



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Caracterización funcional de una proteína implicada en la vía de
señalización por glucosa en *Arabidopsis thaliana*

TESIS QUE PRESENTA

FLAVIA SOLEDAD BOSSI SANDOZ

PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. PATRICIA LEON MEJIA

CUERNAVACA, MORELOS

AGOSTO 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Prologo	5
Resumen	7
Abstract	8
1. Generalidades de la señalización por azúcares	9
1.1. Los azúcares funcionan como señales tipo hormonas	9
2. Componentes y mecanismos de las vías de señalización por azúcares	11
2.1. Vías de señalización	11
2.2. Elementos de las vías de señalización	15
2.2.1. Receptores	16
2.2.1.1. Hexocinasa	17
2.2.1.2. Transportadores de azúcares	18
2.2.1.2.1. Transportadores de hexosas/monosacáridos	18
2.2.1.2.2. Transportadores de disacáridos	20
2.2.1.3. AtRGS1	20
2.2.2. Elementos involucrados en la transducción de la señal	21
2.2.2.1. SnRKs	21
2.2.2.2. Proteínas G heterotriméricas	24
2.2.3. Efectores de la señal de azúcares	25
2.2.3.1. Hexocinasa	26
2.2.3.2. Factores de transcripción	27
2.2.4. Otros elementos	33
2.3. Interacciones entre las vías de señalización por azúcares y otras vías de señalización	34
3. Los azúcares modulan las respuestas de la señalización a través de diferentes mecanismos moleculares	38
3.1. Regulación transcripcional	40
3.2. Regulación post-transcripcional - Estabilidad de mensajero	43
3.3. Regulación a nivel de la traducción	44
3.4. Regulación post-traducciona - Estabilidad/Degradación de proteínas	45
3.5. Modulación de actividad por modificaciones covalentes	46
4. Antecedentes directos del proyecto	46
4.1. El factor de transcripción ABI4: estructura proteica	48
4.2. El factor de transcripción ABI4: patrón de expresión de su promotor	50
4.3. El papel del factor de transcripción ABI4 en la vía de señalización por azúcares en <i>Arabidopsis thaliana</i>	51
5. Objetivos	53
6. Metodología	65

7. Resultados	59
7.1. ABI4 y la señalización por azúcares en plantas	59
7.1.1. Detección de la proteína ABI4 endógena: la historia inconclusa	59
7.1.2. La bioinformática al servicio de ABI4 – parte 1	66
7.1.3. La identificación de los genes blancos directos del factor de transcripción ABI4: los genes ABI4, ABI5 y SBE2.2	69
7.1.4. El factor ABI4 actúa como un regulador positivo de la transcripción de los genes <i>ABI4</i> , <i>ABI5</i> y <i>SBE2.2</i>	72
7.1.5. El caso CLA1: blanco indirecto de ABI4 en respuesta a glucosa?	74
7.1.6. La bioinformática al servicio de ABI4 – parte 2	78
7.1.6.1. Análisis <i>in silico</i> de los fragmentos de las regiones regulatorias 5´ de los genes <i>ABI4</i> , <i>ABI5</i> y <i>SBE2.2</i> empleados en los ensayos EMSA	78
7.1.6.2. Predicción <i>in silico</i> de nuevos genes blancos directos de la proteína ABI4	80
8. Discusión	85
8.1. La proteína ABI4: personalidad y presencia	85
8.2. El factor de transcripción ABI4: función y blancos de acción	87
8.2.1. Blancos directos e indirectos: estrategias de análisis <i>in silico</i>	87
8.2.2. Realidad virtual o ciencia ficción ?	88
8.2.3. Los blancos directos de ABI4 en respuesta a glucosa	89
8.2.4. Una proteína regulatoria + múltiples elementos <i>en cis</i> = ¿ caos o versatilidad funcional ?	92
8.3. Las funciones de ABI4 durante el ciclo de vida de una planta de <i>Arabidopsis thaliana</i>	96
8.3.1. ABI4 y el desarrollo de las semillas	96
8.3.2. ABI4 y la germinación de las semillas (énfasis en la imbibición)	97
8.3.3. ABI4 y el establecimiento de las plántulas	99
9. Conclusiones	103
10. Perspectivas	105
11 Bibliografía	107
Apéndice I --- Bossi F., Cordoba E., Dupre P, Santos Mendoza M., San Román C., y Leon, P, 2009. "The Arabidopsis ABA-INSENSITIVE (ABI) 4 factor acts as a central transcription activator of the expression of its own gene, and for the induction of ABI5 and SBE2.2 genes during sugar signaling." The Plant Journal, aceptado Marzo 2009.	115
Apéndice II --- Material suplementario	137
Apéndice III --- Análisis exploratorios	157

Prólogo

Este escrito narra los resultados obtenidos durante el trabajo de investigación llevado a cabo en el marco del programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas, el cual fue realizado bajo la dirección de la Dra. Patricia León Mejía (Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, UNAM). Este escrito comienza con una introducción detallada del tema de estudio y los antecedentes directos al proyecto, y continúa con la descripción minuciosa de los resultados obtenidos no publicados y una síntesis de los resultados publicados. También se incluyen 3 apéndices. El Apéndice I corresponde al artículo publicado en una revista especializada, el cual contiene los datos más importantes surgidos de este trabajo de investigación. El Apéndice II contiene material suplementario, en su mayoría tablas, que no se incluyeron en el cuerpo del escrito para facilitar su lectura. El último Apéndice (III) se incluyó con el objetivo de documentar algunos análisis exploratorios que se realizaron durante este trabajo, cuyo estudio detallado no se continuó por limitaciones de tiempo. La realización de este trabajo de investigación fue posible gracias al apoyo de DGEP-UNAM, así como de los proyectos de CONACYT (31791-N), DGAPA (IN218007) y del Howard Hughes Medical Institute otorgados a la Dra. Patricia León Mejía.

Quisiera agradecer a la Dra. Patricia León por brindarme la posibilidad de realizar este trabajo bajo su dirección, por su constante apoyo, respeto, orientación y paciencia.

También quisiera agradecer a los miembros de comité tutorial, Otto Geiger, Federico Sánchez y Mario Zurita, por sus atinados comentarios, consejos y asesoría a lo largo de este trabajo.

Mi reconocimiento especial a los miembros del jurado por su disponibilidad y comprensión, así como por sus correcciones, comentarios y reflexiones que contribuyeron a la forma final de este escrito.

Agradezco a los investigadores Arturo Guevara y Patricia Dupre por enriquecer mi proceso de formación académica, y a Elizabeth Córdoba por su ayuda incondicional para concretar la publicación del Apéndice I. También quisiera agradecer a Carolina San Román por su ayuda técnica con los protocolos experimentales.

Gracias a Roque que, sin entender las palabras dibujadas ante sus ojos, me ayudó con el embellecimiento de este escrito a través de sus dibujos y cartoons; y a Jesi que, en medio de una investigación periodística para su primer libro, se dio tiempo de revisar la redacción y ortografía de esta tesis.

Finalmente, mi agradecimiento más especial es para toda mi familia, en especial a Roque, Seba, Jesi, Martita y Tato por su apoyo permanente, cariño, confianza y paciencia durante todos estos años de estudio. (Y como olvidarme de “chupi-uai (Super-WHY)”, “go Diego go”, “Dora, the explorer”, Phineas and Ferb, “Harold and the Purple Crayon”, “Mario Brothers games” y todos aquellos que entretuvieron al Seba durante las tardes grises de San Francisco mientras completaba este trabajo).

Resumen

Los azúcares funcionan como importantes señales regulatorias a través de múltiples vías de señalización durante el desarrollo de las plantas. Dichas vías de señalización culminan, en su mayoría, en la modulación de la expresión de una gran diversidad de genes. En las plantas, el mecanismo molecular que regula la expresión génica más estudiado en respuesta a azúcares es la transcripción. Sin embargo, los factores de transcripción implicados en las respuestas a azúcares y su(s) rol(es) en la cascada de transducción están poco caracterizados hasta la fecha. En este trabajo se analizó la función del factor de transcripción de la familia APETALA2 ABI4 durante las respuestas a glucosa en *Arabidopsis thaliana*. A pesar de las variadas estrategias bioquímicas y moleculares empleadas durante la realización de este proyecto no fue posible detectar a la proteína ABI4 *in planta*. De hecho el análisis de proteínas por western blot de plantas que sobre expresan el gen *ABI4* sugirió que la acumulación de la proteína ABI4 podría estar sujeta a una regulación estricta. Por otro lado, el uso de estrategias genéticas y moleculares nos permitieron identificar y caracterizar tres blancos del factor ABI4: los genes *ABI4*, *ABI5* y *SBE2.2*. Nuestros resultados indicaron que la proteína ABI4 participa en la regulación por glucosa de dichos genes *in vivo* a través de su unión directa a las regiones regulatorias 5' de dichos genes blanco. Estudios publicados durante el desarrollo experimental de este trabajo demostraron que ABI4 actúa como un represor de genes fotosintéticos en respuesta a glucosa (Acevedo *et al.* 2005; Koussetvisky *et al.* 2007). Por lo tanto, se propone que ABI4 es un regulador transcripcional dual durante las respuestas a azúcares. Al final de este escrito se discuten dos modelos hipotéticos para explicar la acción dual de ABI4 y se presentan análisis exploratorios *in silico* con el objetivo de contrastar dichos modelos. Serán indispensables estudios experimentales futuros para determinar más genes blanco de ABI4 y el mecanismo por el cual el factor ABI4 realiza su función dual durante las respuestas a azúcares en plantas.

Abstract

Sugars act as important regulatory signals through multiple signaling pathways during plant development. These signaling pathways culminate in the most part, in modulating the expression of a wide variety of genes. In plants, the most studied molecular mechanism that regulates gene expression in response to sugars is the transcription. However, transcription factors involved in the responses to sugars and their role(s) in the transduction cascade are poorly characterized to date. In this work, we analyzed the role of the APETALA2 transcription factor ABI4 in response to glucose in *Arabidopsis thaliana*. Despite the variety of biochemical and molecular strategies employed during the realization of this project it was not possible to detect the protein ABI4 *in planta*. In fact protein analysis through western blot of plants over-expressing the *ABI4* gene suggested that the accumulation of ABI4 protein could be subject to strict regulation. Alternatively, the use of genetic and molecular strategies allowed us to identify and characterize three ABI4 target genes: the *ABI4*, *ABI5* and *SBE2.2* genes. Our results showed that the ABI4 protein is involved in the glucose regulation of these genes *in vivo* through direct binding to their 5' regulatory regions. Studies published during the development of this experimental work demonstrated that ABI4 acts as a repressor of photosynthetic genes in response to glucose (Acevedo *et al.* 2005; Koussetvisky *et al.* 2007). Therefore, we propose that ABI4 is a dual regulator in response to sugars. Two models to explain the dual action of ABI4 are discussed and *in silico* analysis are presented to contrast these two working models. Future experimental studies will be necessary to determine more ABI4 target genes and the mechanism by which the ABI4 protein performs its dual function during the sugar responses in plants.

1. Generalidades de la señalización por azúcares

1.1. Los azúcares funcionan como señales tipo hormonas

La vida en nuestro planeta depende de 4 grupos de biomoléculas: proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y carbohidratos. Inicialmente a cada uno de estos grupos se le atribuyeron una serie de funciones celulares específicas. Sin embargo, estudios modernos demostraron que las funciones tradicionales asignadas a cada una de estas biomoléculas se sobrelapan en gran medida. Los carbohidratos constituyen un ejemplo claro de esta versatilidad funcional, ya que a sus funciones tradicionales como componentes estructurales y proveedores de energía para el metabolismo se le suma la capacidad de actuar como señales tipo hormonas, regulando una gran variedad de respuestas fisiológicas tanto en procariotes como en eucariotes.

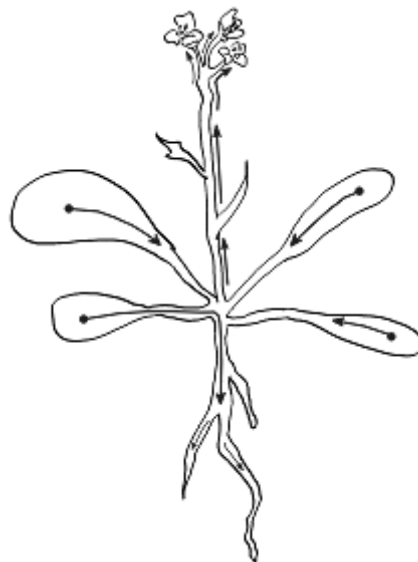
La glucosa es la principal fuente de energía para las reacciones metabólicas y como consecuencia el flujo de carbono en las células es inmenso. Esto hizo difícil demostrar al principio si los azúcares eran también señales regulatorias, o si la regulación observada era simplemente una consecuencia indirecta de los mecanismos de retroalimentación metabólica de los seres vivos. Estudios en levaduras (Carlson 1999; Gancedo 2008), plantas (Sheen 1990) y animales (Foufelle *et al.* 1998; Towle 2005) demostraron de manera contundente que la señalización por azúcares es un fenómeno universal con algunos elementos conservados, aunque a través de mecanismos claramente diferentes en los tres reinos (Rolland *et al.* 2001; Rolland *et al.* 2006).

En las plantas, los niveles o concentraciones de azúcares son capaces de afectar las distintas etapas del desarrollo desde la embriogénesis y germinación, pasando por el crecimiento, morfología, metabolismo y fotosíntesis, hasta las respuestas a estrés, floración y senescencia (Wobus y Weber 1999; Gibson 2005; Gupta y Kaur 2005; Rolland *et al.* 2006). Estas respuestas fisiológicas son moduladas por los azúcares a través de diferentes mecanismos moleculares, entre ellos destaca la regulación mediante la activación y represión de genes a nivel transcripcional (Sheen 1990; Koch 1996; Gonzali *et al.* 2006). Sin embargo, es importante mencionar que la regulación mediada por azúcares también involucra mecanismos post-transcripcionales, como el control de la estabilidad del mensajero (Chan y Yu 1998a) y el control de la traducción (Wiese *et al.* 2004). También se han reportado mecanismos post-

traduccionales mediados por azúcares que incluyen la modulación de la estabilidad y la actividad de las proteínas en respuesta a azúcares (Yanagisawa *et al.* 2003).

A pesar del gran impacto que la regulación por azúcares tiene sobre todo el ciclo de vida de las plantas, los mecanismos y elementos de la señalización por azúcares aún son poco conocidos. La señalización por azúcares en plantas ha probado ser extremadamente compleja. Existen una gran variedad de moléculas carbonadas capaces de dispararla; incluyendo a distintos tipos de hexosas (siendo la glucosa la más estudiada), y a disacáridos como la sacarosa (Sheen 1990; Koch 2004). Estas señales pueden provenir de la biosíntesis, el transporte o la degradación de polisacáridos complejos. El estudio de la señalización por azúcares en las plantas resulta un gran desafío por la existencia de la síntesis primaria de azúcares a través de la fotosíntesis y la partición de dichas moléculas en los tejidos fuente (“source”) y demandantes (“sink”). Ambos procesos condicionan la concentración local de azúcares en los diferentes tejidos y estadíos de desarrollo, y dificultan la disección de los elementos clave de la señalización por azúcares (Figura 1). Asimismo, el flujo de carbono en las plantas es muy dinámico. Por ejemplo, se sabe que la concentración de sacarosa en plantas cambia 5-10 veces durante el ciclo diurno (Farrar *et al.* 2000) mientras que se ha reportado que los gradientes de concentración de sacarosa oscilan entre 20mM a 160mM por ejemplo durante el desarrollo de las semillas en leguminosas y en *Brassica napus* (Wobus y Weber 1999; Hill *et al.* 2003).

Figura 1 – La sacarosa es producida en las hojas maduras (tejido fuente o “source”) a través de la fotosíntesis; y es transportada por el floema hacia los tejidos demandantes (“sink”) como la raíz, las hojas jóvenes, los meristemas, las flores, los frutos y las semillas inmaduras. Las flechas indican el movimiento de la sacarosa en una planta de *Arabidopsis* desde los tejidos productores (extremo redondeado) hasta los tejidos demandantes que utilizan a los esqueletos carbonados como fuente de energía y como precursores de distintas vías metabólicas (punta).



A la fecha se han propuesto varias vías diferentes de señalización en respuesta a azúcares (Figura 2). Sin embargo, aún no es posible establecer cómo funcionan cada una estas vías, ni tampoco se sabe si estas vías cuentan con componentes específicos dependiendo del tipo de la señal de carbono que la inicia o bien si la respuesta y, por lo tanto la vía de señalización que la genera, depende de la integración del balance de carbono en la plantas. Es evidente que las plantas han desarrollado mecanismos sofisticados para percibir los niveles de azúcares y responder a ellos; y hasta el momento está bastante lejos de entenderse con claridad cómo encajan cada uno de los componentes asociados a las vías de respuesta a azúcares dentro del rompecabezas llamado la señalización por carbono en las plantas superiores.

2. Componentes y mecanismos de las vías de señalización por azúcares.

2.1. Vías de señalización

Como se ha mencionado en el párrafo anterior, la señalización por azúcares en plantas es un fenómeno complejo que depende de al menos 7 vías diferentes de señalización en plantas. Estas son (Figura 2): 1- una vía dependiente de hexocinasa (HXK) (Jang *et al.* 1997; Moore *et al.* 2003), 2- una vía dependiente del catabolismo de la glucosa que también involucra a la HXK (Xiao *et al.* 2000; Lejay *et al.* 2003), 3- una vía independiente de HXK relacionada a receptores membranales asociados al transporte de hexosas (Roitsch *et al.* 1995), 4- una vía que involucra a cinasas relacionadas a SNF1 (sucrose non fermenting 1) o SnRKs (proteínas relacionadas a SNF1) (Baena-Gonzalez *et al.* 2007; Lu *et al.* 2007), 5- una vía asociada a proteínas G heterotriméricas (Chen *et al.* 2006), 6- una vía específica de disacáridos (Chiou y Bush 1998) y 7- finalmente una vía dependiente del metabolismo de trehalosa (Avonce *et al.* 2004; Grennan 2007; Paul *et al.* 2008).

El mecanismo de señalización que cuenta con más evidencias experimentales en *Arabidopsis thaliana* es la vía dependiente de la enzima hexocinasa (HXK), la cual parece actuar a varios niveles durante la transducción de la señal de glucosa:

1- La HXK1, además de su actividad enzimática, actúa como el receptor de la señal de glucosa. Moore *et al.* (2003) demostraron que la HXK1 es un elemento clave para percibir la señal de la glucosa y modular la expresión de un gran número de genes en respuesta a la señalización por azúcares en *Arabidopsis*; y también se ha demostrado

que su función como receptor parece independiente de su actividad catalítica (Figura 2, (a)).

2- La HXK1 también parece participar directamente en el núcleo como un efector de la señal de glucosa durante la represión por glucosa del gen fotosintético *CAB2* (Cho *et al.* 2006) y en la degradación mediada por proteosoma del factor de transcripción EIN3 en respuesta a glucosa en *Arabidopsis thaliana* (Yanagisawa *et al.* 2003) (Figura 2, (a)).

3- La HXK también genera una señal regulatoria de carbono mediante el metabolismo posterior de la glucosa. La respuesta a glucosa de los genes de respuesta a patógenos *PR1* y *PR5* (Xiao *et al.* 2000) y del transportador de iones *AtNrt2.1* (Lejay *et al.* 2003) depende del catabolismo de la glucosa y/o de intermediarios de glucólisis, sugiriendo la existencia de una vía dependiente de la actividad catalítica de la hexocinasa (Figura 2, (b)).

El uso de análogos de glucosa no fosforilables como la 3-oximetilglucosa y la 6-deoxiglucosa mostraron la existencia de vías de señalización por hexosas independientes de HXK (Roitsch *et al.* 1995). Se ha especulado que en esta(s) vía(s) podría(n) participar transportadores de hexosas con una función receptora. Esta propuesta se apoya en el hecho de que tanto en levaduras (Ozcan *et al.* 1998; Johnston y Kim 2005) como en mamíferos (Diez-Sampedro *et al.* 2003) existen vías de señalización por azúcares cuyo receptor inicial son moléculas semejantes a los transportadores de hexosas localizados en la membrana plasmática de las células. En ambos casos estos receptores carecen o han perdido su función transportadora y actúan únicamente como receptores. Sin embargo, hasta el momento no hay evidencias de que ningún transportador de hexosas funcione como un receptor de azúcares a nivel de membrana en plantas.

A la fecha se ha reportado la participación de un número importante de moléculas implicadas en la transducción de la señal por azúcares en plantas. Entre ellas, destacan las proteínas cinasas ortólogas a la proteína SNF1 de levadura denominadas SnRKs (Baena-Gonzalez *et al.* 2007; Lu *et al.* 2007) y el complejo de proteína G heterotrimérico (Chen *et al.* 2006; Johnston *et al.* 2007).

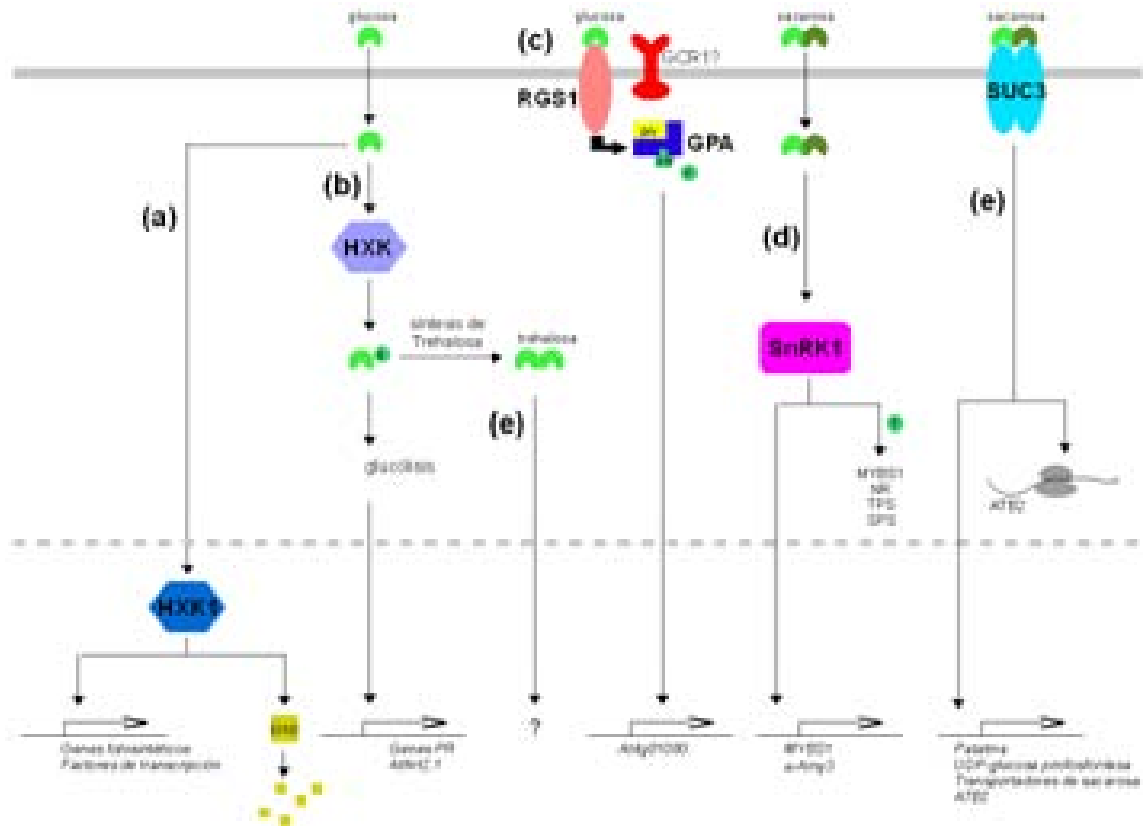


Figura 2 – Vías de señalización por azúcares propuestas en plantas.

- (a) Vía dependiente de la función receptora de la hexocinasa1 (HXK1). EIN3: factor de transcripción implicado en la señalización por etileno y glucosa.
- (b) Vía dependiente de la actividad catalítica de la hexocinasa (HXK). PR: genes de respuesta a patógenos; *AtNrt2.1*: transportador iónico.
- (c) Vía mediada por el complejo heterotrimérico de proteína G. RGS1: proteína reguladora del complejo G heterotrimérico; GPA: subunidad α del complejo G heterotrimérico; GCR1: receptor asociado al complejo G heterotrimérico.
- (d) Vía que involucra proteínas relacionadas a SnRK1 de levaduras (SnRK1s). MYBS1: factor de transcripción de la familia MYB; NR: nitrato reductasa, TPS: trehalosa fosfato sintasa; SPS: sacarosa fosfato sintasa; α -Amy3: α -amilasa 3.
- (e) Vía específica de disacáridos. SUC3: transportador de sacarosa; ATB2: factor de transcripción de la familia bZIP
- (f) Vía dependiente del metabolismo de trehalosa

La función de las SnRKs durante la señalización por azúcares en plantas ha empezado a comprenderse recientemente a través de estudios de esta proteína realizados en arroz (SnRK1) (Lu *et al.* 2007) y en *Arabidopsis* (SnRK1 o AKIN10) (Baena-Gonzalez *et al.* 2007, Jossier *et al.* 2009), en los cuales se demostró la participación de estas proteínas en la modulación de la expresión génica en respuesta a azúcares (Figura 2 (d)).

Por otro lado, estudios de mutantes de las proteínas que conforman el complejo de proteína G heterotrimérico en *Arabidopsis* (*gpa1*, *rgs1*, *thf1*; Tabla 1) han sugerido la participación de las proteínas G en la vía de señalización por azúcares durante la germinación y el desarrollo de la plántula (Figura 2 (c)) (Chen *et al.* 2006; Huang *et al.* 2006; Wang *et al.* 2006; Johnston *et al.* 2007).

Evidencias genéticas y moleculares sugieren que tanto las proteínas SnRKs (Baena-Gonzalez *et al.* 2007; Lu *et al.* 2007) como el complejo G heterotrimérico (Ullah *et al.* 2002; Chen *et al.* 2006; Huang *et al.* 2006; Johnston *et al.* 2007) funcionan en una o más vías de señalización por azúcares independientes de HXK1 (Figura 2 (c) y (d)). Sin embargo, aún no está claro si su función es totalmente independiente de la vía de HXK1 en plantas.

Tabla 1 - Elementos de la vía de señalización por azúcares mediada por proteínas G heterotriméricas en *Arabidopsis thaliana*.

Elementos de la vía de señalización por proteínas G	Proteínas de <i>Arabidopsis</i>	Mutantes	Función	Referencias
Receptor asociado al complejo G heterotrimérico (GPCR)	GCR1 (candidato)	<i>gcr1</i>	nd *	Perfus-Barbeoch <i>et al.</i> 2004
Subunidad α	GPA1	<i>gpa1</i>	GTPasa	Ullah <i>et al.</i> 2002
Subunidad β	AGB1	<i>agb1</i> , <i>elk4</i>	nd *	Perfus-Barbeoch <i>et al.</i> 2004
Subunidad γ	AGG1 AGG2		nd * nd *	Perfus-Barbeoch <i>et al.</i> 2004
Proteínas regulatorias	RGS1	<i>rgs1</i>	- Receptor de ligando D-glucosa. - Regulador de la actividad catalítica de la subunidad α GPA1.	Grigston <i>et al.</i> 2008 Chen <i>et al.</i> 2006 Johnston <i>et al.</i> 2007
	THF1	<i>thf1</i>	- Interactúa con GPA1.	Huang <i>et al.</i> 2006

nd *: función desconocida aún; su participación en la señalización por azúcares no ha sido determinada.

La sacarosa es el disacárido más abundante en las plantas, el cual es el azúcar movilizable desde los tejidos productores a los de demanda. Más recientemente se ha observado que la sacarosa también es capaz de actuar como una señal regulatoria que modula la expresión génica a nivel transcripcional y traduccional (Wiese *et al.* 2005). Esta vía de señalización es específica de disacáridos y fue propuesta por Chiou y Bush (1998) aunque está poco caracterizada en plantas. El único elemento propuesto de dicha vía de señalización es el transportador de sacarosa AtSUT2/SUC3 (Figura 2 (e)). Sin embargo, la función de este transportador como señalizador aún no está

demostrada ya que estudios realizados con sus ortólogos en otras plantas arrojan resultados contradictorios (Barker *et al.* 2000; Meyer *et al.* 2000; Barth *et al.* 2003). En los últimos años, se han acumulado un número importante de evidencias de que otro disacárido, la trehalosa, actúa como una señal de carbono y cuyo metabolismo afecta el crecimiento, el desarrollo y las respuestas a estrés de las plantas (Figura 2 (f)) (Grennan 2007; Paul *et al.* 2008).

En la actualidad es cada vez más claro que las vías de señalización en plantas no son vías lineales (estímulo → respuesta) e independientes, sino que su funcionamiento depende de una red que intercomunica a varias vías y donde un pequeño cambio en una vía puede incidir de manera substancial en las respuestas de otras vías (Fordham-Skelton y Lindsey 2001). Estas interconexiones permiten que las plantas tengan la suficiente plasticidad fisiológica para mantener exitosamente su propia homeostasis y aseguran una rápida adaptación al ambiente exterior. En el caso particular de la vías de señalización por azúcares, se ha demostrado que éstas interactúan con las vías de transducción activadas por señales ambientales, como luz, y por señales endógenas asociadas al desarrollo y a otros nutrientes dentro de las que participan diferentes fitohormonas (Coruzzi y Zhou 2001; Finkelstein y Gibson 2002; León y Sheen 2003). Las interacciones entre las vías de señalización por azúcares y hormonas vegetales se han demostrado particularmente para el ácido abscísico (ABA) (Arenas-Huertero *et al.* 2000), el etileno (Zhou *et al.* 1998; Yanagisawa *et al.* 2003), las auxinas (Moore *et al.* 2003; Mishra *et al.* 2009), las citocininas (Moore *et al.* 2003) y las giberelinas (Perata *et al.* 1997).

2.2. Elementos de las vías de señalización por azúcares

En la siguiente sección se detallan la mayoría de los elementos asociados a las distintas vías de señalización por azúcares en plantas, ordenados según la función propuesta (receptor, transductor y/o efector) para cada elemento dentro de la cascada de transducción de señales (Figura 3).

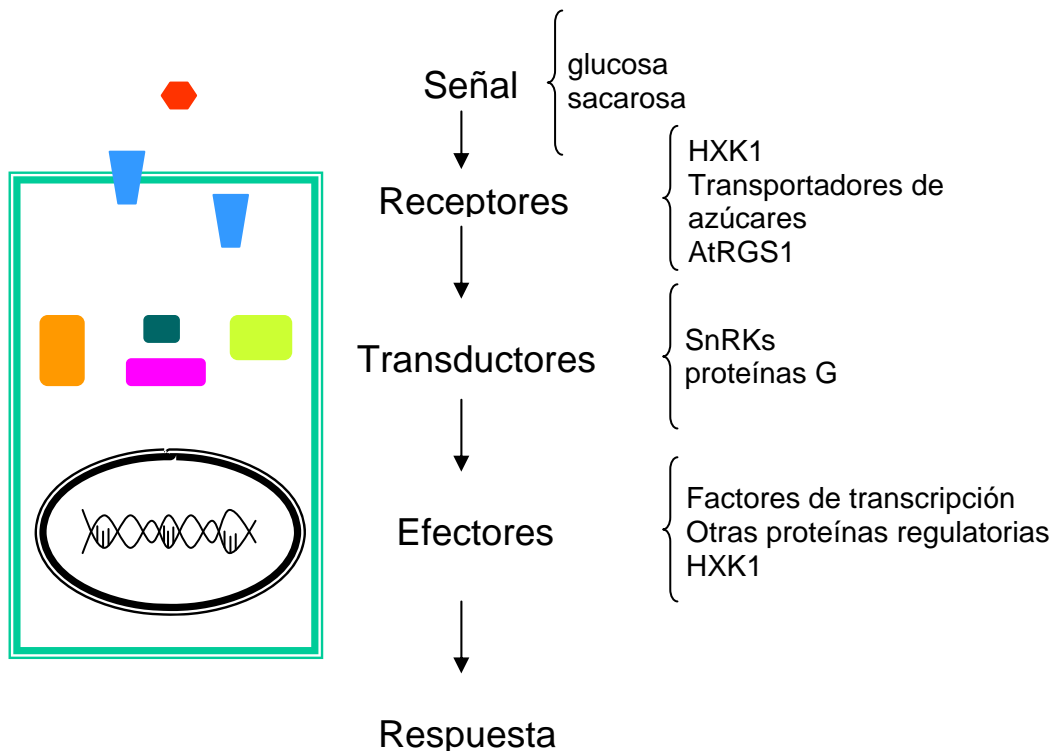


Figura 3 – Esquema general de las cascadas de transducción de señales en respuesta a señales extracelulares (panel izquierdo y central). La capacidad de responder al medio ambiente exterior es crucial para las células. Esta capacidad depende de las proteínas localizadas en la membrana plasmática. En particular dos tipos de proteínas membranales son importantes para la señalización. Uno de ellos son los transportadores específicos que permiten la entrada al citosol de las moléculas impermeables a la membrana plasmática (ej, azúcares). En este caso, los mismos transportadores pueden actuar como moléculas con capacidad receptora o, simplemente, pueden permitir la entrada de las señales al interior celular donde se llevará a cabo la interacción de tales señales con su receptor intracelular específico. La otra clase de proteínas relevantes para el inicio de la señalización en respuesta a señales extracelulares son los receptores localizados sobre la membrana plasmática, los cuales pueden determinar las respuestas celulares a los estímulos externos a través de la modulación de vías de transducción de señales en el citosol. A la derecha de la figura (en las llaves) se indican los elementos específicos de la transducción de señales en respuesta a los azúcares, los cuales serán descritos más detalladamente a continuación.

2.2.1. Receptores

En esta sección se describen brevemente aquellas proteínas que se han propuesto, y en algunos casos demostrado, que funcionan como receptores de la señal de azúcar en plantas.

2.2.1.1. Hexocinasa (*)

La enzima hexocinasa (HXK) juega un papel central en el metabolismo de carbohidratos en todos los organismos ya que el producto de su reacción enzimática, glucosa-6-fosfato, es el compuesto carbonado clave que entra en el metabolismo para la glucólisis y es un precursor importante para la vía de las pentosas y la biosíntesis de ácidos grasos, almidón y polisacáridos de pared celular. Además de su papel catalítico en el metabolismo de las plantas, la HXK también actúa como un receptor intracelular capaz de percibir la concentración de glucosa y en consecuencia modular la expresión génica y el desarrollo de las plantas (Jang *et al.* 1997; Moore *et al.* 2003). El genoma de *Arabidopsis* codifica para 6 genes de HXK y cuya similitud a nivel de secuencia varía entre 45%-85% (Karve *et al.* 2008). Tres de los 6 genes identificados codifican para HXKs incapaces de fosforilar glucosa y/o fructosa; cuya función no se ha determinado en plantas (Karve *et al.* 2008). El resto de los genes (*AtHXK1*, *AtHXK2* y *AtHXK3*) codifica para enzimas capaces de fosforilar hexosas. La proteína *AtHXK2* participa principalmente en glucólisis; y solamente el producto del gen *AtHXK1* se postula que tenga una función como receptor dentro del mecanismo de señalización por azúcares dependiente de HXK (Jang *et al.* 1997; Moore *et al.* 2003; Karve *et al.* 2008). A pesar de que HXK1 y HXK2 tienen funciones distintas, esto no se refleja en la presencia de dominios proteicos diferenciales entre ellas (Karve *et al.* 2008).

El papel de la HXK como receptor dentro las vías de señalización por azúcares en plantas se ha explorado a varios niveles. Por un lado, experimentos en plantas transgénicas con niveles alterados de proteína HXK1 y HXK2 indicaron que la HXK1 es un elemento importante de la vía de señalización por glucosa durante el desarrollo temprano de las plántulas en *Arabidopsis* (Jang *et al.* 1997). Posteriormente, la caracterización fenotípica en respuesta a glucosa de las plántulas mutantes para el gen *HXK1*, *gin2*, demostró contundentemente que la HXK1 tiene un papel esencial como receptor de glucosa (Moore *et al.* 2003). El análisis global del transcriptoma de *gin2* indicó que la HXK1 participa en la regulación de la expresión en respuesta a glucosa de un gran número de genes (Moore *et al.* 2003). Finalmente, estudios de mutagénesis dirigida sobre la proteína HXK1 de *Arabidopsis* permitieron obtener versiones catalíticamente inactivas de esta enzima que aún son capaces de señalar en respuesta a glucosa de la misma manera que lo hace la proteína silvestre (Moore *et al.*

(*) La función efectora de la HXK1 será discutida más adelante.

2003). Este resultado demuestra que la señalización mediante HXK1 es independiente de su función catalítica; y que la HXK1 tiene una función metabólica y una función señalizadora que actúan de manera independiente en *Arabidopsis* (Moore *et al.* 2003). A pesar de los numerosos estudios aún no se ha determinado el mecanismo de acción mediante el cual la HXK percibe y envía la señal de la glucosa hacia el resto de los elementos de la cascada de transducción de señales.

2.2.1.2. Transportadores de azúcares

Entre las funciones más importantes de los transportadores de azúcares en plantas superiores se incluyen la distribución y el tráfico de azúcares, la partición de carbono entre los tejidos fuente y los tejidos demandantes, y el control de la turgencia celular (Williams *et al.* 2000; Lalonde *et al.* 2004). A pesar de que se ha especulado que proteínas tipo transportadores podrían tener una función receptora en plantas, similar a lo que se observa para los transportadores de hexosas RGT2 y SNF3 de levaduras (Ozcan *et al.* 1998), esto no se ha demostrado.

En plantas, hay dos tipos principales de transportadores de azúcares: los transportadores de monosacáridos (Buttner y Sauer 2000; Buttner 2007), y los transportadores de disacáridos (Sauer 2007).

2.2.1.2.1. Transportadores de hexosas/monosacáridos

En *Arabidopsis*, existen 53 genes que codifican para transportadores de monosacáridos (MST), los cuales se dividen en 7 subfamilias en base a la similitud de sus secuencias (Buttner 2007; http://www.biologie.uni-erlangen.de/mpp/TPer/index_TP.shtml). Estos transportadores constan de 12 dominios transmembranales conservados y de otros motivos conservados entre los que se incluyen dos firmas conocidas necesarias para el transporte del azúcar (Buttner 2007). Los transportadores de monosacáridos caracterizados funcionalmente hasta el momento son simportadores de protones (H⁺) y azúcar que dependen de energía y tienen una gran amplitud de sustrato (Buttner y Sauer 2000). En la tabla 2 se describen las características más relevantes de cada una de las subfamilias de transportadores de monosacáridos de *Arabidopsis*.

Tabla 2 - Transportadores de monosacáridos de *Arabidopsis thaliana*.

