricante la resina de purificación. Para las fusiones a GST se utilizó la resina "Glutathione-Uniflow Resin" (Clontech) y para las fusiones a MBP se utilizó la resina "Amilose Resin" (Biolabs).

Las células, una vez resuspendidas en tampón de lisis, se semicongelaron en N<sub>2</sub> líquido para favorecer su ruptura, se añadió lisozima y se incubaron en hielo hasta observar que la suspensión bacteriana se volvía viscosa. Se sonicó entonces la solución para acabar de favorecer la lisis bacteriana y reducir la viscosidad debida al ADN. Para ello, se utilizó el sonicador "Branson Sonifier 250" a un duty cycle 50% y control de output = 5. La solución se sonicó por 3 veces durante 15 segundos, y se añadió Tritón TX-100 a una concentración final de 0,5%, dejando incubar la solución en hielo y agitación suave durante 30min. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 20,000 rpm y 4°C durante 30 min y se separó la fracción sobrenadante que contiene las proteínas solubles. Esta fracción soluble se incubó con 200-300 µl de resina durante 4 h a 4°C en agitación suave. Después de este tiempo, se sedimentó la resina, se transfirió a una columna, y se procedió a su lavado según:

- 1 lavado de 2 ml con tampón de extracción + 0.5% TX-100.
- 1 lavado de 2ml con tampón de extracción + 0.25% TX-100
- 1 lavado de 2ml con tampón de extracción + 0.1% TX-100
- 1 lavado de 2ml con tampón de extracción + 0.05% TX-100
- 1 lavado de 2ml con tampón de extracción + Glutati3n 3 Maltosa seg3n indicado por el fabricante de la resina.

Para eluir la prote3na, se incub3 durante 15 min en tamp3n 50mM Tris-HCl pH 8 suplementado con 20mM-100mM de glutati3n o maltosa, dependiendo de la resina utilizada. Se comprob3 la concentraci3n y pureza de la prote3na eluida, mediante electroforesis SDS-PAGE junto a concentraciones crecientes de BSA y posterior tinci3n del gel con azul de *Coomassie*.

## 16. Ensayo de actividad quinasa

Los ensayos quinasa se llevaron a cabo en un volumen final de reacci3n de 25 $\mu$ l, que inclu3a 0.5 $\mu$ g de la prote3na BIN2 y 1 $\mu$ g de las prote3nas sustrato PIF4 y BES1 en tamp3n quinasa (20mM Tris-HCl pH 7.5, 50mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT), 1 $\mu$ M ATP fr3o y 5 $\mu$ Ci de [ $\gamma$ 32P]ATP. La mezcla de reacci3n se incub3 durante 40min a 30°C.

La reacci3n se par3 a3nadiendo el mismo volumen de tamp3n TMx2 y se calent3 3 min a 95°C. Las prote3nas fosforiladas se separaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS al 8%, el cual se ti3n3 con *Coomassie* para visualizar las prote3nas, y se sec3 un secador de geles (*Biorad*) por 2 horas a 65°C. La radioactividad incorporada se analiz3 usando el sistema de detecci3n "*FX molecular imager system*" (*Biorad*) y el programa "*Image Quant*" de la misma compa3a.



*Detalle de la parte subterránea de una planta de patata*

**ANTECEDENTES**



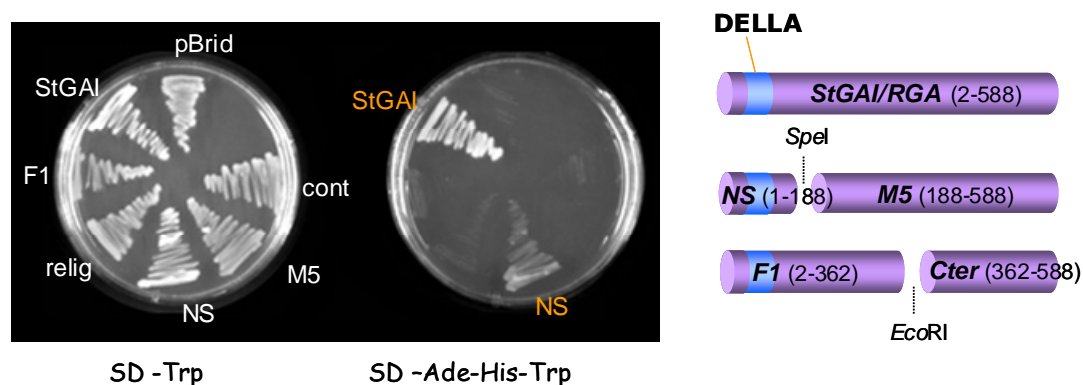




## ANTECEDENTES

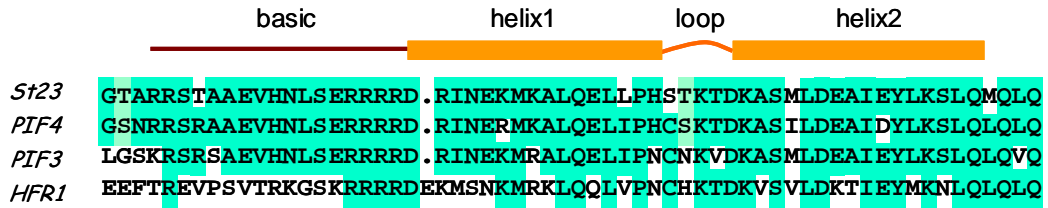
La estudiante Mariana Rodríguez-Falcón, en su trabajo de tesis doctoral, realizó un cribado doble híbrido en levadura con el fin de identificar proteínas que interaccionaran con el represor DELLA StGAI/RGA de patata. En dicho ensayo se utilizaron sendas bibliotecas de expresión, generadas a partir de cDNAs de hoja y estolón de *S. tuberosum* que habían sido cedidas por el Dr. Uwe Sonnewald (IPK-Gatersleben) y que fueron escindidas de lambda-ZAP en el laboratorio para obtener las correspondientes fusiones al GAL4-AD en el vector pGAD424.

Previo a dicho cribado, fue imprescindible obtener diferentes construcciones parciales de la proteína StGA/RGA ya que la proteína completa daba un elevado índice de autoactivación. Así, se observó que construcciones correspondientes a la mitad N-terminal (residuos 1 a 362) o C-terminal de la proteína (residuos 188 a 588) carecían de la actividad autoactivadora (Figura 23) y podían ser utilizados como proteína cebo en los ensayos de interacción.



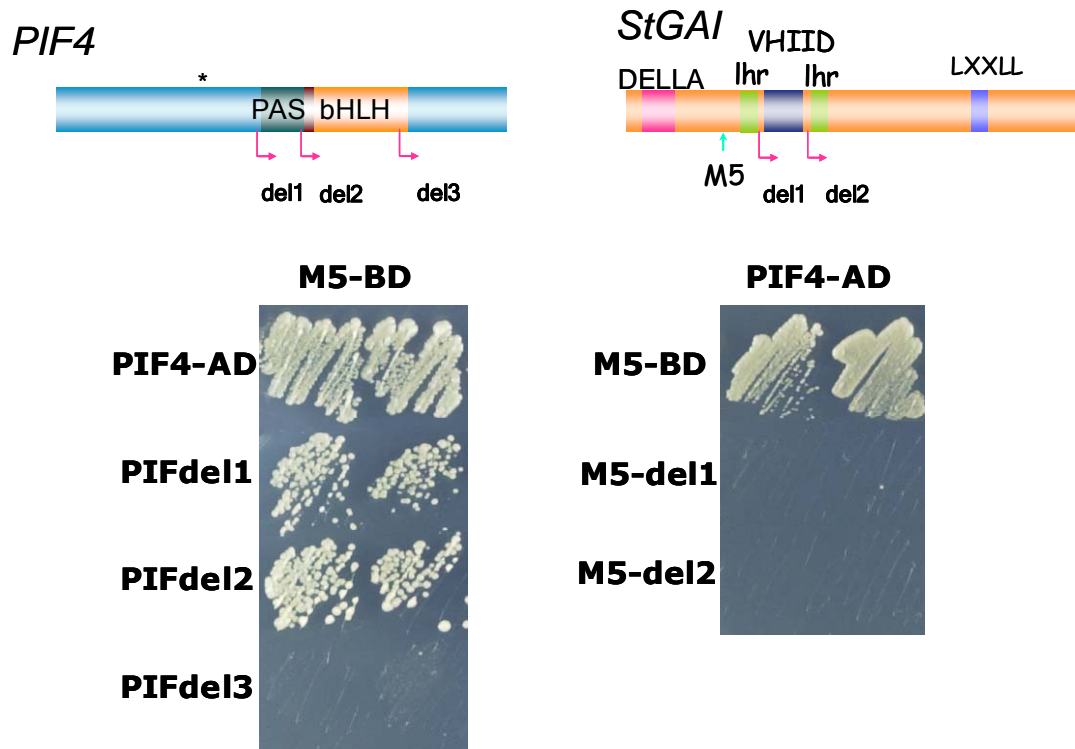
**Figura 23:** Estudio de autoactivación de la proteína StGA/RGA y sus versiones truncadas en levadura.

En sendos cribados con los fragmentos F1 y M5, se obtuvieron un total de 35 colonias positivas que se recomprobaron por interacción de los insertos correspondientes clonados en los plásmidos complementarios (los insertos positivos se clonaron en pGBKT7 y se co-transformaron con los fragmentos F1 y M5 clonados en pGADT7). Uno de los interactores más representados, aislado 6 veces en el cribado con el fragmento M5 y 3 veces en el cribado con el fragmento F1, fue un factor de transcripción (St23), que compartía un alto grado de similitud con los factores bHLH PIF3 y PIF4 de *Arabidopsis* (Fig. 24). Se aisló el cDNA completo correspondiente a este gen, al que se denominó StPIF23. Fuera del dominio bHLH, el gen de patata comparte mayor identidad con PIF4 que con PIF3, por lo que correspondería al ortólogo de patata de este gen.

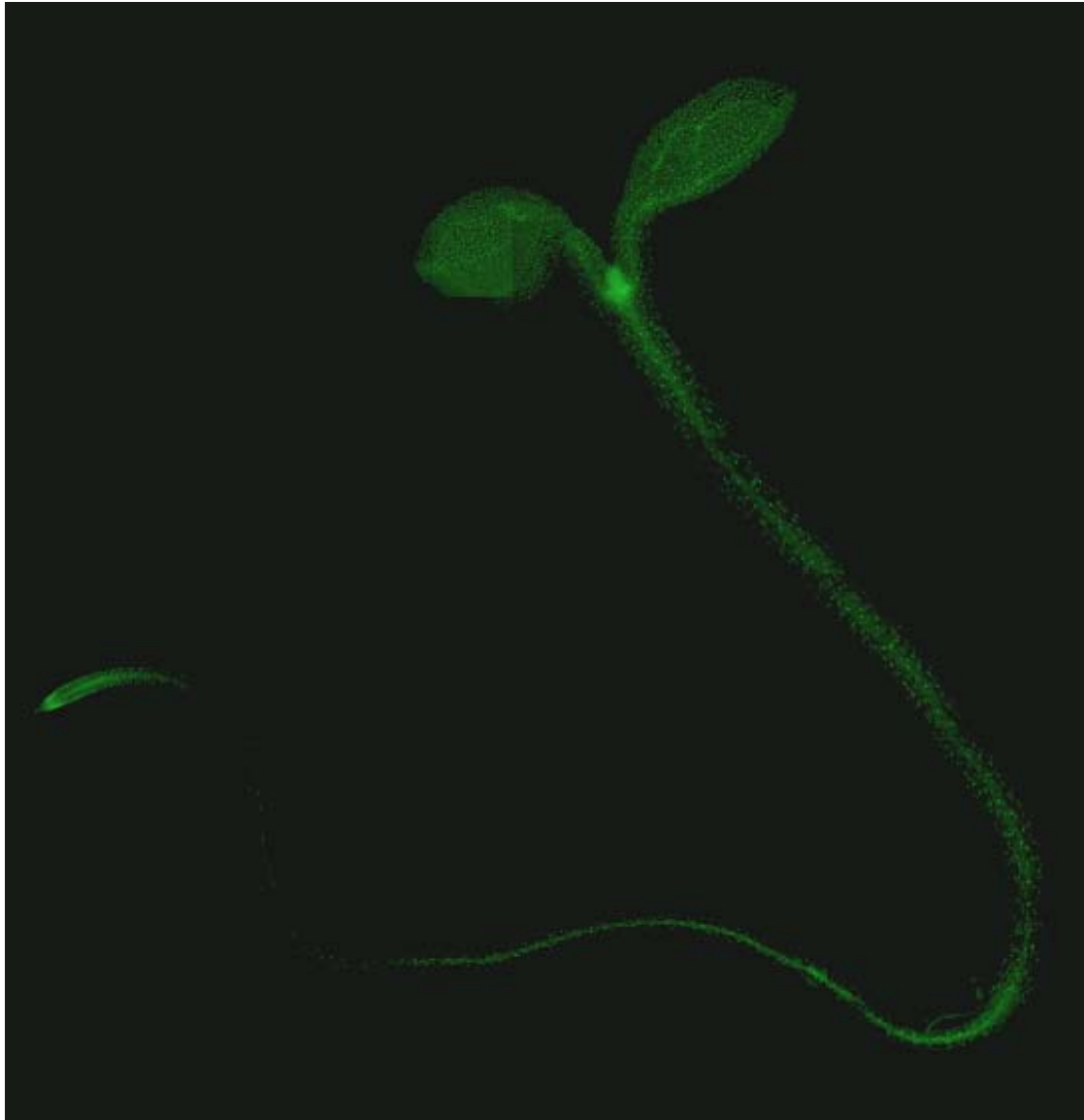


**Figura 24:** Homología de secuencia a nivel de aminoácidos entre el clon St23 obtenido en el cribado doble híbrido y las proteínas PIF4, PIF3 y HFR1 de *Arabidopsis*.

A su vez, se determinó que dominios en las respectivas proteínas median esta interacción. Se generaron diferentes deleciones de las proteínas StRGA y StPIF23, lo que permitió establecer que el dominio de interacción en StRGA corresponde a un dominio conservado tipo cremallera de leucinas, mientras que en StPIF23 el dominio de interacción es el propio dominio bHLH (Fig.26). Este resultado es especialmente significativo ya que el dominio bHLH funciona como dominio de unión al DNA. Por tanto, los represores DELLA parecerían secuestrar estos factores dando lugar a un complejo inactivo, incapaz de unirse al ADN.



**Figura 25:** Análisis de los dominios de interacción entre las proteínas StPIF23 y StGAI/RGA. Como se observa en la figura, la interacción entre PIF4 y StGAI/RGA precisa del dominio bHLH de PIF4 y la primera cremallera de leucinas de StGAI/RGA



*Observación al microscopio de fluorescencia de la planta BES1:GFP*

## ***RESULTADOS***



## RESULTADOS

### I. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA INTERACCIÓN PIF4-DELLA.

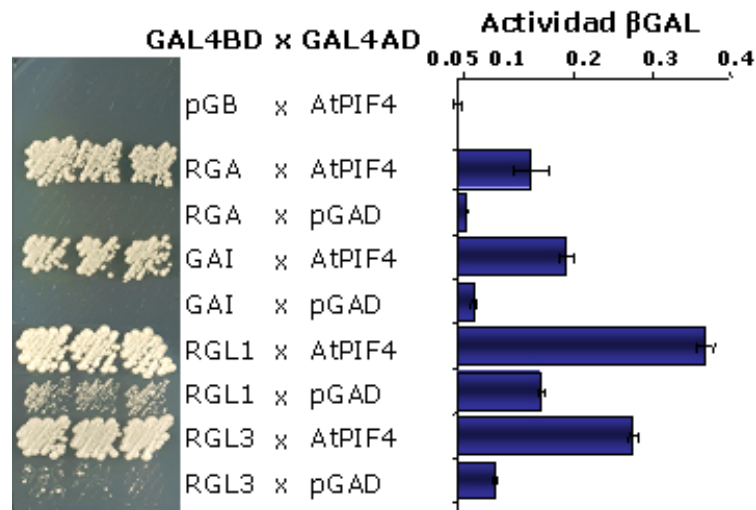
Considerando estos antecedentes y puesto que PIF4 se había identificado como un factor nuclear que une el fotoreceptor **phyB**, y se habían obtenido evidencias experimentales que indicaban que este factor regularía negativamente la ruta de señalización de phyB, promoviendo el crecimiento etiolado de la plántula, se decidió estudiar esta interacción en mayor profundidad. Resultados obtenidos por otros grupos habían, en efecto, establecido que los represores **DELLA** juegan un papel importante en el control de la **etiología** en plántulas germinadas en oscuridad. Así, consideramos que la interacción DELLA-PIF4 podría explicar el fenotipo parcialmente de-etiolado en oscuridad, de plántulas crecidas en presencia de paclobutrazol o el de los mutantes *gai1.1* y *sly1.10* (179). Por consiguiente, en un primer bloque de estudios, se confirmó esta interacción en *Arabidopsis* y se estudió la posible función de dicha interacción en la represión del crecimiento del hipocótilo ejercida por los represores DELLA.

#### 1. INTERACCIÓN DEL FACTOR PIF4 Y LOS REPRESORES DELLA DE ARABIDOPSIS.

##### 1.1. Interacción de PIF4 con las cinco proteínas DELLA de *Arabidopsis*

Para comprobar que la interacción que habíamos observado entre las proteínas PIF4 y RGA de patata, ocurría también con los correspondientes ortólogos de *Arabidopsis*, se clonó la región codificante completa correspondiente al factor PIF4 (At2g43010) y las regiones equivalentes a la construcción M5 (se excluyó el dominio DELLA que genera autoactivación) de las proteínas RGA (At2g01570), GAI (At1g14920), RGL1 (At1g66350) y RGL3 (At5g17490) en los vectores de expresión pGADT7 y pGBKT7, respectivamente. Estas construcciones se co-transformaron en la cepa AH109 de levadura y seleccionaron en medio SD-Leu-Trp y medio selectivo SD-4 para establecer la interacción entre las dos proteínas de fusión. La construcción PIF4-AD se transformó también con el vector pGBKT7 y las fusiones DELLA-BD con el vector pGADT7 vacío, para analizar el fondo debido a autoactivación de estas construcciones. Como se observa en la Figura 26, tanto en los estudios de crecimiento en medio selectivo como en los de actividad  $\beta$ -gal de los cultivos, se pudo observar una mayor actividad en las células transformadas con las fusiones PIF4-AD y DELLA-BD, indicativa de una interacción entre estas proteínas. Las fusiones RGL1-BD y RGL3-BD mostraron un mayor fondo que las fusiones RGA-BD y GAI-BD pero, en todos los

casos, la actividad de las células co-transformadas con la fusión PIF4-AD fué claramente mayor que la de las células co-transformadas con el vector pGADT7 vacío.



**Figura 26:** Estudio de interacción entre las proteínas DELLA y el factor de transcripción PIF4 de *Arabidopsis*. A la izquierda de la figura se observa el crecimiento de la levadura en medio SD-LTAH, indicando la existencia de interacción entre las proteínas DELLA y PIF4. A la derecha el resultado del análisis de la actividad β-Galactosidasa indicadora de la intensidad de la interacción.

De este resultado podemos concluir que PIF4 interacciona específicamente en levadura con las proteínas RGA, GAI, RGL1 y RGL3. Puesto que la proteína RGL2, que no fue utilizada en el ensayo, comparte una elevada semejanza con resto de proteínas DELLA, y muestra conservado el dominio cremallera de leucinas responsable de la interacción, asumimos que PIF4 también interaccionaría con esta proteína.

## 1.2. Análisis de la interacción PIF4-DELLA, mediante experimentos de Complementación Bimolecular Fluorescente (BiFC)

Una vez establecido que las proteínas de *Arabidopsis* interaccionan en levadura de forma similar a como se había observado para las proteínas de patata, decidimos estudiar si dicha interacción ocurre también en la planta. Se utilizó para ello dos aproximaciones alternativas: estudios de Complementación Bimolecular Fluorescente (BiFC) y de co-inmuprecipitación de las proteínas (co-IP).

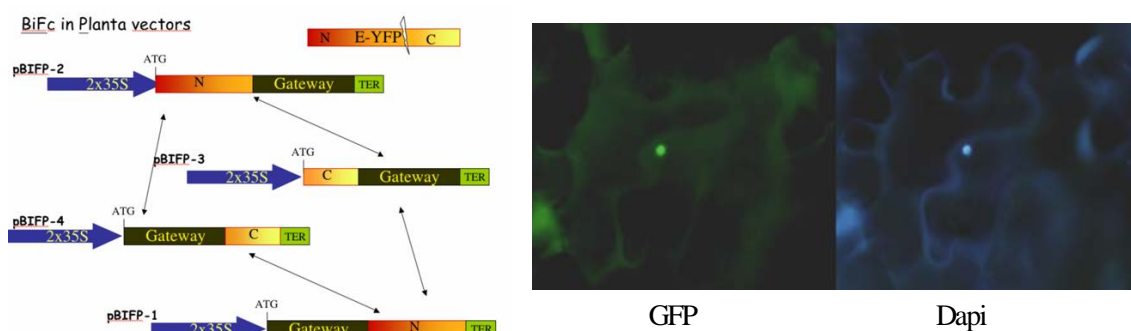
La técnica de Complementación Bimolecular Fluorescente (BiFC) fue inicialmente descrita por Hu y col. en 2002, y permite establecer la asociación entre dos proteínas en células vivas (191), en base a la fluorescencia emitida por la proteína fluorescente verde (GFP) y sus variables (YFP, CFP, BFP y RFP). Estas proteínas pueden dividirse en dos fragmentos, N- y C-terminal que por sí mismos no emiten fluorescencia pero que, al ser fusionados a dos proteínas interactoras, la proximidad de ambos fragmentos, permite una reestructuración del fluoróforo de manera que recupera su capacidad de emitir



fluorescencia. Una de las principales ventajas de esta técnica, frente a otros métodos de análisis de interacción, es que permite visualizar la interacción entre las proteínas que se estudian, y al mismo tiempo, determinar la localización celular del complejo.

Para ello, se clonaron las secuencias correspondientes a los cDNAs de PIF4 y RGA en los diferentes vectores pBiFP desarrollados por el Dr. Parcy, y que corresponden a las regiones N- y C-terminal de la proteína fluorescente eYFP, con las secuencias de inserción GATEWAY situadas en N- y C-terminal (plásmidos pBiFP1-4). Con las 8 construcciones generadas se transformaron células de *Agrobacterium* de la cepa GV3101, y estas se co-infiltraron en las combinaciones que se indican en el esquema incluido en la Figura 27 en hojas de *Nicotiana benthamiana* junto con la proteína p19, inhibidora de silenciamiento. A los dos días de la infiltración, las hojas agroinfiltradas se observaron al microscopio de fluorescencia, para determinar la presencia de fluorescencia eYFP en las células.

De las combinaciones analizadas, resultaron positivas las construcciones: 35S:Nter-eYFP:PIF4 + 35S:Cter-eYFP:RGA y 35S:PIF4:Nter-eYFP + 35S:RGA:Cter-eYFP (Fig. 27).



**Figura 27:** Esquema de las construcciones utilizadas en el experimento de Complementación Bimolecular Fluorescente (BiFC) y fluorescencia nuclear debida a la interacción entre las proteínas PIF4 y RGA. A la izquierda imagen obtenida tras la iluminación de las hojas con luz UV y filtro eYFP. A la derecha se muestra la tinción DAPI de las hojas para confirmar la localización nuclear.

Como se observa en la Figura 26, la fluorescencia se localizó en el núcleo, resultado esperado teniendo en consideración que tanto PIF4 como RGA son proteínas nucleares. El ensayo se realizó varias veces, en las que se ensayaron distintas condiciones y/o tratamientos que potenciaran la acumulación de ambas proteínas. Así, las condiciones más idóneas fueron aquellas en que las plantas infiltradas se mantuvieron en oscuridad y se trataron con 5 $\mu$ M PAC, 2 horas antes de ser observadas al microscopio. En oscuridad se evita la degradación de PIF4 y con PAC se promueve la acumulación de RGA, ya que se inhibe su degradación por el complejo SCF<sup>SLY</sup>. Como control negativo de la interacción, se utilizaron fusiones correspondientes a la proteína SLY en los vectores pBiFC.

De este resultado podemos concluir que las proteínas PIF4 y RGA interactúan en el núcleo de células vegetales, aspecto que se confirmó mediante experimentos de co-inmunoprecipitación de plantas de *Arabidopsis* que expresaban la fusión GFP:RGA.

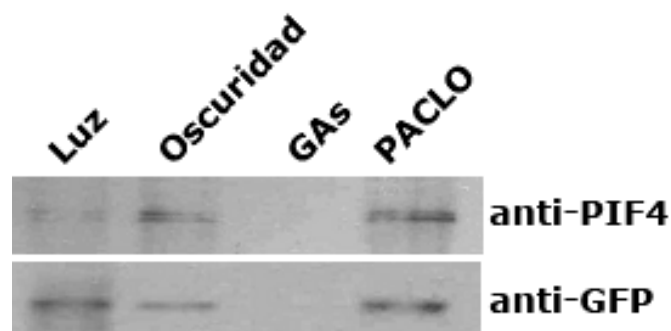
### 1.3. Análisis de la interacción PIF4/RGA mediante Co-Inmunoprecipitación con anticuerpos específicos

Con el fin de confirmar los resultados anteriores se inmunoprecipitó la proteína de fusión GFP-RGA con un anticuerpo anti-GFP y se analizó si la proteína PIF4 se detectaba también en la fracción inmunoprecipitada. Para estos estudios se utilizaron plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresaban la construcción pRGA:GFP-RGA (78), amablemente cedidas por la Dra. Tai-Ping Sun. Estas líneas resultaron particularmente útiles para este ensayo ya que permitieron inmunoprecipitar la proteína de fusión GFP-RGA con un anticuerpo anti-GFP conjugado a una resina de agarosa (ver materiales y métodos). Para analizar la presencia de PIF4 en la fracción inmunoprecipitada, se utilizó un anticuerpo específico anti-PIF4 generado en el laboratorio del Dr. Christian Fankhauser.

Se utilizaron para este ensayo plantas crecidas en distintas condiciones:

- ciclos de luz/oscuridad (16h/8h);
- oscuridad;
- oscuridad y tratadas con GAs (25 $\mu$ M)
- oscuridad y tratadas con PAC (0.5 $\mu$ M).

Las plántulas se crecieron durante 5 días en estas diferentes condiciones, transcurridos lo cuales se recogieron para obtener un extracto proteico que se incubó con 50  $\mu$ l de resina anti-GFP (Roche), siguiendo el protocolo que se describe en el apartado 11 de materiales y métodos. La fracción inmunoprecipitada se separó en geles de poliacrilamida-SDS y se analizó mediante western blot bien con un anticuerpo anti-GFP para comprobar la eficiencia de inmunoprecipitación de la proteína GFP-RGA o con el anticuerpo anti-PIF4 antes mencionado.



**Figura 28:** Resultado del análisis de co-Inmunoprecipitación de las proteínas PIF4 y GFP:RGA. Las plantas se crecieron durante 5 días en luz y oscuridad (con GAs y PACLO). PIF4 co-inmunoprecipita con GFP-RGA en dichos extractos, indicando la existencia de interacción entre ambas proteínas.

Como se observa en la Figura 28, fuimos capaces de detectar la proteína PIF4 en la fracción inmunoprecipitada correspondiente a los extractos de plantas crecidas en luz, oscuridad y oscuridad + PAC. La cantidad recuperada de la proteína fue menor en plantas crecidas en un ciclo de luz/oscuridad (16h/8h) que en oscuridad, debido a que la proteína PIF4 es menos estable en luz. Esta banda, por otra parte, era más intensa en plantas tratadas con PAC, debido a que en estas condiciones se estabiliza la proteína GFP:RGA y ésta se recupera en mayor cantidad. Por último, no se recuperó ni la proteína GFP:RGA ni la proteína PIF4 en plantas tratadas con GAs, ya que dicho tratamiento induce la rápida degradación de RGA. Este carril sirvió como control negativo del ensayo y permitió establecer que la proteína PIF4 no se une de manera inespecífica a la resina anti-GFP, sino que es recuperada debido a que forma un complejo estable con la proteína GFP-RGA.

De este resultado podemos concluir que PIF4 es co-inmunoprecipitada junto con la proteína GFP-RGA, lo que confirma una interacción entre ambas proteínas. La abundancia relativa de PIF4 en las diferentes muestras analizadas, por otra parte, concuerda con la estabilidad reportada para ambas proteínas: PIF4 es inestable en presencia de luz y RGA es rápidamente degradada en respuesta a un tratamiento con GAs.