Subfamilia	Número	Características relevantes	Localización	Referencias
1- MST/STP	14	-Simportadores de monosacáridos /H ⁺ de alta afinidad, más específicos para la glucosa (excepto AtSTP3). -Subfamilia mejor caracterizada. -AtSTP1 fue el primer transportador identificado en plantas superiores y actualmente es el más caracterizado dentro de la subfamilia 1.	Membrana plasmática	Lalonde <i>et al</i> 2004 Buttner 2007 Buttner y Sauer 2000 Sherson <i>et al</i> 2000
2- VGT	3	-La función de AtVGT1 es importante durante la floración y germinación de las semillas.	Vacuola (AtVGT1 y 2) Cloroplasto	Lalonde <i>et al</i> 2004 Buttner 2007 Aluri y Buttner 2007
3- TMT/MSSP	3	-Presentan una extensión citoplasmática similar a la de los transportadores de glucosa RGT2 y SNF3 que funcionan como receptores de glucosa en levadura.	Vacuola	Lalonde <i>et al</i> 2004 Buttner 2007
4- AtpGlcT /AtSGB1	4	-Se especula que los tres AtpGlcT localizados en cloroplasto participan en la exportación de glucosa derivada de la degradación de almidón hacia el citoplasma. Sin embargo, aún no se ha demostrado experimentalmente que estas proteínas transporten hexosas. -AtSGB1 se aisló como un supresor de la mutación en la subunidad β del complejo G heterotrimérico y su función es importante durante el desarrollo temprano de la plántula de <i>Arabidopsis</i> .	Cloroplasto (AtpGlcT) Golgi (AtSGB1)	Lalonde <i>et al</i> 2004 Buttner 2007 Wang <i>et al</i> 2006
5- PT	6	-Simportadores de polialcoholes/H ⁺ .	Membrana plasmática	Lalonde <i>et al</i> 2004 Buttner 2007
6- INT	4	-AtINT4 es un simportador específico de inositol/H ⁺ implicado en el cargado de inositol al floema. -AtINT1 es un simportador específico de inositol/H ⁺ implicado en el transporte de inositol desde la vacuola al citoplasma.	Membrana plasmática Vacuola	Lalonde <i>et al</i> 2004 Buttner 2007 Schneider <i>et al</i> 2008
7- similares a ERD6	19	-Subfamilia menos caracterizada. -AtERD6 codifica para un posible transportador de azúcares de tipo facilitador independiente de energía.	Vacuola (AtERD6)	Lalonde <i>et al</i> 2004 Buttner 2007 Kiyosue <i>et al</i> 1998

MST/STP: proteínas transportadoras de azúcares; VGT: proteínas transportadoras de glucosa vacuolar; TMT: proteínas transportadoras de monosacáridos del tonoplasto; MSSP: posible proteína receptora de monosacáridos; AtpGlcT: transportadores de glucosa plastídicos; AtSGB1: supresor de la proteína G beta 1; PT: proteínas transportadoras de polialcohol o polioli; INT: transportadores de inositol; ERD6: respuesta temprana a deshidratación.

La vía de señalización por azúcares mediante transportadores de hexosas es muy importante en levaduras (Ozcan *et al.* 1998; Johnston y Kim 2005) y humanos (Diez-Sampedro *et al.* 2003; Dyer *et al.* 2003). En plantas, los resultados observados con análogos de glucosa no fosforilables durante el estudio de la señalización por azúcares independiente de hexocinasa sugirieron la existencia de receptores de azúcar extracelulares o membranales (Roitsch *et al.* 1995). Sin embargo, no se ha demostrado que ninguno de los transportadores de monosacáridos de plantas funcione como

receptor de azúcares a nivel de membrana celular de manera homóloga a lo demostrado para los transportadores de hexosas de levaduras (Ozcan *et al.* 1998) y humanos (Diez- Sanpedro *et al.* 2003). Quizás en plantas los transportadores no son el elemento receptor dentro de la vía de señalización y su función radica en el tráfico de las moléculas de azúcares hacia el citoplasma u organelos para disparar otras vías de señalización como la vía asociada a HXK1, SnRKs y/o proteínas G heterotriméricas.

2.2.1.2.2. Transportadores de disacáridos

Los transportadores de disacáridos (DST) de plantas descritos hasta el momento son simportadores de H⁺/disacáridos (particularmente sacarosa) dependientes de energía, con 12 dominios transmembranales en su estructura proteica y cuyo amino y carboxilo terminal se localizan en el citoplasma (Lalonde *et al.* 1999). En *Arabidopsis* existen 9 genes que codifican para DSTs (Sauer 2007), dos de los cuales parecen ser pseudogenes (Sauer *et al.* 2004). El resto codifica para transportadores funcionales y comparten aproximadamente 75% de similitud a nivel de aminoácidos entre ellos (Sauer 2007). Según un análisis filogenético, los DSTs de plantas pueden dividirse en 4 grupos (Sauer 2007). Entre ellos, destaca el grupo 3 que incluye al transportador de sacarosa de *Arabidopsis* AtSUC3 y al de tomate LeSUT2 (Sauer 2007).

La proteína LeSUT2 de tomate se ha propuesto como un posible receptor de sacarosa debido a que su actividad como transportador de sacarosa es indetectable en levaduras, y a que presenta un dominio carboxilo terminal citoplasmático grande similar al dominio carboxilo terminal de los transportadores de hexosas de levadura RGT2 y SNF3 (Barker *et al.* 2000). Sin embargo, el gen ortólogo de *SUT2* en *Arabidopsis* (*AtSUC3*) es un transportador funcional en células de levadura transgénicas (Meyer *et al.* 2000). El gran dominio citoplasmático que caracteriza a la proteína AtSUC3 no está implicado directamente en el transporte de sacarosa, por lo que no se excluye la posibilidad de que AtSUC3 también pueda actuar como receptor de sacarosa (Meyer *et al.* 2000).

2.2.1.3. AtRGS1

El gen *AtRGS1* codifica para una proteína membranal de 459 amino ácidos, cuyo dominio amino terminal contiene 7 dominios transmembranales probables (Chen *et al.* 2003). Hacia la región carboxilo terminal de AtRGS1 se encuentra un dominio denominado RGS (regulador de la señalización por proteínas G), el cual comprende

unos 120 amino ácidos y cuya estructura tridimensional se organiza en 9 α -hélices (Tesmer *et al.* 1997). La función de los dominios RGS es estabilizar el estado de transición durante la hidrólisis del GTP en la subunidad α de la proteína G heterotrimérica, modulando de esta manera la actividad GTPasa de esta subunidad (Tesmer *et al.* 1997).

Recientemente, se ha propuesto que la proteína RGS1 de *Arabidopsis thaliana* podría funcionar como un receptor transmembranal de D-glucosa extracelular y modular la expresión génica en respuesta a glucosa a través de la señalización por proteínas G heterotriméricas (Grigston *et al.* 2008). La presencia de la proteína AtRGS1 en las células y su interacción física con la subunidad α (GPA1) del complejo G heterotrimérico se ha visto que son necesarias para la expresión correcta de un grupo de genes en respuesta a glucosa. Interesantemente, la función moduladora de la actividad de la GTPasa de AtRGS1 no es esencial durante la regulación de la expresión génica en *Arabidopsis*, sino más bien parece que RGS1 actúa como una proteína estructural favoreciendo la interacción proteína-proteína entre las subunidades catalíticas y regulatorias del complejo G heterotrimérico en presencia de azúcares. Sin embargo, las evidencias a favor de esta función receptora de RGS1 son aún indirectas y faltan más estudios que establezcan claramente su función receptora.

2.2.2. Elementos involucrados en la transducción de la señal

Después de que una señal es percibida por su receptor correspondiente, ésta debe transmitirse hacia los efectores de la respuesta a través de elementos intermediarios o transductores por una cascada de transducción (Figura 3). A continuación se describen los transductores de la señal de azúcar que han sido mejor caracterizados en plantas superiores.

2.2.2.1. SnRKs

Las proteínas SnRKs de plantas se agrupan dentro de la superfamilia de proteínas cinasas de serina y treonina CDPK/SnRK (Hrabak *et al.* 2003). En *Arabidopsis* se han identificado 38 genes que codifican para proteínas similares a la SNF1 de levadura, la cual es una cinasa de serina-treonina implicada en la señalización por azúcares en levaduras (Celenza y Carlson 1986; Hrabak *et al.* 2003). Estos 38 genes de *Arabidopsis* se distribuyen en tres subgrupos: SnRK1, SnRK2 y SnRK3, en base a su similitud de secuencia y al nivel de conservación de algunos dominios proteicos (Hrabak

et al. 2003). Dentro del subgrupo SnRK1 se incluyen a las proteínas de *Arabidopsis* SnRK1.1 también llamada AKIN10 (At3g01090), SnRK1.2 o AKIN11 (At3g29160) y SnRK1.3 (At5g39440). Estas proteínas son las más similares a las cinasas implicadas en la señalización por azúcares en levaduras (Celenza y Carlson, 1986) y mamíferos (Carling *et al.* 1994; Carling 2004).

La caracterización de las proteínas SnRKs aisladas a partir de diferentes especies vegetales ha provisto datos interesantes en cuanto a la función de estas proteínas. Las SnRK1s son necesarias en la regulación del desarrollo del polen y la maduración de semillas al afectar el metabolismo de sacarosa y almidón (Zhang *et al.* 2001). También se ha visto que estas enzimas son clave para la regulación de la expresión de genes asociados al metabolismo de carbono (Purcell *et al.* 1998), y de la actividad de enzimas claves del metabolismo de carbono y nitrógeno (Sugden *et al.* 1999; Tiessen *et al.* 2003). Finalmente se ha demostrado que las SnRK1s interactúan con la proteína reguladora PRL1 (locus regulatorio pleiotrópico 1) (Bhalerao *et al.* 1999) y con proteínas asociadas al proteosoma (α 4/PAD1 y SKP1/ASK1) y que dicha asociación depende de los niveles de glucosa (Farras *et al.* 2001). Todos estos hallazgos sugieren que las SnRKs están implicadas en las respuestas a carbono en las plantas superiores.

La función específica de las SnRK1s en las vías de señalización por azúcares en plantas empezó a vislumbrarse más claramente a partir del reporte de Lu *et al.* 2007, en el cual se demuestra que la SnRK1A de arroz es esencial para modular la represión en presencia de azúcares de los genes *MYBS1*, que codifica para un factor de transcripción MYB, y de α -amilasa3 (*α Amy3*) (Figura 4). Por otro lado, el análisis de las respuestas a azúcares durante el ayuno de carbono permitieron establecer que las proteínas SnRK del subgrupo1 de *Arabidopsis*, AKIN10 y AKIN11, tienen una importancia crucial en la vía de señalización por azúcares que interactúa con los fenómenos de oscuridad y la falta de disponibilidad de energía (Baena-Gonzalez *et al.* 2007) (Figura 4). Se ha corroborado que las proteínas AKIN10 y AKIN11 son parcialmente redundantes y son responsables de la inducción de genes específicos en condiciones de oscuridad (genes *DIN*) y cuyo nivel de expresión disminuye en presencia de azúcares (Baena-Gonzalez *et al.* 2007). Además estudios comparativos de transcripción global en protoplastos que sobreexpresan *AKIN10* y que carecen de *AKIN10* indican que esta proteína cinasa es un regulador global de la expresión de genes en *Arabidopsis* (Baena-Gonzalez *et al.* 2007).

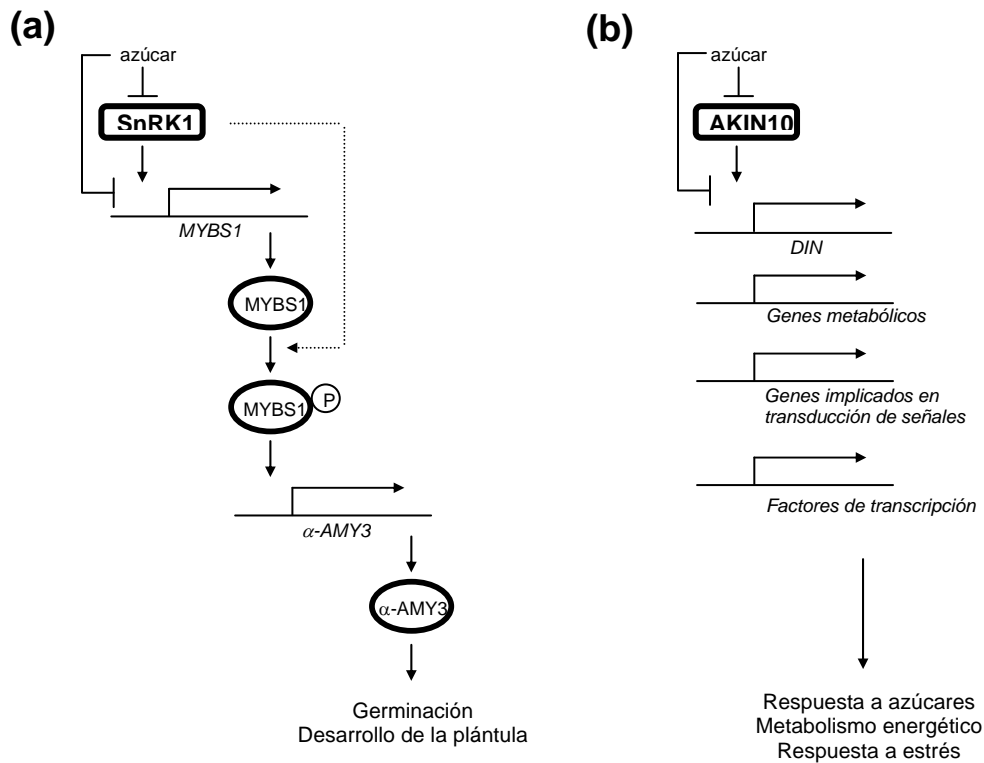


Figura 4 - La función de las SnRKs en las vías de señalización por azúcares en plantas.

(a) La proteína SnRK1A de arroz es esencial para modular la represión génica en respuesta a la presencia de azúcares (Lu *et al* 2007). La presencia de azúcar inactiva a la proteína SnRK1A y reprime la transcripción del factor de transcripción MYBS1. En ausencia de azúcar, se activa la actividad de SnRK1A, y por consiguiente, la transcripción de MYBS1. La proteína SnRK1A activada modula también la actividad del factor MYBS1 por fosforilación. Así, MYBS1 fosforilado se une directamente sobre el promotor del gen de α -amilasa 3 (α -Amy3) y controla su expresión en respuesta a la concentración de azúcares.

(b) En presencia de azúcar, la proteína SnRK1.1 o AKIN10 de *Arabidopsis* se inactiva y la expresión de los genes específicos que se inducen en el período de oscuridad (genes *DIN*) se reprime. En ausencia de azúcar, AKIN10 se activa y modula positivamente la expresión de los genes *DIN*. Estudios de transcripción global indican que la proteína cinasa AKIN10 es un regulador global de la expresión de genes en *Arabidopsis*, ampliando el impacto de la función de las SnRKs en las plantas superiores (Baena-Gonzalez *et al* 2007).

A pesar del gran avance realizado en los últimos años con respecto a la caracterización de proteínas SnRKs en plantas, aún faltan muchos más estudios para entender la función de estas proteínas en la cascada de transducción de señales de azúcares así como para esclarecer su participación en las diferentes vías de señalización.

2.2.2.2. Proteínas G heterotriméricas

La participación de proteínas G heterotriméricas en la transducción de señales es un mecanismo común en todos los eucariotes. El complejo de proteínas G heterotriméricas está formado por las subunidades α , β y δ unidas a un receptor acoplado a la proteína G denominado GPCR (Figura 5). En mamíferos existen múltiples isoformas para cada una de las subunidades α , β y δ , lo que hace a este mecanismo de señalización uno de los más versátiles por su selectividad y capacidad combinatoria. Sin embargo, en plantas hasta la fecha sólo se han identificado una subunidad α , una subunidad β y dos subunidades δ (Perfus-Barbeoch *et al.* 2004).

El primer indicio de que las proteínas G heterotriméricas participan en la señalización por azúcares en plantas proviene de estudios en la mutante para la proteína reguladora de la señalización por proteínas G denominada RGS1 (*rgs1*). Dicha mutante es insensible a altas concentraciones de glucosa durante la germinación (Chen y Jones 2004; Chen *et al.* 2006). El gen *RGS1* de *Arabidopsis* codifica para una proteína con dominios transmembranales, cuya función es regular la actividad de la subunidad α (GPA1) que es la subunidad catalítica del complejo G responsable de hidrolizar el GTP a GDP (Chen *et al.* 2003; Johnston *et al.* 2007). La interacción entre la subunidad RGS y GPA1 acelera la reacción de hidrólisis, lo cual constituye un mecanismo de control novedoso del funcionamiento de las proteínas G en plantas (Johnston *et al.* 2007).

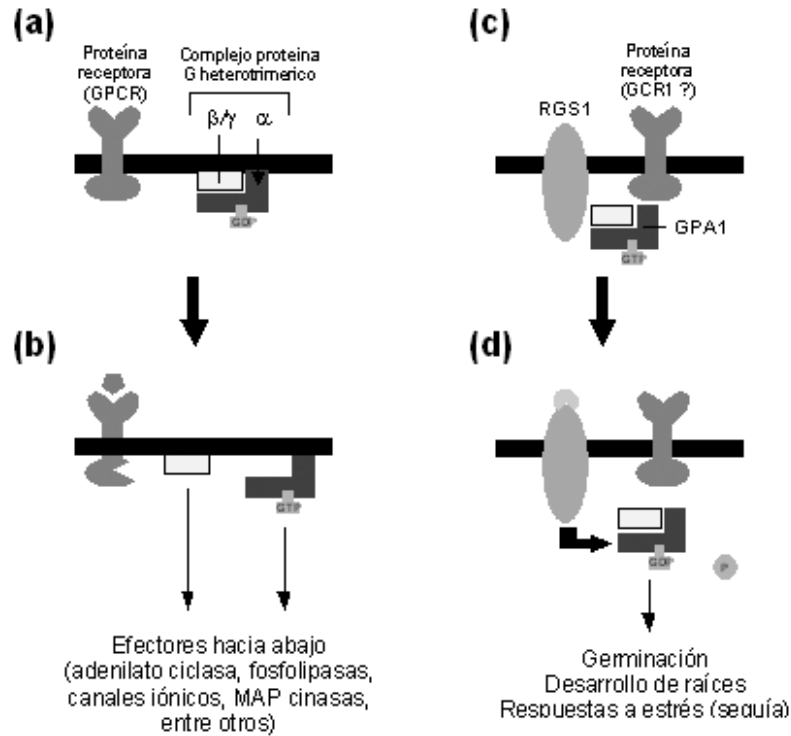


Figura 5 - Transducción de señales mediada por proteínas G.
 (a) En animales, el complejo G heterotrimerico inactivo está constituido por tres subunidades diferentes (α , β y γ). (b) La unión de un ligando a una proteína receptora GPCR asociada al complejo G heterotrimerico, provoca el intercambio de GDP por GTP en la subunidad α . Esto a su vez activa al complejo G heterotrimerico, el cual se disocia en la subunidad α , y el complejo dimérico β/γ . La hidrólisis del GTP a GDP restaura la conformación inactiva del complejo G heterotrimerico.
 (c) En *Arabidopsis*, el gen *GPA1* codifica para la subunidad α del complejo G heterotrimerico, y el gen *RGS1* codifica para una subunidad regulatoria del complejo G heterotrimerico (Tabla 1). La proteína *RGS1* se activa por la unión del ligando D-glucosa y regula la actividad catalítica de *GPA1*, acelerando la reacción de hidrólisis del GTP a GDP en presencia de azúcar.

2.2.3. Efectores de la señal de azúcares

Como se ha esquematizado en la Figura 3, las células perciben las señales a través de receptores específicos membranales o intracelulares. Esta señal se transmite luego a los elementos intermediarios quienes, finalmente, controlan la actividad de las moléculas efectoras encargadas de la respuesta primaria para dicha señal. Esta respuesta en muchos casos implica la modulación de la regulación génica a través de mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales.

En esta sección se describen brevemente los principales elementos regulatorios

o efectores caracterizados en plantas superiores hasta la fecha, responsables de modular la expresión génica en respuesta a la señal de azúcares.

2.2.3.1. Hexocinasa (HXK) ^(*)

La HXK es un elemento muy versátil dentro de la señalización por azúcares. Como ya se mencionó, la HXK es un receptor intracelular de glucosa en *Arabidopsis* y el elemento que define a la vía de señalización por azúcares dependiente de HXK (Figura 2 (a) y (b)). Estudios más recientes dirigidos a entender el mecanismo de acción de la HXK demostraron que su localización subcelular podría ser relevante para su función (Rolland *et al.* 2006). Así se encontró que la HXK se asocia a complejos proteicos de alto peso molecular en múltiples localizaciones subcelulares, incluyendo mitocondrias, citoesqueleto de actina y núcleo (Cho *et al.* 2006; Kim *et al.* 2006; Balasubramanian *et al.* 2007; Cho *et al.* 2009). En 2006, Cho *et al.* (2006) reportaron que la proteína HXK1 de *Arabidopsis* interactúa con otras dos proteínas en el núcleo formando un complejo heterotrimérico, el cual es importante para regular directamente la represión por glucosa del gen *CAB2*. Esto indica que la HXK no sólo es capaz de actuar como el elemento receptor de la glucosa, sino que también es parte de la respuesta efectora participando directamente en el control de la expresión génica a nivel transcripcional (Figura 6). Asimismo, se especula que este complejo proteico interacciona con factores transcripcionales específicos aún desconocidos (Figura 6).

La participación de HXK dentro de un complejo efector es novedosa y sugiere que una enzima (tradicionalmente asociada al metabolismo) puede unir a su ligando y, en consecuencia, afectar de manera directa las interacciones entre las diferentes proteínas dentro de un complejo multiproteico efector. Los efectores mejor caracterizados durante la señalización por azúcares son los factores de transcripción. Futuros estudios permitirán establecer la identidad de los factores de transcripción específicos que interaccionan dentro del complejo efector en el que participa HXK en respuesta a azúcares.

^(*) La función receptora de la HXK fue discutida previamente en el apartado 2.2.1.1.

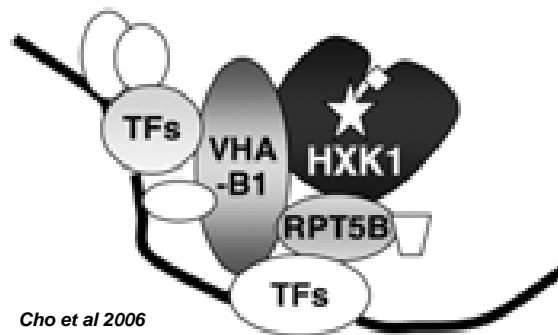


Figura 6 - Modelo de la función reguladora de la HXK en respuesta a glucosa.

La HXK1 interacciona con las proteínas VHA-B1 y RPT5B en el núcleo (Cho *et al.* 2006). VHA-B1 codifica para un componente del complejo de H⁺-ATPasa vacuolar y RPT5B es un elemento de la subunidad regulatoria 19S del proteosoma. La formación del complejo trimérico HXK1-VHA-B1-RPT5B es esencial para modular la represión por glucosa del gen fotosintético *CAB2* en *Arabidopsis* (Cho *et al.* 2006). Las proteínas HXK1, VHA-B1 y RPT5B no tienen un dominio de unión del DNA, por lo que se especula que este complejo contiene elementos adicionales, como factores de transcripción específicos, que participarían en la unión al DNA y la interacción con VHA-B1 y RPT5B (Cho *et al.* 2006).

2.2.3.2. Factores de transcripción

Los factores de transcripción comprenden aproximadamente el 5-6 % del genoma de *Arabidopsis* (Riechmann *et al.* 2000). Los análisis del transcriptoma de *Arabidopsis* en respuesta a azúcares utilizando microarreglos demostraron que la fracción de los genes regulados por azúcares que corresponde a los factores de transcripción está enriquecida con respecto al porcentaje de factores de transcripción en el genoma completo de *Arabidopsis* (Price *et al.* 2004); y que un porcentaje importante de los factores de transcripción responden rápidamente a los azúcares en *Arabidopsis* (Li *et al.* 2006; Osuna *et al.* 2007). Esto sugiere que un número substancial de factores de transcripción forma parte de la cascada de transducción en respuesta a azúcares en *Arabidopsis* y resalta la importancia de dichos factores como elementos efectores fundamentales de la respuesta durante la señalización por azúcares en plantas.

En base a los distintos análisis globales entre 20 a 50 de las 64 familias de factores de transcripción anotadas en la base de datos DATF ("The Database of

Arabidopsis Transcription Factors"; Guo *et al.* 2008) se regulan en respuesta a glucosa, dependiendo de las condiciones de estudio (Price *et al.* 2004; Li *et al.* 2006; Osuna *et al.* 2007). Entre las familias más afectadas se encuentran las siguientes: AP2, MYB, bZIP, NAC, WRKY, MADS, Aux/IAA, C2C2(Zn) CO-like, homeodominio, NAM-like y de choque térmico (Price *et al.* 2004; Li *et al.* 2006; Osuna *et al.* 2007). Los factores cuya transcripción se modula con tratamientos transitorios de glucosa pertenecen principalmente a las familias MYB, bZIP, AP2, homeodominio, NAM-like y de choque térmico (Li *et al.* 2006). Por otro lado, se ha observado que la mayoría de los factores de transcripción cuya abundancia disminuye en presencia de carbono, pertenece a las familias MADS y WRKY (Li *et al.* 2006); y también que los genes que más rápido se reprimen por glucosa son factores de transcripción asociados a la regulación por luz, como por ejemplo GT2, GT1, GBF1, MYBST1 (Li *et al.* 2006).

A pesar de la importancia de los factores de transcripción como efectores de la respuesta a azúcares, responsables de modular una gran variedad de genes, sólo unos pocos factores de transcripción asociados a la regulación de la expresión génica por azúcares en plantas se han caracterizado hasta el momento, los cuales se detallan en las Tablas 3 y 4. La Tabla 3 describe los factores de transcripción de *Arabidopsis*, mientras que la Tabla 4 incluye a los factores de otras especies vegetales como por ejemplo, papa, arroz y uva. Finalmente un modelo que trata de integrar las interacciones propuestas y demostradas entre los factores de transcripción de *Arabidopsis* en respuesta a azúcares se ilustra en la Figura 7.

Un aspecto que destaca de los factores de transcripción involucrados en las respuestas a azúcares hasta el momento es que la mayoría de ellos pertenecen a familias con dominios de unión al DNA exclusivos de plantas como los dominios AP2, WRKY, B3 y CCT. Por lo cual se sugiere que mecanismos novedosos de regulación transcripcional en plantas podrían depender de las interacciones entre dichos factores de transcripción y también, entre estos factores únicos en plantas y aquellos no únicos. Futuros estudios de carácter integral urgen para ubicar a cada uno de los factores descritos dentro de los distintos complejos transcripcionales y para tratar de comprender como se desenvuelve la regulación transcripcional durante la señalización por azúcares en plantas.

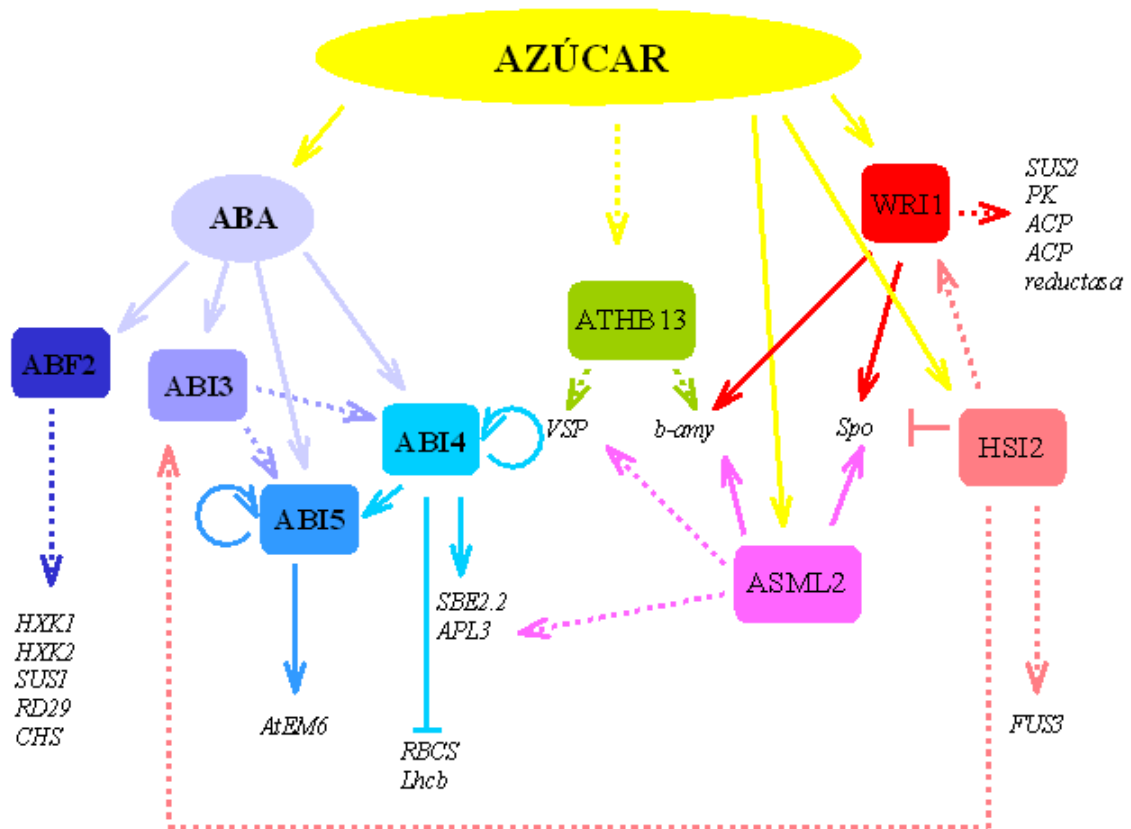


Figura 7 – Factores de transcripción de *Arabidopsis* implicados en la señalización por azúcares. (Ver abreviaturas y detalles en tabla 3).

Tabla 3 - Factores de transcripción que participan en la vía de señalización por azúcares en *Arabidopsis thaliana*.

Familia	Factor	Expresión	Función	Caja de unión	Blancos directos	Otros posibles blancos	Referencias
ABI3/VP1	ABI3	- semillas, plántulas	-Participa en el desarrollo del embrión, la maduración de las semillas, la inducción a la desecación y la dormancia. -Elemento de la vía de señalización por ABA y por glucosa durante la germinación y las etapas tempranas del desarrollo de las plántulas. -Implicado en procesos relacionados a las respuestas a ABA en plantas adultas, el desarrollo de cloroplasto, la modulación de la distribución de recursos, la floración y el crecimiento de las raíces laterales en respuesta a auxinas. -Activador transcripcional.	- Motivo RY	-Proteínas de almacenamiento específicas de semilla (1)	- <i>ABI4</i> - <i>ABI5</i> - <i>RAB18</i>	Lopez-Molina <i>et al</i> 2002 Brocard-Gifford <i>et al</i> 2003 Dekkers <i>et al</i> 2008 (1) Monke <i>et al</i> 2004
	HSI2	- tallo, raíz, hojas, y flores - inducible por sacarosa	-Elemento de la vía de señalización por azúcares. -Represor transcripcional.	ND (*)	ND (*)	- <i>ABI3</i> - <i>FUS3</i> - <i>WRI1</i> - <i>Olesinas</i> - <i>Proteínas de reserva 2S y 12S</i> (2)	Tsakagoshi <i>et al</i> 2005 Tsakagoshi <i>et al</i> 2007 (2) Tsakagoshi <i>et al</i> 2007
AP2/ERF	WRI1/ASML1	- silicuas - inducible por sacarosa	-Regulación del metabolismo de almacenamiento durante la maduración de las semillas. -Participa durante la germinación y establecimiento de la plántula. -Activador transcripcional.	ND (*)	- <i>Spo</i> - β - <i>amy</i>	- <i>SUS2</i> - <i>PK</i> - <i>ACP</i> - <i>ACP reductasa</i> (3)	Focks y Benning 1998 Ruuska <i>et al</i> 2002 Cernac y Benning 2004 Masaki <i>et al</i> 2005a Cernac <i>et al</i> 2006 (3) Ruuska <i>et al</i> 2002
	ABI4	- embrión, plántulas - inducible por azúcares, osmolitos y ABA	-Elemento de la vía de señalización por glucosa y ABA durante el establecimiento temprano de la plántula. -Punto de control durante el desarrollo postgerminativo. -Regulador dual de la transcripción (activador y represor).	- CE-1 - Caja S - Motivo CCAC	- <i>ABI4</i> - <i>ABI5</i> - <i>SBE2.2</i> - <i>APL3</i> - <i>RBCS</i> - <i>Lhcb</i>	(4) ver sección 8.1.5.2. de esta tesis	Finkelstein <i>et al</i> 1998 Acevedo-Hernandez <i>et al</i> 2005 Rook <i>et al</i> 2006b Koussevitzky <i>et al</i> 2007 Bossi <i>et al</i> 2009 Niu <i>et al.</i> 2002 (4)Nakabayashi <i>et al</i> 2005
bZIP	ABI5	- semillas, plántulas - inducible por glucosa y ABA	-Elemento de la vía de señalización por glucosa y ABA durante la germinación y el establecimiento temprano de la plántula. -Punto de control durante el desarrollo postgerminativo. -Activador transcripcional.	- ABRE	- <i>AtEm6</i>	- <i>AtEm1</i> (5)	Lopez-Molina <i>et al</i> 2001 Finkelstein y Lynch 2000 Brocard <i>et al</i> 2002 Carles <i>et al</i> 2002 (5)Nakabayashi <i>et al</i> 2005

bZIP	ABF2	- plántulas - hojas, raíz, flores y silicuas inmaduras en plantas adultas - inducible por ABA, sal y sacarosa	-Elemento de la vía de señalización por ABA, azúcares y estrés durante el crecimiento post-germinación. -Posible activador transcripcional.	- ABRE (CACGTGGC)	ND (*)	- RBCS - HXK1 - HXK2 - SUS1 - RD29A - CHS	Kim <i>et al</i> 2004
	ATB2/bZIP11	- tejido vascular de plantas jóvenes - tejidos vegetativos jóvenes en plantas adultas - expresión controlada en respuesta a sacarosa a nivel transcripcional y postranscripcional	-Se especula que participa en la partición de asimilados y la coordinación de procesos metabólicos en tejidos demandantes recién establecidos durante el desarrollo de las plantas. -Implicado en la regulación del metabolismo de aminoácidos en respuesta a azúcares. -Activador transcripcional.	- Caja G (ACGT) (**) - ACTCAT	- ASN1 - ProDH2 - ProDH / ERD5		Rook <i>et al</i> 1998 Sato <i>et al</i> 2004 Wiese <i>et al</i> 2004 Wiese <i>et al</i> 2005 Hanson <i>et al</i> 2008
C2C2-CO-like F	ASML2	- flores, semillas en desarrollo (silicuas) - Inducible por azúcares	-Modula genes del metabolismo de carbono en respuesta a azúcares. -Activador transcripcional.	ND (*)	- β -amy	- APL3 - VSP	Masaki <i>et al</i> 2005b
C2C2 GATA	GNC	- hipocótilo - tallo - Inducible por nitrógeno	-Regula la síntesis de clorofila. -Participa en la vía de señalización por glucosa, donde se especula que controla la retro-alimentación de la señal de carbono. -Posible punto molecular de convergencia entre las señalizaciones por carbono y nitrógeno. -Activador transcripcional.	(***)	ND (*)	- AtPLT6 - AtSTP13 - HXK1	Bi <i>et al</i> 2005
HDZip	ATHB13	- semillas y hojas - receptáculo y estigma (flores) - tejido vascular de la porción basal de los pecíolos (hojas de roseta y cotiledones) - base de hojas caulinas	-Participa en el desarrollo de hojas y cotiledones. -Regula la expresión de genes en respuesta a azúcares.	CAATNATTG	ND (*)	- β -Amy - VSP	Hanson <i>et al</i> 2001 Johannesson <i>et al</i> 2001 Hanson <i>et al</i> 2002

(*) ND: no determinado ; (**): caja putativa según análisis *in silico* (no demostrada experimentalmente); (***): consenso de caja de unión de los factores de la familia C2C2 GATA: (T/A)GATA(G/A) o (T/C)TATC(T/A) (Jeong y Shih 2003), presente en los promotores de *AtPLT6*, *AtSTP13* y *HXK1*.

Lista de abreviaturas –

Factores de transcripción - ABI3: ABA INSENSITIVE 3 (At3g24650); HSI2: HIGH-LEVEL EXPRESSION OF SUGAR-INDUCIBLE GENE 2 (At2g30470); WRI/ASML1: WRINKLED1 / ACTIVATOR de *SPO^{min}::LUC1* (At3g54320); ABI4: ABA INSENSITIVE 4 (At2g40220); ABI5: ABA INSENSITIVE 5 (At2g36270); ABF2: ABSCISIC ACID RESPONSIVE ELEMENTS - BINDING FACTOR 2 (At1g45249); ATB2/bZIP11: ARABIDOPSIS THALIANA BASIC LEUCINE-ZIPPER 11 (At4g34590); ASML2: ACTIVATOR de *SPO^{min}::LUC2* (At3g12890); GNC: GATA FACTOR, NITRATO INDUCIBLE, CARBONO METABOLISM RELATED (At5g56860); ATHB13: ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX 13 (At1g69780).

Genes blancos - *RAB18*: responde a ABA 18 (proteína tipo LEA/dehidrina); *FUS3*: FUSCA 3; *Spo*: esporamina, β -amy: β -amilasa; *SUS2*: sacarosa sintasa 2; *PK*: piruvato cinasa; *ACP*: acyl carrier proteína; *ACP reductasa*: 3-cetoacil-ACP sintasa, enoyl-ACP reductasa; *SBE2.2*: enzima ramificadora de almidón 2.2; *APL3*: subunidad grande de la enzima ADP-glucosa pirofosforilasa, *RBCS*: subunidad pequeña de la RUBISCO; *Lhcb*: proteína cosechadora de luz que une clorofila a/b; *AtEm6* y *AtEm1*: proteínas de embriogénesis tardía clase 1; *HXK1*: hexocinasa1; *HXK2*: hexocinasa2; *SUS1*: sacarosa sintasa 1; *RD29A*: responde a desecación 29A; *CHS*: chalcona sintasa; *ASN1*: asparagina sintetasa; *ProDH2* prolina deshidrogenasa 2; *ProDH/ERD5*: prolina deshidrogenasa / respuesta temprana a la deshidratación 5; *VSP*: proteína de almacenamiento vegetativo; *AtPLT6*: transportador de polioles 6; *AtSTP13*: transportador de azúcares 13.

Tabla 4 - Factores de transcripción que participan en la vía de señalización por azúcares en papa, camote, cereales (arroz y cebada) y uva.

Planta	Familia	Factor	Expresión	Función	Caja de unión	Blancos directos	Otros posibles blancos	Referencias
Papa	GeBP	STK	- tubérculo - inducible por sacarosa	-Regulación génica en respuesta a azúcares.	Caja B	- <i>PAT21</i>	- <i>SUS4</i> - <i>SAGP</i>	Zourelidou <i>et al</i> 2002
	ASR (**)	Ci21A/Asr1	- tubérculo	-Implicado en la regulación del metabolismo de glucosa, y la captación de glucosa en órganos heterotróficos.	ND (*)	ND (*)	- Transportadores de hexosas	Frankel <i>et al</i> 2007
Camote	WRKY	SPF1	- hojas, pecíolos, tallos y raíces tuberosas	-Participa en la modulación de los genes asociados al metabolismo de carbono.	- SP8a - SP8b - caja W	- <i>Spo</i> - β - <i>amy</i>		Ishiguro y Nakamura 1994 Maeo <i>et al</i> 2001
Cebada	WRKY	SUSIBA2	- endospermo - inducible por azúcares	-Implicado en la regulación de la síntesis de almidón.	- SURE - Caja W	- <i>Iso1</i>	- <i>Sbellb</i>	Sun <i>et al</i> 2003 Sun <i>et al</i> 2005
Arroz	MYB (1R)	OsMYBS1	- tejido vegetativo - se reprime en presencia de sacarosa	-Elemento de la vía de señalización en respuesta a azúcares y a hormonas. -Activador transcripcional fuerte.	TATCCA	- α - <i>amilasa</i> - <i>Amy32b</i>		Lu <i>et al</i> 2002
		OsMYBS2	- raíz y hojas - hojas senescentes - inducible en presencia de sacarosa	-Elemento de la vía de señalización en respuesta a azúcares y a hormonas. -Activador transcripcional débil.	TATCCA	- α - <i>amilasa</i> - <i>Amy32b</i>		Lu <i>et al</i> 2002
		OsMYBS3	- todos los tejidos - hojas senescentes - se reprime en presencia de sacarosa	-Elemento de la vía de señalización en respuesta a azúcares y a hormonas. -Represor transcripcional.	TATCCA	- α - <i>amilasa</i> - <i>Amy32b</i>		Lu <i>et al</i> 2002
Uva	ASR (**)	VvMSA	- fruto (maduración) - inducible por azúcares y ABA	-Implicado en la modulación transcripcional de la expresión génica de los transportadores de azúcares durante la maduración del fruto. -Activador transcripcional.	- S3 - SURE1	- <i>VvHT1</i>		Cakir <i>et al</i> 2003 Carrari <i>et al</i> 2004

(*) ND: no determinado; (**) Nota: Las proteínas inducibles por ABA, estrés y maduración (ASR) tienen función desconocida, aunque se especula que son proteínas cromosómicas no-histonas implicadas en modular la topología y la expresión del DNA (Carrari *et al* 2004).

Lista de abreviaturas –

Factores de transcripción – STK: STOREKEEPER (CAC39398); Ci21A/Asr1: COLD-INDUCIBLE 21A/ ABA-, STRESS- and RIPENING- INDUCIBLE PROTEIN; SPF1: (S51529); SUSIBA2: SUGAR SIGNALING IN BARLEY 2 (AY323206); OsMYBS1: factor de transcripción MYBS1 de arroz (AAN63152); OsMYBS2: factor de transcripción MYBS2 de arroz (AAN63153); OsMYBS3: factor de transcripción MYBS3 de arroz (AAN63154); VvMSA: *Vitis vinifera* MATURATION-,STRESS-, ABA-INDUCED PROTEIN (AAZ93634). Genes blancos - *PAT21*: *patatita clase 1*; *SUS4*: *sacarosa sintasa*; *sAGP*: *ADP glucosa pirofosforilasa*; *Spo*: *esporamina*, β -*amy*: β -*amilasa*; *iso1*: *isoamilasa 1*; *Sbellb*: *enzima ramificadora de almidón IIb*; *Amy32b*: α -*amilasa tipo A de cebada*; *VvHT1*: *transportador de monosacáridos*.

2.2.4. Otros elementos

Además de los componentes mencionados en las secciones previas existen otros elementos asociados a las vías de señalización por azúcares menos caracterizados, de identidad bioquímica y función molecular desconocidas hasta el momento. Entre ellos destacan las proteínas ABI8, ISI1 y GLZ2 (Brocard-Gifford *et al.* 2004; Chen *et al.* 2004; Rook *et al.* 2006a).

El gen *ABI8* codifica para una proteína específica de plantas de función desconocida (Brocard-Gifford *et al.* 2004). La mutante *abi8* es insensible a ABA durante la germinación y es alélica a las mutantes enanas *eld1* y *kob1* previamente caracterizadas (Cheng *et al.* 2000; Pagant *et al.* 2002; Brocard-Gifford *et al.* 2004). Brocard-Gifford *et al.* (2004) reportaron que la mutante *abi8* es también insensible a glucosa y tiene alterada la expresión y actividad de enzimas asociadas con la movilización de azúcares, lo que sugiere que ABI8 participa en la señalización y/o transporte de carbono. Análisis genéticos entre la mutante *abi8* y plantas que sobre-expresan a los genes *ABI3* y *ABI5* indicaron que ABI8 parece actuar en una vía independiente de aquella definida por los otros factores de transcripción ABI (Figura 7).

La caracterización de otra mutante llamada *isi1* demostró que ISI1 es un factor importante de la regulación por azúcares (Rook *et al.* 2006a). El gen *ISI1* codifica para una proteína novedosa con repeticiones de un dominio proteico similar al dominio Armadillo que se ha implicado en interacciones proteína-proteína en animales (Rook *et al.* 2006a; Coates 2003; Samuel *et al.* 2006). La proteína ISI1 participa en la modulación en respuesta a sacarosa de la expresión de un subconjunto de genes asociados al metabolismo de carbono a través de una vía genética independiente de las mutantes relacionadas a ABA (*abi4*, *aba2*) (Rook *et al.* 2006a). El gen *ISI1* se expresa predominantemente en el floema de hojas que acaban de realizar la transición de un metabolismo demandante a uno productor o fuente. Este patrón de expresión sugiere su participación en la distribución eficiente de carbohidratos, pero hasta el momento su función específica es aún desconocida (Rook *et al.* 2006a).

La mutante *glz2* es insensible a glucosa, y además presenta un tamaño pequeño, raíces cortas, hojas pequeñas de color verde oscuro, floración tardía y esterilidad femenina (Chen *et al.* 2004). Interesantemente, la función de GLZ2 no se requiere para las respuestas a ABA durante la germinación, sugiriendo que podría ser un elemento exclusivo de la señalización por glucosa (Chen *et al.* 2004). Estudios fenotípicos indican que GLZ2 es necesario para las respuestas normales a glucosa y en

el desarrollo en *Arabidopsis* (Chen *et al.* 2004). Este gen no ha sido clonado aún; por lo que su futura identificación molecular ayudará a dilucidar su posible función en el desarrollo y durante la señalización por glucosa.

Si bien el número de elementos caracterizados de la vía de señalización por azúcares ha aumentado de manera importante en los últimos años, aún faltan más estudios integrales que nos permitan comprender como interaccionan estos elementos dentro de las distintas vías propuestas de señalización por azúcares (Figura 2) durante todo el ciclo de vida de las plantas superiores.

2.3. Interacciones entre las vías de señalización por azúcares y otras vías de señalización

Como se ha mencionado previamente (sección 2.1), las vías de señalización por azúcares interaccionan con programas endógenos de desarrollo dependientes de la acción de fitohormonas y con vías de respuesta a estímulos externos (Coruzzi y Zhou 2001; Finkelstein y Gibson 2002; León y Sheen 2003). En la tabla 5 se detallan las mutantes de la vía de señalización por azúcares en *Arabidopsis*, cuyas respuestas a otras vías de señalización también se afectan.

La primera interconexión reportada de manera contundente con la vía de señalización por glucosa dependiente de HXK es la que existe con la vía de señalización por ABA (Arenas-Huertero *et al.* 2000; Rook *et al.* 2001; Huijser *et al.* 2000; Laby *et al.* 2000) (Figura 8).

A continuación se detallan las evidencias más relevantes que apoyan la interacción entre estas vías debido a que el objetivo principal de esta tesis consiste en la caracterización funcional del factor ABI4, el cual se ha propuesto como punto de convergencia entre ambas vías durante el desarrollo post-germinativo de *Arabidopsis* (Arenas-Huertero *et al.* 2000).

Tabla 5 – Lista de mutantes que sugieren interacciones entre las vías de señalización por azúcares y las vías de ABA, etileno, auxinas, citocininas, luz y nitrógeno.

Alelos	Gen	Función	Interacción entre las vías de señalización por:	Referencias
<i>gin1, aba2, isi4, sdr1, sis4</i>	Deshidrogenasa/reductasa de cadena corta citosólica	Biosíntesis de ABA	Glucosa y ABA	Zhou <i>et al.</i> 1998 Rook <i>et al.</i> 2001 Cheng <i>et al.</i> 2002 Laby <i>et al.</i> 2000 Leon-Kloosterziel <i>et al.</i> 1996
<i>gin5, aba3</i>	Sulfurasa del cofactor de molibdeno	Biosíntesis de ABA	Glucosa y ABA	Arenas-Huertero <i>et al.</i> 2000 Schwartz <i>et al.</i> 1997 Xiong <i>et al.</i> 2001
<i>sis7, nced3</i>	9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa	Biosíntesis de ABA	Glucosa y ABA	Huang <i>et al.</i> 2008 luchi <i>et al.</i> 2001
<i>sis10, abi3</i>	Factor de transcripción de la familia ABI3/VP1	Activador transcripcional	Glucosa y ABA	Dekkers <i>et al.</i> 2008 Huang <i>et al.</i> 2008
<i>gin6, abi4, isi3, sun6, sis5, asa1</i>	Factor de transcripción de la familia AP2/ERF	Activador transcripcional	Glucosa y ABA	Finkelstein <i>et al.</i> 1998 Arenas-Huertero <i>et al.</i> 2000 Huijser <i>et al.</i> 2000 Laby <i>et al.</i> 2000 Rook <i>et al.</i> 2001 Koussevitzky <i>et al.</i> 2007 Mizoguchi <i>et al.</i> 2005
<i>abi5</i>	Factor de transcripción de la familia bZIP	Activador transcripcional	Glucosa y ABA	Arenas-Huertero <i>et al.</i> 2000 Brocard <i>et al.</i> 2002
<i>gin4, ctr1, sis1</i>	Cinasa de serina-treonina	Regulador negativo de la señalización por etileno	Glucosa y etileno	Zhou <i>et al.</i> 1998 Gibson <i>et al.</i> 2001
<i>ein3</i>	Factor de transcripción de la familia AP2/ERF	Activador transcripcional	Glucosa y etileno	Yanagisawa <i>et al.</i> 2003
<i>gin2</i>	HXK1	Receptor de glucosa	Glucosa y auxinas Glucosa y citocininas Glucosa y luz	Moore <i>et al.</i> 2003
<i>cli186</i>	?	Integrador de las vías de señalización por carbono y luz	Sacarosa y luz	Thum <i>et al.</i> 2008
<i>ahk3</i>	Cinasa de histidina	Receptor de citocinina	Sacarosa, citocininas y falta de fósforo	Franco-Zorrilla <i>et al.</i> 2005
<i>axr1</i>	Proteína con actividad enzimática activadora	Degradación de proteínas	Glucosa y auxinas	Moore <i>et al.</i> 2003 Mishra <i>et al.</i> 2009
<i>axr2</i>	Factor de transcripción de la familia AUX/IAA	Represor transcripcional	Glucosa y auxinas	Moore <i>et al.</i> 2003 Mishra <i>et al.</i> 2009
<i>tir1</i>	Proteína con repetidos ricos en leucina y con caja F	Receptor de auxinas	Glucosa y auxinas	Moore <i>et al.</i> 2003 Mishra <i>et al.</i> 2009
<i>tin</i>	Factor de transcripción de la familia HB (WOX5)	Regulador negativo?	Disacáridos y auxinas	Gonzali <i>et al.</i> 2005
<i>hls1</i>	N-acetiltransferasa	Regulador negativo	Sacarosa y auxinas	Ohto <i>et al.</i> 2006
<i>gnc</i>	Factor de transcripción de la familia GATA	Activador transcripcional	Carbono y nitrógeno	Bi <i>et al.</i> 2005

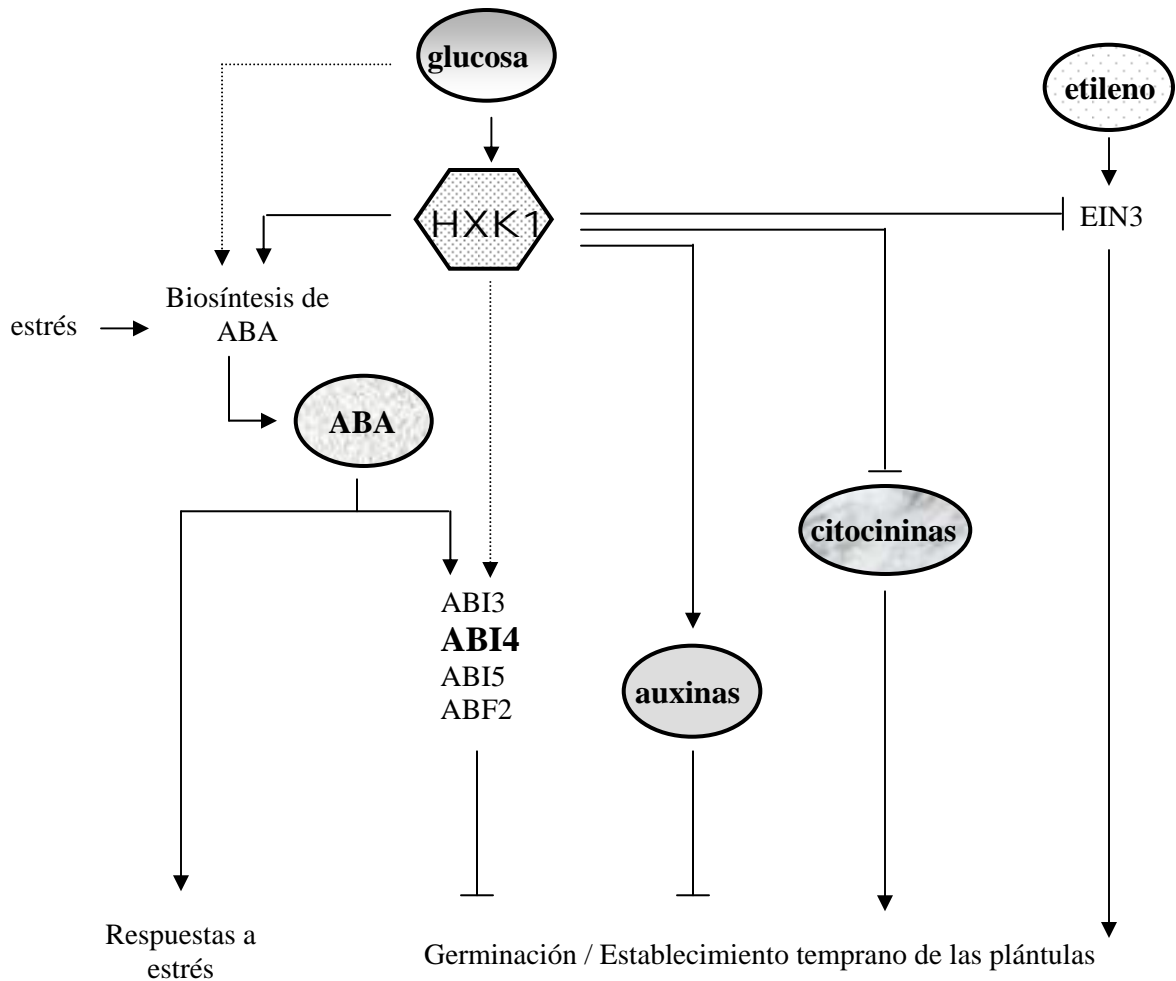


Figura 8 – Esquema de interacciones genéticas entre la vía de señalización por azúcares y las vías de señalización por fitohormonas.

La vía de HXK1 implica un aumento en los niveles de ABA en las células, induce la biosíntesis de ABA y la expresión génica de factores implicados en la vía de señalización por ABA (ABIs y ABFs). La regulación del factor de transcripción EIN3 (tablas 3 y 5) es el punto de convergencia entre las vías de señalización por glucosa y etileno. La señalización por glucosa interactúa positivamente con la señalización por auxinas y negativamente con la señalización por citocininas.

El análisis fenotípico de mutantes deficientes en la síntesis de ABA (Tabla 5) y el análisis del comportamiento de la concentración de ABA en respuesta a glucosa dejaron en claro que un aumento de los niveles endógenos de ABA es necesario para que la respuesta normal a glucosa se lleve a cabo durante el desarrollo postgerminativo de *Arabidopsis* (Arenas-Huertero *et al.* 2000). Arenas-Huertero *et al.* (2000) demostraron que la sensibilidad a glucosa de la mutante *gin5/aba3* se recupera al suplementar con ABA el medio de crecimiento, restaurando así los niveles internos de ABA en plántulas *gin5/aba3*. Este mismo comportamiento se observa para la mutante *gin1/aba2* (Cheng

et al. 2002). Ambos resultados re-confirman la interdependencia de la señalización por glucosa y ABA. Asimismo, el aislamiento de las mutantes *sis10* (un alelo de *abi3*) (Huang *et al.* 2008), *gin6*, *sun6*, *isi3*, *sis5* (alelos de *abi4*) (Arenas-Huertero *et al.* 2000; Huijser *et al.* 2000; Laby *et al.* 2000; Rook *et al.* 2001) y *gin9* (*abi5*) (León P, comunicación personal) como mutantes insensibles a altas concentraciones de glucosa durante el desarrollo temprano de la plántula, y cuyos alelos habían sido identificados como mutantes insensibles a ABA durante la germinación (Ooms *et al.* 1993; Finkelstein *et al.* 1998; Finkelstein y Lynch 2000), sugirió que los factores de transcripción ABI3, ABI4 y ABI5 eran elementos comunes para ambas vías de señalización (Figura 8, Tabla 5).

Más allá de los factores de transcripción comunes entre las vías de glucosa y ABA, aún no está claro como estas vías interaccionan. Una posibilidad tentadora es que parte de dicha interacción dependa de retroalimentación, ya que la abundancia de los transcritos de algunos de los genes relacionados a la biosíntesis y señalización por ABA aumenta en respuesta a glucosa (Cheng *et al.* 2002). Sin embargo, ésto no explica porque el aumento de la concentración de ABA es necesario para la señalización por azúcares. Por el momento, existen dos modelos hipotéticos para explicar la interacción entre la glucosa y el ABA. Uno de ellos plantea que las señales de ABA y glucosa actúan a través de vías independientes que convergen en elementos finales (Rook *et al.* 2001), mientras que el otro propone al ABA como un elemento integral de la vía de señalización por glucosa (Arenas-Huertero *et al.* 2000). Sin embargo y debido a la falta de evidencias contundentes, aún no se ha logrado un consenso general sobre el modelo de interacción entre las vías de señalización por glucosa y por ABA.

Para tratar de entender más detalladamente la interconexión entre glucosa y ABA; y considerando que un punto de convergencia entre ambas vías de señalización son factores transcripcionales (sugiriendo que el control de la transcripción tiene un papel relevante en la interacción de ambas vías), Li *et al.* (2006) realizaron un análisis global de la transcripción comparando el efecto de la señal de ABA y de la señal de glucosa sobre la abundancia de los transcritos en plántulas de *Arabidopsis*. Sus resultados mostraron que la señal de la glucosa regula la abundancia de un número mayor de transcritos que la señal de ABA, indicando que la glucosa es una señal más fuerte que el ABA especialmente durante la represión (Li *et al.* 2006). Las interacciones observadas entre las señales de ABA y glucosa son de lo más variadas: hay co-regulación, regulación antagónica y sinergismo (Li *et al.* 2006). Interesantemente hay

muy pocos genes co-regulados por ambas señales, sugiriendo que la interacción de glucosa y ABA es específica para regular sólo ciertos procesos (Li *et al.* 2006). En las plántulas de *Arabidopsis*, las señales de glucosa y de ABA llevan a cambios rápidos y dinámicos en la expresión génica, donde claramente se observan dos tipos de respuestas. Unas rápidas y transitorias, caracterizadas por regular la expresión de genes asociados a la reprogramación metabólica y de síntesis de proteínas y otras rápidas pero persistentes, las cuales dirigen la respuesta celular a largo plazo y modulan genes implicados en el control de la división celular, el crecimiento y la fotosíntesis (Li *et al.* 2006).

Actualmente la interconexión entre las vías de glucosa y ABA está ampliamente aceptada, particularmente durante las etapas tempranas del establecimiento de las plántulas (León y Sheen 2003; Rook *et al.* 2006b; Rognoni *et al.* 2007; Dekkers *et al.* 2008). Sin embargo a pesar de todo el trabajo invertido en esta área, aún faltan determinar los detalles moleculares que subyacen y definen a la red regulatoria glucosa/ABA.

Si bien todas las interacciones propuestas entre las vías de señalización por azúcares con las vías de fitohormonas (etileno, auxinas, citocininas y giberelinas), y vías como la de respuesta a luz, nitrógeno, ritmo circadiano y redox resultan interesantes, su descripción detallada supera los objetivos de esta tesis. Sin embargo, para todas ellas aún queda poco claro el mecanismo molecular de dicha interacción, el cual es objeto de estudios actuales por muchos laboratorios. En la literatura existen numerosas revisiones y artículos sobre las mencionadas interacciones que pueden ser consultadas para una información más detallada sobre el tema (Dijkwel *et al.* 1997; Perata *et al.* 1997; Coruzzi y Zhou 2001; Gazzarrini y McCourt 2001; Oswald *et al.* 2001; León y Sheen 2003; Moore *et al.* 2003; Thum *et al.* 2003; Yanagisawa *et al.* 2003; Palenchar *et al.* 2004; Price *et al.* 2004; Thum *et al.* 2004; Blasing *et al.* 2005; Gutierrez *et al.* 2007; Thum *et al.* 2008; Mishra *et al.* 2009).

3. Los azúcares modulan las respuestas de la vías de señalización a través de diferentes mecanismos moleculares

En las secciones anteriores se han descrito las vías de señalización por azúcares propuestas hasta el momento y los componentes mejor caracterizados de estas vías, así como también la interconexión de las vías de glucosa y ABA. Como se

ha mencionado, la cascada de señalización comienza con la percepción de una señal, la cual dispara un fenómeno de transducción que culmina con una respuesta primaria dirigida por moléculas efectoras. Esta respuesta primaria se asocia generalmente al control de la expresión génica, el cual puede ocurrir a varios niveles desde la transcripción hasta la estabilidad de proteínas como se muestra en la Figura 9.

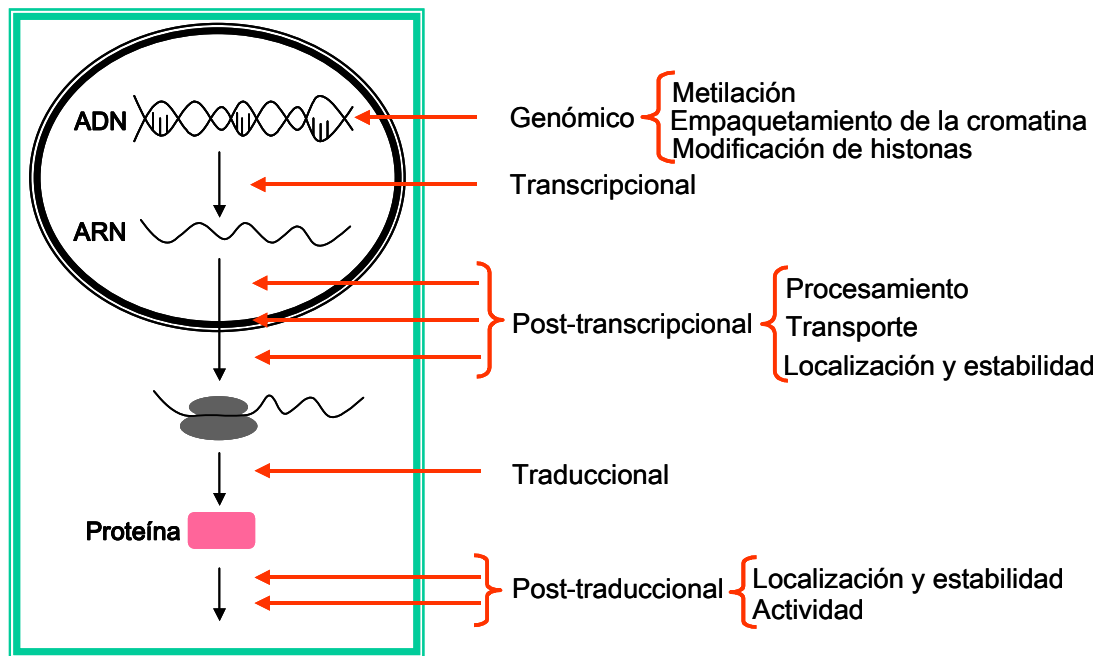


Figura 9 – Niveles de regulación durante la expresión génica.

Hay 5 puntos de control relevantes durante la expresión génica en las células eucariotes.

- 1- A nivel del genoma, el cual incluye el nivel de metilación y accesibilidad de la cromatina;
- 2- A nivel de la transcripción, quien regula el momento y la frecuencia de la transcripción de los genes. Este nivel es dependiente de los factores de transcripción generales y específicos;
- 3- A nivel post-transcripcional, donde destacan la regulación del splicing del mensajero primario, la incorporación de modificaciones moleculares 5' y 3', así como el transporte del mensajero procesado a través de la envoltura nuclear, su localización intracelular y su vida media (modulada por microRNAs entre otros mecanismos) en el citoplasma;
- 4- A nivel traduccional, mediante el cual se seleccionan los mRNA que serán traducidos por los ribosomas;
- 5- A nivel post-traducciona, el cual implica la activación, inactivación y localización selectiva de las proteínas sintetizadas por los ribosomas en el citoplasma.

Se ha demostrado que los azúcares son capaces de modular el desarrollo y metabolismo de las plantas a través de regular varios de los niveles ejemplificados en la Figura 9. En base a los datos acumulados de todos ellos hasta el momento, destaca la regulación de la transcripción de un número importante de genes tanto activando como reprimiendo su expresión (Sheen 1990; Koch 1996; Price *et al.* 2004; Gonzali *et al.*

2006). Sin embargo existen ejemplos que muestran que los azúcares también regulan a niveles post-transcripcionales (Chan y Yu 1998a), traduccionales (Wiese *et al.* 2004) y post-traduccionales (Yanagisawa *et al.* 2003). A continuación se presentan la mayoría de los ejemplos específicos reportados en la literatura sobre los diferentes tipos de regulación de la expresión génica en respuesta a azúcares.

3.1. Regulación transcripcional

En los años 90, Sheen (1990) demostró por primera vez que los azúcares son capaces de modular la transcripción de genes fotosintéticos usando un sistema de expresión transitoria en protoplastos de maíz. A partir de este estudio pionero la cantidad de genes regulados por azúcares aumentó de manera exponencial (ver referencias en Koch 1996; Bossi 2002). La expresión de diferentes tipos de genes se afecta en presencia de azúcares, incluyendo genes relacionados al metabolismo de carbohidratos (fotosíntesis, síntesis de almidón y ciclo glioxilato), metabolismo nitrogenado, metabolismo secundario, genes relacionados a estrés (señalización por ABA y defensa), así como genes asociados a crecimiento, desarrollo y senescencia (ver referencias en Koch 1996; Bossi 2002; Rolland *et al.* 2006).

Estudios recientes, usando un análisis de la expresión global del genoma en respuesta a cambios en la concentración exógena de azúcar, corroboraron que los azúcares son capaces de regular la abundancia de un porcentaje alto (4-11%) de genes de *Arabidopsis*, sugiriendo que la modulación de la abundancia de los mensajeros es uno de los mecanismos más importantes mediante el cual actúa la señalización por azúcares en las células vegetales (Palenchar *et al.* 2004; Price *et al.* 2004; Thum *et al.* 2004; Li *et al.* 2006; Gutierrez *et al.* 2007; Osuna *et al.* 2007; Thum *et al.* 2008). Dichos estudios globales también corroboraron la existencia de una interconexión intensa y compleja entre la señal de carbono y las señales de nitrógeno, luz y ABA para regular la transcripción de genes en *Arabidopsis*; y apoyaron que la señal de carbono es más fuerte para modular la expresión de una gran diversidad de genes que otros estímulos como luz, ABA, y nitrógeno (Palenchar *et al.* 2004; Price *et al.* 2004; Thum *et al.* 2004; Li *et al.* 2006; Gutierrez *et al.* 2007; Osuna *et al.* 2007; Thum *et al.* 2008).

La regulación a nivel transcripcional depende de factores de transcripción y de elementos en *cis* (o sitios de unión) presentes en las regiones regulatorias sobre el DNA a los cuales se unen estos factores de transcripción.

En las tablas 3 y 4 se presenta una lista de los factores de transcripción que se

han reportado que están implicados en las respuestas a azúcares en las plantas superiores; y sus posibles interacciones se esquematizan en la Figura 8. Por lo tanto, en esta sección no se detallarán los factores de transcripción, si no que se describirán solamente algunos de los elementos en *cis* implicados en las respuestas a azúcares caracterizados hasta el momento. En la tabla 6 (modificada de Rook *et al.* 2006b) se enlistan los elementos en *cis* que se ha demostrado que están implicados en la respuesta a azúcar y cuya funcionalidad ha sido comprobada *in vitro* y/o *in vivo*. Varias de las cajas conocidas de respuesta a carbono se sabe que actúan asociadas para generar una respuesta más fuerte (Lu *et al.* 1998; Lu *et al.* 2002; Morikami *et al.* 2005; Li *et al.* 2006; Rook *et al.* 2006b). Por ejemplo, la localización del elemento CMSRE1 respecto a CMSRE2 es esencial para la respuesta adecuada a azúcares del gen esporamina (*SPO*) de camote (Morikami *et al.* 2005). Los elementos S3S1 y CE-1 parecen potenciarse entre sí para regular la expresión del promotor de *APL3* en respuesta a sacarosa (Rook *et al.* 2006b). Una caja G, una caja GC y la secuencia TATCCA, localizados dentro de la secuencia SRS, actúan de manera cooperativa para regular el gen de α -amilasa de arroz en respuesta a azúcar (Lu *et al.* 1998; Lu *et al.* 2002); y finalmente los motivos TER1 y TELO3 inducen de manera cooperativa la expresión específica del reportero GUS en raíces de *Arabidopsis* tratadas con glucosa (Li *et al.* 2006).

En estos últimos años, los análisis del transcriptoma de *Arabidopsis* han generado una gran cantidad de datos de expresión génica que permiten, entre otras cosas, identificar posibles secuencias regulatorias en *cis* que son comunes en los promotores de genes co-regulados durante la respuesta a azúcares (Rhee *et al.* 2006). Esta estrategia *in silico* constituye una manera rápida y global de encontrar motivos candidatos para un análisis posterior más detallado (Thijs *et al.* 2001; Zhang *et al.* 2005; Cheung *et al.* 2006; Vandepoele *et al.* 2006). Así, existen en la literatura más de 50 cajas en *cis* predichas *in silico* que se asocian a respuesta a carbono, las cuales se sintetizan en la Tabla S1, Apéndice II (Palenchar *et al.* 2004; Thum *et al.* 2004; Li *et al.* 2006). Por supuesto al ser todos estos datos predicciones bioinformáticas, mucho debe invertirse en la caracterización funcional de tales secuencias regulatorias dentro de la señalización por azúcares.

Tabla 6 - Elementos en *cis* asociados a la respuesta a azúcares (modificada de Rook *et al*, 2006b).

Motivo	Secuencia	FT*	Genes	Respuesta	Referencias
SP8a	ACTGTGTA	SPF1	- <i>Spo</i> (batata) - <i>β-amy</i> (batata)	Inducción	Ishiguro y Nakamura 1992 Ishiguro y Nakamura 1994
SP8b	TACTATT	SPF1	- <i>Spo</i> (batata) - <i>β-amy</i> (batata)	Inducción	Ishiguro y Nakamura 1992
SURE1	AATAGAAAA	SUSIBA	- <i>Pat</i> (papa) - <i>ISO1</i> (papa)	Inducción	Grierson <i>et al.</i> 1994 Sun <i>et al.</i> 2003
SURE2	AATACTAAT	Nd **	- <i>Pat</i> (papa)	Inducción	Grierson <i>et al.</i> 1994
Caja B	GCTAAACAAT	STK	- <i>Pat</i> (papa)	Inducción	Zourelidou <i>et al.</i> 2002
Caja IV	GAAATAAATTG	nd	- <i>VspB</i> (soja)	Inducción	Tang <i>et al.</i> 2001
CMSRE-1	TGGACGG(CC)	nd	- <i>Spo A</i> (batata) - <i>β-amy</i> (batata)	Inducción	Maeo <i>et al.</i> 2001 Morikami <i>et al.</i> 2005
CMSRE-2	AGACACCGTAAGTGT TCCATCC	nd	- <i>Spo A</i> (batata)	Inducción	Morikami <i>et al.</i> 2005
S3S1	AAATCA(N)xATAGAAA	VvMSA	- <i>VvHT1</i> (uva) - <i>APL3</i> (Arabidopsis)	Inducción	Cakir <i>et al.</i> 2003 Li <i>et al.</i> 2006
CE1	CACCG	ABI4	- <i>ADH1</i> (Arabidopsis) - <i>APL3</i> (Arabidopsis) - <i>SBE2.2</i> (Arabidopsis) - <i>ABI4</i> (maiz y Arabidopsis) - <i>ABI5</i> (Arabidopsis)	Inducción	Niu <i>et al.</i> 2002 Li <i>et al.</i> 2006 Bossi <i>et al.</i> 2009
Caja S	CACCTCCA	ABI4	- <i>RBCS</i> (Arabidopsis)	Represión	Acevedo-Hernandez <i>et al.</i> 2005
Motivo CCAC	CCAC	ABI4	- <i>Lhcb</i> (Arabidopsis)	Represión	Koussevitzky <i>et al.</i> 2007
Caja GC	CCGACGCGG (Parte de SRS)	nd	- <i>α-amy 3</i> (arroz)	Inducción***	Lu <i>et al.</i> 1998
Caja G	(C)TACGTG/A (Parte de SRS)	nd	- <i>α-amy 3</i> (arroz) - <i>RAmy3D</i> (arroz)	Inducción*** Represión	Lu <i>et al.</i> 1998 Toyofuku <i>et al.</i> 1998
TATCCA	TATCCA (Parte de SRS)	OsMYBS	- <i>α-amy 3</i> (arroz) - <i>RAmy3D</i> (arroz)	Inducción*** Represión	Lu <i>et al.</i> 1998 Toyofuku <i>et al.</i> 1998
TELO	AAACCCTAA	nd	- de síntesis de proteínas	Inducción	Li <i>et al.</i> 2006
TER	CATAAT	nd	- de síntesis de proteínas	Inducción	Li <i>et al.</i> 2006

* FT: factor de transcripción; ** nd: no determinado; *** inducción en condiciones de falta de glucosa

La regulación a nivel transcripcional en respuesta a azúcares es la más estudiada en *Arabidopsis*, sin embargo aún no se han caracterizado en detalle los elementos que participan en las redes transcripcionales en respuesta a la disponibilidad de carbono durante las diferentes etapas del desarrollo de las plantas superiores.

3.2. Regulación post-transcripcional – Estabilidad de mensajero.

Además de modular la frecuencia y el nivel de la expresión génica a través de la transcripción, los azúcares también son capaces de afectar la estabilidad de los mensajeros en plantas. Por ejemplo, la vida media de los transcritos correspondientes a tres de los genes de α -amilasa (α AMY3, α AMY7 y α AMY8) se prolonga en presencia de sacarosa (Sheu *et al.* 1996), y en el caso de α AMY3, la región no traducida (UTR) 3' tiene un papel esencial para dirigir este mensajero a degradación (Chan y Yu 1998a; Chan y Yu 1998b). Análisis generales con inhibidores de la traducción mostraron que la estabilidad de los mensajeros de ciertos genes asociados a crecimiento y proteínas de estrés también está controlada por azúcares (Ho *et al.* 2001). El gen *INCW1* que codifica para una invertasa de pared celular de maíz genera dos tipos de mensajeros que difieren en su 3'UTR (Cheng *et al.* 1999). Se ha visto que el transcrito más pequeño se estabiliza en presencia de azúcares en células en suspensión de maíz, lo cual resulta en un aumento de la concentración y actividad de la proteína (Cheng *et al.* 1999). Así, las secuencias 3'UTR parecen ser relevantes para regular la estabilidad de los mensajeros en respuesta a carbono, sin embargo aún se desconocen los mecanismos precisos de cómo se realiza este fenómeno, las secuencias y los factores proteicos que intervienen.

Por otro lado, el análisis global del transcriptoma de *Arabidopsis* en respuesta a glucosa indica que varios de los genes regulados por azúcares son blancos conocidos de microRNAs (Gutierrez *et al.* 2007). Así, se propone por primera vez que mecanismos de regulación post-transcripcional controlados por microRNAs y asociados a la estabilidad, al procesamiento y degradación de los mensajeros podrían tener un papel relevante durante la regulación de la señalización por azúcares. Mas estudios darán luz sobre el impacto de este tipo de regulación como un modulador de las respuestas a carbono en plantas.

3.3. Regulación a nivel de la traducción.

La regulación a nivel traduccional durante las respuestas a sacarosa está bien estudiada en el gen *ATB2* de *Arabidopsis* que codifica para un factor de transcripción tipo bZIP (Rook *et al.* 1998; Wiese *et al.* 2004; Wiese *et al.* 2005; Hanson *et al.* 2008). La expresión del gen *ATB2* se modula a nivel transcripcional y traduccional en respuesta a sacarosa (Rook *et al.* 1998). En particular, la transcripción del gen *ATB2* se induce en presencia de sacarosa, mientras que su traducción se reprime por altas concentraciones de sacarosa (Wiese *et al.* 2004).

La regulación traduccional de *ATB2* depende de la region 5' no traducida de su mensajero, la cual contiene 4 marcos abiertos de lectura pequeños o uORFs hacia arriba del marco de lectura abierto principal que codifica para la secuencia proteica de *ATB2* (Wiese *et al.* 2004). En presencia de bajas concentraciones de sacarosa, ninguno de los uORFs presentes en el 5' de *ATB2* se traduce, permitiendo así la traducción del mensajero de *ATB2* en una proteína *ATB2* funcional (Wiese *et al.* 2004). En presencia de altas concentraciones de sacarosa, el uORF2 (o SCuORF) se traduce y evita la traducción del mensajero de *ATB2* (Wiese *et al.* 2004). Recientemente, Rahmani *et al.* (2009) sugirieron que el péptido uORF2 traducido actúa como un atenuador de la traducción pausando al ribosoma sobre el RNA mensajero. Aún se desconocen los detalles de este mecanismo de regulación al que se le ha denominado "Represión de la Traducción Inducida por Sacarosa" o SIRT a través del cual el uORF2/SCuORF inhibe la traducción de *ATB2*.

El mecanismo SIRT representa un modo flexible de responder a las fluctuaciones diurnas en la concentración de sacarosa en plantas, sugiriendo que es probable que un mayor número de genes se regulen a través de este mismo mecanismo. El análisis de las secuencias de los transcritos de los genes que codifican para los factores de transcripción tipo bZIP mostraron que la secuencia uORF2/SCuORF está conservada en varios genes de plantas (Wiese *et al.* 2004). Secuencias similares a uORF2/SCuORF se encuentran en 5 mensajeros de proteínas bZIP de *Arabidopsis*, y en mensajeros de bZIP de otras especies de plantas, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas (Wiese *et al.* 2004; Wiese *et al.* 2005). Recientemente, la regulación SIRT se ha demostrado experimentalmente para otras dos proteínas bZIP: AtbZIP2 y AtbZIP44, sugiriendo un mecanismo de regulación en

común para un grupo pequeño de factores de transcripción de tipo bZIP en el reino vegetal (Wiese *et al.* 2004; Wiese *et al.* 2005; Hummel *et al.* 2009).

3.4. Regulación post-traducciona - Estabilidad/Degradación de proteínas.

Estudios globales a nivel de regulación de proteínas por degradación indican que la estabilidad de las proteínas y su degradación selectiva están surgiendo como mecanismos importantes de regulación para casi todas las vías de señalización en las plantas (Vierstra 2003; Smalle y Vierstra 2004; Vierstra 2009). Por ejemplo, la estabilidad de la ciclina *CICD3;1* y del factor de transcripción *EIN3* depende de los niveles de azúcares, sugiriendo que los mecanismos post-traduccionales que modulan la vida media de las proteínas juegan un papel importante en la regulación para la respuesta a carbono (Yanagisawa *et al.* 2003; Planchais *et al.* 2004).