## 2. FUNCIÓN DE PIF4 EN LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE LUZ

El factor PIF4 fue inicialmente aislado en un cribado doble híbrido en levadura destinado a identificar proteínas que interaccionasen con el fotorreceptor phyB (39). Este factor une específicamente phyB pero no interacciona con phyA, por lo que actuaría en la ruta de señalización de luz roja. Las plantas mutantes *pif4* se caracterizan por presentar hipocotilos cortos en luz roja, al contrario que las líneas que sobreexpresan PIF4, que muestran hipocótilos alargados y los cotiledones parcialmente cerrados, fenotipo este último que recuerda al de los mutantes *phyB*. Las líneas dobles mutantes *phyBpif4*, por su parte, muestran hipocotilos alargados y un fenotipo similar al de la planta *phyB*, lo que indica que la mutación *phyB* es epistática a la mutación *pif4*. Este resultado llevó a postular que PIF4 regularía negativamente la ruta de señalización mediada por phyB, responsable de inhibir el crecimiento del hipocótilo (39, 41).

Como se ha descrito en el capítulo "antecedentes", los estudios de interacción en levadura con los homólogos de patata permitieron establecer que los represores DELLA interaccionan con el dominio bHLH de PIF4 y posiblemente bloquean la capacidad de unión al ADN de este factor. Ello anularía la regulación negativa de la ruta de señalización de phyB mediada por estos factores, potenciando dicha ruta, lo que resultaría en una mayor inhibición del crecimiento del

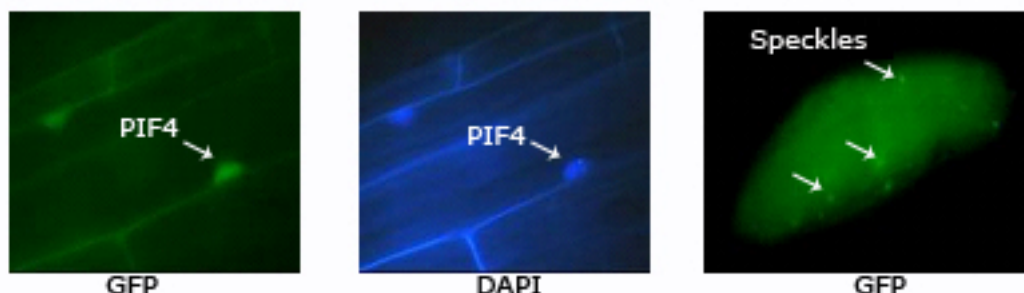
hipocótilo, tal y como se observa en los mutantes *gai1.1* y *sly1.10*, que acumulan niveles elevados de estos represores. Sin embargo, un modelo más simple capaz también de explicar el fenotipo de estos mutantes, es que PIF4 funcione como un promotor del crecimiento (las líneas PIF4-OE muestran hipocótilos alargados), y que este factor esté regulado negativamente por phyB y por los represores DELLA.

Puesto que este modelo plantea una función de PIF4 diferente a la aceptada en la literatura, se diseñó un conjunto de estudios que permitieran establecer cuál de los dos posibles modelos de acción es correcto. Así, se generaron líneas de *Arabidopsis* que expresaban la fusión PIF4:GFP y se estudió la estabilidad de dicha proteína en un fondo genético silvestre o en el fondo mutante *phyB*. Se estudió también si existían genes adicionales con una función redundante a PIF4, que explicara el fenotipo alargado de los mutantes *phyBpif4*, en caso que el segundo modelo de acción sea correcto.

### 2.1. Análisis de la estabilidad de PIF4:GFP

Para analizar los niveles de acumulación del factor PIF4 en condiciones de luz/oscuridad y determinar, en caso de observar cambios en la estabilidad de la proteína, si éstos dependen de la activación del fotorreceptor phyB, se generaron líneas transgénicas que expresaran la construcción 35S:PIF4:GFP en el fondo silvestre (Col-0) y en un fondo mutante *phyB*.

Semillas correspondientes a éstas líneas se germinaron en oscuridad y se observaron al microscopio de fluorescencia. Como se muestra en la figura 29, la fusión PIF4-GFP se detectó en el núcleo, ya que colocaliza con la tinción DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) del tejido.



**Figura 29:** Localización nuclear de la proteína de fusión PIF4:GFP en células del hipocotilo de plántulas de *Arabidopsis* crecidas en oscuridad. En la imagen de la derecha se observan unos lunares subnucleares, son los llamados Speckles cuya función parece estar relacionada con el lugar donde tiene lugar la degradación de los factores de transcripción.

Sin embargo, observamos que tras pocos minutos de exponer las plantas a la luz, la proteína formaba unos agregados subnucleares o *speckles*, descritos como sitios de activación transcripcional o de degradación de la proteína según los casos. En efecto, como se puede ver en la figura 30, la proteína de fusión se degradaba casi totalmente tras 5 min de exposición a la luz, dependiendo dicha

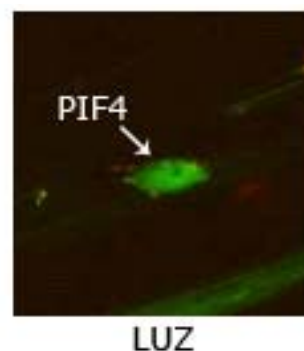
degradación del sistema proteasoma, ya que se inhibe al pretratar las plántulas con el inhibidor MG132, antes de ser expuestas a la luz.



**Figura 30:** Efecto de la luz sobre la estabilidad de la proteína PIF4:GFP en plantas silvestres. La luz induce una rápida degradación de la proteína que es inhibida por un tratamiento con el inhibidor del proteasoma, MG132.

Estudios similares con las líneas mutantes *phyB*, sin embargo, mostraron que, en este fondo genético, la proteína PIF4:GFP se mantiene estable en el núcleo, independientemente de la presencia de luz (Figura 31).

Podemos concluir de estos resultados que los factores bHLH PIF4 se acumulan en el núcleo en oscuridad, pero son rápidamente degradados en presencia de luz. El fotorreceptor *phyB* mediaría esta degradación ya que en un fondo genético *phyB* la proteína es estable.



**Figura 31:** Efecto de la luz en la estabilidad de la proteína PIF4-GFP en el fondo mutante *phyB*. El fotorreceptor *phyB* es necesario para la degradación mediada por luz de la proteína.

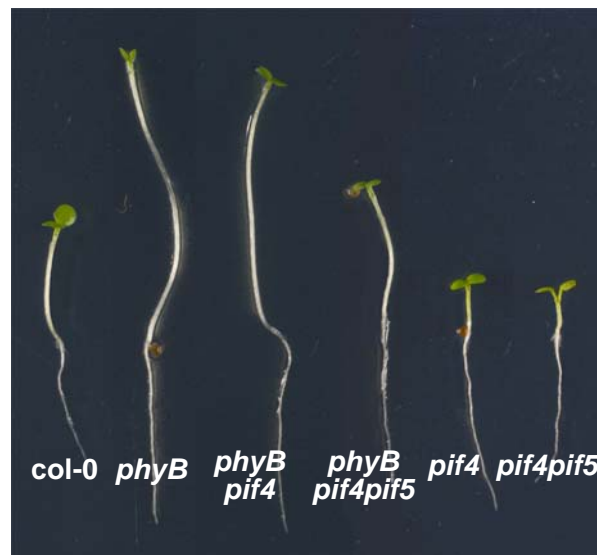
## 2.2. Fenotipos de los mutantes *phyBpif4* y *phyBpif4pif5*

Una de las evidencias genéticas que llevó a postular que PIF4 actuaría como un regulador negativo de la ruta de señalización de *phyB*, fue la observación que el doble mutante *phyBpif4* muestra un fenotipo alargado similar al de los mutantes *phyB*. Sin embargo, estudios posteriores han evidenciado que los fotorreceptores *phyA* y *phyB* regulan la estabilidad de varios de los miembros de la familia de factores de transcripción PIF. De hecho, en un elevado porcentaje de estos factores se ha identificado dominio **APB** conservado, que media la interacción con *phyB* (36). Por consiguiente, es posible que el fenotipo alargado del doble mutante *phyBpif4* se deba a la estabilización de otros miembros de la familia PIF, con una función redundante en el control de la elongación celular. Si se comparan los distintos miembros de la familia PIF en un árbol filogenético, se observa que un segundo gen, PIF5, agrupa en el mismo subclado que PIF4. Esto indicaría que ambos genes se han originado gracias a una

duplicación reciente, y es por tanto posible que conserven su función. Para comprobar esta hipótesis, se generó el triple mutante *phyBpif4pif5*, y se comparó el tamaño del hipocótilo de este mutante con el del mutante *phyBpif4*, el doble mutante *pif4pif5* y el de los mutantes sencillos *phyB*, *pif4* y *pif5*, respectivamente.

Para ello, se cruzó el mutante *phyBpif4* con el doble mutante *pif4pif5* (cedido por el Dr. Christian Fankhauser) y con la ayuda de marcadores moleculares específicos (ver materiales y métodos) se genotipó la descendencia C2 de dicho cruce para identificar la línea triple mutante *phyBpif4pif5*.

Semillas correspondientes al triple mutante, los mutantes dobles *phyBpif4* y *pif4pif5*, y los mutantes sencillos *phyB* y *pif4* se germinaron en luz y se analizó la longitud de los correspondientes hipocótilos. Como se observa en la figura 32, el mutante *phyB*, hiposensible a la luz, muestra un fenotipo etiolado característico. El doble mutante *phyBpif4* muestra, como se había descrito, un hipocotilo similar al de *phyB*. Sin embargo, el triple mutante *phyBpif4pif5* se caracteriza por presentar un hipocotilo mucho más corto que el del mutante *phyBpif4*, lo que confirmaría una función redundante de los factores PIF4 y PIF5, aguas abajo de la ruta de señalización mediada por *phyB*.



**Figura 32:** Fenotipo de los mutantes *phyB*, *pif4*, *pif4pif5*, *phyBpif4pif5* y el triple mutante *phyBpif4pif5*. El triple mutante muestra un hipocótilo más corto que el mutante *phyBpif4*, confirmando así una función redundante de los factores PIF4 y PIF5 en el control de la elongación del hipocótilo.

El doble mutante *pif4pif5*, por otra parte, muestra un hipocótilo más corto que el mutante sencillo *pif4*, lo que estaría de acuerdo con una función redundante de ambos genes. Es de destacar que el hipocótilo del triple mutante *phyBpif4pif5*, es aún más alargado que

el del mutante *pif4*, lo que indicaría una función adicional de otros miembros de la familia PIF en el alargamiento del hipocótilo.

Este resultado, junto con el observado en los estudios de estabilidad de la proteína PIF4:GFP en el fondo mutante *phyB*, confirmaría que PIF4 actúa por debajo de *phyB* promoviendo el crecimiento del hipocótilo y que este factor está negativamente regulado por *phyB* que, al ser translocado al núcleo en luz, induce la rápida degradación de este factor por el sistema 26S-proteasoma.

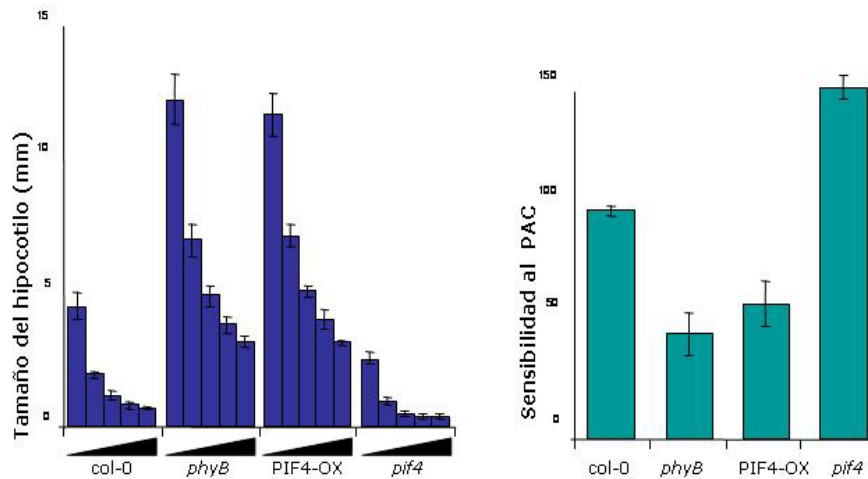
### 3. FUNCIÓN DE LA INTERACCIÓN PIF4-DELLA

Una vez habíamos demostrado que los factores PIF interaccionan con los represores DELLA tanto *in vitro*, como *in vivo* en células de *benthamiana* y *Arabidopsis*, decidimos proceder a la caracterización funcional de dicha interacción. El disponer de líneas mutantes y de líneas que sobreexpresan el gen PIF4 y los represores DELLA en *Arabidopsis*, así como de líneas mutantes para diferentes genes implicados en la señalización de fitocromo y/o GAs nos permitió el diseño de experimentos encaminados a determinar que procesos de desarrollo se verían afectados gracias a esta interacción. En este apartado se reportan una serie de abordajes genómicos y genéticos encaminados a determinar la función de factor PIF4, y la modulación de la actividad transcripcional de estos factores, por los represores DELLA.

#### 3.1. Respuesta alterada de las plantas PIF4OX y *pif4* al tratamiento con GAs

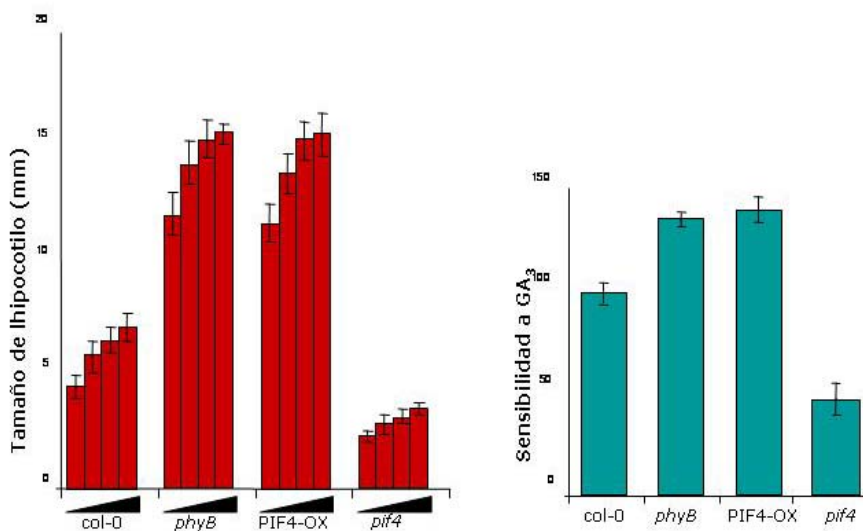
Un primer paso para comprender la función biológica del complejo PIF4-DELLA, consistió en comprobar si las líneas PIF4OX y *pif4* respondían de manera diferente que las líneas silvestres a un tratamiento con GAs (inducen la degradación de las DELLAs) o con el inhibidor PAC (induce la acumulación de estos represores), lo que sería indicativo de una función del factor PIF4 en la ruta de señalización de estas hormonas.

Así, se germinaron semillas silvestres (*col-0*), PIF4OX, y semillas mutantes *pif4* y *phyB*, en medio de germinación suplementado con concentraciones crecientes (0, 0.025, 0.05, 0.1 y 0.2 $\mu$ M) del inhibidor de síntesis de GAs, paclobutrazol (PAC). Al quinto día después de la germinación se midieron los hipocotilos de al menos 20 plantas crecidas en estas condiciones y se calculó la sensibilidad de estas plantas a dicho tratamiento en relación a la respuesta observada en las líneas *col-0* control (Fig. 33). El experimento se realizó tres veces con similares resultados.



**Figura 33:** Efecto de concentraciones crecientes de PAC sobre la longitud del hipocótilo de plantas silvestres (*col-0*) y las líneas *phyB*, PIF4OX y *pif4*. Las plantas se midieron al quinto día después de la germinación. A la derecha se muestra el gráfico que representa la sensibilidad al PAC. Las plantas que acumulan PIF4 son menos sensibles al inhibidor.

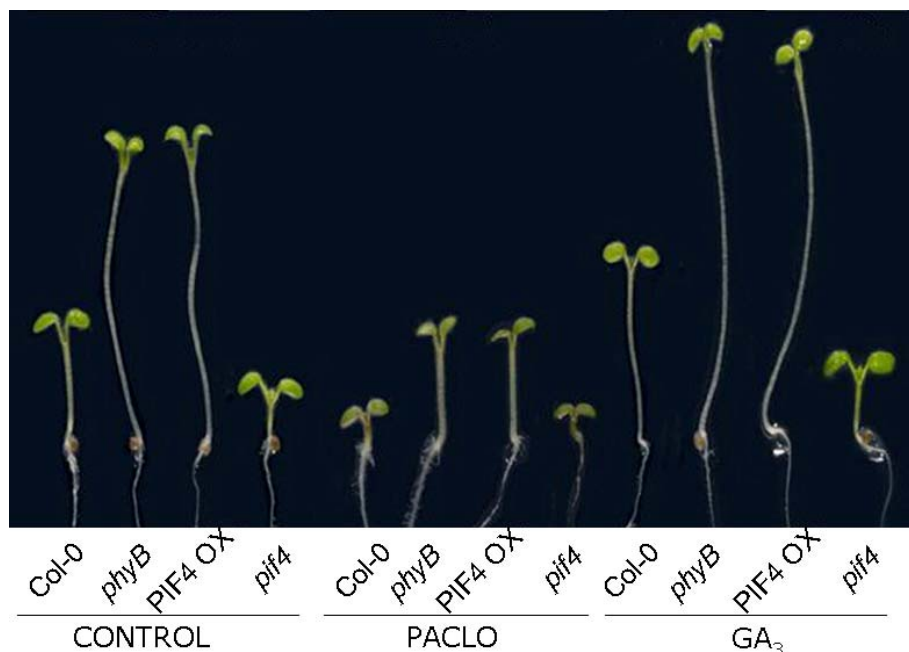
Se germinaron también semillas en medio de germinación suplementado con concentraciones crecientes de  $GA_3$  (0, 2.5, 5 y  $10\mu M$ ) y se calculó la sensibilidad de las plantas a dicho tratamiento, igual que para los tratamientos con PAC (Fig. 34). El experimento se repitió igual que antes tres veces, con resultados similares.



**Figura 34:** Efecto del tratamiento con concentraciones crecientes de  $GA_3$  sobre la longitud del hipocótilo de plantas silvestres (*col-0*) y las líneas *phyB*, PIF4OX y *pif4*. Las plantas se midieron al quinto día después de la germinación. A la derecha se muestra el gráfico que representa la sensibilidad a las GAs. Las plantas deficientes en PIF4 son menos sensibles a la hormona.

Estos estudios confirmaron que las plantas *phyB* y PIF4OX son menos sensibles a PAC, en tanto que la línea mutante *pif4* es hipersensible a dicho tratamiento (Figuras 34-36). Por el contrario, las líneas *phyB* y PIF4OX muestran una respuesta exagerada al tratamiento con  $GA_3$ , mientras que el mutante *pif4* es hiposensible a tratamientos con esta hormona.





**Figura 35:** Fenotipo de las plantas *phyB*, *PIF4OX* y *pif4*, tratadas con 0.1 $\mu$ M PAC o 5  $\mu$ M GA<sub>3</sub>. Las plantas fueron crecidas durante cinco días en luz roja continua en cada tratamiento. Como en las gráficas anteriores, las plantas que acumula PIF4 son hiposensibles al PAC e hipersensibles a las GAS.

De estos resultados se infiere que las líneas *PIF4OX* y *pif4* muestran una respuesta alterada a GAs, lo que implica este factor en la respuesta de alargamiento del hipocótilo inducida por estas hormonas.

### 3.2. Identificación de genes regulados por PIF4

A fin de identificar que genes están regulados a nivel transcripcional por PIF4, se comparó el perfil transcriptómico de las líneas *PIF4OX* y mutantes *pif4pif5* crecidas en luz roja con el de plantas silvestres *col-0*, mediante hibridación de chips de ADN (dos colores de Agilent®).

Se germinaron las semillas en medio de germinación y se crecieron en placa durante 5 días en luz roja, tras los cuales se recogió las semillas y se extrajo el ARN. Se prepararon 3 réplicas biológicas de cada muestra, y se comprobó la expresión diferencial del gen PIF4 antes de enviar los ARNs así obtenidos al servicio de genómica del CNB para la hibridación de los chips de ADN y análisis estadístico de los resultados.

De los resultados de la hibridación, se seleccionaron aquellos genes que estaban sobre-expresados en las líneas *PIF4OX* y reprimidos en el mutante *pif4pif5*, basándose en los siguientes criterios de selección:

- una intensidad de señal >2.
- una diferencia entre muestras (fold change) >1.5.
- un p-valor de significación estadística <0.05.

En la tabla 4 que se incluye en la sección de anexos, se muestra un listado de los genes que, en base a estos parámetros, mostraron una expresión diferencial. En dicha tabla se observa que el número de genes que muestran ser sobre-expresados en las líneas PIF4OX con respecto a col-0, es similar al número de genes reprimidos, lo que parecería apoyar una función de PIF4 como activador transcripcional, en lugar de una función de este factor en la represión de genes activados por la ruta de señalización de phyB.

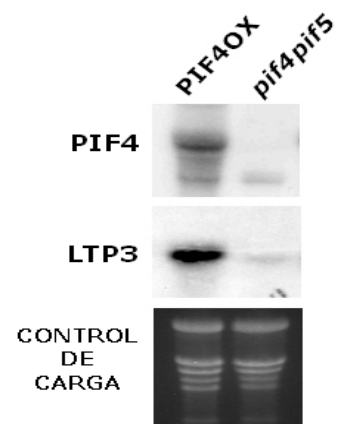
Se puede observar también que una parte importante de los genes sobre-expresados en las líneas PIF4OX y reprimidos en el mutante *pif4pif5* corresponden a genes implicados en la degradación de la pared celular y que por consiguiente tendrían una función en elongación celular. Estos resultados indicarían que la función de PIF4 es promover la elongación del hipocótilo, activando la expresión de genes implicados en elongación celular. Esto explicaría también la función represora de las proteínas DELLA, ya que estos represores al ocupar el dominio de unión al ADN de estos factores, inhibirían la expresión de los genes implicados en debilitar la pared celular, causando así una inhibición del crecimiento del hipocótilo.

### 3.3. Análisis de la actividad transcripcional de PIF4 por expresión transitoria en células de *Arabidopsis*

Uno de los genes con unos niveles mayores de sobre-expresión en las plantas PIF4OX y que mostró estar reprimido en el mutante *pif4pif5* es el gen At5g59320 (*LTP3*). Esta expresión diferencial se comprobó por northern blot, lo que permitió establecer que el transcrito *LTP3* se acumula a niveles elevados en las líneas PIF4OX, pero apenas se detecta en el mutante *pif4pif5* (Figura 36).

El gen *LTP3*, por otra parte, incluye en su región promotora varios motivos G-box, conocidos como secuencias de reconocimiento de los factores bHLH, lo que hace que éste sea un buen candidato para estudiar la actividad transcripcional de PIF4.

Para ello, se realizaron experimentos de expresión transitoria en células de *Arabidopsis*, transformadas mediante biobalística con 3 tipos de construcciones: 1) una construcción reportera, correspondiente al promotor del gen *LTP3* fusionado al gen  $\beta$ -glucuronidasa (GUS); 2) una construcción efectora, que expresaba el factor PIF4 bajo control del promotor constitutivo 35S; y 3) la construcción 35S::LUC, utilizada como marcador de la eficiencia de



**Figura 36:** Niveles de los transcritos PIF4 y LTP3 en plantas PIF4OX y *pif4pif5*.

transformación. Junto con estas construcciones se co-transformaron construcciones correspondientes a los represores RGA,  $\Delta$ RGA (estable en presencia de GAs) y *del1*RGA (delección que no une PIF4), bajo control del promotor 35S, lo que permitió estudiar el efecto de estos represores en la actividad transcripcional de PIF4. Las construcciones utilizadas, se sumarizan en la siguiente tabla:

<b>35S::LUC</b>	Plásmido pUC18 que incluye el promotor 35SCaMV fusionado a la región codificante del gen LUC.
<b>35S::pUC18</b>	Plásmido pUC18 que incluye el promotor 35SCaMV y el terminador <i>nos</i> . Dicho plásmido se usó para igualar la cantidad de ADN utilizado en cada transformación.
<b>pLTP3::GUS</b>	Plásmido pUC18 que porta el fragmento -1062 a +4 del promotor LTP3 fusionado al gen GUS y el terminador <i>nos</i> . El promotor se amplificó con los cebadores LTPfor y LTPrev y se insertó en la diana <i>Sma</i> I del vector pGUS.
<b>35S::PIF4</b>	Plásmido pUC18 que incluye el promotor 35S fusionado a la región codificante del gen PIF4.
<b>35S::RGA</b>	Plásmido pUC18 que incluye el promotor 35S fusionado a la región codificante del gen RGA.
<b>35S::<math>\Delta</math>RGA</b>	Plásmido pUC18 que incluye el promotor 35S fusionado a la región codificante del gen $\Delta$ RGA, con una delección en el dominio DELLA.
<b>35S::<i>del1</i>RGA</b>	Plásmido pUC18 que porta el promotor 35S fusionado a una delección de la proteína RGA, incapaz de interactuar con PIF4.

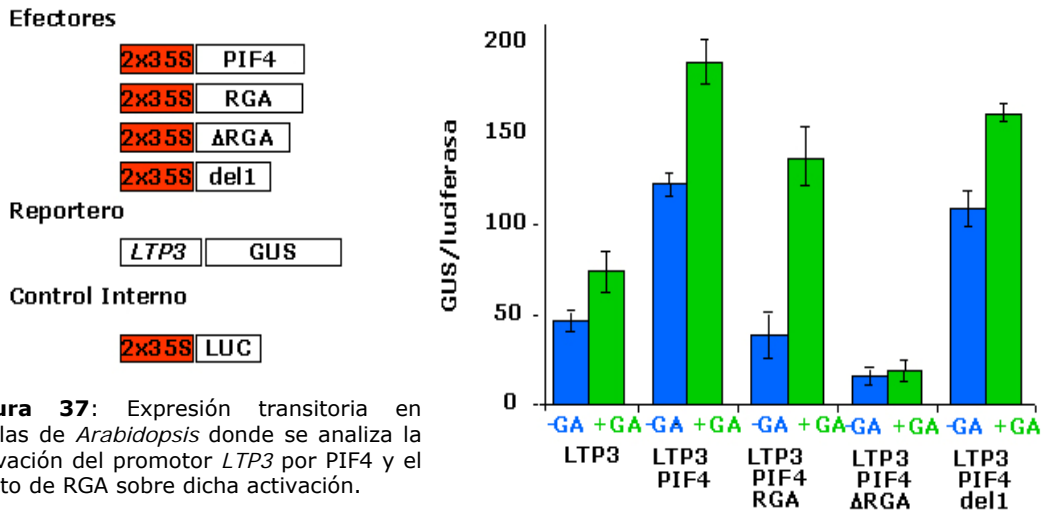
A fin de establecer si el factor PIF4 funciona como un activador transcripcional del gen LTP3 y analizar de qué modo las proteínas DELLA afectarían su actividad transcripcional, se usó las siguientes combinaciones de plásmidos:

- a. 35S::LUC, pLTP3::GUS
- b. 35S::LUC, pLTP3::GUS, 35S::PIF4
- c. 35S::LUC, pLTP3::GUS, 35S::PIF4, 35S:RGA
- d. 35S::LUC, pLTP3::GUS, 35S::PIF4, 35S:  $\Delta$ RGA
- e. 35S::LUC, pLTP3::GUS, 35S::PIF4, 35S::*del1*RGA

Las células, una vez transformadas, se cultivaron durante 2 días en luz tenue en medio LT87 ó medio LT87 suplementado con 25 $\mu$ M GA<sub>3</sub>, y transcurrido este tiempo se recogió unos 200 $\mu$ l de material, procediéndose a analizar la actividad GUS (refleja la transcripción del promotor *LTP3*) y LUC (permite normalizar la eficiencia de transformación entre disparos) de las muestras.

Como se observa en la Figura 37, la transfección de la construcción *LTP3*::GUS sólo (**a**) dio un cierto nivel de actividad, que corresponde a la expresión basal del gen. En células transfectadas con esta construcción + la construcción efectora 35S::PIF4 (**b**), se observó un incremento de más de 2 veces en la actividad del gen, debido a su activación por el factor PIF4. La co-expresión de PIF4 y

RGA (c) o PIF4 y  $\Delta$ RGA (d) inhibe la activación del promotor *LTP3* a niveles inferiores incluso que los basales.



**Figura 37:** Expresión transitoria en células de *Arabidopsis* donde se analiza la activación del promotor *LTP3* por PIF4 y el efecto de RGA sobre dicha activación.

Mientras que el tratamiento con GAs revierte la inhibición causada por la expresión del represor RGA (c), no es capaz de revertir la inhibición que resulta de expresar la proteína  $\Delta$ RGA (d), la cuál es estable en presencia de GAs. Por último, la co-expresión de PIF4 y la proteína *del1*RGA (d) (carece de la región que media la interacción con PIF4) apenas causa una inhibición de la actividad transcripcional de PIF4, lo que indica que dicha inhibición es debida a la unión de RGA al dominio de unión al ADN de PIF4.