El mecanismo que controla la estabilidad de las proteínas mediante la acción del proteosoma es el mejor caracterizado en plantas (Vierstra 2009). El proteosoma es un complejo multiproteico que degrada a las proteínas que tienen unida covalentemente una cadena de proteínas pequeñas denominadas ubiquitininas (Vierstra 2003). Particularmente durante la señalización por azúcares, se ha visto que los niveles endógenos de la ciclina *CICD3;1* disminuyen en ausencia de sacarosa a través de un mecanismo dependiente de la acción del proteosoma en células de *Arabidopsis* (Planchais *et al.* 2004). Para el caso del factor transcripcional *EIN3* de *Arabidopsis*, se ha observado que la glucosa acelera su degradación al potenciar la actividad del proteosoma (Yanagisawa *et al.* 2003). Aún se desconoce de que manera la señal de azúcar condiciona la actividad del proteosoma en las células.

Un estudio de transcripción global también sugiere la participación del proteosoma durante la señalización por azúcares (Osuna *et al.* 2007). 15 genes que codifican para proteínas tipo E3-ligasa, las cuales son enzimas que catalizan la poliubiquitinación de proteínas, se proponen como buenos candidatos de componentes de la vía de señalización por sacarosa (Osuna *et al.* 2007). La función de dichas E3-ligasas sería regular la degradación de un grupo de proteínas específicas e importantes para el metabolismo y crecimiento en células privadas de carbono. Aún faltan más estudios que permitan identificar proteínas específicas del proteosoma asociadas a la señalización por azúcares y para determinar cual es la relevancia de esta regulación dentro del contexto de la señalización por azúcares en plantas.

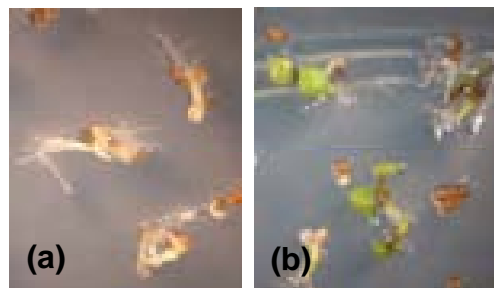
3.5. Modulación de actividad por modificaciones covalentes.

La modificación de proteínas por fosforilación y desfosforilación es un mecanismo importante para regular su función y actividad. Un estudio reciente en extractos proteicos totales de células en suspensión de *Arabidopsis* identificó 2172 sitios únicos de fosforilación en 1346 proteínas diferentes, especulando que la mayoría de los procesos celulares en *Arabidopsis* van a estar regulados por varios eventos de fosforilación (Sugiyama *et al.* 2008). Hasta el momento muy pocas cinasas y fosfatasas se han relacionado a las vías de señalización por azúcares a excepción de la hexocinasa y las proteínas SnRKs, quienes podrían conformar una red regulatoria responsable de controlar la fosforilación de otras proteínas en respuesta a azúcares. Aunque por el momento no hay evidencias en este respecto, no se descarta que otros tipos de modificaciones covalentes modulen la función y/o actividad de las proteínas durante la señalización por azúcares. Estudios futuros darán más luz acerca del impacto de estos tipos de mecanismos de regulación post-traduccionales dentro de las vías de señalización por azúcares en plantas.

4. Antecedentes directos del proyecto

En nuestro laboratorio, la señalización en respuesta a glucosa ha sido estudiada principalmente a través del aislamiento de mutantes de *A. thaliana* con sensibilidad reducida a glucosa denominadas *gin* (insensibles a glucosa), las cuales fueron obtenidas por ser capaces de elongar su hipocotilo, expandir sus cotiledones y enverdecer en un medio con 6% de glucosa (Figura 10). La caracterización detallada de dichas mutantes mediante análisis de complementación y estudios fisiológicos y moleculares constituye una excelente estrategia experimental para identificar componentes involucrados en esta compleja vía de regulación y obtener una visión integral de los mecanismos utilizados por las plantas para percibir y responder a glucosa (Tabla 7).

Figura 10 - (a) Plántulas de tipo silvestre crecida en 7% de glucosa durante 3 días, (b) Plántulas insensibles a glucosa con fenotipo *gin* crecidas en 7% de glucosa durante 3 días.



Entre las mutantes *gin* aisladas en el laboratorio, destaca aquella que codifica para la proteína GIN6/ABI4 que parece ser un punto de convergencia entre las respuestas a glucosa y a la hormona vegetal ABA (Arenas-Huertero *et al.* 2000). El análisis de las mutantes en el gen *ABI4* (*abi4*, *gin6*, *sun6*, *sis5* e *isi3*) sugiere que la proteína GIN6/ABI4 tiene una función importante en el desarrollo y morfogénesis temprana de la plántula y también en modular la expresión de genes implicados en fotosíntesis en respuesta a glucosa en *Arabidopsis* (Arenas-Huertero *et al.* 2000; Huijser *et al.* 2000; Laby *et al.* 2000; Rook *et al.* 2001).

Tabla 7 – Mutantes insensibles a glucosa (*gin*) aisladas en *Arabidopsis thaliana*

Mutante	Alelos	Gen	Participa en...	Referencias
<i>gin1</i>	<i>aba2</i> , <i>isi4</i> , <i>sdr1</i> , <i>sis4</i>	Dehidrogenasa/reductasa de cadena corta citosólica	Biosíntesis de ABA	Zhou <i>et al.</i> 1998; Rook <i>et al.</i> 2001; Cheng <i>et al.</i> 2002.
<i>gin2</i>		Hexocinasa1	Vía de señalización por glucosa (función receptora)	Moore <i>et al.</i> 2003.
<i>gin5</i>	<i>aba3</i>	Sulfurasa del cofactor de molibdeno	Biosíntesis de ABA	Arenas-Huertero <i>et al.</i> 2000; Schwartz <i>et al.</i> 1997; Xiong <i>et al.</i> 2001.
<i>gin6</i>	<i>abi4</i>, <i>isi3</i>, <i>sun6</i>, <i>sis5</i>, <i>asa1</i>, <i>san5</i>	Factor de transcripción de la familia AP2/ERF (ABI4)	Vías de señalización por glucosa y por ABA Germinación y desarrollo temprano de la plántula Señalización retrógrada	Finkelstein <i>et al.</i> 1998; Arenas-Huertero <i>et al.</i> 2000; Huijser <i>et al.</i> 2000; Laby <i>et al.</i> 2000; Quesada <i>et al.</i> 2000; Rook <i>et al.</i> 2001; Koussevitzky <i>et al.</i> 2007; Mizoguchi <i>et al.</i> 2005.
<i>gin9</i>		Factor de transcripción de la familia bZIP (ABI5)	Vías de señalización por glucosa y por ABA	Leon, P (comunicación personal)

ABI4 es un gen único en el genoma de *Arabidopsis thaliana*, cuya mutación tiene un efecto pleiotrópico sobre el fenotipo de *Arabidopsis*. En la Tabla 8 se enlistan los diferentes alelos identificados para el gen *ABI4* así como la localización de las mutaciones y los distintos fenotipos asociados a la mutación de dicho gen. También en la Tabla 8, resalta que la mutante *abi4* puede continuar su desarrollo en presencia de altas concentraciones de azúcares, osmolitos, sales y ABA sugiriendo que la proteína ABI4 forma parte de un punto de control general de respuesta a estrés durante el desarrollo temprano de las plántulas (Finkelstein *et al.* 1998; Arenas-Huertero *et al.* 2000; Huijser *et al.* 2000; Laby *et al.* 2000; Quesada *et al.* 2000; Rook *et al.* 2001; Mizoguchi *et al.* 2005; Penfield *et al.* 2006). Sin embargo, a pesar de los esfuerzos invertidos a la fecha para conocer detalladamente las funciones de este factor transcripcional, no se ha establecido claramente la función de ABI4 durante el desarrollo, ni en las vía de señalización en las que participa.

Tabla 8 – Alelos del gen *ABI4*.

Alelos	Mutación (*)	Fenotipo	Referencias	
<i>gin6</i>	T-DNA a -2 kb	Insensibilidad a azúcares durante el establecimiento temprano de la plántula.	Arenas-Huertero <i>et al.</i> 2000; Huijser <i>et al.</i> 2000; Laby <i>et al.</i> 2000; Rook <i>et al.</i> 2001.	
<i>sun6</i>	G → A (stop; 80 aa) T-DNA a -44 b			I
<i>sis5</i>	C → T (stop; 193 aa)			II
	C → T (stop; 39 aa)			III
	G → A (stop; 80 aa)			IV
	G → A (Glu→Leu en aa 69)	V		
<i>isi3</i>	EMS			
<i>abi4</i>	cambio de marco de lectura en residuo 157; genera proteína truncada de 240 aa ⁽⁺⁾	VI		
<i>abi4</i>	ídem ⁽⁺⁾	VI	Finkelstein <i>et al.</i> 1998; Mizoguchi <i>et al.</i> 2005.	
<i>asa1</i>	T-DNA a -2.1 kb rearrreglo en el final del exón y comienzo del UTR 3'	VII		
<i>sañ5</i>	EMS	Tolerancia a estres salino y osmótico durante la germinación y el establecimiento temprano de la plántula.	Quesada <i>et al.</i> 2000.	
<i>abi4</i>	ídem ⁽⁺⁾	VI	Afecta movilización de lípidos de reserva en el embrión en respuesta a ABA durante la germinación.	Penfield <i>et al.</i> 2006.
<i>abi4</i>	ídem ⁽⁺⁾	VI	Afecta expresión del gen fotosintético <i>Lhcb</i> en respuesta a glucosa.	Koussevitzky <i>et al.</i> 2007.
<i>abi4</i>	ídem ⁽⁺⁾	VI	Afecta crecimiento de la raíz en respuesta a ABA, nitrato y trealosa.	Signora <i>et al.</i> 2001.
<i>abi4</i>	ídem ⁽⁺⁾	VI	Insensibilidad a trealosa para regular genes del metabolismo de almidón	Ramon <i>et al.</i> 2007.

(*) En esta columna se indica el tipo de mutación y su localización en las regiones regulatorias o región codificante de *ABI4* según corresponda. Los números romanos a la derecha de la columna corresponden a la ubicación de tales mutaciones en la secuencia de la proteína *ABI4* esquematizada en la Figura 11.

4.1. El factor de transcripción *ABI4*: estructura proteica

El gen *ABI4* codifica para un factor de transcripción exclusivo de plantas perteneciente a la familia AP2/ERF (Finkelstein *et al.* 1998; Bossi 2002; Sakuma *et al.* 2002). La proteína *ABI4* consta de un dominio de unión al DNA tipo APETALA2 (Finkelstein *et al.* 1998), un dominio de localización nuclear (León P, comunicación personal) y dominios asociados a la activación de la transcripción (Soderman *et al.*

2000) (Figura 11). Ortólogos del gen *ABI4* de *Arabidopsis* se identificaron en maíz y arroz (Niu *et al.* 2002; Yu *et al.* 2002), los cuales comparten con *ABI4* una alta homología dentro del dominio de unión al DNA.

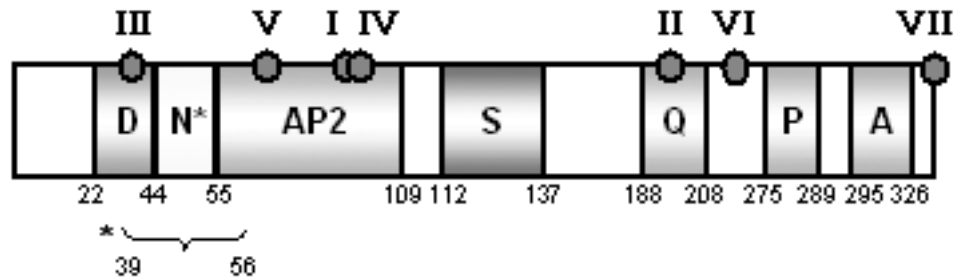


Figura 11 – Esquema de los dominios estructurales de la proteína ABI4 (328 aa). Los números arábigos indican la posición del amino ácido que limita a cada uno de los dominios. El dominio N se solapa con los dominios D y AP2 por lo tanto, su localización precisa se indica en la llave marcada con un asterisco. Los números romanos señalan la localización de las mutaciones en el marco de lectura abierto del factor *ABI4* descritas en la Tabla 8. D: secuencia PEST, asociada a degradación de proteínas; N: secuencia de localización nuclear; AP2: dominio de unión al DNA tipo APETALA 2; S: dominio rico en sitios de fosforilación; Q: dominio rico en glutaminas; P: dominio rico en prolinas; A: dominio rico en aminoácidos ácidos. La funcionalidad de la secuencia N de localización nuclear ha sido demostrada *in vivo* (León P, comunicación personal). La delección de los dominios Q, P y A evita la transcripción de un reportero en levaduras, indicando que los dominios comprendidos entre las posiciones 157-327 forman parte del dominio activador de la transcripción (Soderman *et al.* 2000). Los dominios Q, P y A también podrían funcionar como dominios de interacción proteína-proteína, aunque esto no ha sido demostrado aún.

El análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de la proteína ABI4 indica que ésta presenta al menos otras dos secuencias de funcionalidad aún no demostrada. Estas son una región rica en serinas y treoninas probable blanco de proteínas cinasas (Finkelstein *et al.* 1998) y una secuencia con similitud a la secuencia PEST en la región amino terminal. Esta secuencia PEST en otros genes funciona como una señal que dirige a ciertas proteínas a degradación mediante la acción del proteosoma o de proteasas específicas (Rechsteiner y Rogers 1996). Por otro lado, la identificación de una decena de alelos de *ABI4* con mutaciones en diferentes posiciones del gen apuntan a sitios importantes para el control de su regulación y actividad (Tabla 8; Finkelstein *et al.* 1998; Arenas-Huertero *et al.*, 2000; Huijser *et al.* 2000; Laby *et al.* 2000; Quesada *et al.* 2000; Rook *et al.* 2001; Mizoguchi *et al.* 2005). Por ejemplo: la inserción de un T-DNA 2 kb río arriba del ATG indica la presencia de elementos en *cis* importantes para controlar la transcripción (Arenas-Huertero *et al.* 2000); un cambio de glutamato a

leucina en la posición 69 del dominio AP2 sugiere que este amino ácido podría ser importante para el plegado correcto de la proteína o para la unión/reconocimiento del DNA (Figura 11; Laby *et al.* 2000). Si bien se han dedicado numerosos esfuerzos dirigidos a esclarecer la función de los diferentes dominios de ABI4, aún faltan muchos más estudios para caracterizar a la proteína ABI4 endógena. Por lo tanto, en este trabajo se pretende realizar experimentos encaminados a conocer la regulación y función de la proteína ABI4 durante la señalización por azúcares en *Arabidopsis*.

4.2. El factor de transcripción ABI4: patrón de expresión de su promotor

La expresión del gen *ABI4* está íntimamente controlada durante las distintas etapas del desarrollo de *Arabidopsis*. El análisis del gen *ABI4* y de su promotor indican que *ABI4* se expresa durante la maduración de las semillas, la germinación y el desarrollo temprano de la plántula (Soderman *et al.* 2000; Bossi 2002; Arroyo *et al.* 2003; Penfield *et al.* 2006). En plantas transgénicas portadoras del promotor de *ABI4* fusionado al gen reportero GUS y crecidas en 1% de sacarosa, se ha visto que el promotor de *ABI4* se expresa en el embrión desde la etapa globular (Soderman *et al.* 2000; Penfield *et al.* 2006). En el tejido vegetativo se ha visto expresión en el hipocotilo, cotiledones y ápice radicular de plántulas jóvenes con una actividad mayor en estadios jóvenes que va disminuyendo gradualmente hasta desaparecer alrededor de los días 10-15 después de la germinación (Bossi 2002; Arroyo *et al.* 2003). No hay expresión detectable del transgén p*ABI4*::GUS en plantas adultas (Bossi 2002). Estos resultados sugieren que el promotor de *ABI4* responde a una etapa particular del desarrollo.

Estudios iniciales indicaron que la abundancia del mensajero de *ABI4* cambia en respuesta a azúcares (Arenas-Huertero *et al.* 2000). Por lo tanto, la regulación del gen *ABI4* se evaluó en respuesta a glucosa utilizando las plantas transgénicas anteriormente mencionadas. El análisis de expresión del promotor de *ABI4* en respuesta a glucosa indicó que las plantas crecidas en presencia de glucosa tienen aumentada la actividad del reportero GUS hasta 20 veces, demostrando que la glucosa aumenta los niveles de acumulación de *ABI4* (Bossi 2002; Arroyo *et al.* 2003). En adición a la glucosa, la expresión del gen *ABI4* puede ser modulada por una gran variedad de estímulos, entre los que se incluyen altas concentraciones de glucosa (Arroyo *et al.* 2003), trehalosa (Ramón *et al.* 2007), fitohormonas (Bossi 2002; Arroyo *et al.* 2003), y osmolitos (Bossi 2002; Arroyo *et al.* 2003).

4.3. El papel del factor de transcripción ABI4 en la vía de señalización por azúcares en *Arabidopsis thaliana*

La función de la mayoría de los factores de transcripción es unirse a una secuencia específica del DNA sobre el promotor de su(s) gen(es) blanco(s) y modular así su transcripción. Por lo tanto, siendo ABI4 un factor de transcripción se predice que los efectos fenotípicos observados en mutantes *abi4* dependen de cambios en la modulación de la expresión de diversos genes en *Arabidopsis*.

En 2002, se demostró que la proteína ABI4 de maíz es capaz de unirse a la secuencia CACCG (que se denominó caja tipo CE-1) (Niu *et al.* 2002). Esta secuencia está presente en el promotor del gen *ABI4* y, por lo tanto, se propuso que ABI4 actuaba como un represor de su propia transcripción (Niu *et al.* 2002). Reportes más recientes en la literatura indicaron que ABI4 también se une de manera eficiente a los promotores de los genes fotosintéticos sobre otros dos elementos en *cis* asociados a la respuesta a azúcar: la caja S y el motivo CCAC (Acevedo-Hernandez *et al.* 2005; Koussevitzky *et al.* 2007). La regulación de la expresión de los genes relacionados a fotosíntesis depende de la función represora de la transcripción del factor ABI4 en respuesta a altas concentraciones de azúcares (Acevedo-Hernandez *et al.* 2005). Por otro lado, en esta tesis se presentan datos que demuestran que ABI4 es un activador de su propia transcripción durante el desarrollo postgerminativo y en respuesta a las señales disparadas por glucosa, ABA y estrés osmótico en plántulas de *A. thaliana* (Bossi *et al.* 2009); y que ABI4 funciona como activador de la transcripción del gen del metabolismo de almidón *SBE2.2*, que codifica para la enzima ramificadora de almidón, y del gen *ABI5*, que codifica para un factor de transcripción bZIP implicado en las respuestas a ABA y glucosa (Bossi *et al.* 2009). Por consiguiente, ABI4 parece funcionar como un regulador dual de la transcripción en respuesta a azúcares. Aún se desconoce el mecanismo por el cual ABI4 decide actuar como represor o como activador, sin embargo es probable que esto dependa, al menos parcialmente, de la interacción de ABI4 con otras proteínas regulatorias sobre el DNA.

A pesar de los estudios realizados hasta este momento, aún no se ha establecido claramente el papel de ABI4 durante el desarrollo ni durante las respuestas a glucosa y estrés. Por ello resulta importante estudiar detalladamente el patrón de expresión de la proteína ABI4 en diferentes órganos y etapas del desarrollo de la planta así como la regulación de su expresión a diferentes niveles, e intentar identificar nuevos

genes blanco del factor ABI4. El conocimiento generado de tales estudios, indudablemente ayudará a comprender mejor el papel de este gen en la vía de transducción de señales activada por glucosa y, por consiguiente, del mecanismo molecular que regula una de las vías de señalización de glucosa para plantas superiores.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Caracterizar el papel de la proteína ABI4 en la vía de señalización por glucosa en *Arabidopsis thaliana*.

5.2. Objetivos específicos

- Generar anticuerpos contra la proteína ABI4 de *Arabidopsis thaliana* para determinar su patrón de expresión en los distintos órganos y etapas del desarrollo, y en respuesta a glucosa.
- Identificar posibles genes blancos del factor de transcripción ABI4.
- Estudiar la interacción *in vitro* entre la proteína ABI4 y las regiones regulatorias de los genes blancos identificados.
- Analizar el efecto de la interacción proteína/DNA sobre la transcripción de los genes blancos.
- Determinar el impacto de la autoregulación transcripcional del gen *ABI4* en plántulas de *Arabidopsis* durante la germinación, el establecimiento de la plántula y en respuesta a glucosa.

6. Metodología

Los protocolos empleados para los ensayos EMSA, el análisis de expresión transitoria en protoplastos de *Arabidopsis*, el análisis de abundancia de mensajero por Northern blot y/o RT-PCR y los análisis histoquímicos y fluorimétricos de las plantas transgénicas *pABI4::GUS* están extensamente detallados en la sección Experimental Procedures de Bossi *et al.* (2009) en el Apéndice II, por lo tanto no se describen en esta sección.

A continuación solamente se presenta la metodología empleada para la generación de los anticuerpos anti-ABI4, los análisis de western blot, la generación de plantas transgénicas sobre-expresoras del gen *ABI4* y la delección de la secuencia PEST de ABI4 por mutagénesis dirigida.

- Clonación de la proteína recombinante GST-ABI4

La región codificante completa del gen *ABI4* fue amplificada por PCR con los siguientes primers: 5'-ATGGACCCTTTAGCTTCC-3' y 5'-CTTGACCGACCTTAGGGATGC-3'. El producto de PCR se incubó con T4-polimerasa para generar extremos romos y posteriormente se clonó en el sitio de restricción SmaI en el vector de expresión pGEX2T en la cepa XL1-blue de *Escherichia coli*. Este vector permite clonar a la proteína de interés adyacente a la proteína glutatión S- transferasa (GST) generando una proteína de fusión GST-ABI4. El inserto en pGEX2T fue secuenciado utilizando un primer interno de GST (5' GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG 3'), lo que permitió corroborar que la secuencia clonada de *ABI4* se encuentra en fase y además no presenta mutaciones debido al PCR.

- Sobreexpresión y purificación de la proteína recombinante GST-ABI4

Para sobre-expresar y purificar la proteína GST-ABI4 en *Escherichia coli*, se siguió el siguiente protocolo:

- 1- Preparación de pre-inóculo: crecimiento de 1 colonia bacteriana en 2 ml de medio de cultivo LB líquido más 100mg/μl de ampicilina durante toda la noche a 37°C en agitación.
- 2- Inocular el pre-inóculo en 250 ml medio LB líquido más 100mg/μl de ampicilina. Incubar a 37°C en agitación aproximadamente durante 3.5h. Cuando el cultivo alcance una absorbancia igual a OD_{600nm}=0.8, inducir con 0.6mM de IPTG durante 4h a 30°C.
- 3- Recolectar las bacterias por centrifugación (10-15 minutos, 5000 rpm, 4°C).
- 4- Resuspender la pastilla (bacterias) con 5 ml de PBS 1X frío más 10 microlitros de PMSF 100 mM. Añadir 0.1 volumen de lisozima (10 mg/ml en 25 mM Tris pH8) e incubar durante 1h en agitación a 4°C.
- 5- Realizar un ciclo de congelación (30 minutos a -70°C) / descongelación antes de sonicar el lisado mediante pulsos de 25-30 segundos durante 10 minutos.
- 6- Añadir 1% tritón (concentración final), incubar en agitación durante 30 minutos a 4°C, y centrifugar el lisado (10 minutos, 10000 rpm, 4°C).
- 7- Transvasar el sobrenadante a un tubo nuevo y agregar la resina glutatión agarosa. Incubar 30 minutos en agitación a 4°C.
- 8- Dejar fluir el eluido a través de una columna y lavar la columna con 5 ml de PBS 1X, 3 veces.
- 9- Eluir con 500 μl de glutatión reducido: dejar asentar el glutatión 10 minutos en la columna a temperatura ambiente luego eluir. Recuperar 3 eluciones de 500 μl cada una.

- 10- Correr la proteína GST-ABI4 recuperada en el paso anterior en un gel de poliacrilamida y electroeluir durante 1 hora a 3 watts.
- 11- Finalmente, emplear a la proteína de fusión obtenida para generar anticuerpos policlonales en conejos.

- Inmunización de un conejo con la proteína recombinante GST-ABI4

Antes de comenzar con las inmunizaciones se tomó suero preinmune de 4 conejos. Estos sueros se utilizaron como el anticuerpo primario para realizar ensayos de western blot de extractos totales de proteínas extraídas de bacterias y plantas. De los 4 conejos cuyo suero fue analizado, se procedió a la inmunización con GST-ABI4 de aquel conejo cuyo suero mostraba un fondo más limpio en la membrana de western blot. El procedimiento de inmunización constó de 7 inyecciones en total, cada una de las cuales contenía 50-100 microgramos de proteína recombinante GST-ABI4 según disponibilidad. La primera de las inyecciones contenía a la proteína GST-ABI4 obtenida por trituración de las bandas cortadas a partir de un gel de poliacrilamida y al coadyuvante completo de Freud. Las siguientes inyecciones incluyeron a la proteína GST-ABI4 electroeluída más al coadyuvante incompleto. Entre la primera y la segunda inyección transcurrió un mes; y entre cada una de las siguientes 6 inyecciones transcurrieron 3 semanas. Después de una semana de la tercera y de la quinta inmunización se tomó una muestra del suero y se evaluó su capacidad de detectar a ABI4 en extractos de plantas. Debido a que no fue posible detectar a la proteína ABI4 en extractos proteicos obtenidos de plantas, se continuaron las inyecciones hasta completar 7 inmunizaciones. Una semana después de la séptima inmunización se recuperó todo el suero del conejo.

- Material y condiciones de crecimiento

Para todos los experimentos, las semillas desinfectadas se sembraron en condiciones de esterilidad en medio GM compuesto por sales Murashige y Skoog 1X (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), vitaminas B5 (Sigma Inc., St Louis, MO, USA), 0.05% de MES, 1% de sacarosa (u otra fuente de carbono) y 0.7% de fitoagar. Para romper dormancia y sincronizar la germinación las semillas se incubaron 3 días a 4°C antes de transferirse a 22°C con un fotoperíodo estándar de 16 horas de luz (120 $\mu\text{M m}^2 \text{sec}^{-1}$) y 8 horas de oscuridad donde se mantuvieron por el tiempo indicado en cada experimento.

Para los análisis de western blot se emplearon semillas y plantas de tipo silvestre de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Columbia-0 (Col-0), de tres alelos mutantes de *abi4* y de 10 líneas transgénicas independientes que sobre expresan el gen *ABI4* (35S::*ABI4*-HA). Las líneas mutantes homocigas en *abi4* empleadas corresponden a la mutante *abi4* original (Finkelstein *et al.*, 1998) y a dos líneas independientes, líneas 19.9 y 4.4, generadas por mutagénesis mediante rayos γ . Todos los alelos *abi4* mutantes están en el ecotipo Col-0. Las semillas de *Col-0* y *abi4* se obtuvieron del Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC), las líneas 19.9 y 4.4 fueron provistas por Eiji Nambara (RIKEN Plant Science Center, Japón) y las líneas 35S::*ABI4*::HA se generaron de la siguiente manera. Para obtener las líneas transgénicas 35S::*ABI4*::HA se transformaron plantas Col-0 con el vector binario pART27 (Gleave 1992), el cual porta el gen *ABI4* completo adjacente a la secuencia que codifica para el epítoto hemaglutinina A (HA) y bajo la regulación del promotor constitutivo viral 35S. Las plantas transgénicas sobreexpresoras de *ABI4* se seleccionaron en 50 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina.

Los análisis por western blot se hicieron a partir de extractos crudos de proteínas obtenidos de semillas secas y embebidas; y de plántulas Col-0, mutantes *abi4* y líneas

sobre expresoras crecidas en medio GM y en medio suplementado con 7% de glucosa, 7% de manitol, 1 μ M de ABA o 5 μ M de ABA.

Las líneas *abi4 x pABI4::GUS* se obtuvieron a partir de la cruce entre plantas *abi4* y 2 líneas transgénicas independientes (*pABI4::GUS 1D* y *pABI4::GUS 4A*) portadoras del gen reportero GUS bajo la regulación de la región 5' reguladora de *ABI4* (3kb). Tanto la mutante *abi4* como las transgénicas están en el ecotipo Col-0. Las líneas transgénicas fueron provistas por la Dra. Ruth Finkelstein (Universidad de California, Santa Bárbara, USA). Las cruces se seleccionaron por su insensibilidad a 7% de glucosa y 50 μ g/ml de kanamicina. Los análisis de inducción se realizaron empleando medios GM adicionados con 1% de sacarosa, 4% y 7% glucosa, 4% y 7% manitol, 100nM de ABA, y combinaciones de glucosa-ABA y manitol-ABA según se indica en Bossi *et al.*, 2009.

Las líneas *abi4 x pCLA1::GUS* se obtuvieron a partir de la cruce entre plantas *abi4* y 2 líneas transgénicas independientes portadoras del gen reportero GUS bajo la regulación de la región 5' reguladora de *CLA1* (1524pb). Tanto la mutante *abi4* como las transgénicas *pCLA1::GUS* están en el ecotipo Col-0. Las líneas transgénicas *pCLA1::GUS* fueron generadas en el laboratorio (Estévez *et al.* 2000). Las cruces se seleccionaron por su insensibilidad a 7% de glucosa y 50 μ g/ml de kanamicina. Las líneas de delección del promotor de *CLA1* analizadas por Northern blot también fueron generadas en el laboratorio (Romero-Guido *et al.* 2001). Los análisis de inducción se realizaron empleando medios GM adicionados con 1% de sacarosa, 5% o 7% glucosa y 5% o 7% manitol.

- Detección de la proteína ABI4 por Western blot

La detección de la proteína recombinante ABI4-GST en extractos bacterianos se realizó utilizando lisados crudos completos de *E. coli*, los cuales se extrajeron con Laemmli 2x (4% de SDS, 20% de glicerol, 10% de β -mercaptoetanol, 0.004% de azul de bromofenol y 0.125M de Tris HCl pH6.8). Las proteínas se corrieron en geles de SDS-poliacrilamida al 10% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 1h, en agitación constante a 4°C. La eficiencia de la transferencia se verificó por tinción con Ponceau S (0.1% de Ponceau S, 1% de ácido acético glacial). La membrana se bloqueó con 5% de leche en PBS 1X (137mM de NaCl, 2.7mM de KCl, 4.3mM de Na₂HPO₄, 1.47mM de KH₂PO₄) más 0.1% Tween durante toda la noche a 4°C. Como primer anticuerpo se utilizó el anti-ABI4 generado (1:1000-1:2000) o el anti-GST (1:1000; Zymed, South San Francisco, USA) según se indique. La membrana se incubó con el primer anticuerpo en PBS 1X durante 1 a 2h y con el segundo anticuerpo durante 30 minutos. La membrana se reveló con el kit de revelado para fosfatasa alcalina (Zymed, South San Francisco, USA).

Los extractos crudos de proteínas se aislaron a partir de semillas embebidas y secas con el siguiente buffer: Tris pH8 20mM, NaCl 20mM, inhibidor de proteasas; y de plántulas crecidas en los diferentes medios de crecimiento empleando como buffer de extracción Laemmli 1X (2% de SDS, 10% de glicerol, 5% de β -mercaptoetanol, 0.002% de azul de bromofenol, 0.125 M de Tris HCl pH6.8). Los extractos crudos se corrieron en un gel SDS-poliacrilamida 8-10%. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 1h, en agitación constante a 4°C. La eficiencia de la transferencia se verificó con Ponceau S. La membrana se bloqueó con 5% leche en PBS 1X más 0.1% Tween durante toda la noche en agitación a 4°C. Como primer anticuerpo se utilizó el anti-ABI4 o el anti-HA Y-11 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA). Las condiciones del western blot son similares a las del párrafo anterior.

- Purificación del anticuerpo anti-ABI4

El anti-ABI4 generado en el laboratorio se purificó por afinidad (Lillie y Brown 1987). Para ello se corrió un gel con cantidades elevadas de la proteína ABI4-GST purificada, el cual se transfirió luego a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se bloqueó con leche e incubó con el anti-ABI4 como en un Western blot típico. Finalmente, la membrana se lavó y el anti-ABI4 se recuperó a partir de la membrana con una solución de 0.2M de glicina pH2.7. La solución de glicina que contenía al anticuerpo anti-ABI4 se neutralizó con Tris pH8.

- Clonación del gen ABI4::HA en vector binario pART27

La clonación de ABI4::HA se realizó en dos etapas.

Etapas 1: el gen *ABI4* completo se amplificó por PCR con los siguientes primers 5'-GGGCCATGGACCCTTTAGCTTC-3' y 5'-CCCACCATGGGATCAATAAAAT-3'. El producto del PCR se clonó en el vector TOPO (Invitrogen, Carlsbad, USA). Posteriormente, el gen *ABI4* se subclonó en el sitio NcoI en el vector pPILY (Ferrando *et al.* 2000). El vector pPILY permite clonar el gen de interés entre el promotor 35S y el epítipo HA.

Etapas 2: La construcción 35S::ABI4::HA contenida en el vector pPILY se subclonó en el sitio de restricción NotI en el vector pART27 (Gleave 1992) en *E. coli*. El vector pART27 se transfirió a *Agrobacterium tumefaciens* a través de cruce triparental. Las clonas positivas se seleccionaron con 100 µg/ml de spectinomicina, y se emplearon para transformar botones florales de *Arabidopsis thaliana* por infiltración.

- Delección de la secuencia PEST de ABI4 por mutagénesis dirigida

La delección de la secuencia PEST (HNNPQSDSTTDSSTSSAQ) de la proteína ABI4 se realizó a través de mutagénesis por PCR. Primero se amplificó por PCR un fragmento de 903pb del gen *ABI4* empleando los oligos 5'-AACCATCTGGAAGATAATAACCAAACCCTAACCCGCAAACGCAAAGGCAAA-3' y 5'-CCCACCATGGGATCAATAAAAT-3'. Para favorecer el éxito de la reacción de amplificación se realizaron 5 ciclos con una temperatura de annealing de 35°C y 20 ciclos con una temperatura de 55°C. El producto obtenido de esta reacción de PCR se purificó y unos 500 ng del fragmento purificado se emplearon como templado para una segunda reacción de amplificación con los siguientes primers 5'-GGGCCATGGACCCTTTAGCTTCCCAACATCAACACAACCATCTGG AAGAT-3' y 5'-CCCACCATGGGATCAATAAAAT-3'. Igual que en la reacción de PCR anterior, la temperatura de annealing para los primeros 5 ciclos fue de 45°C y para los siguientes 20 ciclos de 55°C. Así, se obtuvo un fragmento de 933pb de *ABI4* que carece de la secuencia PEST, el cual se clonó en TOPO, y posteriormente en el vector HBT-GFP (Chiu *et al.* 1996). Así se generó un vector para expresar transitoriamente en protoplastos a la proteína recombinante ABI4-GFP, la cual puede ser detectada al microscopio gracias a la fluorescencia emitida por la proteína verde fluorescente GFP.

7. Resultados

7.1. ABI4 y la señalización por azúcares en plantas

La proteína ABI4 se reporta repetitivamente como un elemento esencial de la vía de señalización por glucosa en *Arabidopsis thaliana* (Arenas-Huertero *et al.* 2000; Huijser *et al.* 2000; Laby *et al.* 2000; Rook *et al.* 2001), sin embargo aún se desconocen tanto su regulación como su función durante la señalización por azúcares en plantas. Para tratar de comprender la función de la proteína ABI4 se trazaron dos grandes objetivos durante el desarrollo de esta tesis. Por un lado se planteó estudiar el patrón de expresión y la regulación de la proteína ABI4 endógena; y por otro lado se propuso tratar de entender su función como factor de transcripción responsable de la modulación de la expresión de genes blancos durante la respuesta a glucosa. Siguiendo con esta estructura de dos objetivos generales con sus respectivos objetivos específicos, los resultados serán presentados en secciones independientes. Las dos primeras secciones “7.1.1. Detección de la proteína ABI4 endógena: la historia inconclusa” y “7.1.2. La bioinformática al servicio de ABI4 – parte 1” contienen los resultados sobre los estudios de la proteína endógena y sus desafíos. Las siguientes secciones comprenden “7.1.3. La identificación de los blancos directos del factor de transcripción ABI4: los genes *ABI4*, *ABI5* y *SBE2.2*” y “7.1.4. El factor ABI4 actúa como un regulador positivo de la transcripción de los genes *ABI4*, *ABI5* y *SBE2.2*” (donde se presenta un breve resumen de los resultados más relevantes publicados en *The Plant Journal* por Bossi *et al.* 2009, Apéndice I de esta tesis), y las secciones “7.1.5. El caso *DXS1*: blanco indirecto de ABI4 en respuesta a glucosa?” y “7.1.6. La bioinformática al servicio de ABI4 – parte 2”. Las tablas y figuras suplementarias de la sección 7.1.6. encuentran detalladas en el Apéndice II. Finalmente, en el Apéndice III se incluyen los resultados de varios análisis exploratorios realizados durante esta tesis que por limitaciones de tiempo no se continuaron.

7.1.1. Detección de la proteína ABI4 endógena: la historia inconclusa

El análisis del transcrito del gen *ABI4* ha sido muy extenso (Soderman *et al.* 2000; Bossi 2002; Arroyo *et al.* 2003; Penfield *et al.* 2006; Bossi *et al.* 2009) mientras que los reportes relacionados a la proteína ABI4 son escasos y limitados (Soderman *et al.* 2000). Con el objeto de realizar estudios sobre la proteína ABI4 endógena se decidió generar anticuerpos policlonales mediante el uso de la proteína recombinante GST-

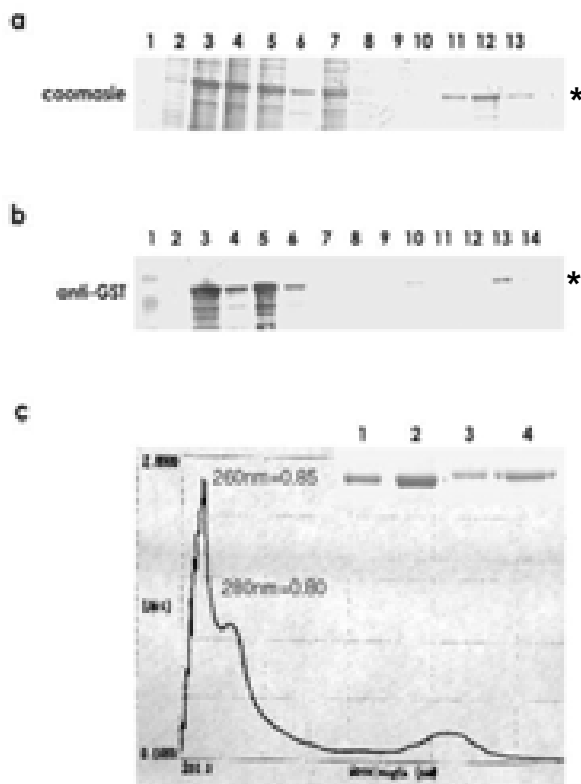
ABI4 que contiene la secuencia de amino ácidos completa de *ABI4*. La sobre expresión de la proteína recombinante se purificó según el protocolo detallado en la sección 6 de esta tesis (Figura 12a y 12b). La proteína específica se extrajo por electro-elución (Figura 12c, carriles 3 y 4).

Figura 12 - Sobre-expresión y purificación de proteína recombinante GST-ABI4 en *E. coli*.

a) Gel de proteínas teñido con colorante coomasie. Los carriles 2 (tiempo 0) y 3 (4hs con IPTG) corresponden a la inducción de la expresión de GST-ABI4 con 0.6mM de IPTG durante 4hs a 30°C. Los carriles 3 a 13 documentan los distintos pasos de la purificación de la proteína recombinante. El carril 3 corresponde al lisado crudo total, el 4 al sobrenadante, el 5 al pellet, el 6 al eluido luego de pasar por la columna de glutatión agarosa, los carriles 8, 9 y 10 indican lavados de la columna con PBS 1X, y los carriles 11, 12 y 13 son tres muestras independientes de proteína pura eluida con glutatión reducido. La banda que corresponde a la proteína GST-ABI4 se indica con un asterisco.

b) Western blot del gel en a) con anticuerpo comercial anti-GST. La banda que corresponde a la proteína GST-ABI4 se indica con un asterisco.

c) Curva de electroelución obtenida en el espectrofotómetro a partir del escaneado de la absorbancia a distintas longitudes de onda de la muestra electroeluida. El pico observado a 280nm indica la presencia de proteína. El cálculo de la concentración de proteína según los valores de absorbancia determina que la concentración de proteína en la muestra es 0.5625 µg/µl. La concentración estimada por fórmula se validó con un gel de proteínas teñido con coomasie, el cual se muestra en la esquina superior derecha del gráfico. Los carriles 1 y 2 corresponden respectivamente a 2.5 µg y 5 µg de BSA, y los carriles 3 y 4 corresponden a 5 µl y 10 µl de GST-ABI4 purificada.



Los anticuerpos se utilizaron para realizar análisis de proteína tipo western blot en extractos proteicos de semillas y plántulas donde sabíamos que la expresión del mensajero de *ABI4* es elevada (Soderman *et al.* 2000; Bossi 2002; Arroyo *et al.* 2003). Dado que los primeros análisis realizados con el anticuerpo resultaron negativos (Figura 13) y considerando que el factor *ABI4* podría encontrarse en niveles muy limitados en las células se cargaron cantidades elevadas de proteínas totales. Sin embargo, con estas condiciones se obtuvieron fondos muy altos, haciendo muy difícil encontrar una banda específica asociada a *ABI4* (Figura 13a tres últimos carriles, y datos no mostrados). Para resolver este problema se decidió inmunopurificar por afinidad el anticuerpo. Empleando el anticuerpo purificado tampoco se detectó ninguna banda que pudiera corresponder a *ABI4* en extractos crudos de proteínas totales de semillas ni de plántulas de *Arabidopsis* (Figura 13c y datos no mostrados). En base a estos resultados

negativos no era posible determinar si la falta de señal se debía a que estamos buscando la proteína en las condiciones inadecuadas, o si era un problema de sensibilidad del anticuerpo.

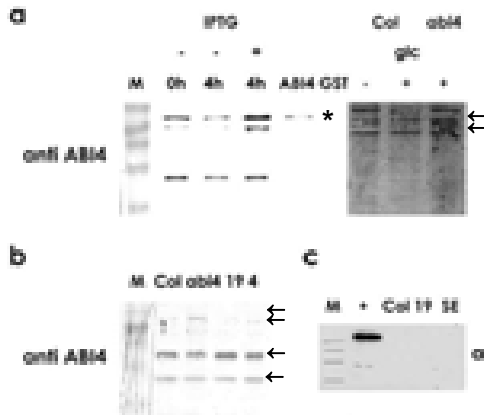


Figura 13 - Detección de ABI4 en extractos proteicos totales de semillas y plántulas de *Arabidopsis*.

a) Western blot con anticuerpo casero anti-ABI4. El primer carril (de izquierda a derecha) es el marcador de peso molecular (M). Los siguientes 5 carriles desde 0h a GST corresponden a extractos que sobreexpresan GST-ABI4 en bacterias (0h: sin IPTG; 4h: sin IPTG durante 4h; 4h: con IPTG durante 4h; ABI4: proteína recombinante GST-ABI4 pura; GST: proteína GST pura. Los últimos 3 carriles de este western corresponden a extractos proteicos de plántulas Columbia (-: sin glucosa; +: con 7% glucosa) y plántulas *abi4* (+: con 7% glucosa). La banda correspondiente a la proteína GST-ABI4 se indica con un asterisco. Las flechas indican bandas inespecíficas.

b) Western blot de extractos completos de proteínas obtenidas de semillas secas. M: marcador de peso molecular; Col: proteínas totales de semillas de Columbia; *abi4*: proteínas totales de semillas *abi4*; 19.9: proteínas totales de semillas de la línea de delección 19.9 (delección completa del gen *ABI4*); 4: proteínas totales de semillas de la línea de delección 4.4 (delección completa del gen *ABI4*). Las flechas indican bandas inespecíficas.

c) Western blot con anticuerpo anti-ABI4 purificado por afinidad. M: marcador de peso molecular; +: GST-ABI4 pura (control positivo); Col: extracto proteico total de semillas de Columbia; 19: extracto proteico total de semillas de la línea mutante 19.9; SE: extracto proteico total de semillas de una línea que sobre expresa al gen *ABI4*.



Figura 14 - Análisis de la sensibilidad del anticuerpo anti-ABI4 a través de un western blot de cantidades conocidas de la proteína recombinante GST-ABI4, las cuales oscilan desde 125ng a 0.015ng, según se indican sobre cada carril en ambos paneles.

NOTA: El anticuerpo (título 1:2000) detecta la banda correspondiente a GST-ABI4 desde 125ng hasta 0.07ng, indicado que la sensibilidad del anticuerpo es bastante decente. Sin embargo, debido al fondo que genera el anticuerpo anti-ABI4 en geles que contienen cantidades altas de extracto proteico, es poco probable que una banda de tinción tan débil como la observada con 0.07ng de proteína sea fácilmente visible en un western de proteínas totales de *Arabidopsis*.

Para analizar la sensibilidad del anticuerpo se corrió un gel con cantidades conocidas de la proteína GST-ABI4 purificada de bacteria (desde 125ng hasta 0.015ng), y se realizó un western blot usando el anticuerpo anti-ABI4 generado. Los resultados indicaron que el anticuerpo contra ABI4 es capaz de detectar hasta 0.07ng de proteína (1×10^9 moléculas de GST-ABI4) (Figura 14). Una proteína altamente expresada constituye aproximadamente el 1% de proteína total en una célula, y 0.07ng de proteína

es el 0.00035% y 0.00014% de 20 y 50 μg de proteína, respectivamente, que es la cantidad de proteína total que se cargó en los geles. En base a esto se concluyó que el anticuerpo no tenía una mala sensibilidad, por lo tanto la falta de detección de ABI4 podría deberse a la baja cantidad de proteína ABI4 en los extractos utilizados.

La falta de detección de la proteína ABI4 en los ensayos realizados fue un resultado inesperado, el cual nos inspiró a desarrollar estrategias alternativas con el objetivo de tratar de detectar dicha proteína en *Arabidopsis thaliana*. Entre las estrategias empleadas, destaca la generación de plantas transgénicas sobre expresasoras del gen *ABI4*, la cual se detalla a continuación.

Teniendo en cuenta que la abundancia de muchos factores de transcripción es baja, se generaron plantas transgénicas sobre expresasoras de *ABI4*. De esta manera se esperaba contar con una herramienta adecuada que nos permitiera detectar a la proteína ABI4 *in planta* y llevar a cabo los estudios de caracterización bioquímica y funcional del factor de transcripción ABI4. Para obtener las plantas transgénicas sobre expresasoras de ABI4 a partir de un promotor fuerte y constitutivo (35S), se transformaron plantas de tipo silvestre con una construcción que porta al gen *ABI4* adyacente a la secuencia que codifica para el epítipo de hemaglutinina A (HA; Figura 15a). Este epítipo, adicionado al extremo carboxilo terminal de ABI4, nos permitiría detectar a la proteína ABI4 con un anticuerpo comercial anti-HA, además de con el anticuerpo anti-ABI4 generado en el laboratorio. Se analizaron unas 10 líneas transgénicas independientes, a las cuales se les corroboró que tenían el transgén y que en ellas efectivamente se sobre expresa el transcrito de *ABI4* (Figura 15b). A partir de estas plantas se obtuvieron extractos de proteínas totales de semillas y de plántulas crecidas en medios con alta concentración de glucosa, manitol y ABA; y se realizaron ensayos de tipo western blot.

Para nuestra sorpresa en ninguno de las líneas transgénicas se detectó una banda que pudiese corresponder a ABI4 ni con el anticuerpo anti-ABI4 (Figura 15c y datos no mostrados), ni con el anticuerpo comercial anti-HA (Figura 15d y datos no mostrados). A partir de estos resultados resulta lógico especular que los niveles de la proteína ABI4 son sumamente bajos y que dichos niveles parecen estar estrictamente regulados por lo que a pesar de que se tenga una cantidad importante de mensajero, este no se refleja en la cantidad de proteína. Este dato apoya la existencia de mecanismos post-transcripcionales que regulan la acumulación de la proteína ABI4 de

manera estricta ya sea a nivel de traducción o de estabilidad de la proteína ABI4. Por lo tanto, se realizaron experimentos encaminados a analizar este aspecto.

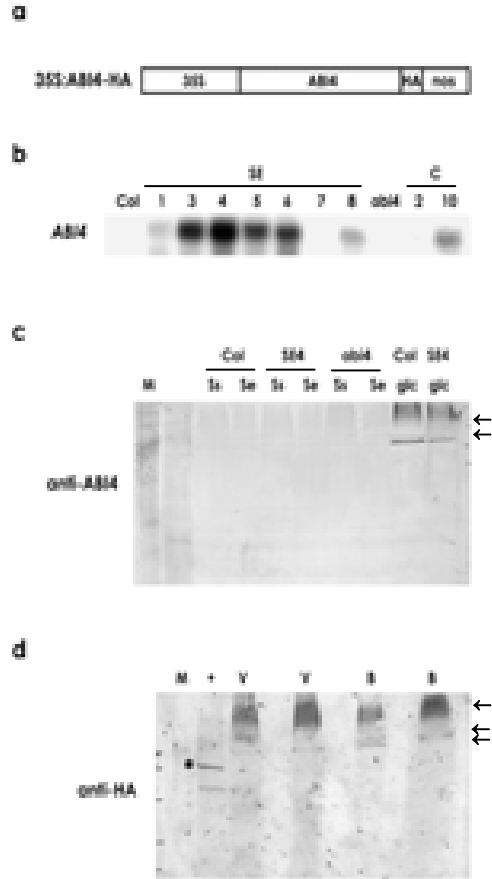
Figura 15 - Generación de plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresan la proteína recombinante ABI4-HA de manera constitutiva.

a) Esquema de la construcción ABI4::HA empleada para transformar plantas de *Arabidopsis*.

b) Análisis de expresión del transcrito de *ABI4* por northern blot en plántulas de tipo silvestre (Col), en distintas líneas sobreexpresoras independientes (SE1, SE3, SE4, SE5, SE6, SE7 y SE8), en la mutante (*abi4*), y en dos líneas complementadas (C2 y C10). Todas las plántulas fueron crecidas en medio GM durante 7-10 días, y en cada carril se cargó 10 µg de mRNA total.

c) Detección de proteína ABI4-HA por western blot en semillas y plántulas utilizando el anticuerpo anti-ABI4. M: marcador de peso molecular; Ss: semilla seca; Se: semilla embebida; glc: glucosa; Col: Columbia; SE4: línea sobreexpresora ABI4-HA número 4; *abi4*: mutante *abi4*. En todos los carriles se cargaron 20 µg de proteína total. Las fechas indican la presencia de bandas inespecíficas.

d) Detección de proteína ABI4-HA por western blot en plántulas de la línea complementada 10 crecidas en 7% de glucosa utilizando el anticuerpo comercial anti-HA. M: marcador de peso molecular; +: control positivo (proteína MAPK-HA); V: plántulas de la línea complementada C10 crecidas en 7% de glucosa que presentan un fenotipo verde; B: plántulas de la línea complementada C10 crecidas en 7% de glucosa que presentan un fenotipo blanco de arresto. En todos los carriles se cargaron 50 µg de proteína total. Las fechas indican la presencia de bandas inespecíficas.



En el laboratorio se realizaron estudios dirigidos a determinar si el mensajero de *ABI4* se regula de manera post-transcripcional. Primero se exploró la hipótesis de que la traducción del mensajero de *ABI4* estuviera regulada. Para ello se analizó la presencia del mRNA de *ABI4* en las fracciones polisomales en plántulas de *Arabidopsis* crecidas en condiciones normales y en respuesta a glucosa. Los resultados de este análisis demostraron que el transcrito de *ABI4* se carga bien a polisomas, sugiriendo que al menos el inicio de la traducción no está regulado en condiciones normales ni en respuesta a glucosa (Patricia Dupre, comunicación personal). Adicionalmente, se demostró que *ABI4* es capaz de traducirse en un sistema de transcripción/traducción *in vitro*. La figura 16 muestra que el gen completo de *ABI4* clonado en un vector de expresión bajo la dirección del promotor T7 se traduce bien *in vitro*. Los resultados obtenidos a partir del análisis de cargado a polisomas y de la transcripción/traducción *in*

in vitro de ABI4 sugirieron que la traducción del mRNA de *ABI4* no parece ser el factor limitante en la acumulación de la proteína ABI4. Por lo tanto, se decidió realizar estudios preliminares encaminados a dilucidar si los niveles de la proteína ABI4 están regulados post-traduccionalmente en *Arabidopsis*.

Figura 16 - Transcripción/Traducción *in vitro* en un sistema de germen de trigo. En la figura se muestra una radiografía del gel en el cual se corrieron los productos de la transcripción/traducción *in vitro*.

M: marcador; LUC: transcripción/traducción del gen *Luciferasa* (control positivo); ABI4: transcripción/traducción del gen *ABI4*, la banda discreta que se observa en este carril corresponde a la proteína ABI4.



Con el objetivo de explorar si la estabilidad de la proteína ABI4 pudiera estar regulada a través de la degradación mediada por proteosoma, se realizó un análisis preliminar de tipo western blot en extractos de plantas tratadas con el inhibidor del proteosoma MG132. Los resultados de este ensayo indicaron que la acumulación de ABI4 no parecía afectarse de manera clara en la presencia del inhibidor de manera tal que fuera posible detectarla (Figura 17a). Por lo tanto, la proteína ABI4 no parece estar sujeta a degradación por proteosoma por lo menos en las condiciones analizadas. Sin embargo, este análisis preliminar debería de ser corroborado con un control del tratamiento. Interesantemente, el resultado de la Figura 17a coincide con el dato publicado en eFP browser para *ABI4* (Figura 17b ; Winter *et al.* 2007), el cual indica que el inhibidor del proteosoma MG132 no afecta la expresión del gen *ABI4* en plántulas de *Arabidopsis* (<http://affymetrix.arabidopsis.info/narrays/experimentpage.pl?experimentid=190>).

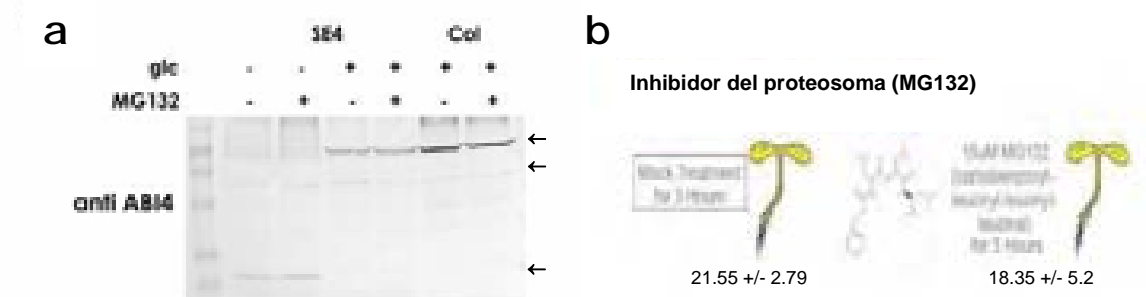


Figura 17 - Se regula ABI4 a nivel post-traduccional?

a) Western blot de extractos de proteínas totales de plántulas SE4 (línea sobreexpresora de *ABI4::HA* número 4) y Col (Columbia) tratadas con el inhibidor del proteosoma MG132 y crecidas en medio sin (-) y con (+) glucosa. El western blot se realizó con el anticuerpo anti-ABI4. Las fechas indican bandas inespecíficas.

b) Esquema representativo (generado por eFP browser) del efecto del inhibidor del proteosoma MG132 sobre la expresión del gen *ABI4* en plántulas de *Arabidopsis thaliana* de 7 días. Los niveles de expresión y su correspondiente desviación estándar se indican según NASCARRAYS 190.

Si bien los ensayos realizados con el inhibidor de proteosoma MG132 sugirieron que la proteína ABI4 no se regula por degradación mediada por esta vía, ésto no excluye que la acumulación de ABI4 esté controlada por otros mecanismos de regulación asociados a degradación de proteínas. De hecho, el análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de ABI4 indicó que la región amino terminal de ABI4 contiene una secuencia denominada PEST (prolina, ácido glutámico, serina y treonina). Esta secuencia se ha implicado en degradación de proteínas tanto en animales como en plantas (Rechsteiner y Rogers 1996). En animales, la secuencia PEST actúa como una señal condicional (modulada por fosforilación) que indica cuáles proteínas deben ser degradadas (Lin *et al.* 1996; Marchal *et al.* 1998). Las proteínas destinadas a proteólisis por la señal PEST son finalmente degradadas mediante la acción del proteosoma o de proteasas específicas como, por ejemplo calpaínas o caspasas (Gregory y Hann 2000; Bordone y Campbell 2002; Liu *et al.* 2004). Por otro lado, en plantas se ha demostrado que la secuencia PEST es importante para controlar la estabilidad del factor de transcripción BES1, el cual participa en la vía de señalización por brasinosteroides en *Arabidopsis* (Yin *et al.* 2002; Yin *et al.* 2005) (Tabla 9).

La presencia de la secuencia con homología a PEST en ABI4 sugiere que la estabilidad de esta proteína podría ser regulada por esta señal a través de alguno de los mecanismos mencionados (Figura 18). Con el objetivo de analizar si esta secuencia afecta de alguna manera la abundancia de la proteína ABI4 se realizó una construcción en la cual se deletó esta secuencia a través de mutagénesis dirigida. Análisis preliminares por expresión transitoria de la proteína recombinante ABI4_{ΔPEST}-GFP, la cual carece de la secuencia PEST de ABI4, indicaron que la ausencia de esta secuencia no aumenta los niveles de expresión de una proteína recombinante ABI4_{ΔPEST}-GFP en protoplastos de *Arabidopsis* (León P., comunicación personal). Sin embargo, no es posible descartar aún un posible rol de la secuencia PEST para regular ABI4 durante etapas diferentes del desarrollo o en respuesta a glucosa, osmótico y/o ABA; o que la secuencia PEST actúe en conjunto con otras secuencias adicionales en la proteína para determinar la estabilidad de ABI4.

Figura 18 - Esquema de la proteína ABI4 donde se resalta la secuencia PEST. Abajo se indica la secuencia de aminoácidos del PEST de ABI4, así como otras características bioquímicas.

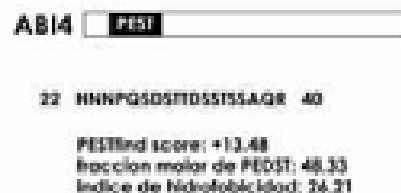


Tabla 9 - Comparación de las secuencias de la proteína ABI4 de distintas especies vegetales (At: *Arabidopsis thaliana*, Vv: *Vitis vinifera*, Pt: *Populus trichocarpa*), y de la proteína AtBES1 asociada a la respuesta a brasinoesteroides en *Arabidopsis*. La funcionalidad de la secuencia PEST en BES1 ha sido demostrada experimentalmente (Yin *et al.* 2002; Yin *et al.* 2005).

Proteína	Secuencia PEST	PESTfind score	Fracción molar de PEDST	Índice de hidrofobicidad	Localización
AtABI4	HNNPQSDSTTDSSTSSAQR	+13.48	48.33	26.21	N-terminal (aa 22-40)
VvABI4	KPITTTTTTSNETNSSNSSSAT AGATSCGGDNGSNGNSR	+10.25	49.72	34.19	N-terminal (aa 9-47)
PtABI4	HPPQEPTTTTTK	+16.90	56.79	28.68	N-terminal (aa 8-19)
PtABI4	KSTDNNTTATTPTTATSDTN SNNNSSGNSR	+15.23	53.64	28.55	N-terminal (aa 25-55)
AtBES1	HAPATIECDESDSSTVDSGH	+11.57	54.81	37.15	C-terminal (aa 231-251)

7.1.2. La bioinformática al servicio de ABI4 - parte 1.

La función de ABI4 resulta altamente interesante durante las etapas tempranas del ciclo de vida de las plantas. Sin embargo, los esfuerzos invertidos hasta la fecha aún no han sido suficientes para entender y caracterizar bioquímicamente al factor de transcripción ABI4. En esta sección se detalla un análisis comparativo *in silico* muy básico entre las proteínas ABI4 aisladas de diferentes especies vegetales, que quizás sirva como trampolín para futuros estudios.

En la Figura 19 y su correspondiente tabla de referencias (Tabla 10) se resaltan los sitios posibles de regulación postraducciona de la proteína ABI4 de *Arabidopsis*; y la comparación de la presencia de éstos en sitios en las proteínas ortólogas de ABI4 en otras especies vegetales tanto dicotiledóneas como monocotiledóneas. ABI4 tiene numerosos sitios potenciales de fosforilación sugiriendo que ABI4 podría estar altamente fosforilada en las células vegetales por diferentes cinasas. Otra modificación covalente postraducciona que destaca es la N-miristilación, aunque la mayoría de los sitios predichos para ABI4 de *Arabidopsis* no se conservan. De manera especial, en la Tabla 9 se muestran las secuencias PEST predichas para la proteína ABI4 de *Arabidopsis thaliana*, la de *Vitis vinifera* y la de *Populus trichocarpa*, sugiriendo que esta secuencia PEST está conservada entre las proteínas ortólogas en dicotiledóneas.

Las modificaciones postraduccionales son responsables de modular la actividad, estabilidad y función de muchos factores de transcripción (Tootle y Rebay 2005;

NQTL	sitio de N-glicosilación	Parcial	N-terminal
PEST	degradación	Conservado en dicotiledóneas (ver tabla 3)	N-terminal
STTD	sitio de fosforilación de la proteína caseína cinasa II	Nula	N-terminal
GGPDNS	sitio de N-miristoilación	Perfecta entre Arabidopsis y Vitis. Alta entre Arabidopsis y Populus, y entre arroz y maíz	N-terminal
RKRT	sitio de fosforilación para las proteínas cinasas dependientes de AMP y cGMP	Perfecta en dicotiledóneas. Alta entre dicotiledóneas y monocotiledóneas.	Dominio AP2
TRK	sitio de fosforilación de la proteína cinasa C	Perfecta en dicotiledóneas. Alta entre dicotiledóneas y monocotiledóneas.	Dominio AP2
GIFATA	sitio de N-miristoilación	Perfecta (relevante?)	Dominio AP2
TAED	sitio de fosforilación de la proteína caseína cinasa II	Perfecta (relevante?)	Dominio AP2
PS	sitio de fosforilación de MAPK	1 sitio de los 4 está perfectamente conservado en dicotiledóneas	Dominio rico en Ser **
TLR	sitio de fosforilación de la proteína cinasa C	Perfecta en dicotiledóneas. Alta entre dicotiledóneas y monocotiledóneas.	Dominio rico en Ser
PLLPRF	desconocida	Perfecta *	Dominio rico en Ser
GGGANF	sitio de N-miristoilación	Nula	Dominio rico en Ser
GIPFNN	sitio de N-miristoilación	Nula, excepto Pro en posición 165 (relevante?)	Dominio rico en Ser
SDIE	sitio de fosforilación de la proteína caseína cinasa II	Nula	C-terminal
NSTS	sitio de N-glicosilación	Nula	C-terminal
GQEQGC	sitio de N-miristoilación	Nula	C-terminal
GCMNNS	sitio de N-miristoilación	Nula	C-terminal
NNSS	sitio de N-glicosilación	Nula	C-terminal
GSVGSS	sitio de N-miristoilación	Perfecta en dicotiledóneas. Nula entre dicotiledóneas y monocotiledóneas.	C-terminal
GLDPGY	sitio de N-miristoilación	Nula, excepto Pro en posición 289 (relevante?)	C-terminal
SIWD	sitio de fosforilación de la proteína caseína cinasa II	Perfecta entre Arabidopsis y Populus	C-terminal
SSME	sitio de fosforilación de la proteína caseína cinasa II	Nula	C-terminal

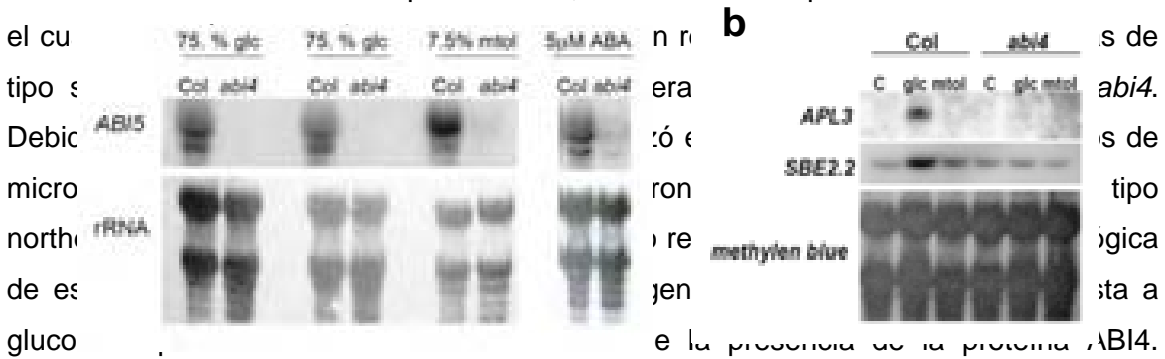
* La secuencia **PLLPRF** no se asocia a ninguna función. Es más, **PLLPRF** parece estar sólo en ABI4 en Arabidopsis según el programa Patmatch; y en ABI4, en una proteína de levadura y en una de ratón según el Prosite. ** En esta región hay muchas serinas conservadas o parcialmente conservadas (S) cuya relevancia se desconoce.

Los resultados obtenidos a partir de todos los estudios dirigidos a caracterizar la proteína ABI4 endógena fueron de alguna manera inesperados y complicaron la realización de varios de los objetivos originalmente planteados para este proyecto.

7.1.3. La identificación de los blancos directos del factor de transcripción ABI4: los genes *ABI4*, *ABI5* y *SBE2.2*

Previo a este trabajo, se había reportado que la proteína ortóloga a ABI4 de maíz se unía *in vitro* a la secuencia CACCG (Niu *et al.* 2002). Esta secuencia está presente en la región promotora de ABI4 de maíz, lo que llevó a sugerir que la proteína ABI4 regula su propia transcripción (Niu *et al.* 2002). La secuencia CACCG también está presente en el promotor del gen *ABI4* de *Arabidopsis* y en los promotores de varios genes regulados por ABA y glucosa, mostrando que el motivo CACCG es un elemento conservado en genes que responden a glucosa y sugiriendo que representa el posible sitio de unión al DNA de la proteína ABI4 (Niu *et al.* 2002).

Con el objetivo de identificar posibles genes blanco de ABI4 implicados en la respuesta a glucosa en *Arabidopsis* se realizó un análisis *in silico*, el cual se llevó a cabo en dos fases. Durante la primera fase, se determinó un primer criterio de selección el cual



era: el criterio de selección fue la presencia de la proteína ABI4. Siguiendo este criterio se seleccionaron varios genes candidatos posibles. Entre ellos se encuentran, el factor de transcripción *ABI5* (Arroyo *et al.* 2003 y Figura 20a), los genes fotosintéticos que codifican para la proteína que une clorofila AB (*CAB*), la subunidad pequeña de rubisco (*RBCS*) y plastocianina (*PC*) (Arenas-Huertero *et al.* 2000) y dos genes que codifican para proteínas del metabolismo de almidón (*APL3* y *SBE2.2*) (Rook *et al.* 2001 y Figura 20b). Luego de obtener esta lista preliminar, los candidatos se filtraron según un segundo criterio, el cual fue buscar la caja CACCG perfecta en sus regiones regulatorias 5', esperando discriminar entre los genes posiblemente regulados por ABI4 de manera directa y aquellos regulados indirectamente. Así, la lista se limitó a los siguientes candidatos: *ABI5*, *APL3* y *SBE2.2* (Bossi *et al.* 2009); a los cuales se agregó el gen *ABI4*, que cumple con ambos criterios de selección y cuya autorregulación transcripcional fue propuesta por Niu *et al.* 2002.

Un análisis más detallado de los promotores de los genes candidatos mostró que existen varios elementos CACCG en las regiones regulatorias 5' de *ABI4*, *ABI5*, *APL3* y *SBE2.2* (Bossi *et al.* 2009). Niu *et al.* 2002 hipotetizaron que debido al sitio donde se encuentra el elemento de unión a ABI4 (CACCG) en relación a la caja TATA y al inicio de la traducción (ATG), la proteína ABI4 debería tener un efecto negativo sobre su propia transcripción; y sugirieron que ABI4 actúa como un represor cuya unión sobre el DNA evita o compite con la formación del complejo de iniciación de la transcripción (Johnson 1995). Por lo tanto para corroborar esta hipótesis, las cajas más cercanas a la caja TATA y al ATG se sometieron a experimentación con el objetivo de determinar si realmente existe interacción *in vitro* entre la proteína ABI4 y las regiones promotoras de *ABI4*, *ABI5*, y *SBE2.2* que incluyen el motivo CACCG (Figura 1 en Bossi *et al.* 2009, Apéndice I). La interacción *in vivo* entre el factor ABI4 y la región regulatoria 5' del gen *APL3* fue reportada (Rook *et al.* 2006b) durante el transcurso de la parte experimental de esta tesis, por lo tanto su análisis detallado no se continuó.

El estudio de la interacción de la proteína ABI4 con sus blancos probables se inició con el análisis de la interacción entre ABI4 y la región promotora del gen *ABI4*. Habiendo establecido *in silico* la presencia de una caja CACCG en el promotor de *ABI4* y con el objeto de determinar si la proteína ABI4 de *Arabidopsis* se une directamente a su propio promotor, se realizaron ensayos de retardo de movilidad electroforética (EMSA) (Bossi *et al.* 2009, Apéndice I). Para estos ensayos se utilizó un fragmento de *ABI4* de 152pb que incluye a la caja CACCG como sonda y a la proteína recombinante GST-ABI4 purificada (Figura 2 en Bossi *et al.* 2009, Apéndice I). Los resultados obtenidos de estos ensayos EMSA indicaron que la proteína GST-ABI4 es capaz de

unirse al promotor de *ABI4*, que la unión depende de *ABI4* y no de GST, y que la interacción es específica (Figuras 2, S1a y S1b en Bossi *et al.* 2009, Apéndice I). La participación de la caja CACCG fue corroborada en detalle a través de mutagénesis dirigida a dicha secuencia (Figura 2b en Bossi *et al.* 2009, Apéndice I). La unión *in vitro* de la proteína *ABI4* a su propio promotor, sugiere que *ABI4* actúa como un regulador directo de su propia transcripción. Análisis similares empleando fragmentos de las regiones regulatorias de los genes *ABI5* y *SBE2.2* demostraron que la proteína *ABI4* también se une directamente a las regiones regulatorias 5' de *ABI5* y *SBE2.2*, indicando que ambos genes son blancos directos de *ABI4* (Figuras 3 y 4 en Bossi *et al.* 2009, Apéndice I).

Si bien el análisis de la interacción de la proteína *ABI4* con el gen *ABI4* fue directo y “simple”, el análisis de las interacciones *ABI4-ABI5* y *ABI4-SBE2.2* resultó más complejo (Bossi *et al.* 2009, Apéndice I). En el caso de *ABI5*, se localizaron 3 cajas tipo CE-1 presentes en su promotor (Figuras 1, 3 y S1c en Bossi *et al.* 2009, Apéndice I). Para determinar si estas tres cajas posibles de unión de *ABI4* unen a dicho factor se hicieron ensayos de retardo con cada una ellas. Inesperadamente, nuestros resultados mostraron que sólo una de estas cajas (la que se orienta en sentido 5'-3') interacciona con el factor *ABI4*, indicando que la orientación juega algún papel esencial o que bases adicionales aún no identificadas son necesarias para que *ABI4* reconozca y actúe sobre su sitio de unión (Figuras S1c y 3a en Bossi *et al.* 2009, Apéndice I). Curiosamente, la caja tipo CE-1 del gen *ABI5* que interacciona con la proteína *ABI4 in vitro* se localiza en la región 5'UTR y no en el promotor del gen *ABI5*.

Para el caso de la interacción de *ABI4* con *SBE2.2*, se observó que la mutación de la caja CACCG no abate completamente la interacción entre el DNA y la proteína *ABI4* (Figuras 4b en Bossi *et al.* 2009, Apéndice I). Un análisis minucioso del oligonucleótido empleado para el ensayo EMSA mostró la presencia de otra caja tipo CE-1 en la secuencia del oligonucleótido (Figuras 4b en Bossi *et al.* 2009, Apéndice I). La mutación de este doble motivo tipo-CE-1 en tándem sobre el promotor de *SBE2.2* evitó la interacción de la proteína *ABI4* con el DNA (Figuras 4b en Bossi *et al.* 2009, Apéndice I). Este resultado sugirió que *ABI4* podría actuar como dímero, o que podría unirse a cualquiera de estas dos secuencias alternativamente para realizar su función. Aunque la intensidad de ambas bandas sugiere una predilección hacia la unión con una de las cajas (Figura 4b en Bossi *et al.* 2009, Apéndice I).

Durante la realización de la parte experimental de esta tesis, se publicaron dos reportes de nuevos elementos en *cis* de unión a ABI4: la caja S (Acevedo-Hernandez *et al.* 2005) y el motivo CCAC (Koussevitzky *et al.* 2007). Interesantemente, la caja CACCG del promotor de *ABI5* que une ABI4 se sobrelapa con un motivo CCAC (Figura 3b en Bossi *et al.* 2009, Apéndice I), responsable de la unión de ABI4 al promotor del gen *Lcbh* (Koussevitzky *et al.* 2007). Por lo tanto para analizar este aspecto, en este trabajo se realizó un análisis de mutagénesis que demostró que la secuencia CCAC de *ABI5* es dispensable para la interacción con ABI4 mientras que la secuencia CACCG es indispensable (Figuras 3b y 3c en Bossi *et al.* 2009, Apéndice I). Estos resultados indicaron que la proteína ABI4 es capaz de unirse a diferentes secuencias dependiendo del gen blanco, lo cual una vez más apoya que ABI4 reconoce de alguna manera el contexto del promotor en el que se encuentran sus posibles cajas de unión, y según ese contexto decide a que tipo de caja se une. Por otro lado, la interacción proteína-proteína entre ABI4 y otros factores de transcripción también podría determinar la identidad del elemento en *cis* al que se une ABI4.

7.1.4. El factor ABI4 actúa como un regulador positivo de la transcripción de los genes *ABI4*, *ABI5* y *SBE2.2*

Una vez determinado *in vitro* que ABI4 interactúa con los promotores de los genes *ABI4*, *ABI5* y *SBE2.2*, la siguiente pregunta de este trabajo fue de que manera esta interacción afecta la transcripción de los genes blanco *in vivo*. Para ello, se realizó un análisis de expresión transitoria en protoplastos usando como plásmido efector, un vector de expresión que sobre-expresa a la proteína ABI4 y como plásmidos reporteros al gen Luciferasa (*LUC*) bajo la regulación de fragmentos de los promotores de *ABI4*, *ABI5* y *SBE2.2* (Figura 5a en Bossi *et al.* 2009, Apéndice I). Los resultados publicados en la Figura 5b en Bossi *et al.* 2009, Apéndice I indicaron que de forma semejante a los datos obtenidos *in vitro*, en protoplastos de *Arabidopsis* ABI4 funciona como un activador de la transcripción de *ABI4*, *ABI5* y *SBE2.2*. Coherentemente con los resultados de los EMSA, la mutación de la caja CACCG en el gen *ABI4* abate significativamente la activación de su expresión dependiente del factor ABI4 (Figura 5c en Bossi *et al.* 2009, Apéndice I). En el caso del gen *ABI5* se observa que la mutación en la caja CCAC disminuye los niveles de expresión del gen reportero a pesar de que según el ensayo EMSA la interacción entre el DNA y la proteína ABI4 no se afecta (Figuras 3 y 5c en Bossi *et al.* 2009, Apéndice I). Este dato en particular indicó que a

pesar de que el motivo CCAC es dispensable para la interacción *in vitro*, la integridad de la caja CCAC es importante para la función de ABI4 *in vivo*. En conjunto, los datos obtenidos a partir del análisis de expresión transitoria demostraron que ABI4 es un regulador positivo de la transcripción, lo cual concuerda con la presencia en la proteína ABI4 de un dominio funcional implicado en la activación de la transcripción (Soderman *et al.* 2000). Finalmente, decidimos realizar estudios adicionales para caracterizar el papel de ABI4 como regulador de su propia transcripción durante el desarrollo de *Arabidopsis* y en respuesta a glucosa.

Con el objetivo de determinar el grado de impacto de la autoregulación transcripcional de ABI4 *in planta*, desarrollamos una estrategia genética utilizando las líneas transgénicas que expresan el gen reportero β -glucuronidasa (*GUS*) bajo la regulación de 3kb del promotor de *ABI4* de *Arabidopsis* (*pABI4::GUS*), las cuales están bien caracterizadas (Soderman *et al.* 2000; Bossi 2002; Arroyo *et al.* 2003; Penfield *et al.* 2006). La estrategia genética empleada consistió en transferir el transgen *pABI4::GUS* al fondo genético de la mutante *abi4* a través de cruzas entre plantas mutantes *abi4* y las líneas transgénicas que portan al reportero *GUS* bajo la regulación del promotor de *ABI4* (Bossi *et al.* 2009, Apéndice I). En total fueron generadas 9 líneas *abi4* x *pABI4::GUS*, las cuales fueron analizadas a través de ensayos histoquímicos y fluorimétricos (Bossi *et al.* 2009, Apéndice I).

El análisis de las cruzas durante el desarrollo, y su comparación con las líneas parentales, permitieron demostrar que la proteína ABI4 es necesaria para la expresión del gen *ABI4* durante el desarrollo temprano de la plántula (Figura 6 en Bossi *et al.* 2009, Apéndice I). La segunda conclusión, y la más relevante en cuanto a la señalización por glucosa, fue que el factor ABI4 es el principal regulador de la expresión del gen *ABI4* en respuesta a glucosa ya que la expresión génica del gen *ABI4* en respuesta a glucosa disminuye 97% en ausencia de proteína ABI4 (Figuras 8c, 8g, 8q y 8r en Bossi *et al.* 2009, Apéndice I). Por lo tanto, ABI4 funciona como un activador de su propia transcripción durante el desarrollo y en respuesta a glucosa en plántulas jóvenes. El análisis de las cruzas *abi4* x *pABI4::GUS* en diferentes condiciones de crecimiento indicó que la proteína ABI4 también es necesaria para la expresión del gen *ABI4* en respuesta a manitol y a ABA (Figuras 8d, 8h, 8i, 8m, 8q y 8r en Bossi *et al.* 2009, Apéndice I). De los análisis histoquímicos de las Figuras 6 y 8 (Bossi *et al.* 2009, Apéndice I) destaca la expresión de *GUS* en la región superior del hipocotilo tanto en embriones germinando y plántulas jóvenes (Figuras 6i, 6p y 6q en Bossi *et al.* 2009,

Apéndice I) como en respuesta a glucosa y glucosa más ABA (Figura 8g y 8o en Bossi *et al.* 2009, Apéndice I). Estos datos sugieren que la expresión del promotor de *ABI4* en la región superior del hipocotilo es independiente de la presencia de la proteína ABI4. En base a los resultados presentados en esta sección, se propone que ABI4 es un regulador positivo directo de su propia transcripción, cuya auto-regulación es esencial durante el desarrollo temprano de las plántulas de *Arabidopsis*, y en respuesta a glucosa, ABA y manitol. El factor ABI4 también modula, directamente y de manera positiva, la expresión de los genes *ABI5*, *APL3* y *SBE2.2* en respuesta a glucosa.