Estos resultados demuestran que PIF4 es un activador transcripcional del gen *LTP3* y que RGA inhibe dicha actividad transcripcional al unirse a la región bHLH de este factor, necesaria para la unión al ADN del factor. La co-expresión de una delección de la proteína RGA que carece del dominio cremallera de leucinas no afecta la actividad transcripcional de PIF4, lo que demostraría que dicha represión es debida a un bloqueo de la capacidad de unión al ADN del factor.

### 3.4. Estudio de la capacidad de unión al ADN de PIF4 mediante Ensayo de Movilidad Electroforética (EMSA)

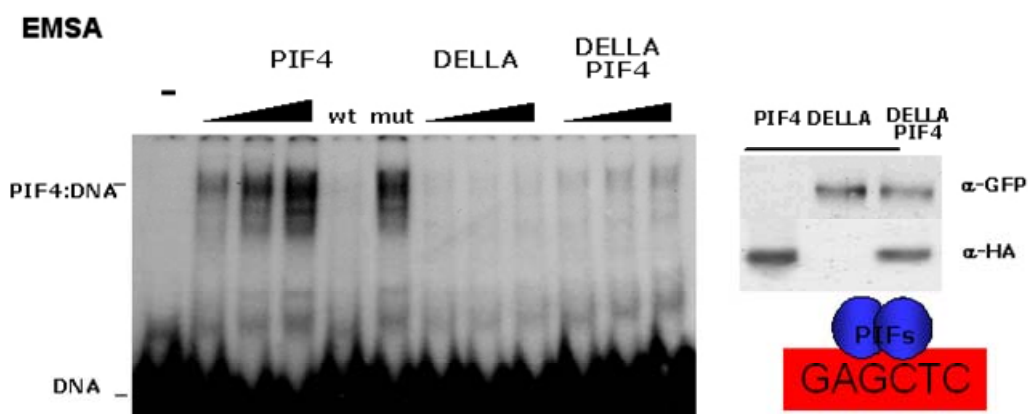
Para comprobar esta hipótesis, se llevaron a cabo ensayos de movilidad electroforética (EMSA), utilizando extractos proteicos de hojas de *benthamiana* que expresaban PIF4 ó ambas proteínas, PIF4 y RGA. Estos ensayos permiten estudiar si una proteína ó mezcla de proteínas se une a una determinada secuencia de ADN ya que, cuando se separan en un gel de poliacrilamida, el complejo proteína-ADN se desplaza más lentamente en el gel que la propia molécula de ADN libre.

Mediante este ensayo pretendíamos confirmar que:

- PIF4 interacciona directamente con los elementos G-box presentes en la región promotora del gen *LTP3*.
- los represores DELLA, al unirse al dominio bHLH de PIF4, bloquean la capacidad de unión al ADN de este factor.

Para la obtención de extractos proteicos enriquecidos en el factor PIF4 o la combinación de las dos proteínas, se agroinfiltraron hojas de *N. benthamiana* con la construcción 35S::PIF4-HA ó con ambas construcciones 35S::PIF4-HA y 35S::GFP-RGA. A los dos días de infiltrar las hojas, se comprobó la expresión de la fusión GFP en el microscopio de fluorescencia y se recogió el material para su extracción. Los extractos obtenidos se analizaron por western blot para comprobar la expresión de ambas proteínas, y se incubaron con un fragmento de ADN correspondiente a la región promotora del gen *LTP3* marcado radioactivamente. Las muestras así incubadas se separaron en un gel de poliácridamida al 5%, el cual se fijó, secó sobre un papel Whatman y se expuso a un film de autoradiografía.

En la figura 38 puede observarse la formación de una banda de retardación correspondiente al complejo PIF4-ADN, en las muestras incubadas con los extractos de hojas transformadas con la construcción 35S::PIF4-HA. Dicha banda de retardación no se observa en los carriles correspondientes al ADN marcado (-) o al ADN incubado con los extractos de hojas transformadas con la construcción 35SS::GFP-RGA, lo que indicaría que el represor RGA es incapaz de unirse a la región promotora de este gen. La banda observada, por otra parte, corresponde a una unión específica de PIF4 al elemento G-box presente en el fragmento *LTP3*, ya que puede ser competida por un exceso de ADN silvestre (**wt**), pero no por un exceso de ADN mutante (**mut**), en el que el motivo G-box CACGTG se mutó a CACGTt.



**Figura 38:** Ensayo de movilidad electroforética en que se incubó un fragmento del promotor correspondiente al gen *LTP3* con extractos proteicos que expresan las proteínas PIF4, RGA y PIF4 + RGA. A la derecha se muestra el resultado del ensayo western blot para analizar los niveles de expresión de las diferentes proteínas.

Podemos observar que los extractos de hojas transformadas con las construcciones 35S::PIF4-HA y 35S::GFP-RGA presentan una banda de retardación mucho menos intensa que la que se observa con los extractos de hojas transformadas con la construcción 35S::PIF4-HA, a pesar que los niveles de expresión del factor PIF4 son similares en ambos extractos (se observa en el western que se incluye en la figura 38).

Este resultado demostraría que las DELLA bloquean la unión al ADN de PIF4 y por tanto secuestran este factor en un complejo transcripcionalmente inactivo.

### **3.5. Análisis *in vivo* de la actividad transcripcional de PIF4 mediante experimentos de Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP)**

Con el fin de demostrar en un sistema *in vivo* que las DELLA secuestran el factor PIF4 en un complejo inactivo, incapaz de unirse al ADN, se llevaron a cabo estudios de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) en plantas de *Arabidopsis*. Esta técnica es particularmente informativa, ya que permite un enriquecimiento selectivo de las regiones promotoras a las que un factor se encuentra unido, mediante la inmunoprecipitación de este factor y posterior amplificación de los fragmentos de ADN co-inmunoprecipitados con éste.

La técnica se basa en un primer paso de entrecruzamiento del ADN unido al factor, mediante incubación con formaldehído (se forman enlaces estables entre los complejos proteína-proteína y proteína-ADN), seguido de un segundo paso de inmunoprecipitación, en el que se inmunoprecipita con un anticuerpo específico los complejos proteína-ADN. Los fragmentos de ADN así obtenidos son entonces amplificados por PCR para determinar si han sido o no enriquecidos en la fracción inmunoprecipitada.

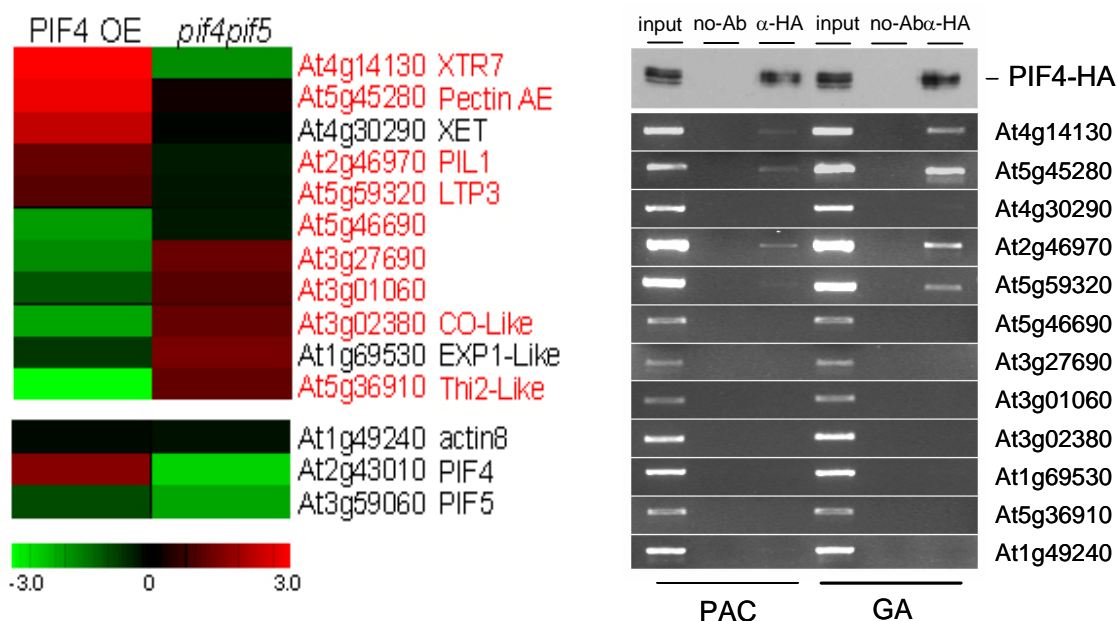
Para estos estudios se utilizaron líneas transgénicas de *Arabidopsis* que expresaban la fusión 35S::PIF4-HA, las cuáles fueron cedidas por el Dr. Christian Fankhauser (Univ. de Lausanne). Las plantas se crecieron sobre papel en medio de germinación, en luz roja continua, durante 6 días, transcurridos los cuales se transfirieron a medio suplementado con GAs o PAC, y se mantuvieron en oscuridad durante la noche.

Para cada ensayo se utilizó alrededor de 2g de material, que se fijó con formaldehído e inmunoprecipitó con un anticuerpo anti-HA (Roche), tal y como se detalla en materiales y métodos. La fracción inmunoprecipitada se incubó a 65°C para revertir las uniones proteína-ADN generadas durante la incubación con formaldehído, se

extrajo con fenol y se precipitó en presencia de glicógeno para recuperar los fragmentos de ADN.

La fracción así purificada se utilizó como molde en reacciones PCR, en las que se amplificó, con cebadores específicos, la región promotora de distintos genes que mostraron una expresión diferencial en las líneas PIF4OX y las líneas mutantes *pif4pif5* (Fig. 39). Se seleccionaron para estos ensayos 4 tipos de genes:

- genes sobreexpresados en las líneas PIF4OX y que presentan elementos G-box en su región promotora.
- genes sobreexpresados en las líneas PIF4OX y que no presentan elementos G-box en su región promotora.
- genes reprimidos en las líneas PIF4OX que presentan elementos G-box en su región promotora.
- genes reprimidos en las líneas PIF4OX que no presentan elementos G-box en su región promotora.



**Figura 39:** Listado de genes que mostraron una expresión diferencial en las plantas PIF4OE y *pif4pif5* (izquierda) y que fueron utilizados en las reacciones de amplificación PCR de la fracción inmunoprecipitada (derecha). En rojo se muestran aquellos genes que presentan un motivo G-BOX en su región promotora.

Como se muestra en la Figura 36, en las reacciones PCR de la fracción inmunoprecipitada se amplificó las regiones promotoras de los genes At4g14130 (*XTR7*), At5g45280 (*PectinAE*), At2g46970 (*PIL1*) y At5g59320 (*LTP3*), que están sobreexpresados en las plantas PIF4OX y además presentan motivos G-box en su región promotora. Sorprendentemente, no se consiguió amplificar los genes At4g30290 (*XET*) y At5g46690, los cuáles a pesar de estar sobreexpresados en las líneas PIF4OX, no presentan elementos G-box en su promotor.

Respecto a los genes At3g27690, At3g01060, At3g02380 (*CO-like*), y At5g36910 (*Thi2-like*), que muestran elementos G-box en su promotor pero se encuentran reprimidos en las líneas PIF4OX,

ninguno de ellos estaba representado en la fracción inmuno-precipitada, como tampoco lo estaba el gen At1g69530 (*EXP1-like*) que no presenta ninguna caja G-box en su promotor. Ello indicaría que estos genes no son dianas directas del factor PIF4, sino que estarían regulados por algún otro factor que está a su vez controlado por PIF4.

Por otra parte, la eficiencia de amplificación de los genes At4g14130, At5g42280, At2g46970 y At5g59320, fue claramente menor en las muestras tratadas con PAC que en las tratadas con GAs, lo que corroboraría que las DELLA (se acumulan en presencia de PAC) reprimen la unión al ADN de PIF4.

De estos resultados podemos concluir que PIF4 es un activador transcripcional que promueve la elongación celular, al unirse a los elementos G-box presentes en la región promotora de un número de genes con una función en la degradación de la pared celular y activar su expresión. Los represores DELLA, por otra parte, reprimen la actividad transcripcional de PIF4, al unirse al dominio bHLH de este factor, secuestrándolo en un complejo incapaz de unirse al ADN.

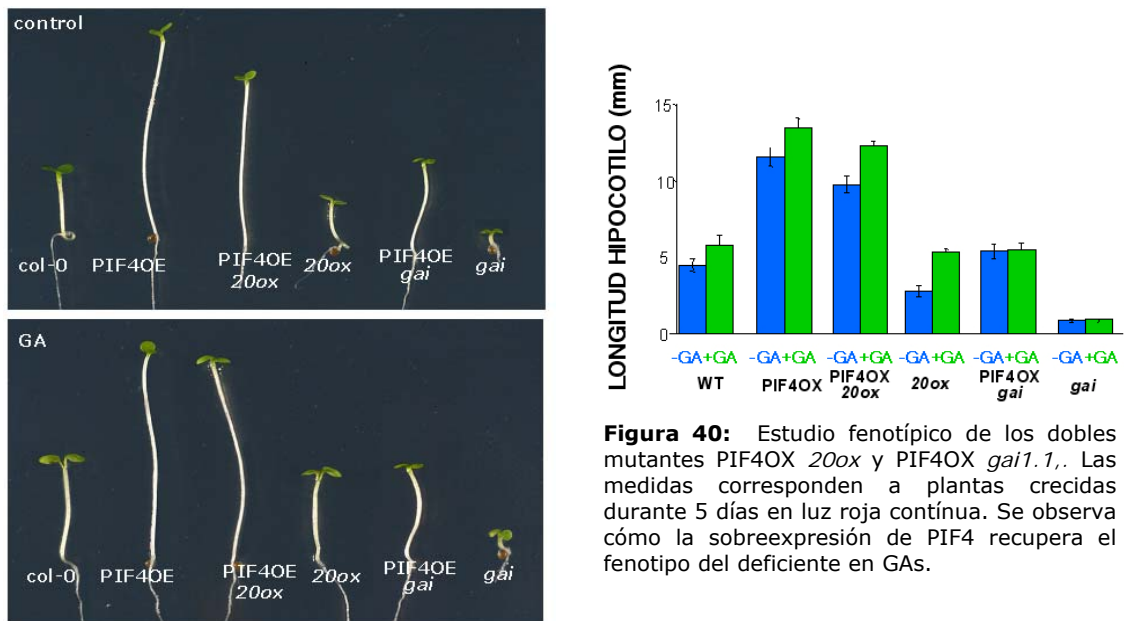
### **3.6. Comprobación fenotípica de la represión transcripcional mediada por las DELLA**

Los experimentos de expresión transitoria, EMSA e inmunoprecipitación de cromatina ponen de manifiesto que las DELLA reprimen la actividad transcripcional de PIF4, al impedir su unión al ADN.

A fin de confirmar mediante estudios fenotípicos dicho efecto represor, se cruzaron las líneas PIF4OX con líneas deficientes en la síntesis de GAs (acumulan las DELLA) o las líneas mutantes *gai1.1*, que acumulan una forma estable del represor. Como línea deficiente en GAs se utilizó una línea de inserción en el gen *GA 20-oxidasa1* (*20-ox*) cedida por los Dres. Omar Rivero y Peter Hedden. Esta línea se usó a pesar del fenotipo débil de este mutante, dado que dicha mutación se hallaba en el fondo col-0, igual que la sobreexpresión de PIF4. La mutación *gai1.1*, sin embargo, fue inicialmente aislada en el fondo genético *Ler*, por lo que las líneas PIF4OX *gai1.1* corresponden a una mezcla de ambos genotipos.

El análisis fenotípico de las líneas generadas, evidenció que las líneas PIF4OX *20-ox* presentan un hypocótilo alargado, pero de menor longitud que las líneas PIF4OX. Las líneas PIF4OX *gai1-1*, por su parte, muestran un fenotipo intermedio entre las líneas PIF4OX y *gai1.1*, lo que demostraría que la sobreexpresión de PIF4, es capaz de recuperar parcialmente el fenotipo enano causado por la mutación *gai1.1* (Fig. 40).





**Figura 40:** Estudio fenotípico de los dobles mutantes PIF4OX *20ox* y PIF4OX *gai1.1*. Las medidas corresponden a plantas crecidas durante 5 días en luz roja continua. Se observa cómo la sobreexpresión de PIF4 recupera el fenotipo del deficiente en GAs.

Cuando estas líneas se crecieron en medio suplementado con GAs (10 $\mu$ M), se observó que dicho tratamiento provoca un incremento claro del tamaño del hipocotilo en las líneas silvestres *col-0* y en el mutante *20-ox* (se recupera el déficit de giberelinas). Dicho alargamiento, por otra parte, fue aún más pronunciado en las líneas PIF4OX *20-ox*, que mostraron hipocotilos idénticos al de las líneas PIF4OX debido a que dicho tratamiento complementa la deficiencia en GAs e induce la desestabilización de las DELLAs. Las líneas mutantes *gai1.1* y PIF4OX *gai1.1*, por el contrario, no respondieron a este tratamiento debido a que acumulan una forma estable de las DELLA que no es degradada en respuesta a la aplicación de GAs.

Estos resultados demuestran que las GAs modulan la actividad de PIF4 al inducir la degradación de los represores DELLA. En efecto, en ausencia de estas hormonas, estos represores se acumulan en el núcleo y bloquean la actividad transcripcional de estos factores, por lo que la longitud final del hipocótilo vendría determinada en todo momento por los niveles de acumulación nuclear de los factores PIF4 y los represores DELLA, los cuales variarían en función de las condiciones de luz y de las condiciones ambientales en las que la planta se desarrolla.

## II. INTERACCIÓN DE LAS SEÑALES BR y GAs EN EL CONTROL DE LA ELONGACIÓN DEL HIPOCÓTILO

Las semillas de los mutantes insensibles a GAs, y en particular las de los mutantes *sly1.10* se caracterizan por presentar una baja eficiencia de germinación, que revierte en parte por la aplicación de BRs. Durante este tratamiento, observamos que la aplicación de estas hormonas no sólo recupera el fenotipo de germinación sino que induce un visible alargamiento de los hipocótilos (Fig.41). De hecho, se había descrito que los BRs son capaces de revertir parcialmente el fenotipo enano de mutantes biosintéticos o insensibles a GAs (166) y, en efecto, comprobamos que los hipocótilos de las plantas mutantes *gai1.1* y *sly1.10*, insensibles a GAs, o del mutante *ga1.3*, deficiente en la síntesis de estas hormonas, son claramente más alargados en semillas germinadas en medio suplementado con BRs, que los de estas mismas semillas germinadas en un medio sin la hormona (Fig.41).

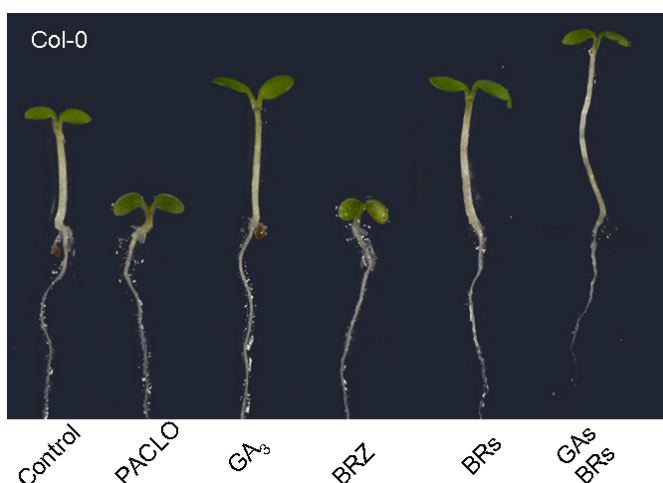


**Figura 41:** Efecto de la aplicación de BRs y GAs en la longitud del hipocótilo de los mutantes biosintéticos (*ga1.3*) o insensibles a GAs (*gai1.1* y *sly1.10*). Las GAs no recuperan el fenotipo de los mutantes insensibles a GAs, mientras que el aporte de BRs recupera el fenotipo de los insensibles y los biosintéticos de GAs

En medio suplementado con GAs, por el contrario, los hipocótilos de los mutantes *gai1.1* y *sly1.10*, son igual de cortos que en medio sin GAs (estos mutantes son insensibles a la hormona), en tanto que el mutante *ga1.3* recupera totalmente su fenotipo (se revierte el bloqueo en la síntesis de estas hormonas) y muestra un hipocótilo más alargado que en presencia de BRs (Fig. 41).

De hecho, está descrito que los BRs son necesarios para el alargamiento del hipocótilo, ya que los mutantes *det2.1* y *cpd*, deficientes en la síntesis de estas hormonas, presentan un fenotipo enano característico, de porte compacto y hojas muy curvadas y oscuras (123). Se ha reportado también la existencia de una regulación cruzada entre las rutas de BRs y GAs, ya que la aplicación simultánea de ambas hormonas produce un efecto sinérgico sobre el crecimiento del hipocótilo, que se traduce en un alargamiento muy exagerado del hipocótilo (192)

Al tratar plantas *col-0* con el inhibidor de síntesis de BRs, brasinazol (BZR), o con BL, comprobamos que la aplicación de BZR inhibe, en efecto, el crecimiento del hipocotilo incluso más que la aplicación de PAC (Fig. 42), mientras que la aplicación de BL induce una elongación similar a la observada tras la aplicación de GAs. Cuando ambas hormonas se aplican al mismo tiempo, sin embargo, se observa un efecto sinérgico sobre el alargamiento del hipocótulo, que de acuerdo a lo descrito en la literatura, es mucho más alargado que el de las plantas tratadas con cada una de estas hormonas por separado (Fig. 42)



**Figura 41:** Fenotipo de elongación del hipocótulo de plantas *Col-0* tratadas con PACLOBUTRAZOL, GAs, BRZ, BRs, o ambas hormonas al mismo tiempo. La falta de cada hormona provoca inhibición del crecimiento del hipocotilo, mientras que el aporte de GAs o BRs promueve su elongación. El aporte combinado de GAs y BRs induce una elongación mayor del hipocotilo.

Un resultado inesperado, sin embargo, fue la observación que si bien la aplicación de BL revierte la inhibición del crecimiento del hipocótulo producida por la aplicación de PAC, la aplicación de GAs no es capaz de revertir la inhibición causada por el inhibidor BRZ, lo indicaría que los BL actúan por debajo de las GAs, en el control de este proceso (Fig. 43).



**Figura 43:** Fenotipos de elongación del hipocótulo de plantas tratadas con PAC, BRZ o tratamientos combinados PAC + BL y BRZ + GAs (izquierda) y fenotipo de insensibilidad a GAs del mutante *det2.1* (derecha). El bloqueo de la síntesis de GAs y BRs provoca un fenotipo enano. Mientras que los BRs revierten el fenotipo enano de plantas tratadas con PAC, las GAs no son capaces de revertir el fenotipo enano de plantas tratadas con BRZ o del mutante *det2.1*.

Con el fin de asegurar que la ausencia de respuesta a la aplicación de GAs en plantas tratadas con BRZ no era causada por un efecto colateral de este inhibidor, el mismo tratamiento con GAs se realizó sobre semillas *det2.1*, deficientes en la síntesis de BRs. Como se muestra en la Fig.43, mientras que la aplicación de BL revierte totalmente el fenotipo enano de este mutante, éste mostró de nuevo ser insensible a la aplicación de GAs.

Estos resultados sugieren:

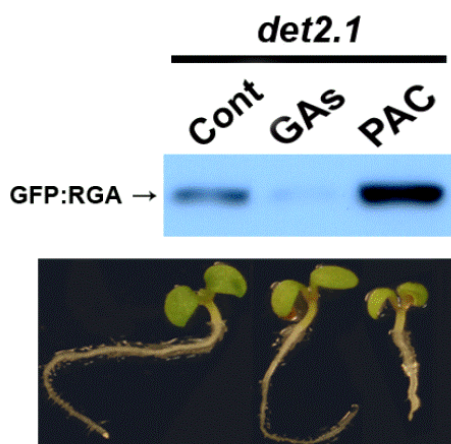
- La existencia de un efecto sinérgico en la elongación del hipocotilo entre las GAs y los BRs.
- La necesidad de una ruta activa de BRs para que se produzca una respuesta al aporte de GAs.

En base a estos resultados nos planteamos caracterizar en mayor profundidad esta interacción, e intentar definir cuál es el mecanismo molecular responsable de la insensibilidad a GAs de los mutantes deficientes en la síntesis de BR o con un bloqueo en la ruta de señalización de estas hormonas.

#### **4. LOS REPRESORES DELLA EN LA INTERACCIÓN DE LAS RUTAS DE BRs y GAs**

Dado que habíamos observado que el mutante biosintético *det2.1* es insensible al aporte exógeno de GAs, al menos en lo que a crecimiento del hipocotilo se refiere, decidimos estudiar en que punto de la vía de señalización de estas hormonas se vería afectada la respuesta. Consideramos que los represores DELLA, debido a que son rápidamente degradados en respuesta a la aplicación de GAs, servían como un excelente sistema diagnóstico, para establecer si la interacción con la ruta de los BRs ocurre en un paso temprano de la ruta de señalización de GAs (debido a una interacción con el receptor *GID1*, o con el complejo E3 ligasa *SCF<sup>SLY</sup>*) y en este caso bloquea también la degradación de estos represores, o por el contrario implica un paso más tardío de esta ruta, posterior a la degradación de las DELLAs.

Por tanto, se cruzó el mutante *det2.1* con la línea *pRGA::GFP-RGA* (cedida por la Dra. Tai-Ping Sun) y la progenie de este cruce se llevó hasta la C2 para seleccionar líneas doble homocigóticas. Estas líneas se germinaron en medio de germinación y en medio de germinación suplementado con GAs o con PAC, y a los 5 días de germinación se recogieron las muestras para ser analizadas por western blot, a fin de determinar los niveles de acumulación de la proteína *GFP-RGA* tras los distintos tratamientos.



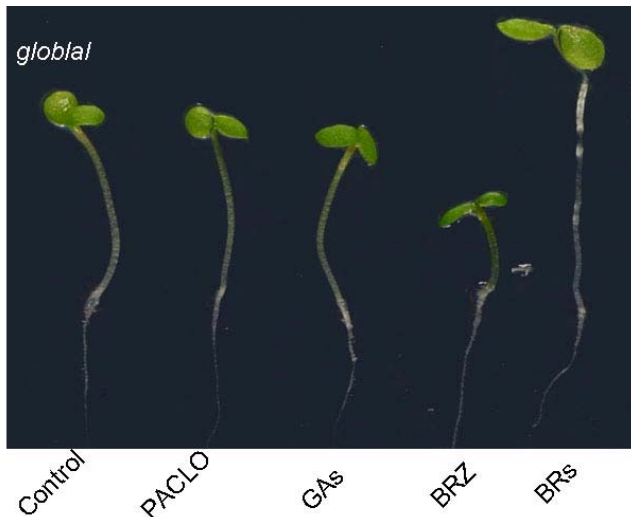
**Figura 44:** Estudio de la estabilidad de las proteínas DELLA en el mutante *det2.1*. La planta *det2.1* expresora de la proteína GFP:RGA fué crecida durante 5 días en medio GM y después se trataron con GAs (25 $\mu$ M) y PAC (1 $\mu$ M) durante 2h, para posteriormente analizar la estabilidad de la proteína GFP:RGA mediante Western Blot utilizando un anticuerpo anti-GFP. Se observa que el tratamiento con GAs degrada la proteína GFP-RGA, mientras que el tratamiento con PAC provoca su acumulación.

En la Fig. 44 se muestra el resultado obtenido tras hibridar las membranas con un anticuerpo anti-GFP. Contrario a lo que en un inicio habríamos esperado, observamos en este experimento que la proteína GFP-RGA muestra un comportamiento similar en el mutante *det2.1* al observado en plantas silvestres. En el fondo *det2.1* RGA se acumula a niveles más altos en plantas tratadas con PAC y es destabilizado en presencia de GAs (Fig.44), lo que indica que la ruta temprana de señalización de GAs no está alterada en este mutante. Sin embargo, aunque en las plantas tratadas con PAC la acumulación produce un fenotipo más enano que el de las plantas *det2.1* control, en este mutante la degradación de las DELLA no se traduce en ningún crecimiento de la planta (Fig. 44).

Este resultado indicaría que el déficit de BRs no afecta la percepción de GAs por *GID1*, ni la degradación de las DELLAs por el complejo *SCF<sup>SLY1</sup>*, sino que bloquea algún paso de señalización, posterior a la degradación de las DELLA.

Para confirmar este resultado, decidimos analizar el efecto del BRZ en los mutantes *global*, portadores de una mutación en cada una de las cinco proteínas DELLA (*gai-t6*, *rga-t2*, *rgl1-1*, *rgl2-1* y *rgl3-4*) y que se caracterizan por mostrar una respuesta constitutiva a GAs (193). Estos mutantes muestran hipocótilos mucho más alargados que las plantas silvestres, y no muestran una inhibición de la elongación del hipocótilo en respuesta a un aporte exógeno de PAC (al estar mutados todos los genes DELLA, no acumulan estos represores aún en ausencia de GAs), ni un alargamiento mayor del hipocótilo tras el tratamiento con GAs.

Cuando estos mutantes se trataron con BRZ o BL, pudimos observar que la aplicación de BRZ si tiene un efecto notable sobre el crecimiento del hipocótilo (Fig. 45), que en presencia de este inhibidor son mucho más cortos que los de las plantas crecidas en medio control ó en presencia de PAC o GAs.



**Figura 45:** Respuesta del mutante *global* a los tratamientos con PAC, GAs, BRZ y BLs. El mutante *global* carece de las cinco proteínas DELLA, por ello muestra un fenotipo constitutivo de planta tratada con GAs (hipocotilo alargado). Sin embargo el tratamiento con BRZ inhibe dicho crecimiento del hipocotilo, reprimiendo de algún modo la elongación del hipocotilo promovida por la ausencia de represores DELLA.

Como se puede observar en la figura 45, la aplicación de BL induce en el mutante *global* un crecimiento exagerado del hipocótilo similar al que se observa en *col-0* tras la aplicación conjunta de GAs + BL, de acuerdo con la respuesta constitutiva a GAs de este mutante. Estos resultados confirmarían que los BRs afectan el crecimiento del hipocótilo al actuar en un paso posterior a los represores DELLA, y que la ausencia ó degradación de las DELLA (en el mutante *global* o tras el tratamiento con GAs) produce un efecto sinérgico con los BRs, que se traduce en un alargamiento del hipocótilo mucho más exagerado que el observado tras la aplicación de BL sólo.

## 5. ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN DE PIF4 EN LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE BRs

Los resultados obtenidos en los apartados 1, 2 y 3 de este trabajo, nos permitieron demostrar un papel clave del factor PIF4 en la elongación del hipocótilo y un efecto de las proteínas DELLA como represoras de su actividad transcripcional. Ya que la interacción entre las rutas de BL y GAs parecería residir en un paso posterior a la degradación de las DELLA, decidimos analizar si el propio factor PIF4 es el responsable de la integración de la señal de BRs.

### 5.1. Análisis de la respuesta de plantas PIF4-OX, *pif4* y *pif4pif5* al aporte exógeno de BRs y BRZ

Con el fin de comprobar si PIF4 desempeña alguna función en la respuesta de la planta a los BRs, analizamos el fenotipo de las líneas PIF4OX y los mutantes *pif4* y *pif4pif5*, crecidos en presencia de BL y BRZ (Fig. 46).



**Figura 46:** Efecto del tratamiento con BL y BRZ sobre el crecimiento del hipocótilo de las líneas PIF4-OX y los mutantes *pif4* y *pif4pif5*. Las plantas se crecieron durante cinco días en medios suplementados con 0.2µM de BRs y 0.1 µM de BRZ. Las plantas que acumulan PIF4 son más sensibles al tratamiento con BRs. Por contra, las plantas deficientes en PIFs son hipersensibles al tratamiento con BRz.

En la figura anterior se observa que la línea PIF4OX es más sensible al aporte exógeno a BL y responde menos al tratamiento con BRZ que las plantas silvestres col-0. Los mutantes *pif4* y *pif4pif5*, por el contrario, muestran una respuesta hiposensible al tratamiento con BL y son hipersensibles a la aplicación de BRZ.

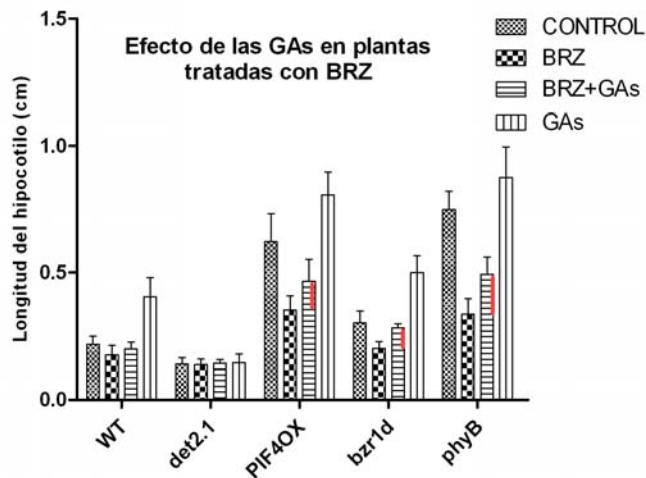
Este resultado es especialmente significativo ya que, al igual que habíamos observado previamente en tratamientos con PAC y GAs, indicaría que este factor media, al menos en parte, la respuesta de elongación del hipocótilo inducida por la aplicación de BL, actuando por tanto como un integrador de la señal de estas hormonas.

Un resultado adicional que confirmaría esta hipótesis es el obtenido al tratar las líneas PIF4OX con BRZ y GAs. Conviene recordar que tanto el mutante biosintético *det2.1* como las plantas silvestres tratadas con BRZ, son insensibles a la aplicación de GAs, por lo que nos planteamos estudiar si las líneas PIF4OX eran capaces de elongarse en respuesta a este tratamiento. Se utilizó en estos estudios también el mutante *bzr1-d*, con una respuesta constitutiva a BRs, y el mutante *phyB*, que además de acumular niveles elevados de PIF4, acumula también niveles más altos de otros miembros de la familia PIF, cuya estabilidad está regulada por este fotorreceptor.

Así, se crecieron plantas col-0, *det2.1*, PIF4OX, *bzr1-d* y *phyB*, en medio de germinación y en medio suplementado con BRZ, BRZ +GAs y GAs, y a los 5 días de tratamiento se midió los hipocótilos de al menos 20 plántulas de cada una de estas líneas, crecidas en los diferentes medios. Las medidas obtenidas se utilizaron para calcular las longitudes promedio de los hipocótilos y las correspondientes desviaciones estándar, y se representan en el histograma que se muestra en la Fig. 47.

Podemos observar en esta Figura que, como habíamos observado anteriormente, el mutante *det2.1* es insensible a la aplicación de GAs, independientemente de la presencia de BRZ. Las líneas silvestres col-0, en cambio, muestran un alargamiento claro del hipocótilo en

respuesta a GAs, pero dicha respuesta es bloqueada en presencia de BRZ.



**Figura 47:** Comportamiento de las plantas *det2.1*, PIF4 OX, *bzr1* y *phyB* tras los tratamientos con BRZ, BRZ+GAs y GAs. Las plantas se crecieron durante cinco días en medios suplementados con cada una de las hormonas o inhibidores. Las GAs no recuperan la inhibición del crecimiento provocada por el tratamiento con BRZ en las plantas silvestre y *det2.1*. Sin embargo, aquellas plantas que acumulan PIF4 (PIF4OX y *phyB*) responden a dicho tratamiento (dicha respuesta se señala con una línea roja vertical en la gráfica).

Se observa también que las líneas PIF4OX, *bzr1d* y *phyB*, muestran un comportamiento claramente diferencial a las plantas col-0 o *det2.1* ya que, en estas líneas la aplicación de GAs induce una elongación clara del hipocótilo en presencia de BRZ (el crecimiento observado se indica por una línea roja en las barras correspondientes a este tratamiento). La aplicación de este inhibidor, de hecho, induce en estas plantas un acortamiento del hipocótilo menor que en las líneas silvestres col-0, lo que evidenciaría que las plantas PIF4OX y *phyB* exhiben una respuesta constitutiva a BRs, similar a la del mutante *bzr1-d*.

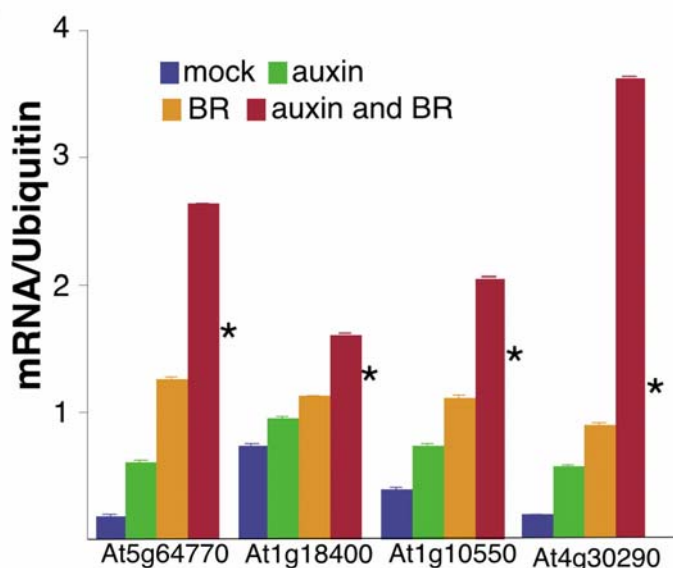
Así, si bien ya resultaba significativa la observación que las líneas PIF4OX mostraran una respuesta hiposensible al tratamiento con BRZ, este resultado confirmaría que tanto estas líneas como los mutantes *phyB*, exhiben una respuesta constitutiva a BRs, lo que claramente implicaría al factor PIF4 en la ruta de señalización mediada por BL.



## 5.2. Comparación de los genes de respuesta a BL y los regulados por PIF4

Estudios transcriptómicos llevados a cabo en los mutantes *det2.1*, tras la aplicación de BL, han permitido establecer que los BRs regulan positivamente la expresión de genes que codifican para *xyloglucan endotrans-glycosylasas/hydrolasas* (*XTH* o *XETs*), expansinas, extensinas y arabinogalactanos (164), implicados en la biosíntesis y modificación de la pared celular. Ya que en este trabajo habíamos también establecido que PIF4 se une a la región promotora de muchos genes con una función en la modificación y degradación de la pared celular (véase apartados 3.2 y 3.5 de éste capítulo), decidimos comparar el patrón de expresión de los genes conocidos por mostrar una activación “temprana” tras el aporte de BL, con los que habíamos establecido corresponden a dianas directas de la actividad transcripcional de PIF4 (ver apartado 3.2).

Nemhauser *y col.* (172), publicaron un estudio transcriptómico en el que se analizaban los genes con una respuesta temprana a BL, a auxinas, o a la combinación de ambas hormonas. De los genes identificados destacaban 4 genes que mostraban una respuesta sinérgica en las plantas tratadas con ambas hormonas y que sin duda corresponden a dianas tempranas de la acción de BL (Fig 48).

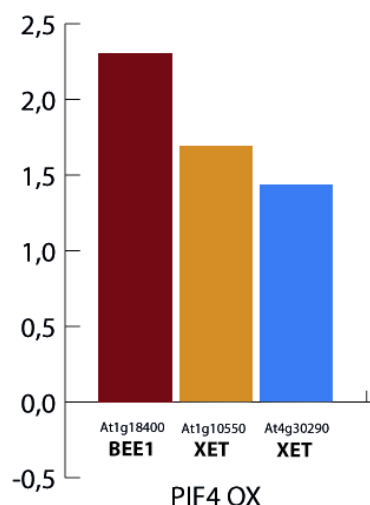


**Figura 48:** Niveles de expresión de 4 de los genes descritos por Nemhauser *y col.* (2004) como genes de respuesta a BL, que se detectan en plantas tratadas con BL, auxinas, o con ambas hormonas.

Estos genes codifican una proteína de función desconocida (At5g64770), el factor bHLH BEE1 (At1g18400), necesario para la respuesta a BL (142), y dos endo-xiloglucano transferasas (At1g10550 y At4g30290), implicadas en la modificación de la pared celular.

Cuando comparamos el patrón de expresión que habíamos obtenido para estos genes en el análisis transcriptómico descrito en el apartado 3.2 (PIF4OX vs *col-0* y *pif4pif5* vs *col-0*), pudimos

comprobar que tres de estos cuatro genes (At1g18400, At1g10550 y At4g30290) estaban también diferencialmente expresados en nuestro estudio, con niveles de sobre-expresión que oscilaban entre 1.5 y 2.3 veces en las plantas PIF4OX (Fig. 49).



**Figura 49:** Representación gráfica de los niveles de expresión de los genes At1g18400, At1g10550, y At4g30290 en las plantas PIF4OX. La expresión se ha normalizado con respecto a col-0.

Este dato nos indujo a comparar de manera más exhaustiva los genes que estaban sobreexpresados en las plantas PIF4OX con los genes identificados como genes de respuesta "temprana" inducidos en respuesta a BRs.

ID	PIF4OX	Nemhauser 2004 (172)	YIN 2002 (130)	YIN 2010 (89)
At4g30280	ATXTH18	x	x	x
At1g65310	ATXTH17	x	x	x
At3g15540	IAA19			
At1g66700		x		
At4g14365				x
At4g30290	ATXTH19	x		x
At1g75780	TUB1			x
At3g14370	WAG2			x
At3g12610				x
At4g18970		x		x
At1g02205	CER1			x
At5g50335		x		x
At5g49630	AAP6			x
At4g34770		x		
At5g24580		x		x
At1g10550	XTH33	x		x
At5g15360				x
At4g19120	ERD3	x	x	
At4g25260		x		
At1g64640		x		x
At4g21850		x		x

**Tabla I:** Listado de genes que mostraron ser sobre-expresados en las líneas PIF4-OE y que se han identificado como genes de respuesta temprana a BL (los genes descritos en los trabajos indicados se señalan con una cruz).

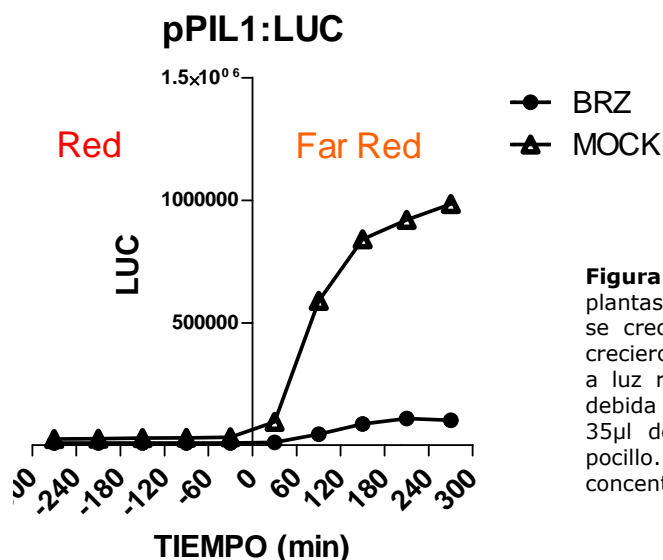
En la tabla anterior se observa que muchos de los genes que en nuestro estudio mostraron estar sobre-expresados en las plantas PIF4-OE, se han identificado también como genes activados en

respuesta a BL, lo que estaría de nuevo de acuerdo con una función de este factor transcripcional en la ruta de señalización de los BRs.

### 5.3. Efecto de los brasinosteroides en la expresión de pPIL1:LUC

En el apartado 3.5 de la memoria, se demuestra que PIF4 se une directamente a la región promotora de gen PIL1 para activar su transcripción. Diferentes trabajos han demostrado que PIL1 es un buen reportero de la acción de PIF4 (44) y que su expresión se incrementa bruscamente cuando una planta pasa de crecer en HR/FR a LR/FR. Por este motivo consideramos que la transcripción de PIL1 es un buen marcador de la actividad de PIF4.

Con el objetivo de poner de manifiesto el efecto que ejercen los BRs en la actividad de PIF4, analizamos la expresión de PIL1 en plantas tratadas con BRZ y plantas sin tratar utilizando la línea transgénica pPIL1:LUC (gentilmente cedida por Joanne Chory) (Fig. 50). Resulta importante mencionar que en la bibliografía disponible no hemos encontrado ninguna evidencia que relacione la expresión de éste gen con la presencia de BRs. Consideramos que éste hecho es debido a que la mayoría de los experimentos de análisis de expresión en plantas tratadas con BRs que encontramos en la bibliografía se han realizado utilizando los chips de ADN de affymetrix. Si bien, el gen PIL1 no se encuentra representado en dichos chips, de ahí que hasta la fecha PIL1 no se haya considerado como gen regulado por BRs.



**Figura 50:** Análisis de la expresión de PIL1 en plantas control o tratadas con BRZ. Las plantas se crecieron en placas de microtitulación y se crecieron en luz roja, para ser luego transferidas a luz roja lejana. Para seguir la actividad LUC debida a la construcción pPIL1::LUC se añadieron 35µl del sustrato *luciferina* (Promega) a cada pocillo. Para los tratamientos con BRZ se usó una concentración final del inhibidor de 1µM.

Como se puede observar en la gráfica superior, el tratamiento con luz roja lejana provoca un incremento brusco de la expresión de PIL1 en las plantas control. Sin embargo, aquellas plantas que han sido tratadas con el inhibidor de la síntesis de BR a penas responden. Este resultado nos indica que la ausencia de BRs en la planta afecta a la función de PIF4.

#### 5.4. Fenotipo de los mutantes *phyB det2.1*

En estudios en los que se intentaba establecer la función de la ruta de señalización de los BRs en la respuesta de elongación del hipocótilo en semillas germinadas en oscuridad, el laboratorio de Joanne Chory había reportado en 1992 que el déficit en la síntesis de BRs inhibe el fenotipo alargado de los mutantes *phyB* (191). El doble mutante *phyB det2.1* muestra en efecto un fenotipo enano similar al del mutante *det2.1* (Fig. 57), lo que indicaría que la mutación *det2.1* es epistática a *phyB*.



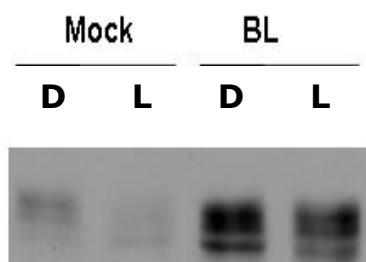
**Figura 57:** Fenotipo de las plantas *phyB*, *phyBdet2.1* y *det2.1* crecidas en oscuridad. Mientras que las plantas Silvestre y *phyB* muestran un fenotipo característico de plantas crecidas en oscuridad, el déficit de BRs provoca que la planta desarrolle un fenotipo de-etiolado en estas condiciones, incluso en la planta *phyB*.

Aunque este resultado no se pudo interpretar al reportar este fenotipo, puede explicarse gracias a la observación hecha en el apartado anterior. En efecto, PIF4 se acumularía en el mutante *phyB*, lo que hace que el fenotipo de este mutante sea alargado, sin embargo, este factor no se expresa o es inactivo en el fondo *det2.1* y por tanto el doble mutante exhibe un fenotipo enano idéntico al de la mutación *det2.1*.

#### 5.5. Análisis de la estabilidad de PIF4 en plantas tratadas con BL

En un primer intento para discernir si la regulación de PIF4 por BRs ocurre a nivel transcripcional, analizamos los datos de expresión disponibles, generados en plantas tratadas con estas hormonas. Estos datos, sin embargo, no mostraron que PIF4 figure entre los genes cuya expresión se active en respuesta a la aplicación de BL, por lo que decidimos comprobar si dicha regulación es ejercida a nivel post-transcripcional, debido a un control sobre la estabilidad de estos factores o algún tipo de modificación de la proteína. Para ello, se crecieron las líneas PIF4-HA en medio de germinación y en medio suplementado con BL, y se analizaron los niveles de acumulación y la

movilidad de la proteína por western blot, utilizando un anticuerpo anti-HA para su detección. Los análisis se llevaron a cabo sobre plantas de 5 días de edad, que se habían crecido en luz continua o en oscuridad (Fig. 51).

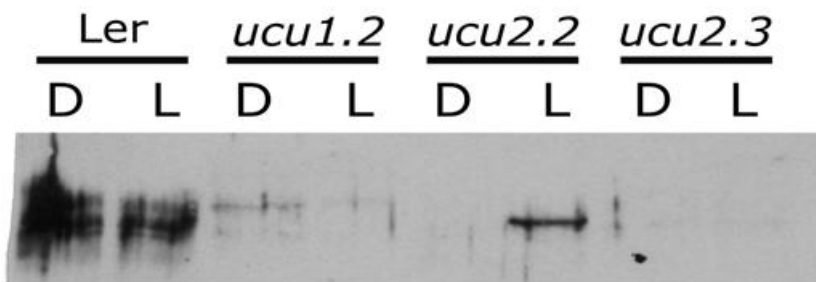


**Figura 51:** Análisis de la estabilidad de la proteína PIF4:HA en plantas tratadas y sin tratar con 1 $\mu$ M BL y crecidas en luz continua o en oscuridad. Las plantas se crecieron durante 5 días en estas condiciones y los niveles de acumulación de la proteína se analizaron por western blot, por incubación con un anticuerpo anti-HA conjugado a peroxidasa.

Se puede observar en la figura anterior que la proteína PIF4 se acumula a niveles superiores en plantas tratadas con BRs que en las plantas control. Pudimos observar, por otra parte, que la fusión PIF4-HA se separa en los geles de electroforesis en varias formas con una distinta movilidad electroforética, que podrían corresponder a distintos grados de fosforilación de la proteína (Fig. 51). Además, la aplicación de BRs parece favorecer una acumulación preferente de las formas con una mayor movilidad electroforética, que corresponderían a las formas no fosforiladas de la proteína, lo que indicaría que los BRs controlarían la estabilidad del factor PIF4 al regular una actividad quinasa responsable de fosforilar de fosforilar este factor, promoviendo así su degradación.

Del experimento se concluye que la aplicación de BRs incrementa la estabilidad de PIF4, lo cuál explicaría porqué un número significativo de genes descritos como de respuesta temprana a BRs coincide con los genes sobreexpresados en las líneas PIF4OX.

Según este resultado, esperaríamos también los niveles de la proteína PIF4 fueran inferiores en los mutantes deficientes o insensibles a BRs que en las líneas silvestres, premisa que se comprobó analizando los niveles de acumulación de este factor en los mutantes *ucu1.2* (*ultracurvata1*, mutación dominante de la quinasa BIN2 que codifica una forma constitutivamente activa de esta quinasa, que confiere insensibilidad al aporte exógeno de BRs), y los mutantes *ucu2.2* y *ucu2.3* (dos alelos diferentes del gen *ultracurvata2*, una FK506-Binding Protein aún no ubicada en la ruta de señalización de BRs, pero cuya mutación provoca también insensibilidad a los BRs). Para este análisis se utilizó un anticuerpo específico anti-PIF4, gentilmente cedido por el laboratorio de Joan Chory (Fig. 52).



**Figura 52:** Análisis de la estabilidad de la proteína PIF4 en los mutantes insensibles a BL *ucu1.2*, *ucu2.2* y *ucu2.3*. Extractos proteicos generados de estas plantas se inmunodetectaron por western blot con un anticuerpo específico anti-PIF4 (cedido por Joanne Chory). Las plantas se crecieron en luz continua o en oscuridad.

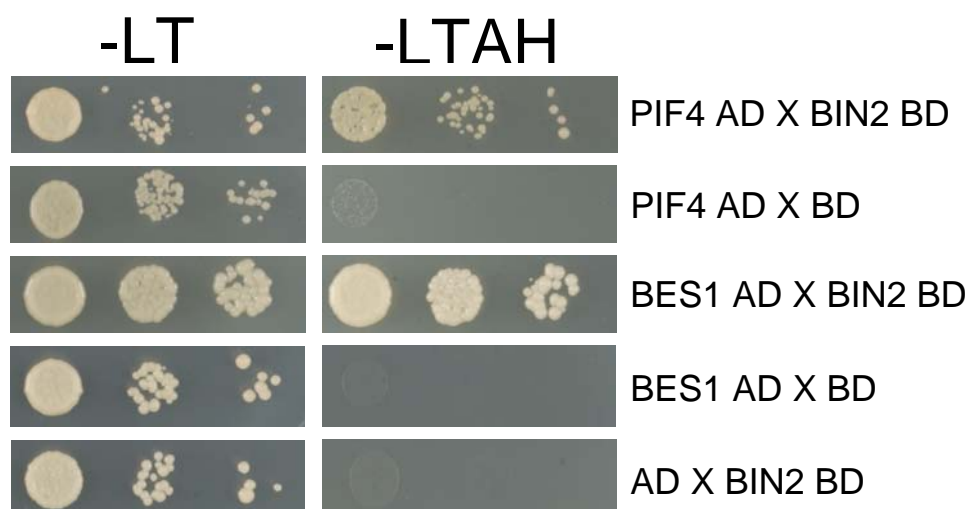
En la figura 52 se observa que la proteína PIF4 se acumula en las plantas silvestres, y que los niveles de ésta proteína son superiores en plantas crecidas en oscuridad que en luz. En los mutantes *ucu1.2*, *ucu2.2* y *ucu2.3*, por el contrario, se detectan niveles claramente inferiores de la proteína, lo que corroboraría que es necesaria una activación de la ruta de señalización de BRs para una estabilización de PIF4.

## 6. BÚSQUEDA DE INTERACTORES DE PIF4 IMPLICADOS EN LA SEÑALIZACIÓN DE BRs

Los resultados que se reportan en el apartado anterior implicarían una actividad quinasa dependiente de BRs en la fosforilación y desestabilización del factor PIF4. A este respecto, es importante destacar que una quinasa con un papel central en la ruta de señalización de BRs, es la correspondiente al enzima GSK3-quinasa BIN2, responsable de fosforilar los factores de transcripción BES1 y BZR1, y regular negativamente su función (136). Esta quinasa se acumula en su forma fosforilada activa en ausencia de BRs, y fosforila los factores BES1 y BZR1 inhibiendo su translocación al núcleo, al mismo tiempo que promueve su degradación (130, 135). Recientemente se ha reportado que la unión de BL al receptor BRI1, promueve una cascada de señalización que activaría la fosfatasa BSU1, la cual es responsable de desfosforilar BIN2 e inactivar este enzima. Ello permite la acumulación de BES1 y BZR1 en el núcleo, y la activación de los genes regulados por estas hormonas (136).

BIN2, al igual que otras GSK3 quinasas, fosforila residuos Ser o Thr en la secuencia consenso S/T-X-X-X-S/T (151). Curiosamente, en la proteína PIF4 se observan diferentes grupos de residuos que cumplen este consenso, lo que indicaría que el factor PIF4 puede ser sustrato de la actividad quinasa de BIN2.

Para estudiar esta posibilidad, analizamos si ambas proteínas podían interactuar de forma directa, en ensayos doble híbrido en levadura. Utilizamos las proteínas BES1 y BIN2 como control positivo de la interacción (Fig. 53).



**Figura 53:** Análisis de la interacción entre las proteínas BIN2 y PIF4 en células AH109 de levadura. La proteína BIN2 se fusionó al BD y las proteínas PIF4 y BES1 al AD de GAL4. Las células transformadas se seleccionaron en medio mínimo SD-LeuTrp o SD-4. Las construcciones se transformaron también con los plásmidos pGBKT7 y pGADT7 vacíos, para establecer los niveles de autoactivación de estas proteínas.

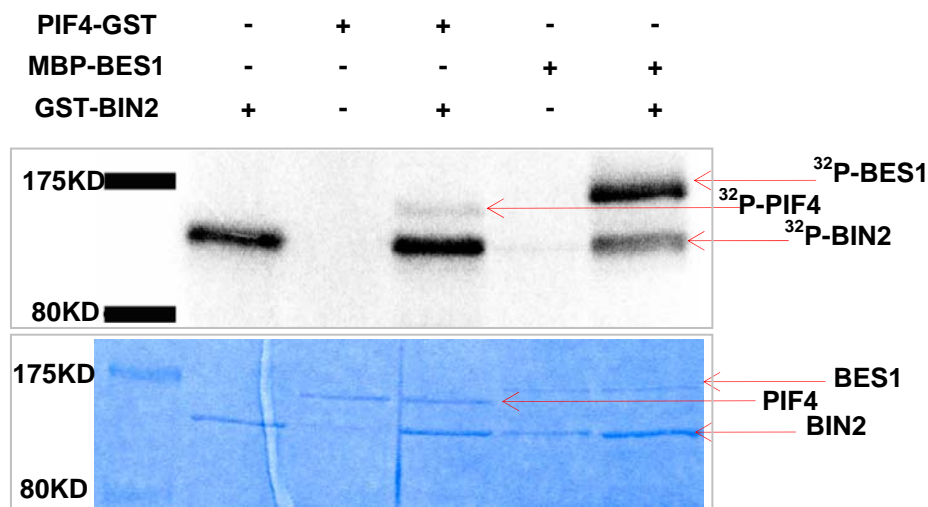
Como se observa en la figura anterior, PIF4 interacciona directamente con la quinasa BIN2 en levadura, aunque con una afinidad algo inferior a la observada para la proteína BES1 (el crecimiento en medio selectivo SD-4 es algo menor). Este resultado indica que BIN2 se une al factor PIF4 y por tanto que este factor podría ser sustrato de BIN2.