Por otro lado, estudios independientes han demostrado que ABI4 regula directamente la represión del gen fotosintético *RBCS* en respuesta a glucosa (Acevedo-Hernandez *et al.* 2005) y la represión del gen fotosintético *Lcbh* durante la señalización retrógrada núcleo-cloroplasto (Koussevitzky *et al.* 2007). Estos datos indicaron que el factor ABI4 es capaz de actuar como un represor de la transcripción en *Arabidopsis*. Por consiguiente, ABI4 actúa como un regulador dual de la transcripción durante el desarrollo de las plantas. Sin embargo, aún faltan más estudios para clarificar el mecanismo por el cual ABI4 modula su actividad dual durante el desarrollo y las respuestas a diversos estímulos, como los azúcares y el estrés.

7.1.5. El caso *DXS1*: blanco indirecto de ABI4 en respuesta a glucosa?

(colaboración con Dra. Patricia Dupre)

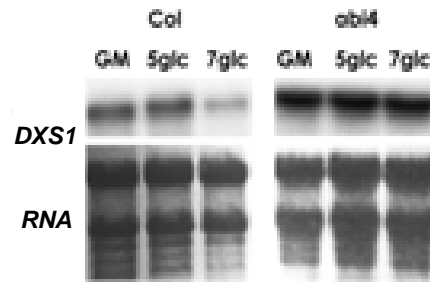
En el laboratorio se han analizado varios aspectos de la regulación de los genes que codifican para las enzimas involucradas en la biosíntesis de los precursores para la biosíntesis de isoprenoides plásticos conocida como la vía MEP (Phillips *et al.* 2008). El gen responsable del primer paso de dicha vía es *DXS1* quien codifica para la enzima 1-deoxy-D-xylulosa-5-fosfato sintasa, y ha sido extensamente estudiado en el laboratorio (Mandel *et al.* 1996; Estévez *et al.* 2000; Córdoba *et al.* 2009).

Resultados de experimentos de tipo northern blot realizados en el laboratorio demostraron que el gen *DXS1* se regula negativamente por glucosa, y esta respuesta se encuentra desregulada en la mutante *abi4* (Figura 21).

Para explorar la participación de la región regulatoria 5' del gen *DXS1* durante su represión por glucosa, se analizó la expresión del promotor del gen *DXS1* en respuesta a glucosa en líneas transgénicas de *Arabidopsis* que portan el gen reportero *GUS* bajo la regulación de 1524 pb o de 759 pb de la región regulatoria de *DXS1* (*pDXS1::GUS*). Los análisis por Northern blot (Figura 22a y b) y fluorimétricos (Figura

22c) de la expresión de *GUS* en las líneas transgénicas *pDXS1::GUS* demostraron que la regulación por glucosa del promotor de *DXS1* depende de elemento(s) en *cis* contenido(s) dentro de un fragmento de 759 pb a partir del inicio de la traducción.

Figura 21 - Análisis de la expresión del gen *DXS1* por northern blot en plántulas Columbia (Col) y en plántulas *abi4* (*abi4*). Las plántulas fueron crecidas en medio GM, 5% de glucosa (5glc) y 7% de glucosa (7glc) durante 7-10 días. El control de carga corresponde al RNA total.



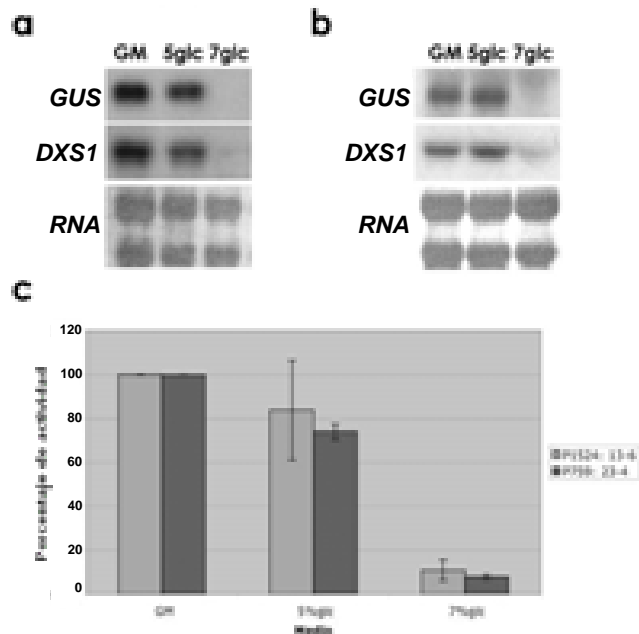
Debido a que la regulación por glucosa de la expresión de *DXS1* se pierde en plántulas *abi4* (Figura 21), y a que la represión del gen *DXS1* en respuesta a glucosa depende de su propio promotor (Figura 22) se desarrolló una estrategia genética para analizar si la proteína ABI4 es necesaria para la regulación del gen *DXS1* durante la respuesta a glucosa. Con este propósito, se transfirió el transgén *pDXS1::GUS* al fondo genético de la mutante *abi4* a través de cruza entre plantas mutantes *abi4* y las líneas transgénicas *pDXS1::GUS*. Se obtuvieron varias líneas *abi4 x pDXS1::GUS* que fueron analizadas por northern blot.

Figura 22 - Análisis del promotor del gen *DXS1* en respuesta a glucosa. Los datos de esta figura fueron generados por la Dra. Patricia Dupre.

a) Expresión de los transcritos de *DXS1* y *GUS* por northern blot en plántulas transgénicas *pDXS1::GUS*, que contienen al gen *GUS* bajo la regulación de 1524pb del promotor de *DXS1*, crecidas en medio GM, 5 % de glucosa (5glc) y 7% de glucosa (7glc).

b) Expresión de los transcritos de *DXS1* y *GUS* por northern blot en plántulas transgénicas *pDXS1::GUS*, que contienen al gen *GUS* bajo la regulación de 759pb del promotor de *DXS1*, crecidas en medio GM, 5 % de glucosa (5glc) y 7% de glucosa (glc).

c) Cuantificación fluorimétrica de la actividad de *GUS* en plántulas *pDXS1::GUS* (1524pb) y *pDXS1::GUS* (759pb) crecidas en medio GM, 5 % de glucosa (5%glc) y 7% de glucosa (7%glc). La actividad se reporta como porcentaje con respecto a la actividad en GM.



Los resultados mostraron que el transcrito de transgén *pDXS1::GUS*, de la misma manera que el gen *DXS1* endógeno, se reprime en respuesta a altas

concentraciones de glucosa en las plántulas de tipo silvestre de 10 días (Figura 23a). A diferencia de este comportamiento, los niveles del transcrito de *GUS* en plántulas *abi4* crecidas en 7% de glucosa ya no se afectan en respuesta a glucosa (Figura 23b y c). Estos resultados demostraron que la represión del promotor del gen *DXS1* en respuesta a glucosa requiere de la proteína ABI4.

Figura 23 - Análisis de la expresión del gen *DXS1* endógeno y del transgén *GUS* bajo la regulación del promotor de *DXS1* por northern blot en plántulas transgénicas *pDXS1::GUS* (a), que contienen al gen *GUS* bajo la regulación de 1524pb del promotor de *DXS1*; y de plántulas de dos cruza independientes *abi4 X pDXS1::GUS* (b y c). Las plántulas fueron crecidas en medio GM, 5% de glucosa (5glc) y 7% de glucosa (7glc) durante 7-10 días. El control de carga corresponde al mRNA total.

El análisis *in silico* de la región promotora de *DXS1* mostró que en la cadena complementaria existe una secuencia CACCG, que como se ha mencionado es el sitio de unión a ABI4, a -392 pb del ATG (Figura 24a), así como 5 motivos CCAC, reportados por Koussevitzky *et al.* (2007) como el sitio de unión a ABI4 en el gen *Lchb* (Figura 19). En la Figura 24a también se resaltan elementos de respuesta a luz localizados en el promotor de *DXS1*. Tanto el elemento tipo CE-1 como 4 de los 5 motivos CCAC se encuentran presentes en la región de 759 pb que participa en la respuesta a glucosa. Para demostrar si alguno de dichos motivos era reconocido por la proteína ABI4 se realizaron ensayos tipo EMSA con fragmentos de la región de 759 pb del promotor de *DXS1*. En total se utilizaron 3 sondas diferentes de 230 pb, 350 pb y 490 pb (Figura 24b). Ninguna de las sondas empleadas mostró una banda de retardo correspondiente a la interacción entre el DNA y la proteína recombinante GST-ABI4 *in vitro* (datos no mostrados). Esto sugiere que ABI4 es un modulador indirecto de la regulación de la expresión de *DXS1* en respuesta a glucosa. Sin embargo, es importante enfatizar que los análisis tipo EMSA usando sondas de DNA grandes como las que fueron usadas resultan complicados y pueden generar falsos negativos, un ensayo con fragmentos de

~ 100 pb (u oligos específicos que incluyan preferencialmente a la región encuadrada en Figura 24a) sería más adecuado para demostrar contundentemente si el gen *DXS1* es blanco directo del factor de transcripción ABI4 durante la respuestas a glucosa.

Figura 24. Secuencia del promotor de *DXS1* y esquema de las regiones de dicho promotor empleadas para los EMSA.

a) Secuencia de 1524 pb del promotor del gen *DXS1* de *Arabidopsis thaliana*. La base **a** indica el sitio de inicio de la transcripción (+1), en rojo, fucsia, azul y anaranjado se resaltan las secuencias relacionadas a regulación por luz predichas por plantCARE: la secuencia escrita en rojo corresponde a una caja G, la azul señala una caja ACE, la anaranjada indica un motivo GAG (leído en cadena complementaria: AGAGATG), la secuencia fucsia a un motivo Gap (leído en cadena complementaria CAAATGAA (A/G)A). En mayúsculas se resaltan las cajas asociadas a ABI4: 5 cajas CCAC en negro, y 1 caja CACCG (leída en cadena complementaria) en rojo. La secuencia encuadrada corresponde a una caja G sobrelapada con sitio unión de ABI4. En negrita se resalta la región regulatoria de 759pb desde el inicio de la traducción (ATG).

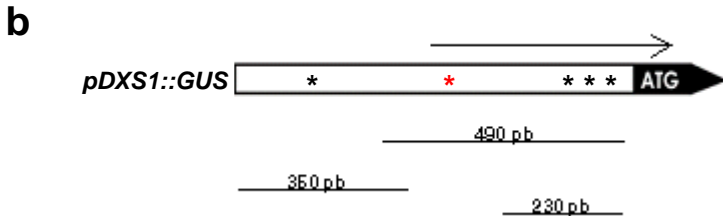
b) Esquema representativo de 759pb de la región regulatoria 5' del gen *DXS1* (marcada en negrita en a)). La localización de las sondas de 490pb, 350pb y 230 pb empleadas para los EMSA se indica con segmentos debajo. La flecha indica el sitio de unión de la transcripción (+1). El asterisco rojo indica la localización de la caja de unión a ABI4 tipo CE-1 y los asteriscos negros la de las secuencias CCAC.

a

```

gtcatcttgcatttcaagcagtttcgacaaaaatTTTatccaactgt
tatattcaaactaattgaaaatcgaaaaaCCACcattaaaaattag
ttaaaaaataacatatcattttgaaaatgcaatatttaaaaaattaa
catatcaatttaacatgcttgttttcttaataagttttgatataatt
ataaaatgaaccgcgtgattacaatttttctttttgtgatggaact
gtcgttagttaaacacttaaaccttaaaccttcatgtaagttttgtt
tattcatatttgactcaattgaaacccaataatcaagaatgtcaaa
tatttatatgttttgcggattttgtaacgtgattctcgcctcatttaa
taatgtgataaatatcataaaatTTTaatctatgtagttgtttaaata
gatattaaactttattaatgtaataagatcgataaataactaagttac
taaccctaaatcatacacttacgagttacgacactaccgcactatct
tggttatattaaataactccttttgttttctaataagtttgatgtttat
atcaacattattattttactttcattttgttaccgatagaaagaggag
aaaattgttgacaaaaacaaagaaaaaaagtaaaattaatattatta
aattaataaaaaataacaaactgtaaaagctatttttaaaaaatTTT
cttgtaaaacatctaaaaatattcttctgtagaacagaggaataatc
attgaagataaatagtgtgaaattatatatatatatagaaatatata
aagtaggatttttttctgtatacaaatatacgtttccaattttatc
aaaaactgtaaagatttttttctttgtcagtacctgctaaacttgt
taatttttttattaaaaaaaatcaaatatacaattcttctataatc
atTTTaaattccattttctttataCCACaaaagattatattgccttt
atcgtctttggtagtgcggtgaatatattttatttttttttt
ctttcatttttctttttaaagaactttataaatgaaataaggaacaa
acaatatacacatgtactaacgtatataataaatatcatcaatctc
tatccaaaacttggattttcatgggttgacGTGGCccaacccaaatct
caagttctctgcggatgacgaaccatctcaccatctctttttttct
ctctctttttttttttttatatatcatcagcaggttacataaaatc
gtgatccatgaagttggctttctgtcgttttattcatcacccca
tttttttaaagtcctccatctttatacttcttcaactctCCACcaCC
ACcattgtcaCCACcactttaaacacacactttcacttgttagtgg
gattcgaaagtgcggttttattcatttggtttactgtttttgataac
ctcaaaatTTTgcctaaatTTTattctctataaatccttatatgttt
tacttacattcctaaagttttcaactttcttgagcttcaaaaagta
cctccaATG

```



7.1.6. La bioinformática al servicio de ABI4 – parte 2

7.1.6.1. Análisis *in silico* de los fragmentos de las regiones regulatorias 5' de los

genes *ABI4*, *ABI5* y *SBE2.2* empleados en los ensayos EMSA

El gen *ABI4* está sujeto a una regulación muy estricta, y aparentemente, la proteína *ABI4* también (Soderman *et al.* 2000; Bossi 2002; Arroyo *et al.* 2003; Penfield *et al.* 2006; Bossi *et al.* 2009, sección 8.1.1 de esta tesis). Además, *ABI4* es un regulador de la expresión génica cuya función parece ser muy compleja (Acevedo-Hernandez *et al.* 2005; Koussevitzky *et al.* 2007; Bossi *et al.* 2009). El factor *ABI4* tiene una actividad dual como modulador transcripcional, y es capaz de unirse de manera eficiente a múltiples variantes del elemento en *cis* CACCG sobre el DNA (Niu *et al.* 2002; Acevedo-Hernandez *et al.* 2005; Koussevitzky *et al.* 2007; Bossi *et al.* 2009). Con el objetivo de tratar de dilucidar de que manera *ABI4* realiza su función dual, se realizó un análisis *in silico* cuyo resultado se detalla a continuación.

Acevedo-Hernandez *et al.* 2005 plantearon que la función represora de *ABI4* es dependiente de la competencia entre las cajas G y S, las cuales se localizan cercanamente sobre el DNA. Así, la competencia reversible entre la(s) proteína(s) que se une(n) a la caja G y la proteína *ABI4* por la unión a sus cajas de DNA correspondientes (G y S, respectivamente), y la abundancia de dichas proteínas en las células en cada momento dado, son en última instancia las responsables del efecto final sobre la expresión de los genes fotosintéticos. Si bien este modelo de acción resulta adecuado para explicar la regulación transcripcional de los genes fotosintéticos en condiciones de alta glucosa y luz (Acevedo-Hernandez *et al.* 2005; Koussevitzky *et al.* 2007), no explica satisfactoriamente la función de *ABI4* ni como activador ni como represor de otros genes, que carecen de una caja G cercana a la caja S (Nakabayashi *et al.* 2005; Bossi *et al.* 2009).

Siguiendo con esta misma línea de pensamiento pero ahora aplicada a los genes que se regulan de manera positiva por *ABI4*, se buscó algún tipo de secuencia conservada en las regiones promotoras de los genes *ABI4*, *ABI5* y *SBE2.2*, cuya regulación positiva directa a través de *ABI4* ha sido demostrada experimentalmente (Bossi *et al.* 2009). Un resultado preliminar indicó que existe una secuencia CTc/tTT conservada en los fragmentos empleados para los EMSA (Figura 25). Interesantemente, esta secuencia está presente en los promotores de *ABI4*, *ABI5* y *SBE2.2*. a una distancia similar de 35-36 pb de la caja CE-1 (Figura 25). Sin embargo, es muy difícil de explicar cual podría ser la relación (si es que hay alguna) entre CACCG y CTCTT. Esta secuencia es idéntica a la reportada como una secuencia consenso de los elementos OSE (de expresión específica de órgano) característicos de los

promotores que se activan en las células infectadas de los nódulos radicales de soya (Stougaard *et al.* 1990). La relevancia de este elemento en la interacción de la proteína ABI4 (si es que tiene alguna) deberá de ser determinada experimentalmente en un futuro, por ejemplo a través de ensayos de expresión transitoria en protoplastos y mutagénesis dirigida.

Figura 25 - Alineamiento de las secuencias CACCG y Ctc/TTT de las secuencias regulatorias 5' de los genes *ABI4*, *ABI5* y *SBE2.2*. La distancia entre ambos motivos se indica en pares de bases (pb) entre paréntesis.

ABI4 CACCG (32bp) caccCTCTTc
ABI5 CACCG (32bp) caccCTTTTc
SBE2.2 CACCG (35bp) CTCTT

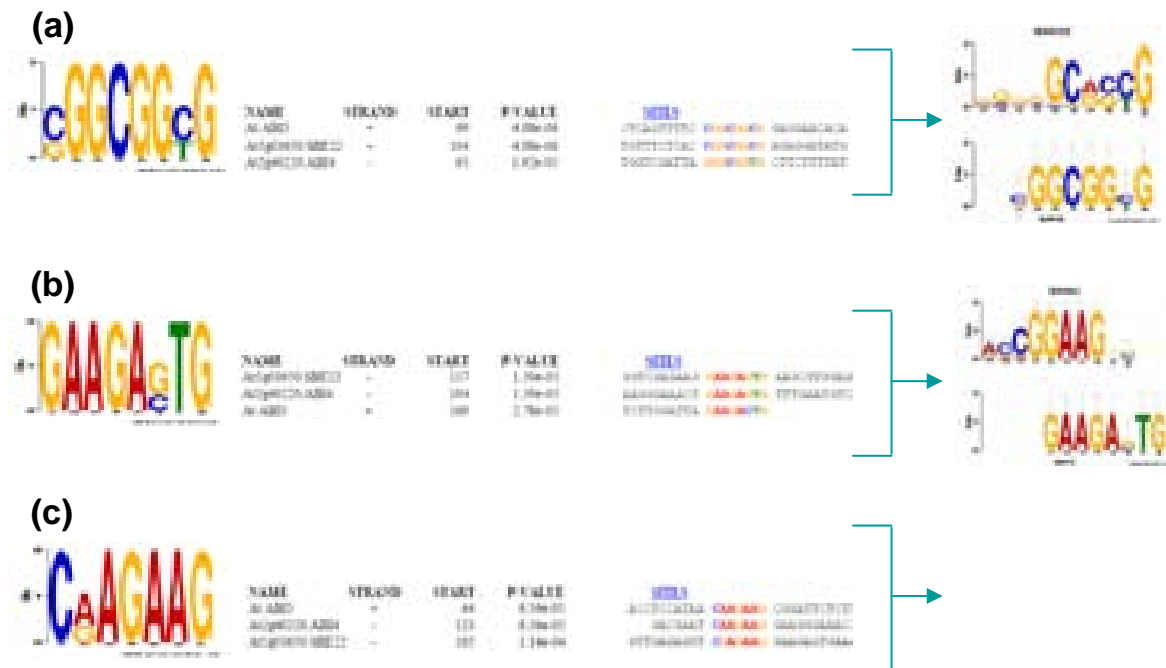


Figura 26 – Secuencias en *cis* conservadas en las regiones de DNA empleadas para los EMSA (Figura 1 en Bossi *et al.* 2009; Apéndice I) según el programa TOMTOM.

La secuencia en (a) corresponde a una caja CE-1 del gen *ABI4* a la cual se une la proteína ABI4 de maíz. La secuencia en (b) es altamente similar a la secuencia de unión al DNA de los factores de transcripción Ets de mamíferos denominada GABTA. La secuencia en (c) no se parece a ningún elemento conocido hasta el momento.

Por otro lado, la búsqueda de secuencias conservadas entre los 3 fragmentos analizados por EMSA (Figura 1) se realizó también usando el programa TOMTOM (Gupta *et al.* 2007; <http://noble.gs.washington.edu/proj/tomtom>). La figura 26 ilustra el resultado obtenido con dicho programa y donde se observa que se distinguen al menos

3 secuencias conservadas entre los fragmentos de *ABI4*, *ABI5* y *SBE2.2*. Una de ellas corresponde a una caja de *ABI4* (Figura 26 (a)). Otra de las secuencias identificadas corresponde a una secuencia con una alta homología al elemento *en cis* GABTA de mamíferos (Figura 26 (b)), el cual une a factores transcripcionales de la familia Ets quienes participan en la regulación del crecimiento celular y desarrollo en mamíferos (Wasylyk *et al.* 1993). La última secuencia en común entre *ABI4*, *ABI5* y *SBE2.2* no se parece a ningún motivo conocido en la base de datos (Figura 26 (c)).

7.1.6.2. Predicción *in silico* de nuevos genes blanco directos de la proteína *ABI4*

El análisis comparativo del transcriptoma de plántulas Col-0 y plántulas *abi4* en respuesta a alta glucosa es la mejor estrategia para predecir genes blanco a gran escala. Sin embargo, debido a que este análisis no ha sido realizado ^(*), se desarrollaron estrategias bioinformáticas con criterios de búsqueda alternativos con el objetivo de tratar de encontrar *in silico* más posibles blancos de *ABI4*. Las estrategias y sus resultados se detallan en las Tablas S2, S3, S4 y S5 (Apéndice II). Todas las estrategias utilizan bases de datos de plantas previamente publicadas en la literatura. Las bases de datos empleadas no fueron generadas durante el transcurso de esta tesis. Lo único novedoso fue el análisis *in silico* realizado de las bases de datos.

La estrategia de la Tabla S2 deriva del análisis *in silico* de los fragmentos de los promotores de los genes *ABI4*, *ABI5* y *SBE2.2* realizado anteriormente (sección 7.1.5.1). Este análisis mostró que la secuencia CTc/tTT está presente en los 3 fragmentos analizados a una distancia similar de la caja CACCG, el cual es el sitio de unión de *ABI4*. Debido a la consistencia de este patrón en los tres genes blanco (Figura 26) se analizó *in silico* si la presencia de una secuencia CACCG y una secuencia CTc/tTT separadas por 30 a 40 pb (CACCGN{30,40}CTc/tTT) se encuentra globalmente representada en los promotores de *Arabidopsis*. Los resultados indican que 966 promotores de *Arabidopsis* contienen esta secuencia considerando regiones regulatorias 5' de 1kb (Tabla S2; Apéndice II). La presencia de la combinación CACCGN{30,40}CTc/tTT no está enriquecida en los promotores (1kb) de *Arabidopsis* con respecto a varias secuencias control. El 3% (27 genes) de estos genes candidatos con CACCGN{30,40}CTc/tTT se encuentran desregulados en semillas *abi4*. Por lo

^(*) Dicho microarreglo ha sido realizado en el laboratorio de la Dra Patricia León en febrero del 2009. Sin embargo, el análisis final de los datos aún no se ha completado. Sería interesante comparar en un futuro los resultados del microarreglo con los datos obtenidos *in silico* descritos en esta tesis.

tanto, estos genes son buenos candidatos como blancos de ABI4, cuya regulación positiva podría depender de la presencia de la proteína ABI4 en semillas. En la Tabla S2.1. (Apéndice II) se detalla la identidad de estos candidatos. Interesantemente, sólo 2 de los 27 genes candidatos se encuentran desregulados tanto en semillas secas como embebidas de la mutante *abi4*, sugiriendo que el factor ABI4 participa en la expresión de un subconjunto de genes diferentes en semillas secas con respecto a las semillas embebidas. El análisis ontológico utilizando la base de datos MIPS (http://mips.gsf.de/proj/funecatDB/search_main_frame.html) (Ruepp *et al.* 2004) de las categorías funcionales a las que pertenecen estos candidatos (Tabla S2.1, Apéndice II) indicó que la categoría más representada en semilla seca corresponde a las proteínas implicadas en interacción con el ambiente/respuestas a agua ($P=7.66e-04$); mientras que en semillas embebidas destacan las categorías metabolismo/biosíntesis de glutamina ($P=2.00e-03$), rescate celular, defensa y virulencia/respuestas a choque térmico ($P=1.46e-03$) e interacción con el ambiente/respuestas a agua ($P=6.61e-05$). Coherentemente con los niveles de expresión del promotor del gen *ABI4*, el número de genes candidatos en semillas embebidas (19 genes) es mayor al número obtenido en las semillas secas (10 genes) (Tabla S2.1; Apéndice II).

La estrategia de la Tabla S3 (Apéndice II) depende del hecho de que los genes co-regulados, muchas veces, son modulados directamente por las mismas proteínas regulatorias. Así, se aislaron 15 posibles candidatos, cuya validez real como blancos deberá de determinarse experimentalmente. En particular, resulta interesante el gen candidato *At2g14520*, de función desconocida, que se regula en respuesta a azúcares, y cuya expresión esta desregulada en semillas *abi4*. Los genes que codifican para proteínas regulatorias como *At2g20100* y *At2g46020* también merecen especial interés.

Por otro lado, la estrategia desarrollada en la Tabla S4 se diseñó con el objetivo de identificar genes que se regulen por glucosa (Palenchar *et al.* 2004; Price *et al.* 2004; Li *et al.* 2006) y cuya regulación dependa de la proteína ABI4 en semillas (Nakabayashi *et al.* 2005). La comparación entre ambas bases de datos aisló 801 genes candidatos (Tabla S4, Apéndice II). Mediante el empleo del programa PROMOMER (http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/BAR_Promomer.cgi) se identificaron 140 genes, los cuales contienen la secuencia CACCG en sus promotores, y 464 genes con la secuencia CCAC (Tabla S4, Apéndice II). Estos candidatos se sometieron a un filtrado posterior considerando el tipo de regulación dada por la presencia de ABI4 en semillas. 57 genes putativos se identificaron como blancos de regulación positiva dependiente de

ABI4 (Tabla S4, Apéndice II), y 323 como blancos de regulación negativa dependiente de ABI4 (Tabla S4, Apéndice II). Sin embargo, un análisis minucioso de estos 380 genes candidatos será necesario para identificar los blancos reales de ABI4.

Finalmente, la estrategia de la Tabla S5 (Apéndice II) también arrojó resultados interesantes. El análisis de los genes desregulados en semillas secas y embebidas de *abi4* indica que la proteína ABI4 participa en la regulación positiva (2x o mayor) del 3% de los genes de *Arabidopsis* y en la regulación negativa (2x o mayor) del 6 % de los genes de *Arabidopsis* (Nakabayashi *et al.* 2005). La búsqueda de genes que contienen la caja CACCG en sus promotores dentro del total de genes desregulados en las semillas mutantes *abi4* respecto de la silvestre identificó 55 genes candidatos, cuya expresión depende de la presencia de ABI4 en semillas y cuyos promotores contienen al menos una caja CACCG (Tabla S5.1, Apéndice II). De manera coherente con el máximo nivel de expresión del mensajero de *ABI4*, la mayoría de los genes que cumplen con los criterios arriba mencionados se expresan en semillas embebidas (Figura 27). El análisis de las categorías funcionales a las que pertenecen los genes candidatos (http://mips.gsf.de/proj/funcatDB/search_main_frame.html) (Ruepp *et al.* 2004) indicó que la categoría más sobrerrepresentada en semillas secas corresponde a la interacción con el ambiente/respuestas a agua ($P=1.12e-03$). En semillas embebidas, las categorías funcionales sobrerrepresentadas incluyen interacción con el ambiente/respuestas a agua ($P=9.54e-04$) y desarrollo ($P=2.49e-04$), en esta última destacan las siguientes sub-categorías: desarrollo del embrión ($P=3.06e-07$) y desarrollo de la planta ($P=6.90e-05$). Interesantemente, un análisis más detallado de los promotores de los 55 candidatos indicó que todos ellos contienen al menos una secuencia CTc/tTT, aunque solo el 24% (13 genes) cumple con una separación de 20-50 pb entre la caja CACCG y la secuencia CTc/tTT (Tabla S5.1, Apéndice II).

Por otro lado, el análisis del conjunto de genes candidatos desregulados en semillas *abi4* indicó que 77 de estos genes contienen el motivo CCAC en sus promotores (Tabla S5.2, Apéndice II), destacándose los genes que se desregulan en semillas secas de *abi4* (Figura 27). Sorprendentemente, la categoría funcional más sobrerrepresentada en este caso corresponde a transporte/transporte de lípidos y ácidos grasos ($P=3.23e-03$).

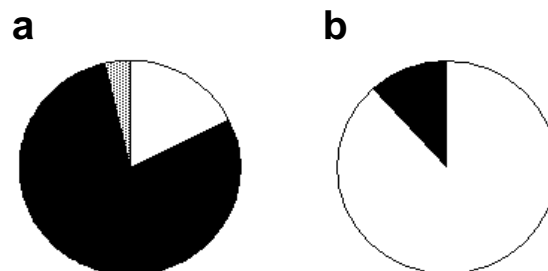
Figura 27 - Representación gráfica de los datos de la tabla S5.

a) Número de genes desregulados en semillas *abi4* (función activadora de ABI4) que tienen al menos una caja CACCG en sus promotores.

- ▨ Semilla seca y embebida
- Semilla seca
- Semilla embebida

b) Número de genes desregulados en semillas *abi4* (función represora de ABI4) que tienen al menos un motivo CCAC en sus promotores.

- Semilla seca



Con el objetivo de determinar si estas diferentes estrategias son redundantes, se compararon las listas de los genes candidatos obtenidos a partir de cada una de las estrategias (Tablas S2.1, S3, S4, S5.1 y S5.2). El resultado de la comparación indicó que sólo el 0.4% de los genes (2 genes) regulados positivamente por ABI4 son aislados como blancos putativos por las cuatro estrategias empleadas, y el 4.25% de los genes (17 genes) regulados negativamente por ABI4 se identificaron en común a partir de las 2 estrategias utilizadas para este caso (Tabla S6). Esto sugiere que las estrategias no son redundantes y que cada una de ellas ofrece una lista cuasi independiente de genes cuya abundancia de transcrito depende directa y/o indirectamente de la presencia del factor de transcripción ABI4 en las células. El análisis experimental de los blancos reales del factor ABI4 será el último determinante de si las estrategias *in silico* empleadas en esta sección son herramientas exploratorias adecuadas.

8. Discusión

8.1. La proteína ABI4: personalidad y presencia.

El patrón de expresión del gen *ABI4* está finamente regulado por el desarrollo en semillas y plántulas de *Arabidopsis thaliana* (Soderman *et al.* 2000; Arroyo *et al.* 2003; Penfield *et al.* 2006; Bossi *et al.* 2009). En particular, la expresión del promotor de *ABI4* se observa desde la maduración de las semillas hasta el período postgerminativo que implica el establecimiento de las plántulas jóvenes (Soderman *et al.* 2000; Arroyo *et al.* 2003; Penfield *et al.* 2006; Bossi *et al.* 2009). En condiciones normales de crecimiento, la mayor cantidad de transcrito de *ABI4* se detecta durante el inicio de la germinación en respuesta a la imbibición de las semillas (Arroyo *et al.* 2003; Nakabayashi *et al.* 2005). Estos niveles van disminuyendo a medida que las plántulas crecen hasta que finalmente la expresión del promotor de *ABI4* ya no se detecta en plantas adultas (Arroyo *et al.* 2003; Bossi *et al.* 2009). El mensajero de *ABI4* también está estrictamente regulado por distintas señales internas y externas en *Arabidopsis*, entre las que se incluyen los azúcares glucosa y trehalosa, el estrés osmótico, y las fitohormonas: ABA, auxinas y etileno (Soderman *et al.* 2000; Bossi 2002; Arroyo *et al.* 2003; Penfield *et al.* 2006; Ramón *et al.* 2007; Bossi *et al.* 2009; Figura 1 en Apéndice III). Así, el gen *ABI4* está extensamente regulado durante el establecimiento inicial de la plántula sugiriendo que actúa como un integrador de las señales internas y externas para determinar el momento adecuado para la germinación y el establecimiento de la plántula.

Si bien la expresión del gen *ABI4* ha sido ampliamente caracterizada, la proteína ABI4 y sus características bioquímicas siguen siendo un misterio. Esto se debe parcialmente a que la proteína ABI4 ha resultado “escurridiza” y difícil de estudiar. Hasta el momento no se ha detectado a la proteína ABI4 en semillas ni en plantas de *Arabidopsis*. Ninguno de los intentos encaminados a analizar la proteína ABI4 endógena resultó exitoso, incluyendo la sobre expresión constitutiva del transgén *ABI4-HA* en plantas transgénicas de *Arabidopsis* y la correspondiente detección de la proteína usando anticuerpos comerciales (Figura 15). Estos datos indicaron que el aumento de la cantidad del mRNA de *ABI4* no es suficiente para incrementar proporcionalmente la cantidad de proteína, sugiriendo que mecanismos de regulación post-transcripcionales mantienen al nivel de la proteína ABI4 por debajo del límite de detección del anticuerpo. En plantas se han descrito diferentes mecanismos de regulación post-transcripcional. Sin embargo, hasta la fecha no hay evidencias directas de que ningún mecanismo

específico controle la estabilidad de la proteína ABI4 de *Arabidopsis*. Las secuencias PEST son motivos pequeños enriquecidos en prolina, ácido glutámico, serina y treonina, que se implican en dirigir a degradación diferentes proteínas (Rechsteiner y Rogers 1996). La secuencia de la proteína ABI4 contiene una secuencia PEST predicha (residuos 22-40), por lo tanto el control del nivel de proteína ABI4 mediante degradación es una hipótesis tentadora. Aunque la funcionalidad de este motivo aún debe comprobarse *in vivo*, resulta interesante el hecho de que la secuencia PEST está conservada en las secuencias proteicas de ABI4 de dicotiledóneas (*Arabidopsis thaliana*, *Vitis vinifera*, *Populus trichocarpa*), pero no de monocotiledóneas (maíz y arroz) (Tabla 9), sugiriendo un mecanismo de regulación diferente para los distintos ortólogos de ABI4 y podría explicar porque es posible sobre expresar exitosamente a la proteína ABI4 de maíz en *Arabidopsis* (Niu *et al.* 2002). Estos datos también coinciden con las diferencias observadas con respecto a expresión y función entre ABI4 de *Arabidopsis* (expresión en semillas y plántulas; función propuesta: punto de control postgerminativo; Arroyo *et al.* 2003) y ABI4 de maíz (expresión exclusiva de semillas; función propuesta: desarrollo y maduración de semillas; Niu *et al.* 2002).

La proteína ABI4 es un elemento efector de la vía de señalización dependiente de HXK descrita en la Figura 2 (a) de la introducción (Arenas-Huertero *et al.* 2000; Bossi 2002). Otro elemento muy relacionado a ABI4 y que participa en la misma vía de señalización en respuesta a azúcares es el factor de transcripción de la familia bZIP ABI5 (Figuras 7 y 8; Arenas-Huertero *et al.* 2000, Brocard *et al.* 2002). Resulta interesante que la estabilidad de la proteína ABI5 está regulada por ABA mediante eventos de ubiquitinación y posterior degradación por el proteosoma (López-Molina *et al.* 2003). Esto depende de la interacción de ABI5 con una proteína específica denominada AFP (proteína que une a ABI5), la cual fue identificada por su capacidad de unirse a ABI5 en un ensayo de dos híbridos (López-Molina *et al.* 2003). Es probable que los efectores finales (como los factores de transcripción, Figura 3) de una misma vía de señalización compartan el mismo mecanismo regulatorio. Por lo tanto, es posible especular que una estrategia como la utilizada para ABI5 podría ser exitosa para explorar en más detalle la posibilidad de que la estabilidad de ABI4 esté regulada en respuesta a glucosa y/o ABA.

A pesar de los esfuerzos invertidos, el factor ABI4 y sus dominios aún no se han caracterizado en detalle, así tampoco como los mecanismos que controlan los niveles de ABI4 en las plantas. El desarrollo de nuevas estrategias de estudio, como por

ejemplo la generación de proteínas con deleciones en diferentes dominios estructurales o una aproximación similar a aquella empleada para caracterizar la estabilidad del factor ABI5 (López-Molina *et al.* 2003), será necesario para continuar con la caracterización de ABI4 y su rol durante la señalización por azúcares en plantas superiores.

8.2. El factor de transcripción ABI4: función y blancos de acción.

8.2.1. Blancos directos e indirectos: estrategias de análisis *in silico*.

Una estrategia muy popular últimamente para identificar genes blanco consiste en encontrar elementos *en cis* comunes a un grupo de genes co-regulados mediante el análisis *in silico* de los promotores de dichos genes (Thijs *et al.* 2001; Zhang *et al.* 2005; Cheung *et al.* 2006; Rhee *et al.* 2006; Vandepoele *et al.* 2006). Uno de los problemas de esta estrategia es que si se usan todos los genes que se co-regulan positivamente y/o negativamente, se están incluyendo blancos directos e indirectos con los cuales es probable que se enmascaren las secuencias *en cis* reales, y se obtengan como resultados falsos positivos. Esta estrategia se vuelve más confiable (aunque menos específica) si se emplea para el análisis un subconjunto de genes que cumplan con varios criterios, por ejemplo, pertenezcan a la misma vía biosintética y co-regulen su expresión de manera similar.

Para el caso de esta tesis, el interés era identificar genes blanco del factor ABI4 que presentasen a la caja tipo CE-1 en sus promotores y cuya regulación fuera relevante para la señalización por glucosa en plántulas jóvenes de *Arabidopsis*. Como primera estrategia se buscó la caja tipo CE-1 en los promotores de todos los genes de *Arabidopsis*. 22558 genes presentan la secuencia CACCG (caja tipo CE-1) si se consideran regiones regulatorias 5' de 3kb. Si se considera una región regulatoria 5' de 1kb, el número de genes disminuye a 11570 empleando el programa Pattern Matching o Patmatch (<http://www.arabidopsis.org/cgi-bin/patmatch/nph-patmatch.pl>), y a 8101 usando el programa PROMOMER (http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/BAR_Promomer.cgi). Esto indica que la caja tipo CE-1 es muy abundante en el genoma, por lo tanto seguir una estrategia de este tipo para identificar blancos directos reales es como buscar una aguja en un pajar. Por consiguiente, se desarrolló una estrategia más sencilla para cumplir con los objetivos de esta tesis. Primero se identificaron genes cuya regulación en respuesta a glucosa estuviera alterada en mutantes *abi4*, y de ellos se descartaron aquellos que no contenían una caja CACCG

perfecta en sus promotores. Así, 4 genes se escogieron para su análisis posterior. Esta estrategia resultó exitosa ya que los genes escogidos resultaron ser blancos reales de ABI4 (Bossi *et al.* 2009; Rook *et al.* 2006b). Una aproximación de este tipo resulta interesante de ser aplicada para el análisis de datos obtenidos a partir de microarreglos que reporten genes desregulados en *abi4*, ya sea durante el desarrollo o durante las respuestas a azúcares y/o ABA.