### 6.1. Análisis de la actividad quinasa de BIN2 utilizando PIF4 como sustrato

Para comprobar si BIN2 es capaz de fosforilar a PIF4, llevamos a cabo ensayos de actividad quinasa con las proteínas expresadas en *E. coli*. Para la purificación de estas proteínas se generaron las fusiones PIF4-GST (el factor PIF4 no es activo si la proteína GST se fusiona en N-terminal) y GST-BIN2. Estas construcciones se transformaron en las cepas BL21 o *Rosetta* de *E. coli* y se indujo la expresión de la proteína con 1mM IPTG o 2% arabinosa, purificando posteriormente la fracción soluble en columnas de *Glutathion-Sepharose* (Clontech). Las proteínas así purificadas se eluyeron con 50 mM glutatión y se utilizaron directamente en la reacción quinasa. Como control positivo de la actividad de BIN2 se utilizó la proteína BES1. Para la purificación de esta proteína se utilizó una fusión a la Maltose Binding protein (MBP), a fin de obtener una proteína de fusión de un tamaño superior a la proteína GST-BIN2, y poder separar ambas proteínas por su movilidad electroforética. La construcción se transformó igual que antes en células *Rosetta*, se indujo la expresión de la proteína con 1 mM IPTG y se purificó en columnas de *amylose Resin* (New England Biolabs). Una vez purificada, la proteína se eluyó con

maltosa y se utilizó directamente en la reacción quinasa (ver materiales y métodos).

Para la reacción quinasa se combinó ambas proteínas en un tampón que incluía el ión  $Mg^{+2}$ , necesario para la actividad GSK3 quinasa, y ATP marcado radioactivamente, a fin de visualizar las proteínas fosforiladas gracias a su marcaje con el isótopo radioactivo. La mezcla de reacción se incubó durante 40 min a 30°C, se detuvo con el mismo volumen de tampón de carga TMx2. La reacción se cargó en un gel de acrilamida-SDS, que se tiñó con Coomassie, se secó sobre papel y se expuso a un film de autoradiografía.



**Figura 54:** Estudio de la actividad quinasa de BIN2 sobre PIF4 y BES1. Las proteínas se incubaron sólo en la mezcla de reacción o en presencia de BIN2. El panel superior corresponde al revelado del film de autoradiografía. En el panel inferior se muestra la tinción con Coomassie (CBB) del gel. Se indica mediante flechas las bandas correspondientes a las proteínas BES1, PIF4 y BIN2 fosforiladas.

En la figura 54, se muestra el resultado del ensayo de actividad quinasa. En el film de autoradiografía se observan sólo las proteínas que han incorporado ATP radiactivo. En los carriles en los que se incubó las proteínas PIF4 y BES1 sólo (carriles 3 y 5), no se observa ninguna banda, lo que indica que en ausencia de BIN2 estas proteínas no se fosforilan. El carril 2 corresponde a la incubación de la proteína BIN2 sólo, y se puede observar la actividad de autofosforilación de esta proteína. En el carril 4 observamos una banda por encima de BIN2, que corresponde a PIF4, lo que demuestra que este factor es fosforilado por BIN2. La intensidad de la banda es menor que la observada en el carril 6, para BES1, que se utilizó como control positivo de fosforilación. En el recuadro inferior se muestra la tinción Coomassie del gel donde se observa las cantidades relativas de cada una de las proteínas en la reacción.

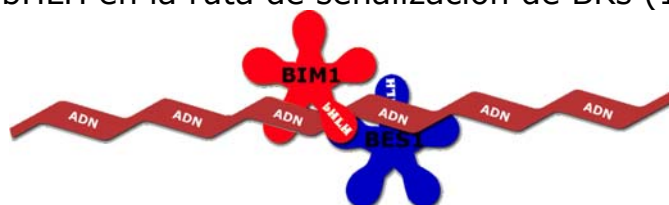
De este resultado podemos concluir que PIF4 actúa como sustrato de BIN2 aunque es fosforilado con una eficiencia menor que BES1. Esta menor fosforilación, sin embargo, puede deberse al hecho



que BES1 presenta múltiples secuencias consenso de fosforilación, mientras que en PIF4 identificamos un número mucho menor.

## 6.2. Interacción de PIF4 con otros intermediarios de la ruta de señalización de BRs

Los factores de transcripción BES1 y BZR1 se aislaron de manera independiente en un cribado de mutantes que mostraran insensibilidad a BRZ (*Brassinazole Resistant-1*) y en una búsqueda de mutantes capaces de rescatar el fenotipo enano causado por la mutación *bri1-1* (130). Ambos genes codifican proteínas con un dominio bHLH atípico en su región N-terminal, que comparten un 88% de similitud. Ambos factores activarían la expresión de genes regulados por BL, aunque BZR1 participa además en la represión de los genes biosintéticos a través de un mecanismo de feed-back negativo (157). Aunque se ha demostrado que ambos factores se unirían a elementos E-box (GTNNA) presentes en los promotores de los genes activados en respuesta a BRs, no está aún bien establecido si estos factores funcionarían solos o formando complejo con otras familias de factores de transcripción. De hecho, en 2005 Yin y *col.* describieron una subfamilia de factores bHLH comprendida por 3 genes a los que denominaron *BIM1-3* (*BES1-interacting Myc-like*), que interaccionarían con BES1 incrementando la afinidad de unión al ADN de este factor. Aunque este fenotipo no es muy pronunciado, mutaciones en estos genes confieren, en efecto, una respuesta parcialmente insensible a BRs, lo que confirmaría una función de esta subfamilia de bHLH en la ruta de señalización de BRs (186).

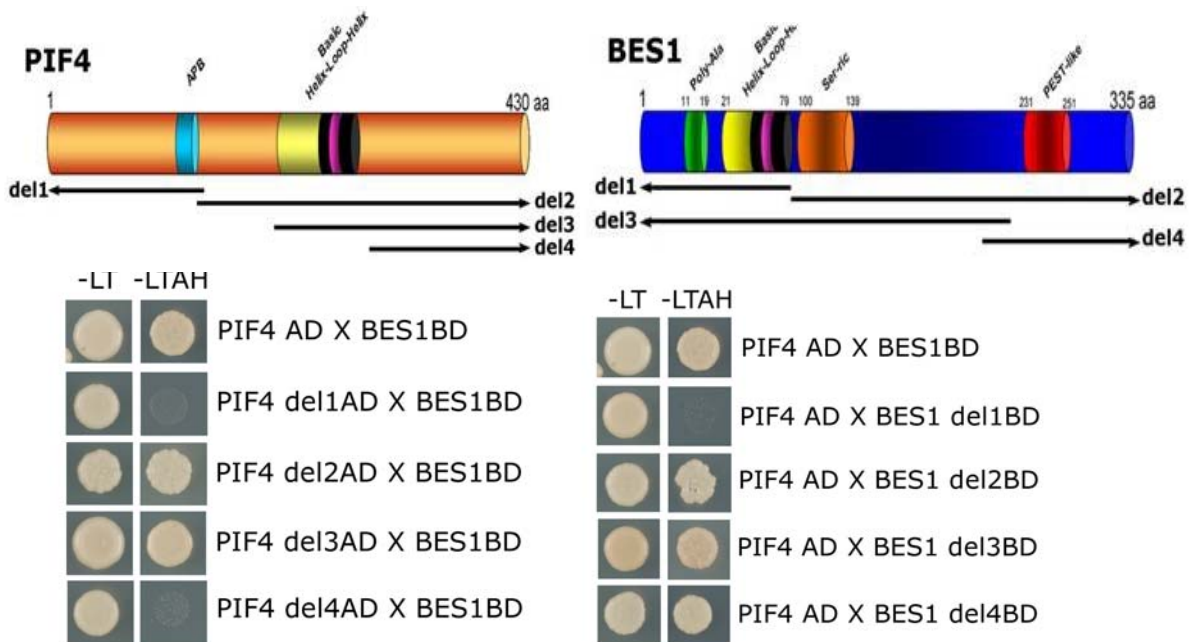


Dados estos antecedentes, consideramos oportuno estudiar si el dominio bHLH de PIF4 estaría también implicado en la interacción con BES1.

## 6.3. Estudios de interacción de las proteínas PIF4 y BES1 mediante ensayo doble híbrido en levadura

Para ello, se fusionó la región codificante correspondiente al factor BES1 al dominio de unión al ADN de GAL4, en el vector pGBKT7, y se llevaron a cabo estudios de co-transformación de esta construcción y la correspondiente a la fusión PIF4-AD en células AH109 de levadura. Como se observa en la Fig. 55, estos estudios demostraron una interacción clara entre ambas proteínas, lo que indicaría que igual

que se había reportado para BIM1, PIF4 es capaz de heterodimerizar con el factor BES1. (Fig. 55).



**Figura 55:** Análisis doble híbrido en levadura donde se estudia la interacción entre los diferentes dominios de las proteínas PIF4 y BES1. PIF4 y sus diferentes delecciones se fusionaron al AD de GAL4, y BES1 y sus formas truncadas al BD de este factor. Las diferentes construcciones se transformaron en la cepa AH109 de levadura y se seleccionaron en medio SD-LeuTrp y en medio SD-4 a fin de establecer su interacción.

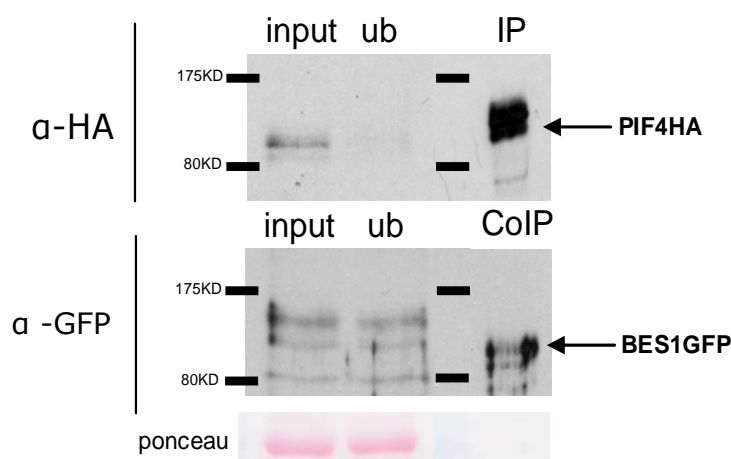
Dado que el factor BES1 incluye un dominio bHLH atípico, se consideró que la interacción PIF4-BES1 podría estar mediada por los dominios bHLH presentes en ambas proteínas y que ello podría modular la afinidad de unión al ADN de estos factores o quizás modificar la secuencia nucleotídica de los elementos de ADN a los que se uniría el complejo. A fin de analizar esta posibilidad se generaron diferentes delecciones de la proteína BES1, las cuales se analizaron junto con las delecciones ya disponibles de PIF4. Como se observa en la Fig. 55, pudimos confirmar en estos estudios que la unión de BES1 implica en dominio bHLH de PIF4, pero contrariamente a lo que esperábamos, el dominio de BES1 implicado en esta unión no es el dominio bHLH sino un dominio situado en las regiones central y C-terminal de la proteína (la del1 de BES1 incluye el dominio bHLH atípico y no interacciona con PIF4).

De estos resultados podemos concluir que las proteínas PIF4 y BES1 interaccionan entre sí pero que mientras que dicha interacción estaría mediada por el dominio bHLH de PIF4, implicaría un dominio distinto al dominio bHLH atípico de BES1. Este resultado es especialmente relevante ya que indicaría que ambas proteínas no se unirían al ADN como heterodímeros sino que la unión de BES1 posiblemente bloquea la capacidad de unión al ADN del homodímero PIF4, igual que habíamos observado anteriormente para los represores DELLA.

## 6.4. Interacción de las proteínas PIF4 y BES1 en planta

Para verificar que la interacción entre PIF4 y BES1 ocurre en *Arabidopsis*, diseñamos un experimento de co-inmunoprecipitación similar al utilizado para comprobar la interacción entre PIF4 y RGA. Para ello, se generaron primero líneas doble transgénicas que expresaran niveles elevados de ambas fusiones PIF4-HA y BES1-GFP.

Estas líneas se utilizaron en ensayos de co-inmunoprecipitación en los que los extractos proteicos obtenidos de estas plantas se inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti-HA o anti-GFP y se comprobó la presencia de la segunda proteína en el inmunoprecipitado, mediante inmunodetección con el anticuerpo correspondiente (Fig. 56).



**Figura 56:** Estudios de interacción de las proteínas PIF4 y BES1 en *Arabidopsis*, mediante ensayos de Co-Inmunoprecipitación. En el gel superior se muestra el resultado de inmunoprecipitar PIF4:HA con anticuerpo anti-HA y en el gel inferior la inmunodetección con el anticuerpo anti-GFP de la muestra inmunoprecipitada. Se observa que en la fracción inmunoprecipitada se recuperan preferentemente las formas no fosforiladas de BES1.

Como se observa en la figura 56, cuando inmunoprecipitamos con un anticuerpo anti-HA la proteína de fusión PIF4-HA, se recupera también la fusión BES1-GFP en la fracción inmunoprecipitada, lo que demuestra que ambas proteínas forman un complejo estable en la planta. Además, las formas de la proteína BES1-GFP que co-inmunoprecipitan con PIF4 corresponden a las formas menos fosforiladas de la proteína. Esto indicaría que sólo las formas no fosforiladas de BES1, con una localización nuclear, interaccionan con PIF4, evidenciando así un posible mecanismo de regulación de esta interacción.

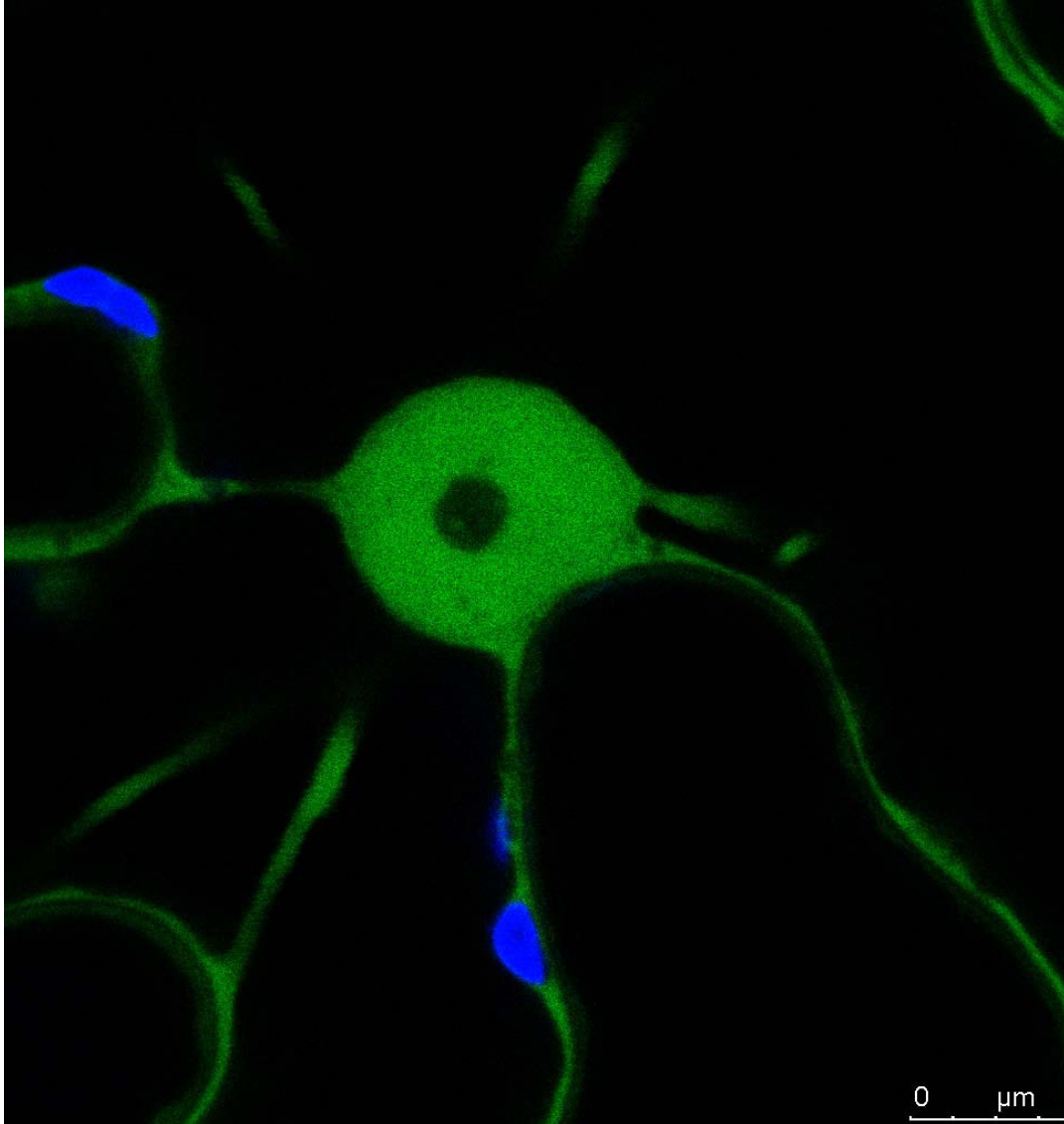
## 6.5. Fenotipo de las líneas transgénicas 35S:PIF4-HA 35S:BES1 RNAi

A fin de caracterizar a nivel funcional esta interacción se han generado líneas transgénicas que sobre-expresan PIF4 en un fondo *bes1* mutante y se están seleccionando en la actualidad líneas que sobre-expresan BES1 en un fondo mutante *pif4pif5*. Como fondo *bes1* mutante se utilizó la línea 35S:BES1 RNAi (amablemente cedida por el Dr. Yiang Yin), en la cuál se han silenciado los cinco genes homólogos a BES1, dado que mutaciones simples en estos genes no causan ningún fenotipo visible, debido a la redundancia funcional de los miembros de esta familia génica. El silenciamiento de la familia génica causa un fenotipo similar al de los mutantes insensibles o deficiente en BRs, y como se muestra en la Fig. 58, la sobreexpresión de PIF4 recupera este fenotipo.



**Figura 58:** Fenotipo de las líneas 35S:PIF4-HA BES1 RNAi. La sobreexpresión del factor PIF4 recupera el fenotipo enano de las líneas 35S:BES1 RNAi.

Esta observación estaría de acuerdo con los resultados anteriores en los que se hacía evidente que muchos de los genes de respuesta temprana a BRs, mostrarían estar activados por PIF4, a la vez que demostraría que el factor PIF4 funciona como activador de la transcripción de manera independiente a BES1. Sin embargo, este resultado no nos permite establecer la función reguladora de la interacción PIF4-BES1. Para la caracterización funcional de esta interacción serán especialmente relevantes las líneas *bes1-dpif4pif5* actualmente en proceso de selección. En efecto, el análisis fenotípico de estas líneas junto con un estudio transcriptómico de estas líneas mutantes junto con las líneas PIF4-HA BES1RNAi ya disponibles, permitirá establecer si BES1 actúa como activador de la transcripción al modular la actividad transcripcional de PIF4 o actúa por sí sólo como un activador transcripcional. De este modo, podremos establecer si estos dos reguladores transcripcionales controlan la expresión de los mismos genes o por el contrario regularían diferentes ramas de la ruta de señalización de BRs.



*Observación al microscopio confocal de la fluorescencia de PIF4:GFP en una hoja de Nicotiana benthamiana.*

## ***DISCUSIÓN***



## DISCUSIÓN

Las plantas precisan de la luz para realizar la fotosíntesis. Sin embargo, al ser organismos sésiles, se ven sometidas a condiciones de luz muy diferentes, según crezcan en campo abierto o en un ambiente sombreado. Es por ello que han desarrollado complejos mecanismos de percepción y señalización de la luz que les permiten adaptar su crecimiento para optimizar la captación de la luz incidente. La luz afecta, de hecho, todos los procesos de desarrollo desde la germinación de la semilla, hasta la inducción floral, teniendo un efecto especialmente relevante durante la germinación, donde estimula el desarrollo de las hojas y los cloroplastos, inhibe el crecimiento del tallo e induce la expresión de numerosos genes cloroplásticos y nucleares.

La enorme capacidad de adaptación de las plantas al medio ambiente se manifiesta prácticamente en todos los procesos de desarrollo que ocurren a lo largo del ciclo de vida de la planta y requiere del control coordinado ejercido por diferentes familias de fotorreceptores. La información ambiental que aportan estos fotorreceptores es subsecuentemente integrada con los propios programas intrínsecos de desarrollo de la planta, lo que se traduce en un nivel adicional de modulación de la expresión de genes con una función en la diferenciación celular y en el desarrollo de nuevos órganos.

Un buen ejemplo de esta regulación integrada, es la regulación de la elongación del hipocótilo durante las fases iniciales de desarrollo del brote. En este proceso se integran tanto la señal luminosa como las señales endógenas generadas por el propio programa de desarrollo de la planta, para así ejercer un control coordinado del crecimiento del tallo embrionario. Está bien establecido que las hormonas vegetales ejercerían una función señalizadora principal en dicha coordinación, dado que estas señales actúan a bajas concentraciones, modulando multitud de aspectos del crecimiento y desarrollo de la planta.

Los resultados presentados en esta memoria muestran cómo las hormonas giberelinas (GAs) y los brasinosteroides (BRs) controlan la actividad del factor de transcripción PIF4, implicado en la respuesta a la luz mediada por fitocromo. Se demuestra además una función clave de PIF4 como promotor del crecimiento y como integrador de las señales de luz, GAs y BRs, lo que permite a la planta adaptar su crecimiento en función del entorno en que se desarrolla.

## 1. Análisis de la Interacción PIF4-DELLA

En el primer bloque de resultados de esta memoria, se muestra mediante experimentos de Complementación Bimolecular Fluorescente (BiFC) y co-inmunoprecipitación con anticuerpos específicos, que las proteínas RGA y PIF4 de *Arabidopsis* interactúan en el núcleo de la planta. Mediante experimentos doble híbrido en levadura comprobamos que PIF4 interactúa no sólo con RGA, sino también con el resto de miembros de la familia DELLA de *Arabidopsis*.

Al iniciar este trabajo, estaba bien establecido que las DELLA actúan como represores del crecimiento de la planta, pero se desconocía cómo dichas proteínas ejercerían esta represión. La observación de una interacción entre estos represores y los factores PIF4, por tanto, abrieron una nueva vía de estudio ya que indicaban que las DELLA reprimirían la elongación del hipocótilo al inhibir la actividad transcripcional de factores implicados en el control del crecimiento y elongación celular en respuesta a la luz.

## 2. Dos posibles modelos de etiolación

En el trabajo publicado por *Huq y col.* en el 2002 (39), se reportaba que el factor de transcripción PIF4 de *Arabidopsis* actúa como un regulador negativo de la ruta de señalización mediada por fitocromo B. Dicha función se le atribuyó gracias a la observación que el mutante *pif4*, con una pérdida de función del gen, muestra un fenotipo hipersensible a la luz roja y exhibe un hipocótilo corto y cotiledones más abiertos que las líneas silvestres. Las líneas que sobre-expresan el factor, por el contrario, presentan un hipocótilo alargado y los cotiledones cerrados, fenotipo que es muy similar al de los mutantes *phyB*. Al estudiar el fenotipo del doble mutante *phyB pif4* estos autores constataron que dichas plantas muestran, en la luz, un fenotipo casi idéntico al de los mutantes *phyB*. Ésto, junto a la observación que PIF4 interactúa directamente con la proteína phyB, les llevó a concluir que PIF4 actuaría como un represor de la ruta de señalización del receptor de luz roja.

Los estudios llevados a cabo en este trabajo, en los que se analizó la estabilidad de la proteína PIF4 fusionada a GFP en la luz, sin embargo, demostraron que este factor sería inestable en la luz, y que su degradación dependería directamente de la actividad de PHYB. PIF4 se acumula en efecto en oscuridad pero es rápidamente degradado al transferir las plantas a la luz. Esta degradación, por otra parte, no se observa en un fondo mutante *phyB* o en plantas tratadas con el inhibidor de proteasoma MG132, lo que indicaría que, en presencia de luz, phyB se transloca al núcleo, interactúa con los factores PIF4, e induce su modificación y posterior degradación por el sistema 26 proteasoma.



Esta observación excluiría el modelo de acción propuesto por Hug y col., ya que demostraría que *phyB* ejerce un control negativo sobre el factor PIF4 y no al contrario, como habían propuesto estos autores. De hecho, el modelo propuesto se basaba en la observación que la mutación *phyB* es epistática a *pif4*. Sin embargo, este resultado no descarta que el fenotipo alargado del doble mutante pueda ser provocado por la función redundante de algún otro miembro de la familia. En efecto, al analizar la relación evolutiva entre los diferentes miembros de la familia PIF, observamos que el gen PIF5 agrupa en el mismo clado que PIF4, lo que indicaba que ambos factores podían compartir funciones similares. A fin de analizar esta posibilidad, se generó el triple mutante *phyBpif4pif5*, que tal y como esperábamos mostró hipocótilos más cortos que el mutante *phyB*. Este resultado confirmaba que la actividad de los factores PIF4 y PIF5 está regulada por *phyB*, y que el fenotipo alargado del doble mutante *phyBpif4* se debe a la redundancia funcional de ambos factores, lo que hace que sea necesaria la pérdida de función en ambos genes para que se observe una inhibición de la elongación del hipocótilo en el fondo genético *phyB*.

Así, la translocación de PHYA o PHYB al núcleo induce una rápida degradación de los factores PIF3, PIF1, PIF4 y PIF5; siendo éste el mecanismo general de regulación de la actividad de los PIFs (47, 49, 50, 194). En ausencia de luz, los fitocromos se localizan en su forma inactiva en el citosol, ello permite la acumulación de los factores PIF en el núcleo, promoviendo así la expresión de numerosos genes con una función en elongación celular.

### 3. Caracterización funcional de la interacción PIF4-DELLA

En estudios en los que se analizó la respuesta a GAs o el inhibidor PAC de las líneas mutantes *pif4* y *pif4pif5* o las líneas PIF4OX, observamos que estos mutantes son más sensibles al inhibidor PAC y muestran una respuesta hiposensible a la aplicación de GAs, mientras que las plantas que acumulan estos factores (*phyB*, PIF4OX) son menos sensibles al inhibidor PAC y presentan una respuesta mayor a la aplicación de GAs. Estos datos estarían de acuerdo con el hecho de que la acumulación de estos factores promueva un crecimiento etiolado y confirmarían un posible papel intermediario de los factores PIF4 y PIF5 en la ruta de señalización de GAs. La semejanza de fenotipos entre las plantas que acumulan PIFs y las plantas tratadas con GAs o que muestran una respuesta constitutiva a estas hormonas (mutante *global*), de hecho, sugiere que las GAs podrían actuar favoreciendo la estabilidad o la actividad de estos factores de transcripción.

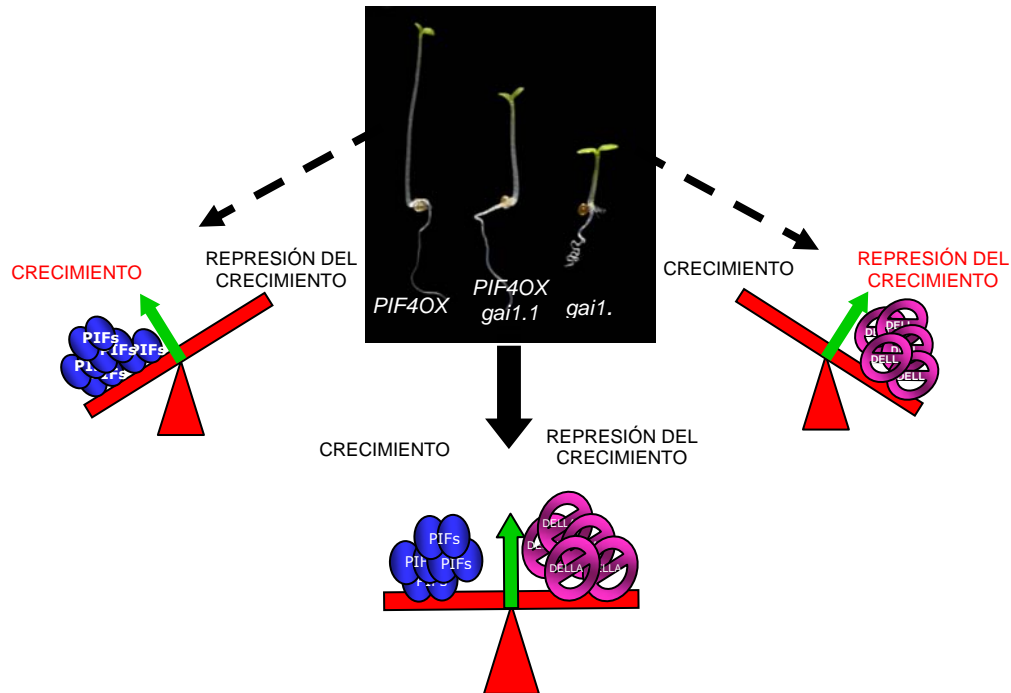
Si bien la estabilidad de los PIFs no parece ser afectada por las GAs, comprobamos en experimentos de expresión transitoria en células de *Arabidopsis*, que la presencia de las DELLA reprime la

expresión de genes regulados por PIF4, en tanto que su degradación provoca un incremento en los niveles de expresión de estos genes. Resultados similares fueron también obtenidos por otros grupos, tras analizar la expresión de los genes diana del factor PIF3, en mutantes deficientes en GAs(179).

En estudios destinados a identificar que dominios de la proteína PIF4 mediarían la interacción con las DELLAs, habíamos observado que el propio dominio bHLH, que une al ADN, es el responsable de la interacción con un dominio cremallera de leucinas en las DELLA. Este resultado es particularmente relevante, ya que indicaba que las DELLA secuestrarían estos factores en un complejo incapaz de unirse al ADN. Dicha actividad se comprobó en efecto en ensayos de retardación en gel y en estudios de inmunoprecipitación de cromatina. Ambos experimentos confirmaron que la unión de las DELLA al dominio bHLH de PIF4, impide la unión al ADN de este factor. También permitieron establecer que PIF4 une elementos G-box presentes en los promotores de sus genes diana. Los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina, por otra parte, establecieron que sólo aquellos genes con un patrón inducido de expresión en las líneas PIF4OX y que mostraban elementos G-box en su región promotora correspondían a dianas directas de este factor. Ninguno de los genes reprimidos en las líneas PIF4OX fue recuperado en la fracción inmunoprecipitada, independientemente que presentaran o no elementos G-box en su región promotora. Esto demostraría que PIF4 actúa como un activador transcripcional y que regula de manera directa la expresión de genes implicados en la remodelación de la pared celular como *XET*, *XTR7* y *LTP3* y también de factores de transcripción como *PIL1*. En estos ensayos observamos además que la aplicación de PAC, al inducir la acumulación de las DELLA, inhibe la unión de PIF4 a la región promotora de estos genes. Esto hace que su expresión se vea reprimida, inhibiéndose así el crecimiento de la planta.

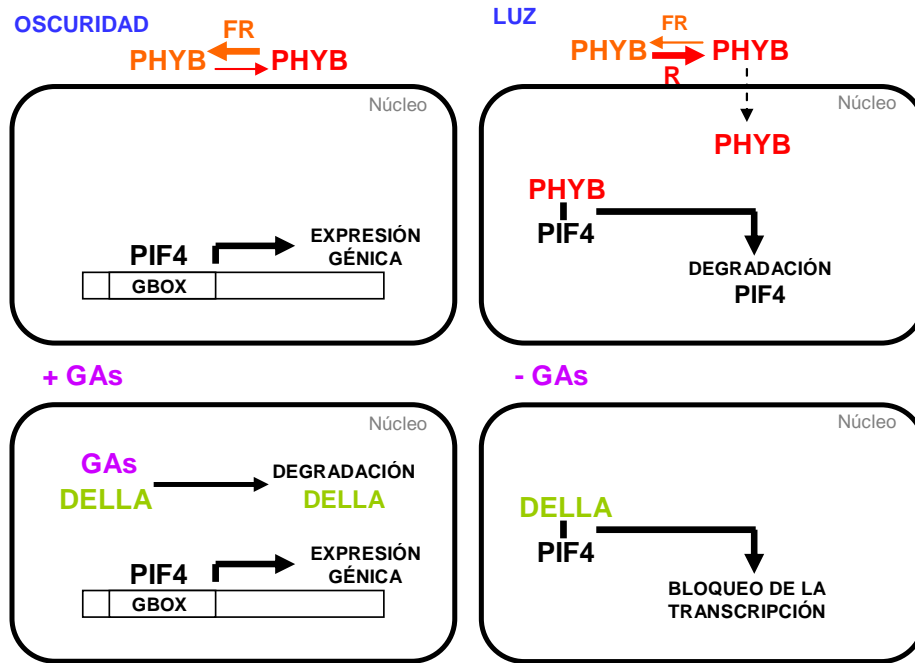
Puesto que disponíamos de líneas que acumulaban niveles elevados de las DELLAs, decidimos confirmar este modelo cruzando estas plantas con las líneas PIF4OX. Para ello seleccionamos las líneas *20ox* con un bloqueo en uno de los últimos pasos de síntesis de GAs y la mutación *gai1.1*, que acumula una forma estable de este represor. En ambos casos, el cruce de las líneas PIF4OX con las líneas mutantes resultó en plantas con unos hipocótilos de longitud intermedia, debido a que la acumulación de las DELLA secuestra el exceso de PIF4 en un complejo inactivo. Las líneas PIF4OX *20ox*, por otra parte, al ser tratadas con GAs, recuperaron el fenotipo alargado típico de las líneas PIF4OX, debido a que este tratamiento induce la degradación de las DELLA. Las líneas PIF4OX *gai1.1*, por el contrario, mantuvieron una longitud intermedia del hipocótilo aún tras la aplicación de GAs, debido a que este tratamiento no induce la degradación de la proteína mutante *gai1*. Este resultado pondría de

manifiesto que la longitud del hipocótilo viene determinada por el balance final entre las formas libre y complejada con las DELLAs del factor PIF4. Así, en presencia de un exceso de PIF4, éste se acumula en su forma libre, transcripcionalmente activa, en el núcleo, lo que permite la activación de los genes implicados en elongación celular. En presencia de un exceso de las DELLAs, por el contrario, estos represores secuestran el factor PIF4 en un complejo inactivo, lo que se traduce en una represión de los genes implicados en elongación celular.



Este mismo balance sería el responsable del control de la elongación del hipocótilo en respuesta a las condiciones ambientales, permitiendo así a la planta modular su crecimiento en función del entorno (Fig. 60).

En condiciones de oscuridad, phyB se localiza en el citosol, lo que permite la acumulación de PIF4 en el núcleo, que se traduce en un crecimiento exagerado del hipocótilo. En presencia de luz, phyB es activado a su forma Pfr, que es rápidamente translocada al núcleo. En el núcleo este fotorreceptor induce la degradación de PIF4, inhibiendo el crecimiento del hipocótilo. Conjuntamente con esta regulación, operaría también el efecto represor ejercido por las DELLAs. Estos represores, se acumularían en el núcleo en ausencia de GAs (la síntesis de estas hormonas se reprime, por ejemplo, en condiciones de estrés hídrico y otros tipos de estrés). Dicha acumulación favorece la interacción de estos represores con los PIF, impidiendo que éstos se unan a sus dianas génicas y activen su expresión génica, lo que se traduce en una inhibición del crecimiento. En presencia de GAs, por el contrario, las DELLA son degradadas, los factores PIF se acumulan libres en el núcleo y se induce la elongación celular.



**Figura 60:** Modelo de acción de las proteínas DELLA, phyB y PIF4 en el control de la elongación celular.

Según este modelo los factores PIF desempeñarían una función clave como integradores de las señales de luz y GAs, al ser degradados en presencia de luz o secuestrados por los represores DELLA en una forma transcripcionalmente inactiva. Estos factores jugarían por tanto un papel central en la respuesta de adaptación de la planta a las condiciones de luz circundantes y a diferentes condiciones de estrés (estas suelen inducir la acumulación de las DELLAs).

#### 4. Interacción de las rutas de señalización de GAs y BRs.

Tanto las hormonas GAs y como los BRs ejercen una regulación positiva sobre el crecimiento vegetal. Existen numerosas indicaciones que sugieren que existiría una regulación cruzada entre ambas rutas de señalización ya que se ha visto que la aplicación conjunta de ambas hormonas induce una respuesta sinérgica claramente mayor que la aplicación de cada una de estas hormonas por separado. En la actualidad, se han identificado prácticamente todos los intermediarios de señalización que participarían en la transducción de la señal de estas hormonas, sin embargo, no se han identificado los nodos de interacción entre ambas vías ni se comprende bien por que la planta utiliza dos rutas de señalización alternativas para regular el mismo proceso.

En este trabajo observamos que la aplicación de BL era capaz de revertir parcialmente el fenotipo enano de los mutantes *gai1.1* y *sly1.10*, insensibles a GAs. Con el fin caracterizar mejor este fenómeno, se pre-trataron plantas silvestres con los inhibidores PAC

(inhibe la síntesis de GAs) y BRZ (inhibe la síntesis de BRs) y luego se aplicó GAs o BL a estas plantas. Observamos así que mientras que el aporte exógeno de BL revierte el fenotipo enano causado por la aplicación de PAC, el aporte de GAs no es capaz de rescatar el fenotipo enano causado por la aplicación de BRZ, lo que indicaría que la planta necesita una ruta activa de BRs para poder responder a GAs.

Para determinar si los BRs son requeridos en un paso temprano o tardío la ruta de señalización de GAs, estudiamos si las proteínas DELLA se degradaban tras la aplicación de GAs en las plantas deficientes en BRs. En efecto, si la interacción con la ruta de los BRs ocurre en un paso temprano de la ruta de señalización de las GAs (en caso de que los BRs regulen la actividad del receptor GID1 o del complejo E3 ligasa SCF<sup>SLY</sup>) esperamos que los represores DELLA no se degradaran en las plantas *det2.1* tratadas con GAs, en tanto que si la interacción ocurre en un paso más tardío, observaríamos una degradación similar a la que se detecta en plantas silvestres. Contrario a lo que hubiésemos esperado, observamos que la aplicación de GAs induce una rápida degradación de la proteína GFP-RGA, tanto en el mutante *det2.1* como en las plantas control, aunque en el mutante dicha degradación no viene acompañada por una elongación del hipocótilo. Este resultado indicaba que los BRs controlan la elongación del hipocótilo, en un paso posterior a la represión ejercida por los represores DELLA y de acuerdo con este resultado observamos que la aplicación de BRZ provoca una similar represión del crecimiento en el quintuple mutante DELLA (*global*) que en las plantas silvestres utilizadas como control.

Dado que resultados anteriores obtenidos en este trabajo demostraban que PIF4 es un activador transcripcional con un papel central en el control de la elongación y crecimiento celular, nos planteamos si los BRs podían controlar la actividad transcripcional de este factor. En este sentido, se ha reportado recientemente que PIF4 mediaría la respuesta de elongación inducida por un incremento en la temperatura (195), y que las plantas deficientes en BRs no muestran esta respuesta de elongación cuando son sometidas a similares tratamientos (196). Por otra parte, los BRs favorecen la relajación de la pared celular (159), al activar la expresión de genes que codifican distintos enzimas del tipo *Xiloglucan endotransglicosilasas/hidrolasas* o *expansinas* (160-163), enzimas que a su vez habíamos encontrado que estaban modulados por PIF4.

Todas estas evidencias estarían a favor de una función de los BRs en la regulación de la actividad de los PIFs, aspecto que se estudió en mayor profundidad.

## 5. PIF4 como posible efector de la ruta de señalización de BRs

Una confirmación fenotípica de que PIF4 podría actuar como un efector de la ruta de BRs, se obtuvo al analizar la respuesta de las plantas PIF4OX, *pif4* y *pif4pif5* a tratamientos con BRZ y BL. En estos estudios observamos que las líneas que sobreexpresan PIF4 son más sensibles a BL, y muestran una respuesta menor a BRZ y que por el contrario, las plantas *pif4* y *pif4pif5*, muestran una menor respuesta a BL y son hipersensibles a BRZ.

A su vez, al tratar las plantas con BRZ+GAs, observamos que las líneas *phyB* (estos mutantes acumulan niveles elevados de los PIFs) o PIF4OX, al contrario de las plantas silvestres, presentan un fenotipo más alargado en respuesta a este tratamiento que en presencia de BRZ. Dicho comportamiento se asemeja al observado en los mutantes *bzr1-d*, con una respuesta constitutiva a BRs, lo que indicaría que las líneas PIF4OX, en lo que a la elongación del hypocótilo se refiere, se caracterizan por presentar una respuesta constitutiva a estas hormonas.

Cuando se compararon los perfiles transcriptómicos de las plantas PIF4OX con los de plantas tratadas con BR, observamos que ambos perfiles son muy semejantes. En los trabajos publicados por Jennifer Nemhauser en 2004 (172), Yanhai Yin en 2002 y 2005 (130, 186) y Céline F. Mouchel en 2006, por ejemplo, se reportan distintas relaciones de genes activados en respuesta a los BRs, y observamos que una parte importante de estos genes se hallan también sobreexpresados en las plantas PIF4OX. Esta observación podría indicar que la activación de estos genes en respuesta a BL, se debe en realidad a una inducción/estabilización del factor PIF4 en respuesta a este tratamiento, aspecto que se analizó estudiando el patrón de expresión del gen *PIL1*, un gen que en estudios de inmunoprecipitación de cromatin, habíamos visto que corresponde a una diana directa de PIF4.

Al transferir las plantas desde un ambiente rico en luz roja (*high R/FR*) a un ambiente sombreado rico en luz rojo lejana (*low R/FR*) se induce una elongación del tallo característica que se conoce como respuesta de huída de la sombra o "*shade avoidance*". *PIL1* es uno de los genes marcadores de esta respuesta, ya que su expresión se induce rápidamente tras transferir la planta a un ambiente rico en FR. Esta respuesta está mediada por los factores PIF4 y PIF5(44), y en concordancia con estos resultados, observamos que en líneas *PIL1:LUC* se produce una fuerte activación de la actividad luciferasa ya a la media hora de transferir las plantas a FR. Esta misma respuesta no se observó en plantas crecidas en medio suplementado con BRZ, lo que indicaría que este inhibidor reprime la actividad transcripcional o estabilidad de los factores PIF4/PIF5.

Las siguientes evidencias: a) las plantas que acumulan PIFs son menos sensibles a BRZ; b) existe un paralelismo entre los genes de respuesta a BRs y los activados por PIF4; y c) el gen *PIL1* no se expresa en presencia de BRZ, nos llevaron a concluir que la actividad transcripcional de PIF4 debe estar regulada por la ruta de señalización de BRs, aspecto que procedimos a estudiar en mayor profundidad.

En una primera aproximación encaminada a determinar cómo los BRs modularían la actividad de este factor, analizamos si existían en la literatura datos que indicaran que la transcripción de PIF4 se encuentra inhibida en los mutantes deficientes en BRs. Dado que no encontramos ninguna evidencia indicativa de una función de los BRs en la activación de la expresión de este factor, analizamos si estas hormonas afectaban la estabilidad de la proteína PIF4. Estos estudios demostraron que, en efecto, los niveles de acumulación del factor PIF4 son muy superiores en las plantas tratadas con BRs que en las plantas control y por el contrario, que en los mutantes insensibles a BL, apenas se observan niveles detectables de este factor.

## 6. Los brassinosteroides modulan la estabilidad de PIF4

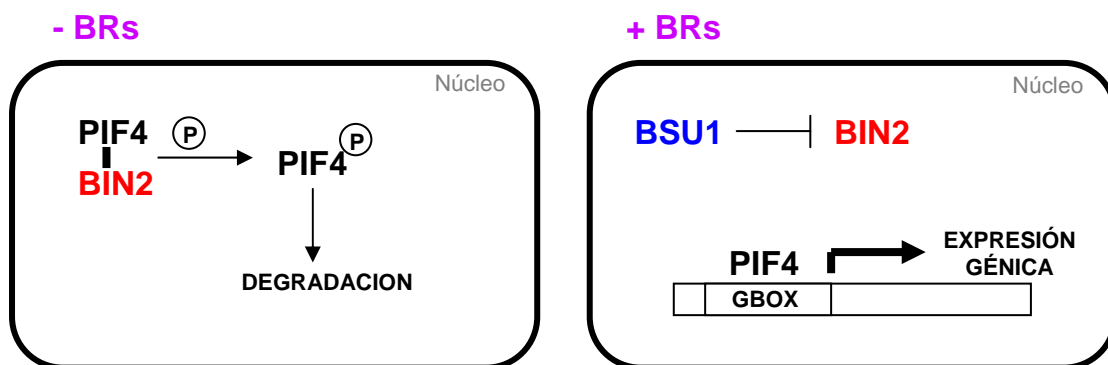
Estos estudios permitieron también observar que la proteína PIF4 se separa en geles de poliacrilamida en bandas de distinta movilidad electroforética, que podrían corresponder a formas fosforiladas de la proteína. En las plantas tratadas con BRs, se acumulan de manera diferencial aquellas bandas con una mayor movilidad electroforética, o formas no fosforiladas de la proteína, lo que indicaría que los BRs podrían regular una actividad quinasa que fosforila estos factores, induciendo su degradación. Dado que se había reportado una función principal de la GSK3-quinasa BIN2 en la ruta de señalización de BRs, decidimos estudiar si esta quinasa podía fosforilar PIF4 e inducir su degradación.

BIN2 fosforila los residuos Ser/Thr con un motivo consenso S/T-X-X-X-S/T, presente en múltiples copias en sus proteínas diana, BES1 y BZR1. En ausencia de BRs, BIN2 se encuentra en su forma fosforilada activa, que fosforila estos factores induciendo su degradación. Recientemente, se ha reportado que la cascada de señalización de BRs activa la fosfatasa BSU1, responsable de defosforilar BIN2 e inactivar esta enzima. Ello permitiría la acumulación nuclear de los factores BES1 y BZR1, y la expresión de los genes regulados por estas hormonas. Curiosamente, PIF4 posee varias regiones con los motivos de reconocimiento de la quinasa BIN2, por lo que presumiblemente podría ser sustrato de esta quinasa.

En ensayos doble híbrido en levadura, en efecto observamos que PIF4 interacciona con la GSK3 quinasa BIN2, y en reacciones de fosforilación *in vitro* con las proteínas purificadas pudimos comprobar

que este factor es uno de los substratos de la actividad quinasa de este enzima. Este resultado explicaría por qué PIF4 es inestable en ausencia de BRs y se acumularía en plantas tratadas con BL. Esto es, en ausencia de BRs, BIN2 es activa y fosforila a PIF4, que en este estado sería susceptible de ser degradado por el sistema 26S proteasoma. Por el contrario, en presencia de BL, BIN2 es inactivado por BSU1, lo que hace que PIF4 no sea fosforilado y pueda acumularse en el núcleo.

Esto explicaría el fenotipo parcialmente de-etiolado de los mutantes *det2.1* crecidos en oscuridad. En ausencia de BRs, BIN2 es activo, fosforila PIF4 e induce la degradación de estos factores. Aunque en oscuridad PIF4 no es desestabilizado por phyB, la activación de BIN2 favorece la degradación de este factor a través de un mecanismo independiente de phyB, promoviendo así una inhibición de la elongación del hipocótilo y una apertura parcial de los cotiledones, similar a la observada en plantas que han percibido luz. Este mecanismo de regulación explicaría también la respuesta alterada a la temperatura, sombra o a la aplicación de GAs de estos mutantes (Fig. 61).



**Figura 61:** Regulación de la estabilidad de PIF4 por la GSK3 quinasa BIN2, con un papel central en la ruta de señalización de los BRs. En ausencia de BRs, BIN2 fosforila a PIF4 e induce la degradación de este factor por el sistema proteasoma. En presencia de BRs, BIN2 es inactivado por BSU1 y PIF4 no es fosforilado. Ello permite la acumulación de este factor en el núcleo, promoviendo así la expresión de genes con una función en elongación celular.

## 7. Interacción de los factores PIF4 y BES1

Los factores de transcripción BES1 y BZR1 se aislaron de manera independiente en un cribado de mutantes que mostraran insensibilidad a BRZ (*Brassinazole Resistant-1*) y en una búsqueda de mutantes capaces de rescatar el fenotipo enano causado por la mutación *bri1-1* (130). Estos factores comparten un 88% de identidad y codifican una familia de proteínas bHLH atípicas, responsables de activar la expresión de los genes de respuesta a BRs. Se ha reportado, en efecto, que estos reguladores se unirían a elementos E-box (GANNTC) conservados en los promotores de sus genes diana, activando así su expresión. En ausencia de BRs, estos factores son fosforilados por la quinasa BIN2, lo que promueve su exclusión del núcleo y su rápida degradación(134). Recientemente se



ha reportado que estos factores interaccionarían con el factor bHLH, BIM1 (186); y que dicha interacción favorece la unión de BES1 a sus dianas génicas. Basándonos en este resultado analizamos si BES1 podría también interaccionar con el factor bHLH PIF4, aunque este factor no se agrupa en la misma subfamilia que BIM1. Mediante estudios doble híbrido y experimentos de co-inmunoprecipitación en *Arabidopsis*, confirmamos que BES1 interacciona con PIF4 y que dicha interacción estaría mediada por el dominio bHLH de PIF4 y la región C-terminal de BES1.

Este resultado fue en parte inesperado ya que tanto PIF4 como BES1, son factores de tipo bHLH y por tanto una heterodimerización mediada por el dominio de unión al ADN, se veía como el mecanismo más probable de regulación de la afinidad de unión al ADN o de la selectividad de unión de estos factores. Cabe también destacar que las formas de BES1 que coimmunoprecipitan con PIF4 no corresponden a las más abundantes, sino que son las formas de menor tamaño, o formas activas no fosforiladas de la proteína, lo que estaría de acuerdo con una interacción de estos factores en el núcleo.

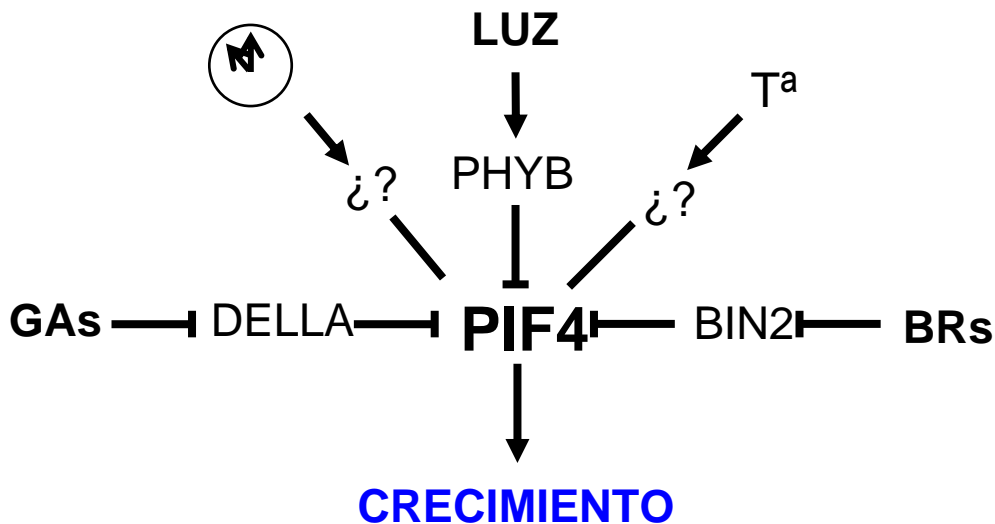
En un análisis fenotípico de las líneas PIF4OX 35S:BES1 RNAi hemos comprobado que la sobreexpresión de PIF4 recupera el fenotipo enano de las líneas BES1 RNAi, lo que indicaría que PIF4 no precisa formar heterodímeros con BES1 para su actividad transcripcional. La construcción del triple mutante *pif4pif5bes1d*, nos permitirá comprender mejor la función de la interacción entre estos factores ya que podremos comparar los perfiles transcriptómicos de esta líneas con los de las líneas PIF4OX BES1-RNAi a fin de establecer si estos factores regularían dos ramas independientes de la ruta de respuesta a BRs o si por el contrario necesitan uno del otro para desempeñar su actividad.

## 8. Control hormonal de la respuesta a la luz

Los datos presentados en este trabajo de tesis doctoral resuelven ciertas incógnitas y ponen de manifiesto la importancia de las GAs y BRs en el proceso de integración de la información ambiental (Fig 63).

La luz es una importante fuente de energía, así como una fuente de información esencial para la planta. Los fitocromos perciben los cambios en el espectro R/FR informando a la planta de cualquier oscilación en este espectro, debida a las plantas que crecen en estrecha proximidad. PIF4 y PIF5, por otra parte, funcionarían como nodos integradores responsables de conectar la información ambiental percibida a través de phyB, con el patrón de desarrollo interno de la planta. En high R/FR, PIF4 y PIF5 son degradados tras interaccionar con la forma activa Pfr del fotorreceptor. Sin embargo, en ambientes sombreados, la mayor parte de las moléculas de

fitocromo se encuentran en su estado inactivo Pr en el citosol. En estas condiciones los PIFs se acumulan en el núcleo, activando la transcripción de sus genes diana. Se ha visto además que la transcripción de PIF4 está regulada por el reloj circadiano y la temperatura.



**Figura 62:** Modelo que integra los diferentes factores que regulan la actividad de los PIFs. Ambientales: El reloj circadiano, la temperatura y la luz. Endógenos: Las hormonas giberelinas y los brasinosteroides.

Estos factores actúan también como integradores de las señales hormonales endógenas de la planta y de los cambios en los niveles de síntesis de estas hormonas que se producen en respuesta a condiciones ambientales adversas o a distintas condiciones de estrés. Así, en este trabajo se demuestra que dos señales hormonales, las GAs y BRs, juegan un papel principal en la modulación de la actividad transcripcional de los PIFs. En ausencia de GAs, los represores DELLA se acumulan en el núcleo y secuestran estos factores en un complejo transcripcionalmente inactivo, impidiendo su unión al ADN. En presencia de GAs, las proteínas DELLA son rápidamente degradadas por el sistema 26S proteasoma, permitiendo así la acumulación de estos factores en su forma libre en el núcleo y la activación de los genes diana de estos factores, con una función en elongación celular.

La ausencia de BRs, por otra parte, activaría la quinasa BIN2, responsable de fosforilar los factores BES1/BZR1 y PIF4, y inducir su degradación. En presencia de BRs, se activa una cascada de fosforilación que activa en último término la fosfatasa BSU1 responsable de defosforilar BIN2, e inactivar esta quinasa. Ello permite una acumulación de los factores BES1/BZR1 y PIF4 en su forma estable defosforilada, y la activación de los genes diana de estos factores, con una función en crecimiento y elongación celular.

El enorme abanico de señales (i.e. luz, temperatura, el reloj endógeno y los niveles de las hormonas GAs y BRs) integradas por

estos factores de transcripción sin duda permiten un control tremendamente fino de su actividad transcripcional, permitiendo así a la planta optimizar su crecimiento en función de condiciones ambientales variable a lo largo de todo su ciclo de vida.



## ***CONCLUSIONES***



## CONCLUSIONES

- PIF4 se acumula en el núcleo en oscuridad, en esta situación se une a sus dianas génicas promoviendo la expresión de genes que provocan la elongación celular. Cuando la planta percibe la luz, PHYB se transloca al núcleo e interacciona con PIF4 provocando su degradación a través del proteasoma.
- En ausencia de GAs, las DELLA interaccionan con los PIF, impidiendo que éstos se unan a sus dianas génicas y activen su expresión. Como resultado, el crecimiento es inhibido. Por contra, en presencia de GAs, las DELLA son degradadas, los factores PIF se acumulan libres en el núcleo y se induce la elongación celular.
- La estabilidad de PIF4 depende de la cantidad de BRs en la planta. Sin BRs, la proteína-quinasa BIN2 se encuentra activa. Esta quinasa fosforila motivos S/T-X-X-X-S/T en los factores de transcripción BES1/BZR1, de respuesta a BRs, y también en el factor PIF4, promoviendo la degradación de estos factores por el sistema proteasoma. En presencia de BRs, se activa una cadena de fosforilaciones que terminan con la inactivación de BIN2 por acción de la fosfatasa BSU1. En esta situación, BES1/BZR1 y PIF4 se encuentran defosforilados y se acumulan en el núcleo.
- BES1 interacciona con PIF4. La formación del heterodímero BES1-PIF4 podría regular la expresión de genes de respuesta temprana a BRs, pero se necesitan más datos moleculares que permitan establecer la función de esta interacción.
- Los factores PIF desempeñan una función central en la integración de las señales de luz, GAs y BRs. Esta compleja modulación de su actividad transcripcional permite a la planta adaptar su crecimiento y desarrollo a condiciones ambientales cambiantes a lo largo de su ciclo de vida.