A la fecha sólo se ha publicado un análisis del transcriptoma de semillas *abi4*, el cual indicó que la expresión del 3-6 % de los genes de *Arabidopsis* depende de ABI4 directa y/o indirectamente en semillas (Nakabayashi *et al.* 2005). Ahora bien, son todos ellos blancos directos de ABI4? Una manera de acercarnos a discernir cuáles serían blancos directos y cuáles no es mediante el uso de la estrategia empleada durante esta tesis para aislar genes candidatos. El análisis *in silico* de la presencia de las cajas CACCG o el motivo CCAC en los genes desregulados en semillas *abi4* arrojó un número alto de genes blanco putativos (Tablas S5.1 y S5.2). Ensayos experimentales futuros iluminarán si esta estrategia *in silico* (Tabla S5) y/o las estrategias de las Tablas S2, S3 y S4 resultan útiles para la selección de genes candidatos. Sería interesante poder contrastar estos datos *in silico* con los resultados obtenidos a partir de un análisis de microarreglos realizado recientemente en el laboratorio, ya que en ese estudio se compararon los genes que responden a glucosa en plántulas Col-0 y plántulas *abi4*. Lamentablemente, el análisis de los datos de microarreglos aún no se ha finalizado.

8.2.2. Realidad virtual o ciencia ficción ?

Resulta altamente interesante (y contradictorio) que las estrategias *in silico* presentadas en las Tablas S2, S3, S4 y S5 no identifican a los genes *ABI5* y *SBE2.2* como blancos de la proteína ABI4. La revisión de los criterios empleados para las estrategias mencionadas dejó en claro que ésto se debe principalmente a dos razones diferentes asociadas a los criterios de selección utilizados.

Uno de los criterios empleados en las estrategias de las Tablas S2-S5 para elegir genes candidatos como blancos de ABI4 es que su expresión esté desregulada en semillas *abi4*. La expresión del gen *SBE2.2* no se afecta en semillas de *abi4* y, por lo tanto, las estrategias lo descartan como candidato. El otro criterio de selección utilizado corresponde a la presencia de cajas de unión a ABI4 reportadas en la literatura para lo cual se empleó el programa PROMOMER. Este programa analiza solamente las regiones promotoras regulatorias de los genes de *Arabidopsis* en sentido 5' - 3'. Debido

a que la caja CACCG de *ABI5* se encuentra en la región 5' líder no traducida, el programa PROMOMER lo descarta como blanco de *ABI4*.

La incongruencia entre los blancos detectados *in silico* y los blancos reales analizados durante esta tesis señala que las estrategias *in silico* son solamente elementos exploratorios. El análisis de datos de expresión y función deberán de tenerse en cuenta para estimar la validez real de cada uno de los candidatos propuestos por las estrategias *in silico*, aún antes de iniciar la validación experimental.

8.2.3. Los blancos directos de *ABI4* en respuesta a glucosa

Recientemente, se caracterizaron algunos blancos directos de *ABI4* (Acevedo *et al.* 2005, Rook *et al.* 2006b, Koussevitzky *et al.* 2007, Bossi *et al.* 2009) que pertenecen a las siguientes categorías: genes fotosintéticos (Acevedo *et al.* 2005, Koussevitzky *et al.* 2007), genes relacionados con el metabolismo de almidón (Rook *et al.* 2006b, Bossi *et al.* 2009), y factores de transcripción (Bossi *et al.* 2009).

En 2002, la secuencia CACCG (tipo CE-1) se reportó como la caja de unión al DNA para la proteína *ABI4* de maíz *in vitro* (Niu *et al.* 2002). En base a su localización sobre el promotor, se propuso que *ABI4* actuaría como un represor de su propia transcripción (Niu *et al.* 2002). Posteriormente, Bossi *et al.* (2009) corroboraron que *ABI4* se une *in vivo* a la caja CE-1 sobre su propio promotor en *Arabidopsis*, pero inesperadamente, *ABI4* autoreguló de manera positiva su expresión durante el desarrollo y en respuesta a las señales de glucosa, ABA y estrés osmótico. Más aún, la autorregulación transcripcional de *ABI4* controla su expresión general durante la mayor parte de la germinación, el desarrollo de las plántulas, y las respuestas a azúcar, ABA y osmótico (Bossi *et al.* 2009). Estos resultados sugirieron que *ABI4* es el principal regulador de su expresión en *Arabidopsis* (Bossi *et al.* 2009).

Por otro lado, evidencias genéticas apoyan la participación de otras dos proteínas, *CBL9* y *GSQ5/DOG1*, en la regulación de la expresión de *ABI4* en respuesta a ABA y glucosa durante la germinación y el establecimiento temprano de la plántula (Pandey *et al.* 2004; Teng *et al.* 2008). El gen *GSQ5/DOG1* (At5g45830) codifica para la proteína DELAY OF GERMINATION1 cuya expresión es específica de semillas, y que está implicada en el control de la dormancia (Teng *et al.* 2008). En particular, *DOG1* aumenta la expresión de *ABI4* en respuesta a glucosa durante la vía de señalización por azúcares mediada por ABA (Teng *et al.* 2008), sugiriendo que *DOG1* es un regulador positivo de la expresión de *ABI4*. Serán necesarios más estudios para determinar si

DOG1 es un regulador directo, si interactúa con la proteína ABI4 para regular al gen *ABI4*, y eventualmente si DOG1 tiene alguna participación en la actividad residual del transgén *pABI4::GUS* que se observa en las cruces *abi4 x pABI4::GUS* (Bossi *et al.* 2009). Por otro lado, CBL9 codifica para una proteína similar a calcineurina B que parece actuar como un regulador de las respuestas a ABA y a estrés (a través de controlar los niveles de calcio) durante la germinación de *Arabidopsis* y el establecimiento temprano de las plántulas (Pandey *et al.* 2004). El análisis de las plántulas *cb19* demostró que CBL9 modula negativamente la acumulación del transcrito de *ABI4* (así como de *ABI3* y *ABI5*) en respuesta a glucosa, ABA y manitol, sugiriendo que la proteína CBL9 participa en el control de los niveles de expresión de estos genes (Pandey *et al.* 2004). Aún faltan más estudios para precisar la relación funcional entre CBL9 y las proteínas regulatorias *ABI* que participan en la señalización por ABA y glucosa durante la germinación y el establecimiento temprano de la plántula de *Arabidopsis*.

Aún no se ha aislado ninguna proteína de plantas que interactúe físicamente con ABI4. Por lo cual sería interesante explorar si las proteínas mencionadas en el párrafo anterior u otras aún no identificadas son probables interactores de ABI4 dentro de la red transcripcional que controla la expresión de ABI4 durante el desarrollo y las respuestas a azúcares, osmótico y fitohormonas.

El factor de transcripción bZIP ABI5, implicado en la señalización por azúcares y ABA, también resultó ser blanco directo de la proteína ABI4 (Bossi *et al.* 2009). En *Arabidopsis*, el transcrito de *ABI5* presenta su máximo nivel de expresión en semillas secas (Lopez-Molina *et al.* 2001; Brocard *et al.* 2002; Nakabayashi *et al.* 2005), el cual es independiente de la presencia de la proteína ABI4 (Nakabayashi *et al.* 2005) y parcialmente dependiente de la presencia de ABI5 (Brocard *et al.* 2002; Nakabayashi *et al.* 2005). Esto sugiere que ABI4 no es un regulador importante directo de *ABI5* en esta etapa del desarrollo. Por otro lado, la acumulación del mensajero de *ABI5* se incrementa en respuesta a glucosa y ABA en plántulas jóvenes (Brocard *et al.* 2002; Arroyo *et al.* 2003). Dicho aumento en los niveles del mensajero de *ABI5* es dependiente del factor de transcripción ABI4 en plántulas de *Arabidopsis* (Arroyo *et al.* 2003; Bossi *et al.* 2009; Figura 20a). Interesantemente, la proteína ABI5 también es parcialmente necesaria para la respuesta a ABA y glucosa del gen *ABI5* en plántulas transgénicas que portan al gen reportero GUS bajo la regulación del promotor de ABI5 (*pABI5::GUS*) de diferentes edades (Brocard *et al.* 2002). Los resultados publicados por Brocard *et al.* (2002) y

Bossi *et al.* (2009) tomados en conjunto sugieren que tanto ABI4 como ABI5 podrían interactuar para modular la expresión del gen *ABI5* en respuesta a glucosa y ABA. Numerosas evidencias genéticas apoyan que ABI5 y ABI4 se regulan entre sí y están estrechamente asociados en la vía de señalización por glucosa que controla los eventos postgerminativos (Arroyo *et al.* 2003). Sin embargo, los intentos por demostrar la interacción heterodimérica proteína-proteína entre ABI4 y ABI5 no han sido exitosos (Nakamura *et al.* 2001; Gampala *et al.* 2002), aunque una posible interacción a nivel de proteína entre estos factores de transcripción en un complejo compuesto por múltiples proteínas aún no se descarta en *Arabidopsis*.

La respuesta a glucosa de los genes relacionados con la biosíntesis del almidón, como la subunidad grande de la ADP-glucosa pirofosforilasa (*APL3*) y la enzima ramificadora de almidón (*SBE2.2*), está afectada en las hojas de plantas *abi4* (Rook *et al.* 2001). Más recientemente, se demostró que la regulación transcripcional de ambos genes depende de la interacción directa del factor de transcripción ABI4 sobre las regiones promotoras de *APL3* y *SBE2.2* (Rook *et al.* 2006b; Bossi *et al.* 2009). Rook *et al.* (2006b) analizaron la expresión del promotor de *APL3* y concluyeron que ABI4 es un activador débil de su expresión en respuesta a glucosa, cuya fuerza se potencia si actúa en conjunto con la proteína (aún desconocida) que se une a la secuencia S3S1. Por otro lado, la expresión de *APL3* en respuesta al azúcar trehalosa es independiente de ABI4, sugiriendo que la presencia de la proteína ABI4 es relevante para la respuesta a glucosa únicamente (Ramón *et al.* 2007). En el caso del gen *SBE2.2*, Bossi *et al.* (2009) demostraron que la interacción entre proteína ABI4 y la región promotora 5' de *SBE2.2* depende de la secuencia CACCGGCGGCG, que incluye dos secuencias tipo CE-1 en tandem. Al igual que en el promotor de *APL3*, una caja tipo S3S1 también está presente en el promotor de *SBE2.2*. Aún se desconoce si el elemento S3S1 presente en el promotor de *SBE2.2* es funcional, y si tiene alguna relevancia para la señalización por glucosa dependiente de ABI4. A diferencia de lo que se observa en el caso de la autoregulación de ABI4, la participación de la proteína ABI4 para modular la expresión de otros genes, como *APL3* y *SBE2.2* parece estar sujeta a la acción cooperativa con otras proteínas; y el impacto que ABI4 tiene sobre la expresión de estos genes depende en última instancia del momento del desarrollo, del tipo de respuesta y de la presencia de otras proteínas regulatorias.

La actividad dual del factor de transcripción ABI4 durante las respuestas a azúcares se ha confirmado recientemente (Acevedo *et al.* 2005; Koussevitzky *et al.*

2007). La expresión de los genes fotosintéticos, incluidos *CAB*, *PC*, *RBCS*, y *Lhcb*, se regula negativamente por azúcares (Arenas-Huertero *et al.* 2000; Acevedo *et al.* 2005, Koussevitzky *et al.* 2007). Esta respuesta negativa ya no se observa en las plántulas *abi4*, sugiriendo la participación de ABI4 en la represión por glucosa de varios genes fotosintéticos (Arenas-Huertero *et al.* 2000; Acevedo *et al.* 2005; Koussevitzky *et al.* 2007). Acevedo *et al.* (2005) demostraron que el factor de transcripción ABI4 se une directamente a la caja S (CACCTCCA) sobre el promotor de *RBCS* reprimiendo así la expresión de *RBCS* en respuesta a glucosa y ABA en plántulas jóvenes de *Arabidopsis*. Más recientemente, el análisis de la expresión de otro gen relacionado a fotosíntesis, *Lhcb*, demostró que ABI4 también participa en la modulación de su expresión en respuesta a glucosa y a la señalización retrógrada del cloroplasto (Koussevitzky *et al.* 2007). Ensayos de un híbrido en levaduras realizados con el promotor de *Lhcb* indicaron que ABI4 reprime la expresión del gene *Lhcb* por su unión directa a la secuencia CCAC sobre el promotor (Koussevitzky *et al.* 2007).

Hasta la fecha se ha concluido que 6 genes de *Arabidopsis* son blancos directos de la proteína, cuya interacción física y relevancia fisiológica se ha demostrado experimentalmente (Acevedo *et al.* 2005; Rook *et al.* 2006b; Koussevitzky *et al.* 2007; Bossi *et al.* 2009). Debido a que la expresión del gen *ABI4* en respuesta a glucosa depende de la vía de HXK (Bossi 2002) y a que ABI4 es un elemento de dicha vía (Arenas-Huertero *et al.* 2000), es posible sugerir que el factor ABI4 regula la expresión de sus genes blancos en respuesta a la cascada de señalización iniciada por la HXK (Figura 2 (a)). En la siguiente sección se discutirán los posibles mecanismos de acción que contienen con la función dual del factor ABI4 durante las respuestas a azúcares.

8.2.4. Una proteína reguladora + múltiples elementos *en cis* = ¿ caos o versatilidad funcional ?

La proteína reguladora ABI4 es el primer miembro de la sub familia ERF-EREB (familia AP2) que se reporta como un regulador dual de la transcripción mediante su unión a tres secuencias similares sobre el DNA (motivo CCAC, elemento tipo CE-1, y caja S) (Niu *et al.* 2002; Acevedo *et al.* 2005; Koussevitzky *et al.* 2007; Bossi *et al.* 2009). Una rápida observación visual del motivo CCAC (Koussevitzky *et al.* 2007) indicó que estas 4 bases podrían ser el núcleo del sitio de unión de ABI4 sobre el DNA, ya que éstas se encuentran presentes en el elemento tipo CE-1 (CACCG) propuesto por Niu *et al.* (2002) y en la caja S (CACCTCCA) reportada por Acevedo *et al.* (2005). El análisis

por mutagénesis dirigida del promotor de *RBCS* indicó que las bases CAC de la caja S son importantes para la unión de ABI4 apoyando la propuesta de que el motivo CCAC sea el núcleo de la caja de unión de ABI4. Sin embargo, experimentos de mutagénesis en la región regulatoria del gen *ABI5* de *Arabidopsis* indicaron que el motivo CCAC es dispensable para la unión ABI4 al DNA *in vitro*, sugiriendo que el elemento CCAC es diferente del elemento tipo CE-1 funcionalmente. En base a estos resultados, es posible especular que ABI4 se une a dos elementos *en cis* funcionalmente diferentes de los cuales depende, al menos parcialmente, su actividad dual: el motivo CCAC (y su variante la caja S) es importante para la represión, y la presencia del motivo tipo CE-1 correlaciona con la función activadora de ABI4. La cuantificación *in silico* de la similitud entre el motivo CE-1 y la caja S utilizando el programa TOMTOM (Gupta *et al.* 2007; <http://noble.gs.washington.edu/proj/tomtom>) apoya dicha hipótesis y corrobora que ambos elementos *en cis* son diferentes (Figura S3). Por otro lado, aunque las secuencias CCAC y CACCG están dispersas en todo el genoma de *Arabidopsis* a una tasa muy elevada, la proteína ABI4 no se une indiscriminadamente a todas ellas (Bossi *et al.* 2009). Esto sugiere que bases adicionales sobre el DNA no identificadas hasta el momento y/o la interacción cooperativa con otros elementos *en cis* serán los determinantes esenciales del tipo de interacción entre ABI4 y su promotores blanco. La caracterización *in vivo* de un mayor número de genes blanco de ABI4 será indispensable para evaluar esta propuesta.

Adicionalmente, aún falta por explorar la(s) posible(s) interacción(es) de la proteína ABI4 con otros factores de transcripción que actúan sobre sus mismos genes blancos. La participación de ABI4 con otras proteínas dentro de un complejo regulatorio transcripcional es otra alternativa para justificar y entender la actividad dual de ABI4 como factor de transcripción, especialmente al considerar que la proteína ABI4 tiene un dominio funcional de activación de la transcripción (Soderman *et al.* 2000), pero ningún dominio proteico relacionado a la función represora. Un modelo sobre la actividad represora de ABI4 dependiente de la interacción con otras proteínas fue propuesto por Acevedo *et al.* 2005 para explicar la regulación por glucosa de los genes fotosintéticos. Dicho modelo se detalla a continuación: 1- los promotores de los genes reprimidos por ABI4 contienen elementos *en cis* implicados en la regulación por luz y por carbono, 2- los elementos *en cis* correspondientes a las respuestas a carbono y luz son independientes y cada uno de ellos une su propio factor de transcripción; 3- tales elementos *en cis* se localizan muy cercanos entre sí, de manera tal que su ocupación

resulta excluyente por impedimento estérico; 4- la interacción entre el elemento de respuesta a luz y su factor de transcripción correspondiente, así como la interacción entre el elemento de respuesta a carbono (caja S) y su factor de transcripción (ABI4) resultan en una competencia reversible; 5- como consecuencia ambos factores de transcripción no pueden estar unidos al mismo tiempo al DNA; 6- la unión de ABI4 a su caja en *cis* afecta negativamente la expresión de los genes fotosintéticos debido a su acción represora (Acevedo *et al.* 2005) o a su acción de activador débil, lo cual se percibe como una represión (Rook *et al.* 2006b). Este modelo resulta adecuado para explicar el mecanismo de acción de ABI4 sobre la represión de genes fotosintéticos solamente. La función activadora de ABI4 podría explicarse también empleando un modelo similar al postulado para la represión de *RBCS* dependiente de ABI4 en respuesta a glucosa. En este caso la actividad dual de ABI4 estaría determinada por las interacciones específicas con uno o más factores de transcripción diferentes (Figura 28b). Sin embargo, hasta el momento no se ha identificado proteína que interaccione con ABI4. Por otro lado, debido a que hasta el momento, la función activadora de ABI4 correlaciona con la presencia de la caja tipo CE-1 y su actividad represora con la caja S o el motivo CCAC, la función dual de ABI4 podría depender de sobre qué tipo de caja ABI4 se une al DNA (Figura 28a; Latchman 2001). Las evidencias acumuladas hasta el momento no permiten generar un modelo único para explicar el mecanismo por el cual ABI4 ejerce su función dual como regulador transcripcional (Figura 28).

A pesar del gran avance realizado en la comprensión de la función del factor ABI4, aún faltan más estudios, como por ejemplo, identificar proteínas regulatorias que interactúen con ABI4 para clarificar la actividad dual de ABI4. Por otro lado, un análisis de expresión transitoria en protoplastos empleando como plásmido efector a un vector que sobre expresa a la proteína ABI4 y como plásmidos reporteros al gen de *LUC* regulado por las cajas mínimas de DNA sobre las que interacciona ABI4 (tipo CE-1, caja C y motivo CCAC) sería útil para empezar a entender que importancia tienen las diferentes cajas de unión para definir si ABI4 actúa como un activador o como un represor. Finalmente, me parece crucial invertir esfuerzos para tratar de identificar otros elementos de la red transcripcional (ensayos exploratorios: uso de un sistema de dos híbridos o ensayos de pulldown con la proteína recombinante GST) en la que participa ABI4 durante el desarrollo y las respuestas a diversos estímulos, como los azúcares y el estrés.

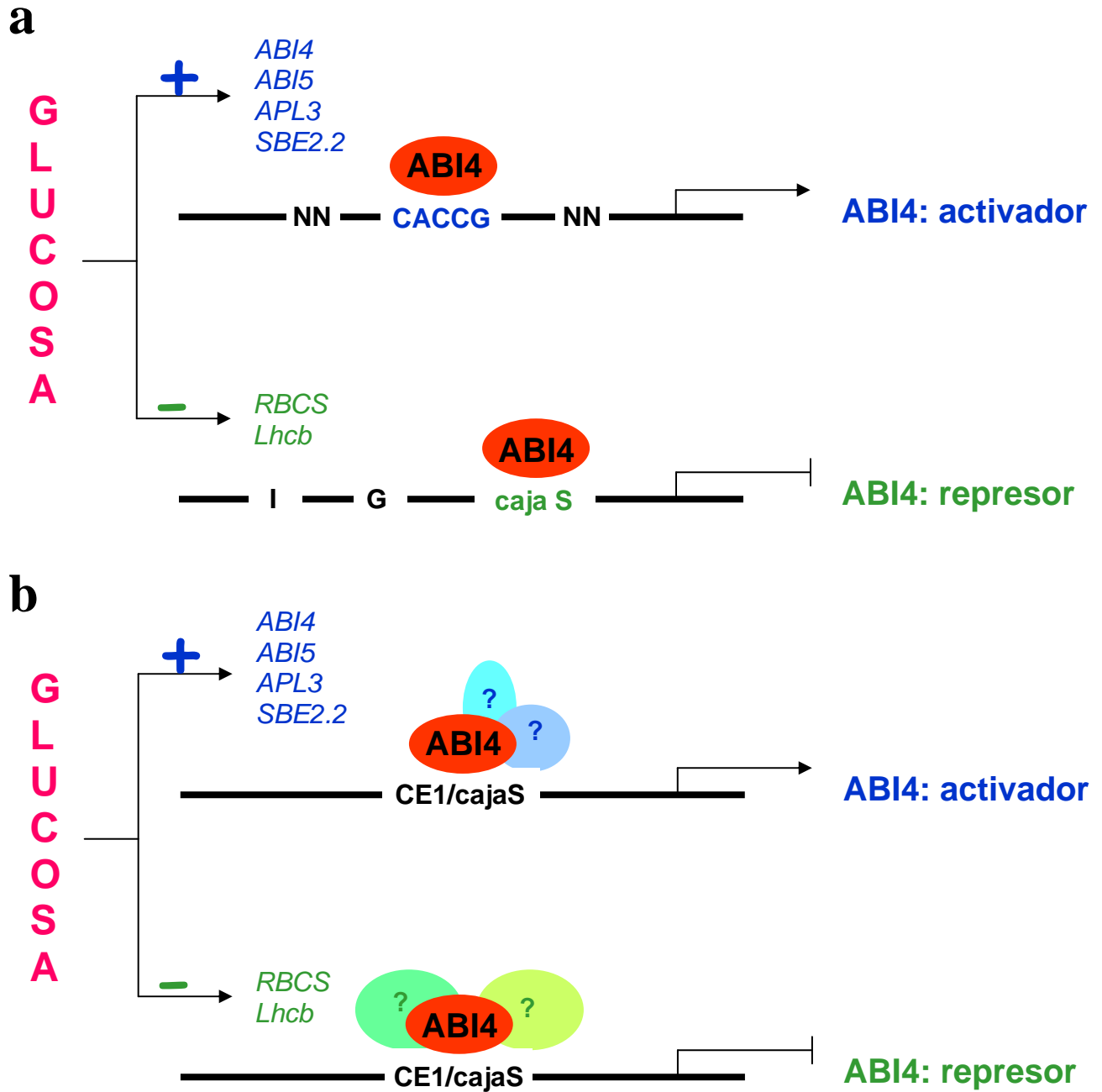


Figura 28 – Modelos propuestos para la acción dual de ABI4 sobre la expresión génica en respuesta a azúcares.

(a) Modelo dependiente de la secuencia de elementos *en cis* sobre el DNA y bases adicionales aún no identificadas.

(b) Modelo dependiente de la interacción física entre ABI4 y otras proteínas regulatorias. Los detalles y abreviaturas se encuentran descritos en el texto.

8.3. Las funciones de ABI4 durante el ciclo de vida de una planta de *Arabidopsis thaliana*.

8.3.1. ABI4 y el desarrollo de las semillas.

El desarrollo de las semillas comprende la embriogénesis y la maduración. La maduración de las semillas es un proceso esencial que se caracteriza por dos acontecimientos principales: 1 - la acumulación de las reservas de almacenamiento y 2 - la maduración/desecación de las semillas. El gen *ABI4* se expresa en embriones inmaduros de *Arabidopsis* (Soderman *et al.* 2000, Penfield *et al.* 2006, Bossi *et al.* 2009) y evidencias genéticas señalan que ABI4, junto con otros factores de transcripción ABI, está implicado en la modulación de genes específicos de semillas y / o genes regulados por ABA durante la maduración de las semillas (Soderman *et al.* 2000, Finkelstein 2002). La proteína ABI4 parece tener una responsabilidad limitada sobre la modulación de los genes que se expresan en las etapas tempranas del desarrollo de las semillas (Soderman *et al.* 2000). Sin embargo, ABI4 podría tener un papel importante en la regulación de los genes que se expresan durante las fases tardías del desarrollo de las semillas. Esta hipótesis es coherente con los resultados del análisis global realizado por Nakabayashi *et al.* 2005, donde se observa que la expresión de 5 genes que codifican para proteínas de almacenamiento de semillas (At1g03880, At4g27150, At4g28520, At5g44120 y At5g54470) se afecta en las semillas secas de *abi4*. La proteína ABI4 también participa en la acumulación de los transcritos de diferentes tipos de LEAs y de otros genes con funciones de protección a la desecación en las semillas secas (Nakabayashi *et al.* 2005). Sería interesante determinar el alcance de la responsabilidad de ABI4 en la expresión de los genes específicos de semilla, en particular de los genes que codifican para proteínas de almacenamiento y proteínas asociadas a la desecación, y si la regulación por ABI4 se ve influenciada por los picos endógenos de ABA y / o el estado metabólico de carbono-nitrógeno durante la maduración de las semillas.

La mutante *abi4* no presenta alteraciones en el fenotipo del embrión y/o semillas, por lo tanto la proteína ABI4 no es un componente esencial de las vías de transducción de señales que controlan la embriogénesis y la maduración de las semillas (Finkelstein *et al.* 1998, Penfield *et al.* 2006). A pesar de los estudios realizados, la función específica de ABI4 durante la embriogénesis y la maduración de las semillas en *Arabidopsis* es incierta, y probablemente redundante. Los niveles de acumulación del transcrito de ABI4 durante la maduración de las semillas y en semillas secas son bajos,

sugiriendo que la función principal de ABI4 y sus principales blancos de acción no parecen ser relevantes en esta etapa del desarrollo de una planta de *Arabidopsis*. Contrariamente, el papel de la proteína ABI4 de maíz parece ser más importante durante el desarrollo de las semillas de maíz, ya que su expresión es específica del grano, se regula durante el desarrollo de las semillas inmaduras, y no se detecta en los tejidos vegetativos de plántulas de maíz (Niu *et al.* 2002).

8.3.2. ABI4 y la germinación de las semillas (énfasis en la imbibición).

El éxito de la germinación es crucial para las plantas y por lo tanto, está estrictamente regulado por el medio ambiente, así como por el “calendario” interno dictado por las señales de desarrollo. La germinación puede definirse de manera general como un proceso de dos fases: 1 – la activación del metabolismo y 2 – el alargamiento celular. El metabolismo se activa por la imbibición de semillas, y se caracteriza por la movilización de las reservas almacenadas como lípidos, proteínas y almidón. Durante este período de imbibición es cuando ocurre la máxima acumulación de mensajero de ABI4 (Arroyo *et al.* 2003). Recientemente, un análisis de microarreglos demostró que la expresión de ABI4 aumenta 23 veces en semillas embebidas en comparación con las semillas secas (Nakabayashi *et al.* 2005). Además, la acumulación de ABI4 en semillas embebidas es parcialmente dependiente de la presencia de la proteína ABI4 (Bossi *et al.* 2009). Debido a que los niveles endógenos de ABA son bajos durante la germinación, la expresión de ABI4 podría autoregularse positivamente por una señal de desarrollo, por un efecto osmótico causado por la imbibición de las semillas, por el aumento temporal de carbono que proviene de la degradación de las reservas de almacenamiento, o por una combinación de todos estos estímulos.

En las semillas secas de *Arabidopsis*, hay altos niveles de transcrito de ABI5, sin embargo, en las semillas embebidas, estos niveles disminuyen notablemente (91%), sugiriendo que ABI5 no tiene un papel regulatorio importante durante la imbibición de las semillas en condiciones normales de crecimiento. A pesar de ello, la abundancia del mensajero de ABI5 disminuye 47% en semillas embebidas de la mutante *abi4*. Este dato curioso sugiere que durante la imbibición de las semillas, el(los) factor(es) que mantiene(n) elevados los niveles del transcrito de ABI5 desaparece(n), y la proteína ABI4 podría tomar el lugar de esta(s) proteína(s) regulatoria(s), pero actuando como un activador débil de la expresión de ABI5 manteniendo sus niveles bajos en condiciones normales de crecimiento y asegurándose así que la proteína ABI5 y los genes

relacionados a ABA/dormancia regulados por *ABI5* no interfieran con la germinación. Este modelo coincide con el modelo hipotético de acción de *ABI4* sugerido por Rook *et al* 2006b quien propone que el factor *ABI4* es un activador débil de la expresión de *APL3* y de genes fotosintéticos como *RBCS* en respuesta a azúcares.

La mutante *abi4* no afecta el fenotipo visible de las semillas de *Arabidopsis* o el proceso de imbibición, lo que sugiere que la función de *ABI4* en las semillas es redundante o se vuelve importante en respuesta a condiciones ambientales severas. En las semillas bajo condiciones de estrés, los niveles de ABA aumentan y la germinación se inhibe: la radícula no emerge, las reservas no se movilizan y no se pierde la tolerancia a la desecación. Las semillas de *Arabidopsis* almacenan carbono en forma de triglicéridos, y el 90% de esos triglicéridos se acumulan en el embrión (Penfield *et al.* 2006). Análisis genéticos indicaron que la proteína *ABI4* es importante para modular la germinación de *Arabidopsis* en condiciones adversas, a través de la modulación de los procesos regulados por ABA tales como el catabolismo de triglicéridos en el embrión (Penfield *et al.* 2006). *ABI4* actúa como un elemento hacia abajo en la señalización durante el desarrollo de las semillas y la germinación, principalmente implicado en la modulación de genes finales del metabolismo. Sin embargo, el factor *ABI4* parece ser un punto de convergencia de la mayoría de las vías de señalización de estrés, incluyendo las señales de estrés derivadas de la comunicación retrograda núcleo-cloroplasto (Koussevitzky *et al.* 2007). Más intrigante aún es el hecho de que *ABI4* parece ser una molécula integradora de las diferentes señales tanto internas como externas durante la germinación. El aumento de *ABI4* durante el período de imbibición parece ser importante para preparar a las semillas para que germinen, y su disminución (o inactividad) parece relevante para que la germinación se complete ya que los niveles de *ABI4* empiezan a decrecer luego de la imbibición en condiciones normales de crecimiento (sin estrés). Mi visión actual es que el medio ambiente determina la expresión del gen *ABI4* y, quien a su vez, controla a los switches que disparan los eventos post-germinativos (después de la imbibición). Cuando el ambiente es favorable, la función de *ABI4* “desaparece” parcialmente ya que su expresión disminuye en ausencia de condiciones de estrés. Esto permite que la semilla germinada se establezca exitosamente. En este sentido *ABI4* parece actuar como un regulador negativo de los eventos que se desencadenan luego de la imbibición de las semillas (Figura 30).

8.3.3. ABI4 y el establecimiento de las plántulas jóvenes.

En condiciones normales de crecimiento, *ABI4* se detecta en el hipocótilo, los cotiledones y la radícula de las plántulas jóvenes (Soderman *et al* 2000, Arroyo *et al.* 2003), lo cual coincide con su papel propuesto como punto de control durante el establecimiento de la plántula (Arroyo *et al.* 2003). Resulta interesante a este respecto que la expresión de *ABI4* es notablemente intensa en cotiledones, aunque casi indetectable en las hojas verdaderas que aparecen en la plántula a medida que ésta crece, sugiriendo que la participación de *ABI4* no es esencial en tejidos autotróficos (Figura S1 en Apéndice II). Por otro lado, el promotor de *ABI4* presenta un patrón de expresión curioso durante el desarrollo de la raíz: se detecta en toda la radícula en las semillas en germinación, su expresión se limita al ápice radical en plántulas de 3-4 días, y no se observa expresión en las raíces de plantas adultas (Bossi 2002, Arroyo *et al.* 2003). La expresión del gen GUS dirigida por el promotor de *ABI4* en el ápice de la raíz se intensifica en respuesta a glucosa (Figura S2 en Apéndice II). El patrón de expresión del promotor de *ABI4* en las raíces de plántulas de 3 días en GM y en respuesta a glucosa es similar al observado para el promotor del gen *ABI5* (Brocard *et al* 2002), sugiriendo que ambos factores ABI se corregulan en el ápice radical en plántulas de 3 días y en respuesta a glucosa. Análisis genéticos en las células del ápice de la raíz serán necesarios para determinar si la proteína *ABI4* regula la expresión del promotor de *ABI5* en raíces. El patrón de expresión del promotor de *ABI4* durante el ciclo de vida de *Arabidopsis* es consistente con la propuesta mencionada en la sección anterior donde se especula que *ABI4* es un punto de control que actúa como regulador negativo del desarrollo durante la germinación y los eventos post-germinativos.

La transición de las plántulas desde organismos heterótrofos a autótrofos es otro de los pasos cruciales en el desarrollo de plantas. Después de la protrusión de la radícula (germinación), las nuevas plántulas (aún heterótrofas) se autoabastecen durante su crecimiento temprano a través de la movilización de las reservas de almacenamiento disponibles. Si la movilización de reservas, particularmente de lípidos, en el embrión se interrumpe por condiciones ambientales adversas, entonces la germinación se detiene y el embrión entra en una etapa latente (Penfield *et al.*, 2006). Otros eventos de arresto del desarrollo pueden observarse durante el período post-germinativo en respuesta a un ambiente desfavorable. Por ejemplo, el desarrollo de las plántulas puede ser detenido por altas concentraciones de azúcares o de ABA dentro de una ventana de desarrollo que incluye las primeras 48-72 horas después de la

germinación de las semillas (Lopez-Molina *et al.* 2001; Arroyo *et al.* 2003; Dekkers *et al.* 2004). Interesantemente, ABI4 tiene múltiples funciones durante este delicado proceso de crecimiento temprano. En particular, la presencia de la proteína ABI4 es muy importante durante el establecimiento de plántulas, ya que participa en la cascada de señalización que modula la movilización de reservas de almacenamiento (Penfield *et al.*, 2006), la expresión de genes fotosintéticos (Acevedo *et al.* 2005, Koussevitzky *et al.* 2007, la señalización retrógrada de cloroplasto (Koussevitzky *et al.* 2007), el crecimiento de la raíz (Soderman *et al.* 2000, Signora *et al.* 2001, Ramon *et al.* 2007) y en respuesta a azúcares y/o ABA. El factor ABI4 podría controlar estos procesos mediante su unión directa a sus genes blanco en estas condiciones. Así, la expresión del gen fotosintético *RBCS* está regulada directamente por ABI4 en respuesta a glucosa y ABA (Acevedo *et al.* 2005); la expresión de genes del metabolismo de carbono, como *APL3* y *SBE2.2*, en respuesta a glucosa depende de la presencia de la proteína ABI4 (Rook *et al.* 2006b, Bossi *et al.* 2009); y las respuestas a glucosa, ABA y osmótico de los genes regulatorios *ABI4* y *ABI5* dependen de la interacción del factor de transcripción ABI4 sobre sus promotores (Bossi *et al.* 2009, Figura 20).

Los niveles de mensajero de *ABI4* son bajos en las plántulas, pero la acumulación de su transcrito aumenta en respuesta a azúcares, fitohormonas y estrés osmótico (Soderman *et al.* 2000, Bossi 2002, Arroyo *et al.* 2003, Penfield *et al.* 2006, Ramón *et al.* 2007, Bossi *et al.* 2009, Figura 1 en Apéndice III); y la proteína ABI4 parece ser esencial para que las plántulas sobrevivan en ambientes severos (Finkelstein *et al.* 1998, Arenas-Huertero *et al.* 2000, Quesada *et al.* 2000). A este respecto, ABI4 parece ser fundamental para modular las respuestas relacionadas a ABA que se asocian a la señalización por glucosa durante el establecimiento temprano de la plántula actuando como un elemento de la vía de señalización por glucosa dependiente de hexocinasa (Price *et al.* 2003). Por otro lado, ABI4 también es importante como un elemento de la vía de señalización de ABA que controla la germinación de las semillas (Finkelstein *et al.* 1998; Penfield *et al.* 2006). Estos datos en conjunto sugieren que ABI4 podría tener dos funciones concretas y parcialmente independientes en estas dos etapas (germinación y establecimiento de la plántula) definidas por el conjunto de genes que ABI4 modula durante las respuestas a ABA en la germinación y a glucosa en plántulas jóvenes. Si esto es así, aún faltan identificar muchos más genes blancos directos del factor ABI4 los cuales serán fundamentales

para comprender en detalle la función del factor ABI4 durante el ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana*.

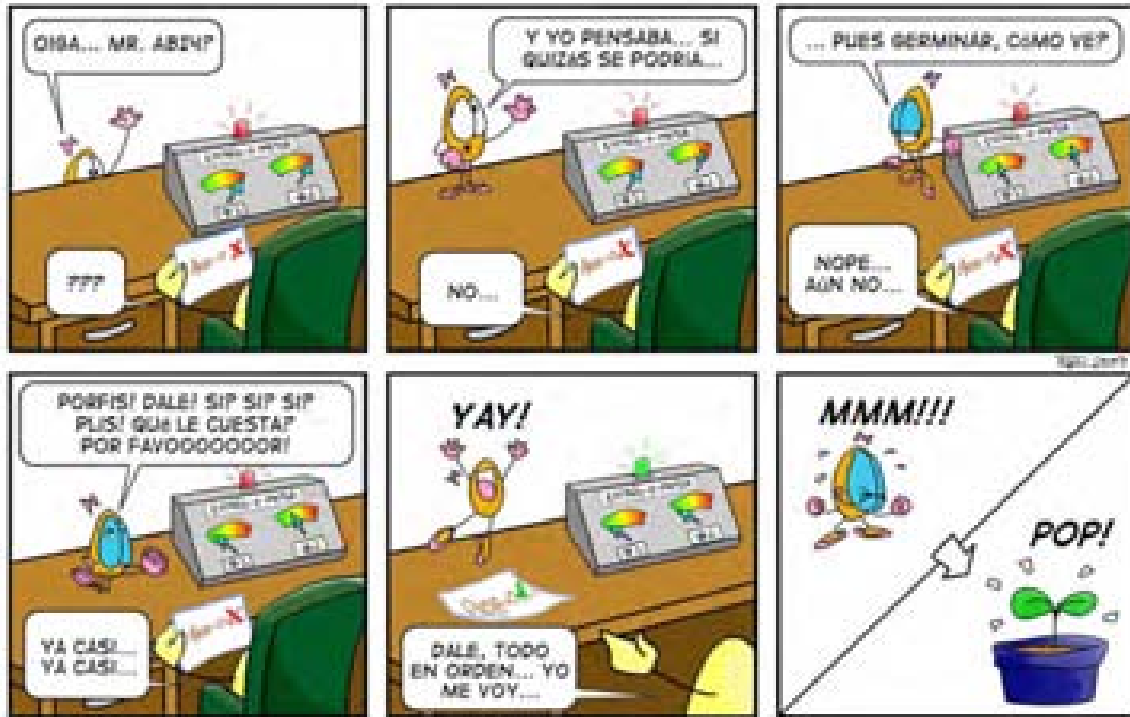


Figura 29 – El factor ABI4, la semilla y la plántula de *Arabidopsis*

9. Conclusiones

- La detección de la proteína ABI4 endógena con anticuerpos específicos no fue posible en *Arabidopsis*, sugiriendo que el factor ABI4 se encuentra a muy bajos niveles en las plantas.
- Estudios destinados a incrementar los niveles de la proteína ABI4 en *Arabidopsis* sugirieron que la abundancia del factor ABI4 parece estar sujeta a regulación post-transcripcional, ya que plantas sobre expresas del transcrito de *ABI4* no aumentaron de manera proporcional los niveles de proteína endógena.
- La proteína ABI4 se une a la secuencia CACCG en el promotor de los genes *ABI4*, *ABI5* y *SBE2.2*, indicando que ABI4 regula la expresión de estos tres genes de manera directa.
- Experimentos *in vivo* indicaron que el factor ABI4 actúa como un activador transcripcional sobre la expresión de los genes *ABI4*, *ABI5* y *SBE2.2*.
- El análisis de la expresión del promotor de *ABI4* en plantas transgénicas que carecen de la proteína ABI4 demostraron que el factor ABI4 es el principal regulador de su expresión tanto durante el desarrollo temprano de la plántula como en respuesta a glucosa, ABA y osmótico.
- Estos resultados más datos previamente publicados que demostraron que la proteína ABI4 reprime genes fotosintéticos mediante su unión directa al DNA sugieren fuertemente que ABI4 tiene una actividad dual como regulador de la expresión génica en respuesta a glucosa. El mecanismo que controla la actividad dual de ABI4 aún se desconoce.
- Debido a la naturaleza de los genes que modula ABI4, es posible especular que ABI4 actúa abajo en la vía de señalización en respuesta a glucosa controlando principalmente la expresión de genes metabólicos.