## ANEXOS

## 1. Artículos publicados durante el trabajo de tesis doctoral

nature

Vol 451 | 24 January 2008 | doi:10.1038/nature06520

## LETTERS

## A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation

Miguel de Lucas<sup>1\*</sup>, Jean-Michel Davière<sup>1\*</sup>, Mariana Rodríguez-Falcón<sup>1\*</sup>, Mariela Pontin<sup>1</sup>, Juan Manuel Iglesias-Pedraz<sup>1</sup>, Séverine Lorrain<sup>2</sup>, Christian Fankhauser<sup>2</sup>, Miguel Angel Blázquez<sup>3</sup>, Elena Titarenko<sup>1</sup> & Salomé Prat<sup>1</sup>

Cell elongation during seedling development is antagonistically regulated by light and gibberellins (GAs)<sup>1,2</sup>. Light induces photomorphogenesis, leading to inhibition of hypocotyl growth, whereas GAs promote etiolated growth, characterized by increased hypocotyl elongation. The mechanism underlying this antagonistic interaction remains unclear. Here we report on the central role of the *Arabidopsis thaliana* nuclear transcription factor PIF4 (encoded by *PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4*)<sup>3</sup> in the positive control of genes mediating cell elongation and show that this factor is negatively regulated by the light photoreceptor phyB (ref. 4) and by DELLA proteins that have a key repressor function in GA signalling<sup>5</sup>. Our results demonstrate that PIF4 is destabilized by phyB in the light and that DELLAs block PIF4 transcriptional activity by binding the DNA-recognition domain of this factor. We show that GAs abrogate such repression by promoting DELLA destabilization, and therefore cause a concomitant accumulation of free PIF4 in the nucleus. Consistent with this model, intermediate hypocotyl lengths were observed in transgenic plants over-accumulating both DELLAs and PIF4. Destabilization of this factor by phyB, together with its inactivation by DELLAs, constitutes a protein interaction framework that explains how plants integrate both light and GA signals to optimize growth and development in response to changing environments.

Seedlings undergo alternative developmental programmes depending on whether they are germinated in the dark or in the light. Dark-grown seedlings exhibit etiolated growth, characterized by long hypocotyls, small and closed cotyledons with undifferentiated chloroplasts, and the repression of light-regulated genes<sup>1</sup>. During photomorphogenesis, light inhibits hypocotyl growth and promotes cotyledon opening and expansion, chloroplast differentiation and the activation of light-regulated genes. phyB is the main photoreceptor mediating de-etiolation in red light<sup>4,6</sup>. Absorption of red light converts this photoreceptor into a Pfr active form that is translocated into the nucleus<sup>7,8</sup>; Pfr interacts there with members of the bHLH family of phytochrome-interacting factors (PIFs), involved in modulation of light-regulated genes with a role in photomorphogenesis<sup>1,4</sup>.

Gibberellins (GAs) exert an opposite effect to light on photomorphogenesis<sup>2</sup>. GAs promote etiolated growth, whereas GA-deficiency induces a partially de-etiolated phenotype in the dark, which is reverted by a lack of DELLA function<sup>2,9</sup>. DELLAs function as key repressors of GA-responsive growth, by inhibiting GA-regulated gene expression<sup>5</sup>. These repressors accumulate in the nucleus and are rapidly degraded in response to GA<sup>10,11</sup>. In *Arabidopsis*, RGA

(encoded by *repressor of ga1-3*) and GAI (encoded by *GA insensitive*) are the main repressors controlling hypocotyl growth and stem elongation<sup>12,13</sup>. Mutations within the DELLA domain render these proteins resistant to degradation, and result in a GA-insensitive dwarf phenotype<sup>12,14</sup>. This domain binds the GA receptor GID1 (ref. 15) in a GA-dependent manner, which promotes interaction with the F-box protein SLEEPY1 (SLY1) and polyubiquitination of these proteins by the SCF<sup>SLY1/GID2</sup> ligase complex, thereby signalling their degradation by the 26S proteasome pathway<sup>16,17</sup>.

The functional mechanism by which DELLAs regulate gene expression and promote photomorphogenesis remains unclear. Attempts to demonstrate direct DNA-binding ability of DELLAs have been unsuccessful, indicating that these repressors might exert their negative regulatory function through protein–protein interaction with other transcription factors. Here we report on the interaction of DELLAs with the PIF4 and PIF3 bHLH factors using a yeast two-hybrid-based screen (Fig. 1a and Supplementary Fig. 1), and provide evidence for a crucial role of these factors in the integration of both GA and light signals to modulate hypocotyl growth.

Pull-down assays using a purified glutathione S-transferase (GST)–RGA protein confirmed interaction of DELLAs with the PIF4 and PIF3 factors and showed an increased affinity for PIF4 binding (Fig. 1b). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays in *Nicotiana benthamiana* leaves demonstrated interaction of these proteins in living plant cells (Fig. 1c). In addition, co-immunoprecipitation studies using transgenic green fluorescent protein (GFP)–RGA lines<sup>10</sup> further corroborated this interaction (Fig. 1d). Co-immunoprecipitation with an anti-GFP antibody and subsequent detection with an antibody raised against the PIF4 protein showed that binding to the RGA repressor is more efficient in seedlings treated with the inhibitor of GA biosynthesis paclobutrazol (PAC), which induces RGA accumulation, and also in seedlings exposed to dark (see Fig. 1d). Treatment with GA promotes RGA degradation and abolishes this interaction (Fig. 1d).

The *pif4* mutant has short hypocotyls in red and white light, whereas PIF4 overexpressors (35S-PIF4) show a long-hypocotyl phenotype that resembles the *phyB* mutants<sup>3</sup>. We also demonstrate that these plants have an altered response to PAC and GA treatments, indicative of a PIF4 role in GA-induced hypocotyl growth control. Response to increasing concentrations of PAC was reduced in *phyB* and 35S-PIF4 (in an *slr2* background) seedlings, whereas *pif4* seedlings showed a hypersensitive response to this inhibitor (Fig. 2a, c). GA application, in turn, induced an exaggerated elongation response in *phyB* and 35S-PIF4 seedlings, whereas *pif4* was partially insensitive to this treatment (Fig. 2b, c). These results thus point to a possible

<sup>1</sup>Departamento de Genética Molecular de Plantas, Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, Campus Univ. Autónoma de Madrid, Cantoblanco. c/ Darwin 3, 28049 Madrid, Spain.

<sup>2</sup>Centre for Integrative Genomics, University of Lausanne, Genopode Building, CH-1015 Lausanne, Switzerland. <sup>3</sup>Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Universidad Politécnica de Valencia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 46022 Valencia, Spain.

\*These authors contributed equally to this work.

## 2. Descripción de genes más representativos que han sido mencionados en la memoria

<b>ABR.</b>	<b>NOMBRE</b>	<b>CODIGO AT</b>
<i>PHYA</i>	PhytochromeA	<a href="#">AT1G09570</a>
<i>PHYB</i>	PhytochromeA	<a href="#">AT2G18790</a>
<i>HY5</i>	Elongated Hypocotyl 5	<a href="#">AT5G11670</a>
<i>HFR1</i>	Long Hypocotyl in Far Red	<a href="#">AT1G02340</a>
<i>PIF3</i>	Phytochrome Interacting factor 3	<a href="#">AT1G09530</a>
<i>PIF4</i>	Phytochrome Interacting factor 4	<a href="#">AT2G43010</a>
<i>PIF5</i>	Phytochrome Interacting factor 5	<a href="#">AT3G50060</a>
<i>PIF1</i>	Phytochrome Interacting factor 1	<a href="#">AT2G20180</a>
<i>GA20OX</i>	GA 20-oxidasa	
<i>GA3OX</i>	GA 3-oxidasa	
<i>GID1a/b/c</i>	GA insensitive dwarf 1 a/b/c	<a href="#">AT3G05120</a> <a href="#">AT3G63010</a> <a href="#">AT5G27320</a>
<i>SLY</i>	SLEEPY1	<a href="#">AT4G24210</a>
<i>GAI</i>	Gibberellic Acid Insensitive	<a href="#">AT1G14920</a>
<i>RGA</i>	Repressor of <i>ga1-3</i>	<a href="#">AT2601570</a>
<i>RGL1</i>	RGA-Like 1	<a href="#">AT1G66350</a>
<i>RGL2</i>	RGA-Like 2	<a href="#">AT3G03450</a>
<i>RGL3</i>	RGA-Like 3	<a href="#">AT5G17490</a>
<i>PIL1</i>	PIF3-Like 1	<a href="#">AT2G46970</a>
<i>LTP3</i>	Lipid Transfer Protein 3	<a href="#">AT5G59320</a>
<i>XTR7</i>	Xiloglucan Endotransglycosylase 7	<a href="#">AT4G14130</a>
<i>CPD</i>	Constitutive Photomorphogenic Dwarf	<a href="#">AT5G05690</a>
<i>DET2</i>	De-etiolated 2 / Dwarf 6	<a href="#">AT2G38050</a>
<i>BRI1</i>	Brassinosteroid Insensitive 1	<a href="#">AT4G39400</a>
<i>BAK1</i>	BRI1-Associated Receptor Kinase 1	<a href="#">AT4g33430</a>
<i>BKI1</i>	BRI1-Kinase Inhibitor 1	<a href="#">AT5G42750</a>
<i>BSU1</i>	BRI1-Suppressor 1	<a href="#">AT1G03445</a>
<i>BIN2</i>	Brassinosteroid Insensitive 2	<a href="#">AT4G18710</a>
<i>BES1</i>	BRI1-EMS-Supresor 1	<a href="#">AT1G19350</a>
<i>BZR1</i>	Brassinazole Resistant 1	<a href="#">AT1G75080</a>
<i>BIM1</i>	BES interacting Myc-like protein 1	<a href="#">AT5G08130</a>
<i>BEE1</i>	BR Enhanced Expression 1	<a href="#">AT1G18400</a>

### 3. Lista de Oligonucleótidos Utilizados en la memoria

5NcoSt23	TGCCATGGATCCATGTCTTCCTG
ACTIN8-F	GACTCAGATCATGTTTGAGACCTTT
ACTIN8-R	CCAGAGTCCAACACAATACCG
APB PIF4 REV	TCACGTCTCTGAGGTTGGTCTCTG
AT20OX1-F	GCGACGACATGAGCCGCTCAAATC
AT20OX1-R	CTCTCTAAAGTAGTCCCGTTTTACG
AT2G46970CHIP-F	ATTTAGAATGTGTCGAGAGGG
AT4G14130CHIP-F	ATTGTGTAATCGGAATTAATTGG
AT4G14130CHIP-R	ATCGTTTATGGTGTGGCATAG
AT4G30290CHIP-F	TCGTTCCCATATATTAGACTAG
AT4G30290CHIP-R	GATTCGTTGTTGGCTGTTGCC
AT5G45280CHIP-F	GAGGATAAAGAACGCCGATTC
AT5G45280CHIP-R	CATATCAATTCGGCTCATGAG
ATLTP3-F	CCCAAAAAGAAGTTCAAACAC
ATLTP3-R	TCGTATGCGTTGGAGGAGATATC
AtPIF4Del3F	CACCGGATCAAACCGAAGGAGTCG
AtPIF4Del4f	CACCGTGATGTGGATGGGGAGTGG
BES11delec4F	CACCATGGCTGCTAAACAGTCAATG
BES1delec1R	AGCCATGTCACCAGGTAGAG
BES1delec2F	CACCATGGCTGGATCATCTTCTCGAGC
BES1delec3 R	CAAAGAAGTCATTGACTGTTTTAGC
Bes1F	CACCGAATTCATGACGTCTGACGGAGCAACG
Bes1R	ACCCGGGCAACTATGAGCTTTACCATTTC
BIN2F	CACCGAATTCATGGCTGATGATAAGGAGATG
BIN2R	TGGGATCCAGTTCAGATTGATTCAAGAAG
BZR1F	CACCGAATTCATGACTTCGATGGAGCTACGTC
BZR1R	TGGGATCCACCACGAGCCTTCCATTTCC
ChipBEE1_f	GACCACTAGTTCTTAACCTC
ChipBEE1_r	CTGACAACCTTCTTAGACTGG
CPDfor	CACCATGGCGTTCACCGCTTTTCTC
CPDrev	AGTAGCAAAATCACGGCGCTTCACG
DEL1RGA-F	CGGGATCCCTATGAGAAAAGTGGCTAC
FPG1	CGGGATCCTGAAGAGAGATCGAGAT
FPG2	AACTGCAGTTAACTCAGTCACATCT
FPIL1MUT	GCATCACGCGGCATTACCGGAAGTGCACGGGAACCTGGCCAA
FPIL1WT	GCATCACGCGGCATTACCGTGAAGTGCACGTGAACCTGGCCAA
GaiGFP-F	CACCCCTCCAATGAAGAGAGATCATCATCAT
GAIPGB-R	TTCTGCAGTCTAATTGGTGGAGAG
GLYHfor	CAGAGGGTAGTATTGGATTCTAG
GLYHrev	GCTTGGTGTCTTTTGGAGATTC
LTP3G-BOXF	TCTAGTGTTGGGTACACGTGTCCGTCAGTTACAC
LTP3G-BOXF_MT	TCTAGTGTTGGGTACACGGGTCCGTCAGTTACAC
LTP3G-BOXR	GTGTAACCTGACGGACACGTGTACCCAACACTAGA
LTP3G-BOXR_MT	GTGTAACCTGACGGACCCGTGTACCCAACACTAGA
LTP3P-F	GGGGTACCAGGTCCTTGTACTATAAGGAATCC
LTP3P-R	CGGGATCCTGAGTTTCGTTTTCTTAGCTTATG
LTPfor	GACCAGTTTACTGCCACAGTGC
ltp-gen3	CCTTGTGGAATCCTGCGAC
ltp-gen5	CAAGAATGGCCTCAACTAC
LTPrev	GTAGTTGAGGCCATTCTAGATTGC
Pbes1f	CTGTGTAAGAAAAGGAGCTG
Pbes1f	CTACTAAATAATTTTGTAAATGTG
pBES-f	CACCGTATCACTATTCTGCTAT
Pbes-r (Not I)	CCGGCCGCGTGTGATGATG

pBridBAM	ACGGATCCCCGGAATTC
pGadXbA	GCTCTAGATTTCGATCTCTTTTTTTGGGTTTGG
PIF4 SIN APB F	CACCATGCTTGAAGATCAAGAAACTGTC
Pif4BamHI	CGGGATCCGACATGGAACACCAAGGTTGG
Pif4-Cla-5	CCATCGATACATGGAACACCAAGGTTGG
PIF4-CLA-5	CCATCGATACATGGAACACCAAGGTTGG
PIF4DEL1	GCTCTAGAGGCCACAAAAGGAAGAGTAG
PIF4DEL2	GCTCTAGAGGAACTGCCCCGAAGGAGC
PIF4DEL3	GCTCTAGAATGATGTGGATGGGAAGTGG
Pif4PromotorF	CACCCAGTACGCATCCAATCTTCTC
Pif4PromotorR	CGGGATCCGGGTACAGACAGAAAGTGAC
PIF4RNAifor	CACCGATAAGGTCATCC
PIF4RNAirev	GCACCGCTCCTTCGGG
PIF4-SAC-3	CCGAGCTCACCAACCTAGTGGTCC
Pif4-Sac-3	CCGAGCTCACCAACCTAGTGGTCC
PIF4YFP-F	CACCATGGAACACCAAGGTTGG
PIF4-YFP-R	TCCGTGGTCCAAACGAGAACCCTC
PIF4YR	CGGAATTCACCAACCTAGTGGTCC
pLTP-MUTF	GCTTCTAGTGTGGGTACACGGGTCCGTCAGTTACAC
pLTP-MUTR	GCTGTGTAAGTACGCGACCCGTGTACCCAACACTAGA
pLTP-WTF	GCTTCTAGTGTGGGTACACGTGTCCGTCAGTTACAC
pLTP-WTR	GCTGTGTAAGTACGCGACACGTGTACCCAACACTAGA
RGADEL1	CGGGATCCCTACTTACTTTGCTGAAGC
RGADEL2	CGGGATCCAATGGCCTGCACTTATGC
RGA-GFP_3	CGGTACCCAGAGATCTGTATAGTTCATCC
RGAGST-F	CGGGATCCAAATGAAGAGAGATCATCACC
RGAGST-R	CGGGATCCTCAGTGCGCCGCCGTC
RGAPGB-F/GAIPGB-F	CGGGATCCTGGTTGACTCGCA
RGAPGB-R	TTCTGCAGACTCAGTACGCCGCCG
RGAYFP-F	CACCATGAAGAGAGATCATCAC
RGAYFP-R	GTACGCCGCCGTCGAGAG
RGL1GFPF	CACCATGAAGAGAGAGACACAACCAC
RGL1PGB-F	CGGGATCCCTACGCGCTCTGTGG
RGL1PGB-R	GCGTCGACTTTATTCCACACGATTGAT
Rgl2GFP-F	CACCCCTCCAATGAAGAGAGGATACGGAG
Rgl2GFP-R	CGACTCAGGCGAGTTTCCACG
Rgl3GFP-F	CACCCCTCCAATGAAACGAAGCCATCAAGAAAC
Rgl3GFP-R	CTTTA CGACGTATCTACC
RGL3PGB-F	GCGTCGACCCGTGGTGCTTATCGAGG
RGL3PGB-R	AACTGCAGTCTACCGCCGCAACTC
RPIL1MUT	GCTTGGCCAAGTTCCCGTGCACTTCCCGTGAATGCCGCGTGAT
RPIL1WT	GCTTGGCCAAGTTACGCTGCACTTACGCTGAATGCCGCGTGAT
βEXPAN-F	ATGCAGCTCTTCCGGTCATC
βEXPAN-R	ACTCAATGAGAAGCGATAACC
XTR7P3	GCTCTAGAGGTTGATAGAAATGAAAGTTGTGG
XTR7P5	GGAATTCCATGCCATGCCCGCATGCC
ΔRGA-F	CGGGATCCAGATGGCGGAGGTTGC
PD14	GCATCTGAATTTTCATAACCAATC
PD43	ATCATCTCCGACCGGTTTGC
PD44	TCTGACCAGTATGCACATGG
PD30	TGAACCTGGCAAGAAGAACC
PD31	CTTCAGCTGCACGGCTTCTTC
JMLB1	GGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTG
GA3	CTAATTGGTGGAGAGTTTCCAAGC
GA5	ATGAAGAGAGATCATCATCATCAT
SLY1.10F	TCGTCACTGGACTAACATCGGCTG

SLY1.10R	GAGCATGCTTGATCCTAGGA
263R	GCTAACAGTCTGGCTTATGGATAC

#### 4. Tabla resumen de los genes inducidos en las plantas PIF4OX y reprimidos en las plantas *pif4pif5*.

Principales genes inducidos en PIFOX			Principales genes reprimidos en PIFOX		
AGI	PIF4 OX	<i>Pif4pif5</i>	AGI	PIF4 OX	<i>Pif4pif5</i>
At3g22235	3,72	0,67	At2g15050	-3,56	-0,17
At5g43570	3,34	-0,01	At3g28290	-3,5	-0,49
At3g28320	3,33	-0,38	At1g23130	-3,4	-0,12
At1g50290	3,09	-0,54	At3g47250	-3,37	0,05
At4g14130	3,08	-1,67	At3g16450	-3,32	-0,32
At3g60950	3,05	-0,28	At1g25210	-3,31	-0,05
At4g30280	3,03	0,14	At4g11211	-3,22	-0,69
At1g65310	2,97	-0,57	At2g05100	-3,19	0,55
At1g65500	2,95	0,83	At3g28300	-3,17	-0,39
At1g02930	2,85	0,51	At1g58270	-3,12	-0,74
At1g54040	2,83	-0,66	At5g05060	-3,11	-0,21
At5g45280	2,82	0,32	At5g11280	-3,1	-0,15
At4g19240	2,82	-0,41	At3g50480	-3,09	-0,01
At3g49620	2,78	0,11	At5g65730	-3,01	-0,61
At4g17470	2,72	-1,01	At5g36910	-3	1,17
At4g24420	2,7	-0,19	At3g02480	-2,96	-0,89
At3g15540	2,7	0,12	At2g06025	-2,69	-0,16
At4g35720	2,63	-0,77	At1g73490	-2,66	0,19
At4g16215	2,63	-0,34	At3g14210	-2,6	-0,27
At2g35810	2,61	-0,21	At5g39160	-2,6	-0,44
At1g66700	2,61	-0,16	At1g31580	-2,58	0,58
At2g39350	2,57	0,51	At1g59900	-2,56	-0,6
At5g38900	2,53	0,68	At1g24793	-2,55	0,16
At5g22500	2,47	0	At5g39190	-2,53	-0,45
At4g08770	2,47	0,35	At3g21370	-2,49	-1,81
At3g43280	2,47	-0,22	At5g05040	-2,47	-0,09
At1g58025	2,46	-0,2	At1g25141	-2,46	0,07
At4g14365	2,45	0,92	At1g23960	-2,41	-0,42
At2g43620	2,42	2,55	At1g25054	-2,41	0,12
At5g44565	2,38	-0,08	At1g58848	-2,39	-0,13
At4g08780	2,36	0,49	At2g35300	-2,37	-0,6
At5g19890	2,34	0,06	At5g15970	-2,35	-2,69
At5g24210	2,31	0,41	At5g48490	-2,35	0,42
At4g30290	2,3	-0,08	At5g09220	-2,33	0,07
At4g02520	2,29	0,57	At5g44920	-2,33	-0,51
At2g47780	2,24	0,45	At1g24880	-2,31	0,13
At2g32190	2,22	0,07	At5g54770	-2,31	-0,11
At2g30770	2,22	0,72	At5g09530	-2,3	-0,43
At4g29270	2,21	0,26	At2g33790	-2,28	-0,5
At1g54040	2,21	0,21	At3g09270	-2,25	0,33
At3g59900	2,2	0,68	At5g39130	-2,25	-0,38
At4g35190	2,17	-0,56	At2g25080	-2,23	-0,42
At4g29200	2,16	0,07	At3g24240	-2,23	0,28
At2g29460	2,15	-0,33	At2g13975	-2,21	-0,28
At2g35820	2,13	-0,11	At2g05185	-2,17	-0,06
At2g15050	2,12	-0,29	At1g73330	-2,15	0,38
At1g75780	2,11	-0,03	At3g46490	-2,15	-0,06
At4g12490	2,1	1,33	At2g25890	-2,14	-0,44
At2g02930	2,07	0,7	At5g42850	-2,1	-0,33
At3g15356	2,04	0,61	At3g44970	-2,08	0,25
At3g14370	2,02	-0,08	At3g50640	-2,07	-0,2



**Principales genes inducidos en PIFOX**

<b>AGI</b>	<b>PIF4 OX</b>	<b>Pif4pif5</b>
At1g26945	2,02	1,25
At3g16150	2,01	0,62
At1g56240	2,01	0,34
At5g49250	1,98	0,23
At5g25250	1,98	0,33
At4g32460	1,97	0,53
At1g19610	1,96	0,5
At3g12610	1,93	0,35
At2g38530	1,93	-0,14
At1g34180	1,93	0,41
At4g18970	1,92	0,2
At1g02205	1,91	0,72
At3g51660	1,9	-0,37
At1g25083	1,9	0,7
At4g11290	1,89	0,03
At2g41100	1,88	0,81
At5g39580	1,87	1,29
At5g50335	1,86	0,28
At5g38020	1,86	0,02
At1g69930	1,86	0,07
At5g02580	1,85	-0,38
At4g37580	1,85	-0,26
At1g17745	1,84	0,38
At1g21520	1,83	-0,03
At2g43510	1,82	-1,93
At5g05340	1,81	-0,15
At5g49630	1,8	0,44
At2g26440	1,8	0,74
At5g36925	1,78	0,92
At5g10770	1,78	-0,12
At3g21080	1,78	0,32
At2g41380	1,78	0,65
At4g30530	1,77	0,62
At1g15520	1,77	0,33
At5g48070	1,76	0,09
At3g44716	1,75	-0,17
At3g22240	1,75	0,86
At3g16530	1,75	1,03
At1g77330	1,75	-0,16
At5g38940	1,73	1,63
At5g53660	1,72	-0,12
At4g34770	1,72	0,07
At5g24580	1,71	-0,11
At3g01970	1,71	-0,09
At1g32580	1,7	0,07
At5g43170	1,69	0,51
At4g12500	1,69	1,54
At1g52200	1,69	0,48
At1g10550	1,69	0,29
t1g27020	1,69	0,96
At5g15360	1,68	-0,22
At4g19120	1,68	0,17
At4g12480	1,66	1,5
At1g66570	1,66	0,09

**Principales genes reprimidos en PIFOX**

<b>AGI</b>	<b>PIF4 OX</b>	<b>Pif4pif5</b>
At3g44970	-2,06	0,22
At5g38980	-2,05	-0,19
At1g59124	-2,04	-0,04
At1g32560	-2,03	-0,11
At3g47965	-2	-0,57
At5g51720	-1,99	0,72
At2g05510	-1,98	-0,12
At3g01190	-1,98	-0,33
At2g05440	-1,96	0,54
At3g02380	-1,96	1,18
At2g04800	-1,91	-0,34
At3g56290	-1,9	0,79
At4g38280	-1,9	-0,23
At3g17520	-1,88	-0,74
At3g25830	-1,88	-0,84
At5g03090	-1,88	-0,55
At5g46690	-1,84	-0,29
At5g25980	-1,83	-0,57
At3g44630	-1,82	0,25
At5g65850	-1,82	-0,41
At1g28670	-1,79	0,47
At4g17090	-1,79	0,01
At5g17820	-1,79	-0,05
At3g25820	-1,78	-0,74
At5g24120	-1,78	0,15
At1g60590	-1,77	-0,19
At1g13930	-1,76	-1,02
At1g59218	-1,75	-0,17
At1g72510	-1,74	-0,28
At1g75750	-1,74	-1,1
At3g08940	-1,74	0,01
At4g27520	-1,74	0,29
At1g58983	-1,72	0,48
At5g26200	-1,72	0,02
At5g46960	-1,72	-1,55
At1g27540	-1,7	-0,2
At4g14910	-1,7	0,31
At1g66970	-1,69	0,51
At3g59930	-1,69	-0,17
At4g16950	-1,69	0,06
At5g46890	-1,69	-0,04
At3g21670	-1,68	0,17
At5g37360	-1,68	0,07
At3g47295	-1,66	-0,61
At4g18740	-1,66	0,04
At1g58150	-1,65	-0,17
At3g57020	-1,65	-0,57
At4g14040	-1,65	-1
At1g58602	-1,64	0,02
At2g07981	-1,64	-1,15
At3g27690	-1,64	1,24
At5g17300	-1,64	0,11
At2g23130	-1,63	0,26
At5g62340	-1,63	-0,04

**Principales genes inducidos en PIFOX**

<b>AGI</b>	<b>PIF4 OX</b>	<b>Pif4pif5</b>
At4g25260	1,65	0
At4g02290	1,64	-0,15
At3g01290	1,64	0,7
At3g55130	1,63	-0,08
At5g02760	1,62	0,58
At1g13430	1,62	0,33
At2g43010	1,61	-2,49
At5g39030	1,59	-0,17
At5g25440	1,59	0,49
At5g20150	1,59	-0,04
At5g17700	1,59	-0,1
At2g23170	1,59	1,35
At1g44830	1,58	-0,01
At1g64640	1,57	0,16
At5g50760	1,55	0,7
At3g17790	1,55	-1,03
At4g21850	1,54	0,46
At1g04220	1,54	0,07
At5g63650	1,52	-0,22
At4g36930	1,52	-0,4
At2g39980	1,52	-0,22

**Principales genes reprimidos en PIFOX**

<b>AGI</b>	<b>PIF4 OX</b>	<b>Pif4pif5</b>
At2g08986	-1,62	-1,16
At3g15670	-1,62	0,12
At3g19850	-1,62	-0,26
At3g47500	-1,62	0,04
At4g02130	-1,61	-0,26
At1g53480	-1,6	-0,45
At4g19810	-1,59	-1,26
At5g66400	-1,59	-1,35
At5g02160	-1,58	0,24
At2g46450	-1,57	0,54
At5g48790	-1,57	0,04
At4g31290	-1,56	-0,76
At5g26000	-1,55	-0,56
At5g26270	-1,55	0,05
At5g23410	-1,53	-0,47
At1g52690	-1,51	-0,73
At2g43550	-1,51	-0,7
At3g57420	-1,51	-0,12
At1g51400	-1,5	0,24
At5g35940	-1,5	-0,98
At5g44580	-1,5	0



***BIBLIOGRAFÍA***

---



**BIBLIOGRAFIA**

1. Leivar, P., Monte, E., Al-Sady, B., Carle, C., Storer, A., Alonso, J. M., Ecker, J. R., & Quail, P. H. (2008) *Plant Cell* **20**, 337-352.
2. Fankhauser, C. & Chory, J. (1997) *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 203-229.
3. Quail, P. H. (2002) *Curr Opin Cell Biol* **14**, 180-188.
4. Lin, C. (2002) *Plant Cell* **14 Suppl**, S207-225.
5. Briggs, W. R. & Christie, J. M. (2002) *Trends Plant Sci* **7**, 204-210.
6. Butler, W. L., Norris, K. H., Siegelman, H. W., & Hendricks, S. B. (1959) *Proc Natl Acad Sci U S A* **45**, 1703-1708.
7. Kehoe, D. M. & Grossman, A. R. (1996) *Science* **273**, 1409-1412.
8. Blumenstein, A., Vienken, K., Tasler, R., Purschwitz, J., Veith, D., Frankenberg-Dinkel, N., & Fischer, R. (2005) *Curr Biol* **15**, 1833-1838.
9. Sharrock, R. A. & Quail, P. H. (1989) *Genes Dev* **3**, 1745-1757.
10. Furuya, M. (1993) *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **44**, 617-645.
11. P. H. Q. (1997) *Plant, Cell and Environment* **20**, 657-665.
12. Sharrock, R. A. & Clack, T. (2002) *Plant Physiol.* **130**, 442-456.
13. Rockwell, N. C. & Lagarias, J. C. (2006) *Plant Cell* **18**, 4-14.
14. van Thor, J. J., Borucki, B., Crielaard, W., Otto, H., Lamparter, T., Hughes, J., Hellingwerf, K. J., & Heyn, M. P. (2001) *Biochemistry* **40**, 11460-11471.
15. Chen, M., Tao, Y., Lim, J., Shaw, A., & Chory, J. (2005) *Curr Biol* **15**, 637-642.
16. Harper, S. M., Neil, L. C., & Gardner, K. H. (2003) *Science* **301**, 1541-1544.
17. Martinez, S. E., Beavo, J. A., & Hol, W. G. (2002) *Mol Interv* **2**, 317-323.
18. Rockwell, N. C., Su, Y. S., & Lagarias, J. C. (2006) *Annu Rev Plant Biol* **57**, 837-858.
19. Kircher, S., Gil, P., Kozma-Bognar, L., Fejes, E., Speth, V., Husselstein-Muller, T., Bauer, D., Adam, E., Schafer, E., & Nagy, F. (2002) *Plant Cell* **14**, 1541-1555.
20. Yamaguchi, R., Nakamura, M., Mochizuki, N., Kay, S. A., & Nagatani, A. (1999) *J Cell Biol* **145**, 437-445.
21. Kircher, S., Kozma-Bognar, L., Kim, L., Adam, E., Harter, K., Schafer, E., & Nagy, F. (1999) *Plant Cell* **11**, 1445-1456.
22. Nagy, F. & Schafer, E. (2002) *Annu Rev Plant Biol* **53**, 329-355.
23. Chen, M., Schwab, R., & Chory, J. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14493-14498.
24. Chen, M., Chory, J., & Fankhauser, C. (2004) *Annu Rev Genet* **38**, 87-117.
25. Oka, Y., Matsushita, T., Mochizuki, N., Suzuki, T., Tokutomi, S., & Nagatani, A. (2004) *Plant Cell* **16**, 2104-2116.
26. Tepperman, J. M., Hwang, Y. S., & Quail, P. H. (2006) *Plant J* **48**, 728-742.
27. Devlin, P. F., Yanovsky, M. J., & Kay, S. A. (2003) *Plant Physiol* **133**, 1617-1629.
28. Ma, L., Li, J., Qu, L., Hager, J., Chen, Z., Zhao, H., & Deng, X. W. (2001) *Plant Cell* **13**, 2589-2607.
29. Quail, P. H. (2002) *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 85-93.
30. Tepperman, J. M., Zhu, T., Chang, H. S., Wang, X., & Quail, P. H. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9437-9442.
31. Ballesteros, M. L., Bolle, C., Lois, L. M., Moore, J. M., Vielle-Calzada, J. P., Grossniklaus, U., & Chua, N. H. (2001) *Genes Dev* **15**, 2613-2625.
32. Chattopadhyay, S., Ang, L. H., Puente, P., Deng, X. W., & Wei, N. (1998) *Plant Cell* **10**, 673-683.
33. Duek, P. D. & Fankhauser, C. (2003) *Plant J* **34**, 827-836.

34. Toledo-Ortiz, G., Huq, E., & Quail, P. H. (2003) *Plant Cell* **15**, 1749-1770.
35. Ni, M., Tepperman, J. M., & Quail, P. H. (1999) *Nature* **400**, 781-784.
36. Khanna, R., Huq, E., Kikis, E. A., Al-Sady, B., Lanzatella, C., & Quail, P. H. (2004) *Plant Cell* **16**, 3033-3044.
37. Ni, M., Tepperman, J. M., & Quail, P. H. (1998) *Cell* **95**, 657-667.
38. Zhu, Y., Tepperman, J. M., Fairchild, C. D., & Quail, P. H. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13419-13424.
39. Huq, E. & Quail, P. H. (2002) *Embo J* **21**, 2441-2450.
40. Huq, E., Al-Sady, B., Hudson, M., Kim, C., Apel, K., & Quail, P. H. (2004) *Science* **305**, 1937-1941.
41. Oh, E., Kim, J., Park, E., Kim, J. I., Kang, C., & Choi, G. (2004) *Plant Cell* **16**, 3045-3058.
42. Martinez-Garcia, J. F., Huq, E., & Quail, P. H. (2000) *Science* **288**, 859-863.
43. Fairchild, C. D., Schumaker, M. A., & Quail, P. H. (2000) *Genes Dev* **14**, 2377-2391.
44. Hornitschek, P., Lorrain, S., Zoete, V., Michielin, O., & Fankhauser, C. (2009) *Embo J*.
45. Heim, M. A., Jakoby, M., Werber, M., Martin, C., Weisshaar, B., & Bailey, P. C. (2003) *Mol Biol Evol* **20**, 735-747.
46. Yamashino, T., Matsushika, A., Fujimori, T., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., & Mizuno, T. (2003) *Plant Cell Physiol* **44**, 619-629.
47. Bauer, D., Viczian, A., Kircher, S., Nobis, T., Nitschke, R., Kunkel, T., Panigrahi, K. C., Adam, E., Fejes, E., Schafer, E., *et al.* (2004) *Plant Cell* **16**, 1433-1445.
48. Shen, H., Moon, J., & Huq, E. (2005) *Plant J* **44**, 1023-1035.
49. Al-Sady, B., Ni, W., Kircher, S., Schafer, E., & Quail, P. H. (2006) *Mol Cell* **23**, 439-446.
50. Shen, Y., Khanna, R., Carle, C. M., & Quail, P. H. (2007) *Plant Physiol* **145**, 1043-1051.
51. Nozue, K., Covington, M. F., Duek, P. D., Lorrain, S., Fankhauser, C., Harmer, S. L., & Maloof, J. N. (2007) *Nature* **448**, 358-361.
52. Shen, H., Zhu, L., Castillon, A., Majee, M., Downie, B., & Huq, E. (2008) *Plant Cell* **20**, 1586-1602.
53. Monte, E., Tepperman, J. M., Al-Sady, B., Kaczorowski, K. A., Alonso, J. M., Ecker, J. R., Li, X., Zhang, Y., & Quail, P. H. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16091-16098.
54. Kim, J., Yi, H., Choi, G., Shin, B., Song, P. S., & Choi, G. (2003) *Plant Cell* **15**, 2399-2407.
55. Fujimori, T., Yamashino, T., Kato, T., & Mizuno, T. (2004) *Plant Cell Physiol* **45**, 1078-1086.
56. Salter, M. G., Franklin, K. A., & Whitelam, G. C. (2003) *Nature* **426**, 680-683.
57. Neljubov, D. (1901) *Pflanzen Beih. Bot. Zentralb.*, 128-139.
58. Gane, R. (1934) *Nature* **134**, 1008.
59. Hoffman, Y. a. N. E. (1984) *Annu. Rev. Plant Physiol*, 155-189.
60. Barlier, I., Kowalczyk, M., Marchant, A., Ljung, K., Bhalerao, R., Bennett, M., Sandberg, G., & Bellini, C. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14819-14824.
61. Cheng, Y., Dai, X., & Zhao, Y. (2006) *Genes Dev* **20**, 1790-1799.
62. Zhao, Y., Christensen, S. K., Fankhauser, C., Cashman, J. R., Cohen, J. D., Weigel, D., & Chory, J. (2001) *Science* **291**, 306-309.
63. Miller CO, S. F., Von Saltza MH, Strong F (1955) *J Am Chem Soc*, 1329-1334.
64. Miller CO, S. F., Okomura FS, von Saltza MH, Strong FM (1956) *J Am Chem Soc*

65. Hwang, I., Chen, H. C., & Sheen, J. (2002) *Plant Physiol* **129**, 500-515.
66. Heyl, A. & Schmulling, T. (2003) *Curr Opin Plant Biol* **6**, 480-488.
67. Kakimoto, T. (2003) *Annu Rev Plant Biol* **54**, 605-627.
68. Mizuno, T. (2004) *Curr Opin Plant Biol* **7**, 499-505.
69. Thomas, S. G. & Sun, T. P. (2004) *Plant Physiol* **135**, 668-676.
70. Howe, G. A. & Jander, G. (2008) *Annual Review of Plant Biology* **59**, 41-66.
71. Glazebrook, J. (2005) *Annu Rev Phytopathol* **43**, 205-227.
72. Wasternack, C. (2007) *Ann Bot (Lond)* **100**, 681-697.
73. Browse, J. (2005) *Vitam Horm* **72**, 431-456.
74. Finkelstein, R. R., Gampala, S. S., & Rock, C. D. (2002) *Plant Cell* **14 Suppl**, S15-45.
75. Nambara, E. & Marion-Poll, A. (2005) *Annu Rev Plant Biol* **56**, 165-185.
76. Zhu, J. K. (2002) *Annu Rev Plant Biol* **53**, 247-273.
77. Thomas, S. G., Rieu, I., & Steber, C. M. (2005) *Vitam Horm* **72**, 289-338.
78. Dill, A., Jung, H. S., & Sun, T. P. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 14162-14167.
79. Nakajima, M., Shimada, A., Takashi, Y., Kim, Y. C., Park, S. H., Ueguchi-Tanaka, M., Suzuki, H., Katoh, E., Iuchi, S., Kobayashi, M., *et al.* (2006) *Plant J* **46**, 880-889.
80. Dill, A., Thomas, S. G., Hu, J., Steber, C. M., & Sun, T. P. (2004) *Plant Cell* **16**, 1392-1405.
81. MacMillan, J. (2001) *J Plant Growth Regul* **20**, 387-442.
82. Yamaguchi, S. (2008) *Annu Rev Plant Biol* **59**, 225-251.
83. Hedden, P. & Kamiya, Y. (1997) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**, 431-460.
84. Hedden, P. & Phillips, A. L. (2000) *Trends Plant Sci* **5**, 523-530.
85. Olszewski, N., Sun, T. P., & Gubler, F. (2002) *Plant Cell* **14 Suppl**, S61-80.
86. Silverstone, A. L., Mak, P. Y., Martinez, E. C., & Sun, T. P. (1997) *Genetics* **146**, 1087-1099.
87. Telfer, A., Bollman, K. M., & Poethig, R. S. (1997) *Development* **124**, 645-654.
88. Yaxley, J. R., Ross, J. J., Sherriff, L. J., & Reid, J. B. (2001) *Plant Physiol* **125**, 627-633.
89. Ubeda-Tomas, S., Swarup, R., Coates, J., Swarup, K., Laplaze, L., Beemster, G. T. S., Hedden, P., Bhalerao, R., & Bennett, M. J. (2008) *Nat Cell Biol* **10**, 625.
90. Chung, C. H. & Coolbaugh, R. C. (1986) *Plant Physiol* **80**, 544-548.
91. Helmut Aach, H. B., David G. Robinson and Jan E. Graebe (1997) *Planta* **202**, 211-219.
92. Veen, M. K. a. J. H. v. d. (1980) *TAG Theoretical and Applied Genetics* **58**, 257-263.
93. Griffiths, J., Murase, K., Rieu, I., Zentella, R., Zhang, Z. L., Powers, S. J., Gong, F., Phillips, A. L., Hedden, P., Sun, T. P., *et al.* (2006) *Plant Cell* **18**, 3399-3414.
94. Willige, B. C., Ghosh, S., Nill, C., Zourelidou, M., Dohmann, E. M., Maier, A., & Schwechheimer, C. (2007) *Plant Cell* **19**, 1209-1220.
95. Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Nakajima, M., Itoh, H., Katoh, E., Kobayashi, M., Chow, T. Y., Hsing, Y. I., Kitano, H., Yamaguchi, I., *et al.* (2005) *Nature* **437**, 693-698.
96. Richards, D. E., King, K. E., Ait-ali, T., & Harberd, N. P. (2001) *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 67-88.
97. Boss, P. K. & Thomas, M. R. (2002) *Nature* **416**, 847-850.
98. Vandenbussche, F., Fierro, A. C., Wiedemann, G., Reski, R., & Van Der Straeten, D. (2007) *BMC Plant Biol* **7**, 65.



99. Peng, J., Carol, P., Richards, D. E., King, K. E., Cowling, R. J., Murphy, G. P., & Harberd, N. P. (1997) *Genes Dev* **11**, 3194-3205.
100. Peng, J., Richards, D. E., Hartley, N. M., Murphy, G. P., Devos, K. M., Flintham, J. E., Beales, J., Fish, L. J., Worland, A. J., Pelica, F., *et al.* (1999) *Nature* **400**, 256-261.
101. Richards, D. E., Peng, J., & Harberd, N. P. (2000) *Bioessays* **22**, 573-577.
102. Silverstone, A. L., Jung, H. S., Dill, A., Kawaide, H., Kamiya, Y., & Sun, T. P. (2001) *Plant Cell* **13**, 1555-1566.
103. Lee, S., Cheng, H., King, K. E., Wang, W., He, Y., Hussain, A., Lo, J., Harberd, N. P., & Peng, J. (2002) *Genes Dev* **16**, 646-658.
104. Tyler, L., Thomas, S. G., Hu, J., Dill, A., Alonso, J. M., Ecker, J. R., & Sun, T. P. (2004) *Plant Physiol* **135**, 1008-1019.
105. Dill, A. & Sun, T. (2001) *Genetics* **159**, 777-785.
106. King, K. E., Moritz, T., & Harberd, N. P. (2001) *Genetics* **159**, 767-776.
107. Ueguchi-Tanaka, M., Nakajima, M., Katoh, E., Ohmiya, H., Asano, K., Saji, S., Hongyu, X., Ashikari, M., Kitano, H., Yamaguchi, I., *et al.* (2007) *Plant Cell* **19**, 2140-2155.
108. Iuchi, S., Suzuki, H., Kim, Y. C., Iuchi, A., Kuromori, T., Ueguchi-Tanaka, M., Asami, T., Yamaguchi, I., Matsuoka, M., Kobayashi, M., *et al.* (2007) *Plant J* **50**, 958-966.
109. Zentella, R., Zhang, Z. L., Park, M., Thomas, S. G., Endo, A., Murase, K., Fleet, C. M., Jikumaru, Y., Nambara, E., Kamiya, Y., *et al.* (2007) *Plant Cell* **19**, 3037-3057.
110. Dill, A., Thomas, S. G., Hu, J., Steber, C. M., & Sun, T.-p. (2004) *Plant Cell* **16**, 1392-1405.
111. Fu, X., Richards, D. E., Fleck, B., Xie, D., Burton, N., & Harberd, N. P. (2004) *Plant Cell* **16**, 1406-1418.
112. Michael D. Grove, G. F. S., William K. Rohwedder, Nagabhusanam Mandava, Joseph F. Worley, J. David Warthen Jr, George L. Steffens, Judith L. Flippen-Anderson & J. Carter Cook Jrparallel (1979) *Nature*, 216 - 217.
113. Fujioka, S. & Yokota, T. (2003) *Annu Rev Plant Biol* **54**, 137-164.
114. Back, T. G. & Pharis, R. P. (2003) *J Plant Growth Regul* **22**, 350-361.
115. Bishop, G. J. & Koncz, C. (2002) *Plant Cell* **14 Suppl**, S97-110.
116. Losel, R. & Wehling, M. (2003) *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 46-56.
117. Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Sakurai, A., Yoshida, S., Li, J., & Chory, J. (1999) *Plant Physiol* **120**, 833-840.
118. Fujioka, S., Li, J., Choi, Y. H., Seto, H., Takatsuto, S., Noguchi, T., Watanabe, T., Kuriyama, H., Yokota, T., Chory, J., *et al.* (1997) *Plant Cell* **9**, 1951-1962.
119. Fujioka, S., Takatsuto, S., & Yoshida, S. (2002) *Plant Physiol* **130**, 930-939.
120. Nomura, T., Jager, C. E., Kitasaka, Y., Takeuchi, K., Fukami, M., Yoneyama, K., Matsushita, Y., Nyunoya, H., Takatsuto, S., Fujioka, S., *et al.* (2004) *Plant Physiol* **135**, 2220-2229.
121. Bishop, G. J., Nomura, T., Yokota, T., Harrison, K., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Jones, J. D., & Kamiya, Y. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1761-1766.
122. Hong, Z., Ueguchi-Tanaka, M., Shimizu-Sato, S., Inukai, Y., Fujioka, S., Shimada, Y., Takatsuto, S., Agetsuma, M., Yoshida, S., Watanabe, Y., *et al.* (2002) *Plant J* **32**, 495-508.
123. Chory, J., Nagpal, P., & Peto, C. A. (1991) *Plant Cell* **3**, 445-459.
124. Szekeres, M., Nemeth, K., Koncz-Kalman, Z., Mathur, J., Kauschmann, A., Altmann, T., Redei, G. P., Nagy, F., Schell, J., & Koncz, C. (1996) *Cell* **85**, 171-182.

125. Li, J., Biswas, M. G., Chao, A., Russell, D. W., & Chory, J. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3554-3559.
126. Fujita, S., Ohnishi, T., Watanabe, B., Yokota, T., Takatsuto, S., Fujioka, S., Yoshida, S., Sakata, K., & Mizutani, M. (2006) *Plant J* **45**, 765-774.
127. Asami, T. & Yoshida, S. (1999) *Trends Plant Sci* **4**, 348-353.
128. Asami, T., Min, Y. K., Nagata, N., Yamagishi, K., Takatsuto, S., Fujioka, S., Murofushi, N., Yamaguchi, I., & Yoshida, S. (2000) *Plant Physiol* **123**, 93-100.
129. Wang, Z. Y., Seto, H., Fujioka, S., Yoshida, S., & Chory, J. (2001) *Nature* **410**, 380-383.
130. Yin, Y., Wang, Z. Y., Mora-Garcia, S., Li, J., Yoshida, S., Asami, T., & Chory, J. (2002) *Cell* **109**, 181-191.
131. Kinoshita, T., Cano-Delgado, A., Seto, H., Hiranuma, S., Fujioka, S., Yoshida, S., & Chory, J. (2005) *Nature* **433**, 167-171.
132. He, Z., Wang, Z. Y., Li, J., Zhu, Q., Lamb, C., Ronald, P., & Chory, J. (2000) *Science* **288**, 2360-2363.
133. Li, J. & Chory, J. (1997) *Cell* **90**, 929-938.
134. He, J. X., Gendron, J. M., Yang, Y., Li, J., & Wang, Z. Y. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 10185-10190.
135. Wang, Z. Y., Nakano, T., Gendron, J., He, J., Chen, M., Vafeados, D., Yang, Y., Fujioka, S., Yoshida, S., Asami, T., *et al.* (2002) *Dev Cell* **2**, 505-513.
136. Kim, T. W., Guan, S., Sun, Y., Deng, Z., Tang, W., Shang, J. X., Sun, Y., Burlingame, A. L., & Wang, Z. Y. (2009) *Nat Cell Biol* **11**, 1254-1260.
137. Yamamuro, C., Ihara, Y., Wu, X., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Ashikari, M., Kitano, H., & Matsuoka, M. (2000) *Plant Cell* **12**, 1591-1606.
138. Montoya, T., Nomura, T., Farrar, K., Kaneta, T., Yokota, T., & Bishop, G. J. (2002) *Plant Cell* **14**, 3163-3176.
139. Chono, M., Honda, I., Zeniya, H., Yoneyama, K., Saisho, D., Takeda, K., Takatsuto, S., Hoshino, T., & Watanabe, Y. (2003) *Plant Physiol* **133**, 1209-1219.
140. Nomura, T., Bishop, G. J., Kaneta, T., Reid, J. B., Chory, J., & Yokota, T. (2003) *Plant J* **36**, 291-300.
141. Sun, Y., Fokar, M., Asami, T., Yoshida, S., & Allen, R. D. (2004) *Plant Mol Biol* **54**, 221-232.
142. Friedrichsen, D. M., Nemhauser, J., Muramitsu, T., Maloof, J. N., Alonso, J., Ecker, J. R., Furuya, M., & Chory, J. (2002) *Genetics* **162**, 1445-1456.
143. Cano-Delgado, A., Yin, Y., Yu, C., Vafeados, D., Mora-Garcia, S., Cheng, J. C., Nam, K. H., Li, J., & Chory, J. (2004) *Development* **131**, 5341-5351.
144. Zhou, A., Wang, H., Walker, J. C., & Li, J. (2004) *Plant J* **40**, 399-409.
145. Li, J., Wen, J., Lease, K. A., Doke, J. T., Tax, F. E., & Walker, J. C. (2002) *Cell* **110**, 213-222.
146. Nam, K. H. & Li, J. (2002) *Cell* **110**, 203-212.
147. Russinova, E., Borst, J. W., Kwaaitaal, M., Cano-Delgado, A., Yin, Y., Chory, J., & de Vries, S. C. (2004) *Plant Cell* **16**, 3216-3229.
148. Wang, X. & Chory, J. (2006) *Science* **313**, 1118-1122.
149. Li, J., Nam, K. H., Vafeados, D., & Chory, J. (2001) *Plant Physiol* **127**, 14-22.
150. Choe, S., Schmitz, R. J., Fujioka, S., Takatsuto, S., Lee, M. O., Yoshida, S., Feldmann, K. A., & Tax, F. E. (2002) *Plant Physiol* **130**, 1506-1515.
151. Li, J. & Nam, K. H. (2002) *Science* **295**, 1299-1301.
152. Perez-Perez, J. M., Ponce, M. R., & Micol, J. L. (2002) *Dev Biol* **242**, 161-173.
153. Zhao, J., Peng, P., Schmitz, R. J., Decker, A. D., Tax, F. E., & Li, J. (2002) *Plant Physiol* **130**, 1221-1229.

154. Mora-Garcia, S., Vert, G., Yin, Y., Cano-Delgado, A., Cheong, H., & Chory, J. (2004) *Genes Dev* **18**, 448-460.
155. Gampala, S. S., Kim, T. W., He, J. X., Tang, W., Deng, Z., Bai, M. Y., Guan, S., Lalonde, S., Sun, Y., Gendron, J. M., *et al.* (2007) *Dev Cell* **13**, 177-189.
156. Vert, G. & Chory, J. (2006) *Nature* **441**, 96-100.
157. He, J. X., Gendron, J. M., Sun, Y., Gampala, S. S., Gendron, N., Sun, C. Q., & Wang, Z. Y. (2005) *Science* **307**, 1634-1638.
158. Tanaka, K., Asami, T., Yoshida, S., Nakamura, Y., Matsuo, T., & Okamoto, S. (2005) *Plant Physiol* **138**, 1117-1125.
159. Wang, T. W., Cosgrove, D. J., & Arteca, R. N. (1993) *Plant Physiol* **101**, 965-968.
160. Zurek, D. M., Rayle, D. L., McMorris, T. C., & Clouse, S. D. (1994) *Plant Physiol* **104**, 505-513.
161. Xu, W., Purugganan, M. M., Polisensky, D. H., Antosiewicz, D. M., Fry, S. C., & Braam, J. (1995) *Plant Cell* **7**, 1555-1567.
162. Uozu, S., Tanaka-Ueguchi, M., Kitano, H., Hattori, K., & Matsuoka, M. (2000) *Plant Physiol* **122**, 853-859.
163. Koka, C. V., Cerny, R. E., Gardner, R. G., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Yoshida, S., & Clouse, S. D. (2000) *Plant Physiol* **122**, 85-98.
164. Goda, H., Shimada, Y., Asami, T., Fujioka, S., & Yoshida, S. (2002) *Plant Physiol* **130**, 1319-1334.
165. Richard, N. A., De-Sheng, T., Carl, S., & Mandava, N. B. (1983) *Physiologia Plantarum* **59**, 539-544.
166. Mayumi, K. & Shibaoka, H. (1995) *Plant Cell Physiol.* **36**, 173-181.
167. John, H. Y., Mandava, N. B., & Sasse, J. M. (1981) *Physiologia Plantarum* **53**, 445-452.
168. Cohen, J. D. & Meudt, W. J. (1983) *Plant Physiol* **72**, 691-694.
169. Katsumi, M. (1985) *Plant Cell Physiol.* **26**, 615-625.
170. Tanaka, K., Nakamura, Y., Asami, T., Yoshida, S., Matsuo, T. and Okamoto S. (2003) *Journal of Plant Growth Regulation* **22**, 259-271.
171. Clouse, S. D., Zurek, D. M., McMorris, T. C., & Baker, M. E. (1992) *Plant Physiol* **100**, 1377-1383.
172. Nemhauser, J. L., Mockler, T. C., & Chory, J. (2004) *PLoS Biol* **2**, E258.
173. Neff, M. M., Fankhauser, C., & Chory, J. (2000) *Genes Dev* **14**, 257-271.
174. Li, J., Nagpal, P., Vitart, V., McMorris, T. C., & Chory, J. (1996) *Science* **272**, 398-401.
175. Alabadi, D., Gil, J., Blazquez, M. A., & Garcia-Martinez, J. L. (2004) *Plant Physiol* **134**, 1050-1057.
176. Yang, J., Lin, R., Sullivan, J., Hoecker, U., Liu, B., Xu, L., Deng, X. W., & Wang, H. (2005) *Plant Cell* **17**, 804-821.
177. Duek, P. D., Elmer, M. V., van Oosten, V. R., & Fankhauser, C. (2004) *Curr Biol* **14**, 2296-2301.
178. Lorrain, S., Genoud, T., & Fankhauser, C. (2006) *Curr Opin Plant Biol* **9**, 509-514.
179. Alabadi, D., Gallego-Bartolome, J., Orlando, L., Garcia-Carcel, L., Rubio, V., Martinez, C., Frigerio, M., Iglesias-Pedraz, J. M., Espinosa, A., Deng, X. W., *et al.* (2008) *Plant J* **53**, 324-335.
180. Levesque, M. P., Vernoux, T., Busch, W., Cui, H., Wang, J. Y., Blilou, I., Hassan, H., Nakajima, K., Matsumoto, N., Lohmann, J. U., *et al.* (2006) *PLoS Biol* **4**, e143.
181. Steber, C. M. & McCourt, P. (2001) *Plant Physiol* **125**, 763-769.

182. de Lucas, M., Daviere, J. M., Rodriguez-Falcon, M., Pontin, M., Iglesias-Pedraz, J. M., Lorrain, S., Fankhauser, C., Blazquez, M. A., Titarenko, E., & Prat, S. (2008) *Nature* **451**, 480-484.
183. Lorrain, S., Allen, T., Duek, P. D., Whitelam, G. C., & Fankhauser, C. (2008) *Plant J* **53**, 312-323.
184. Reed, J. W., Nagpal, P., Poole, D. S., Furuya, M., & Chory, J. (1993) *Plant Cell* **5**, 147-157.
185. Rieu, I., Ruiz-Rivero, O., Fernandez-Garcia, N., Griffiths, J., Powers, S. J., Gong, F., Linhartova, T., Eriksson, S., Nilsson, O., Thomas, S. G., *et al.* (2008) *Plant J* **53**, 488-504.
186. Yin, Y., Vafeados, D., Tao, Y., Yoshida, S., Asami, T., & Chory, J. (2005) *Cell* **120**, 249-259.
187. McGinnis, K. M., Thomas, S. G., Soule, J. D., Strader, L. C., Zale, J. M., Sun, T. P., & Steber, C. M. (2003) *Plant Cell* **15**, 1120-1130.
188. Michaels, S. D. & Amasino, R. M. (1999) *Dev Genet* **25**, 194-198.
189. Sun, T. P. & Kamiya, Y. (1994) *Plant Cell* **6**, 1509-1518.
190. Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., & Baulcombe, D. (2003) *Plant J* **33**, 949-956.
191. Hu, C.-D., Chinenov, Y., & Kerppola, T. K. (2002) *Molecular Cell* **9**, 789.
192. **Gregory LE, M. N.** (1982) *Physiol Plant* 239-243.
193. Cheng, H., Qin, L., Lee, S., Fu, X., Richards, D. E., Cao, D., Luo, D., Harberd, N. P., & Peng, J. (2004) *Development* **131**, 1055-1064.
194. Huq, E. (2006) *Trends Plant Sci* **11**, 4-7.
195. Koini, M. A., Alvey, L., Allen, T., Tilley, C. A., Harberd, N. P., Whitelam, G. C., & Franklin, K. A. (2009) *Curr Biol* **19**, 408-413.
196. Gray, W. M., Ostin, A., Sandberg, G., Romano, C. P., & Estelle, M. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7197-7202.