10. Perspectivas

- Estudios anteriores a este trabajo demostraron que el gen ABI4 está extensamente regulado durante el desarrollo y en respuesta a diferentes estreses. Este trabajo sugiere que la abundancia de la proteína ABI4 también está sujeta a una estricta regulación. Por lo tanto, sería importante realizar un estudio de deleciones de los diferentes dominios de la proteína ABI4 con el objetivo de determinar la funcionalidad de cada dominio y tratar de afectar los niveles de acumulación de ABI4 para poder así llevar a cabo la caracterización bioquímica del factor ABI4.
- El análisis de la actividad de la proteína ABI4 sobre la expresión de distintos genes blanco en respuesta a glucosa demostró que ABI4 es un factor dual capaz de activar o reprimir la transcripción según el promotor al que se una. Estudios posteriores sobre el/los mecanismos que controlan la dualidad de ABI4 serían interesantes para comprender de que manera ABI4 participa en la regulación transcripcional de los genes modulados durante las respuestas a azúcares.
- Los factores de transcripción forman parte de complejos transcripcionales donde diferentes factores interactúan entre sí para determinar la expresión final de la mayoría de los genes en las plantas, por ello sería importante tratar de identificar proteínas regulatorias que interactúen con ABI4 durante la señalización por azúcares. De esta manera se podrían empezar a caracterizar los complejos transcripcionales que se encienden durante la respuesta a glucosa.
- Como se ha mencionado en las conclusiones, ABI4 regula genes efectores finales de la respuesta a la cascada de transducción de señales. A este respecto, sería muy interesante tratar de identificar a las proteínas que modulan la actividad del factor ABI4, y de esta manera determinar los elementos de la señalización por azúcares que actúan arriba de ABI4.

11. Bibliografía

- Acevedo-Hernandez, G. J., *et al.* (2005). "Sugar and ABA responsiveness of a minimal RBCS light-responsive unit is mediated by direct binding of ABI4." *Plant J* 43(4): 506-19.
- Aluri, S. y M. Buttner (2007). "Identification and functional expression of the *Arabidopsis thaliana* vacuolar glucose transporter 1 and its role in seed germination and flowering." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(7): 2537-42.
- Arenas-Huertero, F., *et al.* (2000). "Analysis of *Arabidopsis* glucose insensitive mutants, *gin5* and *gin6*, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar." *Genes Dev* 14(16): 2085-96.
- Arroyo, A., *et al.* (2003). "Three genes that affect sugar sensing (*abscisic acid insensitive 4*, *abscisic acid insensitive 5*, and *constitutive triple response 1*) are differentially regulated by glucose in *Arabidopsis*." *Plant Physiol* 133(1): 231-42.
- Avonce, N., *et al.* (2004). "The *Arabidopsis trehalose-6-P synthase AtTPS1* gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling." *Plant Physiol* 136(3): 3649-59.
- Baena-Gonzalez, E., *et al.* (2007). "A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling." *Nature* 448(7156): 938-42.
- Balasubramanian, R., *et al.* (2007). "A role for F-actin in hexokinase-mediated glucose signaling." *Plant Physiol* 145(4): 1423-34.
- Barker, L., *et al.* (2000). "SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements." *Plant Cell* 12(7): 1153-64.
- Barth, I., *et al.* (2003). "PmSUC3: characterization of a SUT2/SUC3-type sucrose transporter from *Plantago major*." *Plant Cell* 15(6): 1375-85.
- Bhalarao, R. P., *et al.* (1999). "Regulatory interaction of PRL1 WD protein with *Arabidopsis* SNF1-like protein kinases." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(9): 5322-7.
- Bi, Y. M., *et al.* (2005). "Genetic analysis of *Arabidopsis* GATA transcription factor gene family reveals a nitrate-inducible member important for chlorophyll synthesis and glucose sensitivity." *Plant J* 44(4): 680-92.
- Blasing, O. E., *et al.* (2005). "Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of diurnal gene expression in *Arabidopsis*." *Plant Cell* 17(12): 3257-81.
- Bordone L. y Campbell C. (2002). "DNA ligase III is degraded by calpain during cell death induced by DNA-damaging agents." *J Biol Chem* 277(29):26673-80.
- Bossi, F. (2002). "Análisis del patrón de expresión del promotor de *ABI4* en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*." Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología, UNAM, México.
- Bossi, F., *et al.* (2009). "The *Arabidopsis* ABA-INSENSITIVE (ABI) 4 factor acts as a central transcription activator of the expression of its own gene, and for the induction of *ABI5* and *SBE2.2* genes during sugar signaling." *Plant J.*, March 6th, accepted.
- Brocard, I. M., *et al.* (2002). "Regulation and role of the *Arabidopsis abscisic acid-insensitive 5* gene in abscisic acid, sugar, and stress response." *Plant Physiol* 129(4): 1533-43.
- Brocard-Gifford, I. M., *et al.* (2003). "Regulatory networks in seeds integrating developmental, abscisic acid, sugar, and light signaling." *Plant Physiol* 131(1): 78-92.
- Brocard-Gifford, I., *et al.* (2004). "The *Arabidopsis thaliana* *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE8* encodes a novel protein mediating abscisic acid and sugar responses essential for growth." *Plant Cell* 16(2): 406-21.
- Buttner, M. (2007). "The monosaccharide transporter(-like) gene family in *Arabidopsis*." *FEBS Lett* 581(12): 2318-24.
- Buttner, M. y N. Sauer (2000). "Monosaccharide transporters in plants: structure, function and physiology." *Biochim Biophys Acta* 1465(1-2): 263-74.
- Cakir, B., *et al.* (2003). "A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling." *Plant Cell* 15(9): 2165-80.
- Carles, C., *et al.* (2002). "Regulation of *Arabidopsis thaliana* *Em* genes: role of ABI5." *Plant J* 30(3): 373-83.
- Carling, D. (2004). "The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control." *Trends Biochem Sci* 29(1): 18-24.
- Carling, D., *et al.* (1994). "Mammalian AMP-activated protein kinase is homologous to yeast and plant protein kinases involved in the regulation of carbon metabolism." *J Biol Chem* 269(15): 11442-8.
- Carlson, M. (1999). "Glucose repression in yeast." *Curr Opin Microbiol* 2(2): 202-7.
- Carrari, F., *et al.* (2004). "Heard it through the grapevine? ABA and sugar cross-talk: the ASR story." *Trends Plant Sci* 9(2): 57-9.
- Celenza, J. L. y M. Carlson (1986). "A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase." *Science* 233(4769): 1175-80.

- Cernac, A., *et al.* (2006). "WR11 is required for seed germination and seedling establishment." *Plant Physiol* 141(2): 745-57.
- Cernac, A. y C. Benning (2004). "*WRINKLED1* encodes an AP2/EREB domain protein involved in the control of storage compound biosynthesis in *Arabidopsis*." *Plant J* 40(4): 575-85.
- Chan, M. T. y S. M. Yu (1998a). "The 3' untranslated region of a rice α -amylase gene functions as a sugar-dependent mRNA stability determinant." *PNAS USA* 95: 6543-6547.
- Chan, M. T. and S. M. Yu (1998b). "The 3' untranslated region of a rice α -amylase gene mediates sugar-dependent abundance of mRNA." *Plant J* 15(5): 685-95.
- Chen, J. G. y A. M. Jones (2004). "AtRGS1 function in *Arabidopsis thaliana*." *Methods Enzymol* 389: 338-50.
- Chen, J. G., *et al.* (2003). "A seven-transmembrane RGS protein that modulates plant cell proliferation." *Science* 301(5640): 1728-31.
- Chen, M., *et al.* (2004). "The *GAOLAOZHUANGREN2* gene is required for normal glucose response and development of *Arabidopsis*." *J Plant Res* 117(6): 473-6.
- Chen, Y., *et al.* (2006). "The regulator of G-protein signaling proteins involved in sugar and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* seed germination." *Plant Physiol* 140(1): 302-10.
- Cheng, J. C., *et al.* (2000). "The role of the *Arabidopsis ELD1* gene in cell development and photomorphogenesis in darkness." *Plant Physiol* 123(2): 509-20.
- Cheng, W. H., *et al.* (1999). "Sugars modulate an unusual mode of control of the cell-wall invertase gene (*Incw1*) through its 3' untranslated region in a cell suspension culture of maize." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(18): 10512-7.
- Cheng, W. H., *et al.* (2002). "A unique short-chain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis* glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions." *Plant Cell* 14(11): 2723-43.
- Cheung, T. H., *et al.* (2006). "Unraveling transcriptional control and *cis*-regulatory codes using the software suite GeneACT." *Genome Biol* 7(10): R97.
- Chiou, T. J. y D. R. Bush (1998). "Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(8): 4784-8.
- Chiu, W. *et al.* (1996). "Engineered GFP as a vital reporter in plants." *Curr Biol* 6(3): 325-30.
- Cho, J. I., *et al.* (2009). "Role of the rice hexokinases OsHXK5 and OsHXK6 as glucose sensors." *Plant Physiol* 149(2): 745-59.
- Cho, Y. H., *et al.* (2006). "Regulatory functions of nuclear hexokinase1 complex in glucose signaling." *Cell* 127(3): 579-89.
- Coates, J. C. (2003). "Armadillo repeat proteins: beyond the animal kingdom." *Trends Cell Biol* 13(9): 463-71.
- Córdoba, E., *et al.* (2009). "Unravelling the regulatory mechanisms that modulate the MEP pathway in higher plants." *J Exp Bot* 60 (10): 2933-43.
- Coruzzi, G. M. y L. Zhou (2001). "Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: emerging 'matrix effects'." *Curr Opin Plant Biol* 4(3): 247-53.
- Dekkers, B. J., *et al.* (2004). "Glucose delays seed germination in *Arabidopsis thaliana*." *Planta* 218(4): 579-88.
- Dekkers, B. J., *et al.* (2008). "Interaction between sugar and abscisic acid signalling during early seedling development in *Arabidopsis*." *Plant Mol Biol* 67(1-2): 151-67.
- Diez-Sampedro, A., *et al.* (2003). "A glucose sensor hiding in a family of transporters." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(20): 11753-8.
- Dijkwel, P. P., *et al.* (1997). "Sucrose control of phytochrome A signaling in *Arabidopsis*." *Plant Cell* 9(4): 583-95.
- Dyer, J., S. *et al.* (2003). "Mechanism of glucose sensing in the small intestine." *Biochem Soc Trans* 31(Pt 6): 1140-2.
- Estévez, J. M., *et al.* (2000). "Analysis of the Expression of *CLA1*, a Gene That Encodes the 1-Deoxyxylulose 5-Phosphate Synthase of the 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphate Pathway in *Arabidopsis*". *Plant Physiol* 124: 95-104.
- Farrar, J., *et al.* (2000). "Sucrose and the integration of metabolism in vascular plants." *Plant Sci* 154(1): 1-11.
- Farras, R., *et al.* (2001). "SKP1-SnRK protein kinase interactions mediate proteasomal binding of a plant SCF ubiquitin ligase." *Embo J* 20(11): 2742-56.
- Ferrando, A., *et al.* (2000). "Intron-tagged epitope: a tool for facile detection and purification of proteins expressed in *Agrobacterium*-transformed plant cells." *Plant J* 22(6): 553-60.
- Finkelstein, R. R. y Gibson, S. M. (2002). "ABA and sugar interactions regulating development: cross-talk or voices in a crowd?" *Curr Opin Plant Biol* 5(1): 26-32.

- Finkelstein, R. R. y T. J. Lynch (2000). "The *Arabidopsis* abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor." *Plant Cell* 12(4): 599-609.
- Finkelstein, R. R., *et al.* (1998). "The *Arabidopsis* abscisic acid response locus *ABI4* encodes an APETALA 2 domain protein." *Plant Cell* 10(6): 1043-54.
- Focks, N. y C. Benning (1998). "*wrinkled1*: A novel, low-seed-oil mutant of *Arabidopsis* with a deficiency in the seed-specific regulation of carbohydrate metabolism." *Plant Physiol* 118(1): 91-101.
- Fordham-Skelton, T. y Lindsey, K. (2001). "Signaling in plants." *Genome Biol* 2(1): REPORTS4001.
- Foufelle, F., *et al.* (1998). "Glucose regulation of gene expression." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1(4): 323-8.
- Franco-Zorrilla, J. M., *et al.* (2005). "Interaction between Phosphate-Starvation, Sugar, and Cytokinin Signaling in *Arabidopsis* and the Roles of Cytokinin Receptors CRE1/AHK4 and AHK3." *Plant Physiol.* 138: 847-57.
- Frankel, N., *et al.* (2007). "ci21A/Asr1 expression influences glucose accumulation in potato tubers." *Plant Mol Biol* 63(5): 719-30.
- Gampala, S. S., *et al.* (2002). "ABI5 interacts with abscisic acid signaling effectors in rice protoplasts." *J Biol Chem* 277(3): 1689-94.
- Gancedo, J. M. (2008). "The early steps of glucose signalling in yeast." *FEMS Microbiol Rev* 32(4): 673-704.
- Gazzarrini, S. y P. McCourt (2001). "Genetic interactions between ABA, ethylene and sugar signaling pathways." *Curr Opin Plant Biol* 4(5): 387-91.
- Gibson, S. I. (2005). "Control of plant development and gene expression by sugar signaling." *Curr Opin Plant Biol* 8: 93-102.
- Gibson, S. I., *et al.* (2001). "The *sugar-insensitive1* (*sis1*) mutant of *Arabidopsis* is allelic to *ctr1*." *Biochem Biophys Res Commun* 280(1): 196-203.
- Gleave, A. P. (1992). "A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome." *Plant Mol Biol* 20(6): 1203-7.
- Gonzali, S., *et al.* (2006). "Identification of sugar-modulated genes and evidence for *in vivo* sugar sensing in *Arabidopsis*." *J Plant Res* 119(2): 115-23.
- Gonzali, S., *et al.* (2005). "A turanose-insensitive mutant suggests a role for WOX5 in auxin homeostasis in *Arabidopsis thaliana*." *Plant J* 44(4): 633-45.
- Gregory, M. A. y Hann, S. R. (2000). "c-Myc proteolysis by the ubiquitin proteasome pathway: stabilization of c-Myc in Burkitt's lymphoma cells." *Mol Cell Biol* 20(7): 2423-35.
- Grennan, A. K. (2007). "The Role of Trehalose Biosynthesis in Plants." *Plant Physiol.* 144(1): 3-5.
- Grierson, C., *et al.* (1994). "Separate *cis* sequences and *trans* factors direct metabolic and developmental regulation of a potato tuber storage protein gene." *Plant J* 5(6): 815-26.
- Grigston, J. C., *et al.* (2008). "D-Glucose sensing by a plasma membrane regulator of G signaling protein, AtRGS1." *FEBS Lett* 582(25-26): 3577-84.
- Guo, A. Y., *et al.* (2008). "PlantTFDB: a comprehensive plant transcription factor database. ." *Nucleic Acids Res* 36: 966-969.
- Gupta, A. K. y N. Kaur (2005). "Sugar signaling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants." *J Biosci* 30(5): 761-776.
- Gupta, S., *et al.* (2007). "Quantifying similarity between motifs". *Genome Biology* 8(2):R24.
- Gutierrez, R. A., *et al.* (2007). "Qualitative network models and genome-wide expression data define carbon/nitrogen-responsive molecular machines in *Arabidopsis*." *Genome Biol* 8(1): R7.
- Hanson, J., *et al.* (2008). "The sucrose regulated transcription factor bZIP11 affects amino acid metabolism by regulating the expression of *ASPARAGINE SYNTHETASE1* and *PROLINE DEHYDROGENASE2*." *Plant J* 53(6): 935-49.
- Hanson, J., *et al.* (2001). "Sugar-dependent alterations in cotyledon and leaf development in transgenic plants expressing the HDZhdip gene *ATHB13*." *Plant Mol Biol* 45(3): 247-62.
- Hanson, J., S. *et al.* (2002). "The expression pattern of the homeobox gene *ATHB13* reveals a conservation of transcriptional regulatory mechanisms between *Arabidopsis* and hybrid aspen." *Plant Cell Rep* 21: 81-89.
- Higo, K., *et al.* (1999). "Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999." *Nucleic Acids Res* 27(1): 297-300.
- Hill, L. M., *et al.* (2003). "Metabolism of sugars in the endosperm of developing seeds of oilseed rape." *Plant Physiol* 131(1): 228-36.
- Ho, S. L., *et al.* (2001). "Sugar Coordinately and Differentially Regulates Growth- and Stress-Related Gene Expression via a Complex Signal Transduction Network and Multiple Control Mechanisms." *Plant Physiol* 125: 877-890.

- Hrabak, E. M., *et al.* (2003). "The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases." *Plant Physiol* 132(2): 666-80.
- Huang, J., *et al.* (2006). "The plastid protein THYLAKOID FORMATION1 and the plasma membrane G-protein GPA1 interact in a novel sugar-signaling mechanism in *Arabidopsis*." *Plant Cell* 18(5): 1226-38.
- Huang, Y., *et al.* (2008). "Identification, cloning and characterization of *sis7* and *sis10* sugar-insensitive mutants of *Arabidopsis*." *BMC Plant Biol* 8: 104.
- Huijser, C., *et al.* (2000). "The *Arabidopsis* *SUCROSE UNCOUPLED-6* gene is identical to *ABSCISIC ACID INSENSITIVE-4*: involvement of abscisic acid in sugar responses." *Plant J* 23(5): 577-85.
- Hummel, M., *et al.* (2009). "Sucrose-mediated translational control." *Ann Bot (Lond)*.
- Ishiguro, S. y K. Nakamura (1992). "The nuclear factor SP8BF binds to the 5'-upstream regions of three different genes coding for major proteins of sweet potato tuberous roots." *Plant Mol Biol* 18(1): 97-108.
- Ishiguro, S. y K. Nakamura (1994). "Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, SPF1, that recognizes SP8 sequences in the 5' upstream regions of genes coding for sporamin and beta-amylase from sweet potato." *Mol Gen Genet* 244(6): 563-71.
- Iuchi, S., *et al.* (2001). "Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*." *Plant J* 27(4): 325-33.
- Jang, J. C., *et al.* (1997). "Hexokinase as a sugar sensor in higher plants." *Plant Cell* 9(1): 5-19.
- Jeong, M. J. y M. C. Shih (2003). "Interaction of a GATA factor with *cis*-acting elements involved in light regulation of nuclear genes encoding chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Arabidopsis*." *Biochem Biophys Res Commun* 300(2): 555-62.
- Johannesson, H., *et al.* (2001). "DNA-binding and dimerization preferences of *Arabidopsis* homeodomain-leucine zipper transcription factors *in vitro*." *Plant Mol Biol* 45(1): 63-73.
- Johnson, A. D. (1995). "The Price of Repression." *Cell* 81: 655-8
- Johnston, C. A., *et al.* (2007). "GTPase acceleration as the rate-limiting step in *Arabidopsis* G protein-coupled sugar signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(44): 17317-22.
- Johnston, M. y J. H. Kim (2005). "Glucose as a hormone: receptor-mediated glucose sensing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Biochem Soc Trans* 33(Pt 1): 247-52.
- Jossier, M., *et al.* (2009). "SnRK1 (SNF1-Related Kinase 1) has a central role in sugar and ABA signalling in *Arabidopsis thaliana*." *Plant J* (epub)
- Karve, A., *et al.* (2008). "Expression and evolutionary features of the *hexokinase* gene family in *Arabidopsis*." *Planta* 228(3): 411-25.
- Kim, M., *et al.* (2006). "Mitochondria-associated hexokinases play a role in the control of programmed cell death in *Nicotiana benthamiana*." *Plant Cell* 18(9): 2341-55.
- Kim, S., *et al.* (2004). "ABF2, an ABRE-binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its overexpression affects multiple stress tolerance." *Plant J* 40(1): 75-87.
- Kiyosue, T., *et al.* (1998). "*ERD6*, a cDNA clone for an early dehydration-induced gene of *Arabidopsis*, encodes a putative sugar transporter." *Biochim Biophys Acta* 1370(2): 187-91.
- Koch, K. (1996). "Carbohydrate-Modulated Gene Expression in Plants." *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 509-540.
- Koch, K. (2004). "Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development." *Curr Opin Plant Biol* 7(3): 235-46.
- Koussevitzky, S., *et al.* (2007). "Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression." *Science* 316(5825): 715-9.
- Laby, R. J., *et al.* (2000). "The *Arabidopsis* sugar-insensitive mutants *sis4* and *sis5* are defective in abscisic acid synthesis and response." *Plant J* 23(5): 587-96.
- Lalonde, S., *et al.* (1999). "The dual function of sugar carriers. Transport and sugar sensing." *Plant Cell* 11(4): 707-26.
- Lalonde, S., *et al.* (2004). "Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink " *Annu Rev Plant Biol* 55: 341-72.
- Latchman, D. S. (2001). "Transcription factors: bound to activate or repress." *Trends Biochem Sci* 26(4): 211-3.
- Lejay, L., *et al.* (2003). "Regulation of root ion transporters by photosynthesis: functional importance and relation with hexokinase." *Plant Cell* 15(9): 2218-32.
- Leon-Kloosterziel, K. M., *et al.* (1996). "Isolation and characterization of abscisic acid-deficient *Arabidopsis* mutants at two new loci." *Plant J* 10(4): 655-61.
- Leon, P. y J. Sheen (2003). "Sugar and hormone connections." *Trends Plant Sci* 8(3): 110-6.
- Li, Y., *et al.* (2006). "Establishing glucose- and ABA-regulated transcription networks in *Arabidopsis* by microarray analysis and promoter classification using a Relevance Vector Machine." *Genome Res* 16(3): 414-27.

- Lillie, S. H. y S. S. Brown (1987). "Artificial immunofluorescent labelling in yeast, demonstrated by affinity purification of antibody." *Yeast* 3(2): 63-70.
- Lin, R., *et al.* (1996). "Phosphorylation of IkappaBalpha in the C-terminal PEST domain by casein kinase II affects intrinsic protein stability." *Mol Cell Biol* 16(4): 1401-09.
- Liu, F., *et al.* (2004). "Caspase-mediated specific cleavage of human histone deacetylase 4." *J Biol Chem* 279(33): 34537-46.
- Lopez-Molina, L., *et al.* (2001). "A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in *Arabidopsis*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(8): 4782-7.
- Lopez-Molina, L., *et al.* (2002). "ABI5 acts downstream of ABI3 to execute an ABA-dependent growth arrest during germination." *Plant J* 32(3): 317-28.
- Lopez-Molina, L., *et al.* (2003). "AFP is a novel negative regulator of ABA signaling that promotes ABI5 protein degradation." *Genes Dev* 17: 410-8.
- Lu, C. A., *et al.* (1998). "Sugar response sequence in the promoter of a rice α -amylase gene serves as a transcriptional enhancer." *J Biol Chem* 273(17): 10120-31.
- Lu, C. A., *et al.* (2002). "Three novel MYB proteins with one DNA binding repeat mediate sugar and hormone regulation of α -amylase gene expression." *Plant Cell* 14(8): 1963-80.
- Lu, C. A., *et al.* (2007). "The SnRK1A protein kinase plays a key role in sugar signaling during germination and seedling growth of rice." *Plant Cell* 19(8): 2484-99.
- Maeo, K., *et al.* (2001). "Sugar-responsive elements in the promoter of a gene for α -amylase of sweet potato." *Plant Mol Biol* 46(5): 627-37.
- Mandel, M.A., *et al.* (1996). "*CLA1*, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution." *Plant J* 9: 649-58.
- Marchal, C., *et al.* (1998). "A PEST-like sequence mediates phosphorylation and efficient ubiquitination of yeast uracil permease." *Mol Cell Biol* 18(1): 314-21.
- Masaki, T., *et al.* (2005a). "ACTIVATOR of *Spo^{min}::LUC1/WRINKLED1* of *Arabidopsis thaliana* transactivates sugar-inducible promoters." *Plant Cell Physiol* 46(4): 547-56.
- Masaki, T., *et al.* (2005b). "Activation tagging of a gene for a protein with novel class of CCT-domain activates expression of a subset of sugar-inducible genes in *Arabidopsis thaliana*." *Plant J* 43(1): 142-52.
- Meyer, S., *et al.* (2000). "*AtSUC3*, a gene encoding a new *Arabidopsis* sucrose transporter, is expressed in cells adjacent to the vascular tissue and in a carpel cell layer." *Plant J* 24(6): 869-82.
- Mishra, B. S., *et al.* (2009). "Glucose and auxin signaling interaction in controlling *Arabidopsis thaliana* seedlings root growth and development." *PLoS ONE* 4(2): e4502.
- Mizoguchi, T., *et al.* (2005). "Isolation of *Arabidopsis* mutants that have altered sensitivity to staurosporine and ABA." *Plant Biotechnology* 22: 303-310.
- Monke, G., *et al.* (2004). "Seed-specific transcription factors ABI3 and FUS3: molecular interaction with DNA." *Planta* 219(1): 158-66.
- Moore, B., *et al.* (2003). "Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling." *Science* 300(5617): 332-6.
- Morikami, A., *et al.* (2005). "Two *cis*-acting regulatory elements are involved in the sucrose-inducible expression of the sporamin gene promoter from sweet potato in transgenic tobacco." *Mol Genet Genomics* 272(6): 690-9.
- Nakabayashi, K., *et al.* (2005). "Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed." *Plant J* 41(5): 697-709.
- Nakamura, S., *et al.* (2001). "Physical interactions between ABA response loci of *Arabidopsis*." *Plant J* 26(6): 627-35.
- Niu, X., *et al.* (2002). "Maize ABI4 binds coupling element1 in abscisic acid and sugar response genes." *Plant Cell* 14(10): 2565-75.
- Ohto, M. A., *et al.* (2006). "Involvement of HLS1 in sugar and auxin signaling in *Arabidopsis* leaves." *Plant Cell Physiol* 47(12): 1603-11.
- Ooms, J., *et al.* (1993). "Acquisition of desiccation tolerance and longevity in seeds of *Arabidopsis thaliana* (A comparative study using abscisic acid-insensitive *abi3* mutants)." *Plant Physiol* 102(4): 1185-1191.
- Osuna, D., *et al.* (2007). "Temporal responses of transcripts, enzyme activities and metabolites after adding sucrose to carbon-deprived *Arabidopsis* seedlings." *Plant J* 49(3): 463-91.
- Oswald, O., *et al.* (2001). "Plastid redox state and sugars: interactive regulators of nuclear-encoded photosynthetic gene expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(4): 2047-52.
- Ozcan, S., *et al.* (1998). "Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Embo J* 17(9): 2566-73.

- Pagant, S., *et al.* (2002). "*KOBITO1* encodes a novel plasma membrane protein necessary for normal synthesis of cellulose during cell expansion in *Arabidopsis*." *Plant Cell* 14(9): 2001-13.
- Palenchar, P. M., *et al.* (2004). "Genome-wide patterns of carbon and nitrogen regulation of gene expression validate the combined carbon and nitrogen (CN)-signaling hypothesis in plants." *Genome Biol* 5(11): R91.
- Pandey, G. K., *et al.* (2004). "The calcium sensor calcineurin B-like 9 modulates abscisic acid sensitivity and biosynthesis in *Arabidopsis*." *Plant Cell* 16(7): 1912-24.
- Paul, M. J., *et al.* (2008). "Trehalose metabolism and signaling." *Annu Rev Plant Biol* 59: 417-41.
- Penfield, S., *et al.* (2006). "*Arabidopsis* ABA INSENSITIVE4 regulates lipid mobilization in the embryo and reveals repression of seed germination by the endosperm." *Plant Cell* 18(8): 1887-99.
- Perata, P., *et al.* (1997). "Sugar Repression of a Gibberellin-Dependent Signaling Pathway in Barley Embryos." *Plant Cell* 9(12): 2197-2208.
- Perfus-Barbeoch, L., *et al.* (2004). "Plant heterotrimeric G protein function: insights from *Arabidopsis* and rice mutants." *Curr Opin Plant Biol* 7(6): 719-31.
- Phillips, M. A., *et al.* (2008). "The plastidial MEP pathway: unified nomenclature and resources." *Trends Plant Sci.* 13: 619-23.
- Planchais, S., *et al.* (2004). "Differential stability of *Arabidopsis* D-type cyclins: CYCD3;1 is a highly unstable protein degraded by a proteasome-dependent mechanism." *Plant J* 38(4): 616-25.
- Price, J., *et al.* (2003). "Mechanisms of glucose signaling during germination of *Arabidopsis*." *Plant Physiol* 132(3): 1424-38.
- Price, J., *et al.* (2004). "Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in *Arabidopsis*." *Plant Cell* 16(8): 2128-50.
- Purcell, P. C., *et al.* (1998). "Antisense expression of a sucrose non-fermenting-1-related protein kinase sequence in potato results in decreased expression of sucrose synthase in tubers and loss of sucrose-inducibility of sucrose synthase transcripts in leaves." *Plant J* 14(2): 195-202.
- Quesada, V., *et al.* (2000). "Genetic analysis of salt-tolerant mutants in *Arabidopsis thaliana*." *Genetics* 154(1): 421-36.
- Rahmani, F., *et al.* (2009). "Sucrose control of translation mediated by a uORF encoded peptide." *Plant Physiol.*
- Ramon, M., *et al.* (2007). "ABI4 mediates the effects of exogenous trehalose on *Arabidopsis* growth and starch breakdown." *Plant Mol Biol* 63(2): 195-206.
- Rechsteiner, M. y Rogers, S. W. (1996). "PEST sequences and regulation by proteolysis." *Trends Biochem Sci* 21(7): 267-71.
- Rhee, S. Y., *et al.* (2006). "Bioinformatics and its applications in plant biology." *Annu Rev Plant Biol* 57: 335-60.
- Riechmann, J. L., *et al.* (2000). "*Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes." *Science* 290(5499): 2105-10.
- Rognoni, S., *et al.* (2007). "Sugar effects on early seedling development in *Arabidopsis* " *Plant Growth Regul* 52: 217-28.
- Roitsch, T., *et al.* (1995). "Induction of apoplasmic invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose and a glucose analog and tissue-specific expression suggest a role in sink-source regulation." *Plant Physiol* 108(1): 285-94.
- Rolland, F., *et al.* (2001). "Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells." *Trends Biochem Sci* 26(5): 310-7.
- Rolland, F., *et al.* (2006). "Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms." *Annu Rev Plant Biol* 57: 675-709.
- Romero-Guido, C., *et al.* (2001). "Spatial and temporal patterns of GUS expresión directed by 5' regions of the *Arabidopsis thaliana* *CLA1* gene." X Congreso Nacional de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas. 4th Symposium México-USA.
- Rook, F., *et al.* (1998). "Sucrose-specific signalling represses translation of the *Arabidopsis* *ATB2* bZIP transcription factor gene." *Plant J* 15(2): 253-63.
- Rook, F., *et al.* (2001). "*Impaired sucrose-induction* mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signalling." *Plant J* 26(4): 421-33.
- Rook, F., *et al.* (2006a). "*Impaired sucrose induction1* encodes a conserved plant-specific protein that couples carbohydrate availability to gene expression and plant growth." *Plant J* 46(6): 1045-58.
- Rook, F., *et al.* (2006b). "Sugar and ABA response pathways and the control of gene expression." *Plant Cell Environ* 29(3): 426-34.
- Ruepp, A., *et al.* (2004). "The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes." *Nucleic Acids Research* 32(18): 5539 –45.

- Ruuska, S. A., *et al.* (2002). "Contrapuntal networks of gene expression during *Arabidopsis* seed filling." *Plant Cell* 14(6): 1191-206.
- Sakuma, Y., *et al.* (2002). "DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression." *Biochem Biophys Res Commun* 290: 998-1009.
- Samuel, M. A., *et al.* (2006). "Multifunctional Arm Repeat Domains in Plants " *Int Rev Cytol.* 253: 1-26.
- Satoh, R., *et al.* (2004). "A novel subgroup of bZIP proteins functions as transcriptional activators in hypoosmolarity-responsive expression of the *ProDH* gene in *Arabidopsis*." *Plant Cell Physiol* 45(3): 309-17.
- Sauer, N. (2007). "Molecular physiology of higher plant sucrose transporters." *FEBS Lett* 581(12): 2309-17.
- Sauer, N., *et al.* (2004). "*AtSUC8* and *AtSUC9* encode functional sucrose transporters, but the closely related *AtSUC6* and *AtSUC7* genes encode aberrant proteins in different *Arabidopsis* ecotypes." *Plant J* 40(1): 120-30.
- Schneider, S., *et al.* (2008). "Functional and physiological characterization of *Arabidopsis* INOSITOL TRANSPORTER1, a novel tonoplast-localized transporter for myo-inositol." *Plant Cell* 20(4): 1073-87.
- Schutze, K., *et al.* (2008). "Post-translational regulation of plant bZIP factors." *Trends Plant Sci* 13(5): 247-55.
- Schwartz, S. H., *et al.* (1997). "Biochemical characterization of the *aba2* and *aba3* mutants in *Arabidopsis thaliana*." *Plant Physiol* 114(1): 161-6.
- Sheen, J. (1990). "Metabolic repression of transcription in higher plants." *Plant Cell* 2(10): 1027-38.
- Sherson, S. M., *et al.* (2000). "Monosaccharide/proton symporter AtSTP1 plays a major role in uptake and response of *Arabidopsis* seeds and seedlings to sugars." *Plant J* 24(6): 849-57.
- Sheu, J. J., *et al.* (1996). "Carbohydrate starvation stimulates differential expression of rice alpha-amylase genes that is modulated through complicated transcriptional and posttranscriptional processes." *J Biol Chem* 271(43): 26998-7004.
- Signora, L., *et al.* (2001). "ABA plays a central role in mediating the regulatory effects of nitrate on root branching in *Arabidopsis*." *Plant J* 28(6): 655-62.
- Smalle, J. y R. D. Vierstra (2004). "The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway." *Annu Rev Plant Biol* 55: 555-90.
- Soderman, E. M., *et al.* (2000). "Regulation and function of the *Arabidopsis ABA-insensitive4* gene in seed and abscisic acid response signaling networks." *Plant Physiol* 124(4): 1752-65.
- Stougaard, J., *et al.* (1990). "Interdependence and nodule specificity of *cis*-acting regulatory elements in the soybean leghemoglobin *lbc3* and *N23* gene promoters." *Mol Gen Genet* 220(3): 353-60.
- Sugden, C., *et al.* (1999). "Two SNF1-related protein kinases from spinach leaf phosphorylate and inactivate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, nitrate reductase, and sucrose phosphate synthase *in vitro*." *Plant Physiol* 120(1): 257-74.
- Sugiyama, N., *et al.* (2008). "Large-scale phosphorylation mapping reveals the extent of tyrosine phosphorylation in *Arabidopsis*." *Mol Syst Biol* 4: 193.
- Sun, C., *et al.* (2003). "A novel WRKY transcription factor, SUSIBA2, participates in sugar signaling in barley by binding to the sugar-responsive elements of the *iso1* promoter." *Plant Cell* 15(9): 2076-92.
- Sun, C., *et al.* (2005). "Antisense oligodeoxynucleotide inhibition as a potent strategy in plant biology: identification of SUSIBA2 as a transcriptional activator in plant sugar signalling." *Plant J* 44(1): 128-38.
- Swarup, R., *et al.* (2002). "Auxin cross-talk: integration of signalling pathways to control plant development." *Plant Mol Biol* 49(3-4): 411-26.
- Tang, Z., *et al.* (2001). "Homeodomain leucine zipper proteins bind to the phosphate response domain of the soybean *VspB* tripartite promoter." *Plant Physiol* 125(2): 797-809.
- Teng, S., *et al.* (2008). "The *Arabidopsis GSQ5/DOG1 Cvi* allele is induced by the ABA-mediated sugar signalling pathway, and enhances sugar sensitivity by stimulating *ABI4* expression." *Plant J* 55(3): 372-81.
- Tesmer, J. J., *et al.* (1997). "Structure of RGS4 bound to AIF4--activated G(i *alpha*1): stabilization of the transition state for GTP hydrolysis." *Cell* 89(2): 251-61.
- Thijs, G., *et al.* (2001). "A higher-order background model improves the detection of promoter regulatory elements by Gibbs sampling." *Bioinformatics* 17(12): 1113-22.
- Thum, K. E., *et al.* (2003). "Light- and carbon-signaling pathways. Modeling circuits of interactions." *Plant Physiol* 132(2): 440-52.
- Thum, K. E., *et al.* (2004). "Genome-wide investigation of light and carbon signaling interactions in *Arabidopsis*." *Genome Biol* 5(2): R10.

- Thum, K. E., *et al.* (2008). "An integrated genetic, genomic and systems approach defines gene networks regulated by the interaction of light and carbon signaling pathways in *Arabidopsis*." *BMC Syst Biol* 2: 31.
- Tiessen, A., *et al.* (2003). "Evidence that SNF1-related kinase and hexokinase are involved in separate sugar-signalling pathways modulating post-translational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in potato tubers." *Plant J* 35(4): 490-500.
- Tootle, T. L. y Rebay, I. (2005). "Post-translational modifications influence transcription factor activity: a view from the ETS superfamily." *Bioessays* 27(3): 285-98.
- Towle, H. C. (2005). "Glucose as a regulator of eukaryotic gene transcription." *Trends Endocrinol Metab* 16(10): 489-94.
- Toyofuku, K., *et al.* (1998). "Promoter elements required for sugar-repression of the *RAmy3D* gene for alpha-amylase in rice." *FEBS Lett* 428(3): 275-80.
- Tsukagoshi, H., *et al.* (2005). "Analysis of a sugar response mutant of *Arabidopsis* identified a novel B3 domain protein that functions as an active transcriptional repressor." *Plant Physiol* 138(2): 675-85.
- Tsukagoshi, H., *et al.* (2007). "Two B3 domain transcriptional repressors prevent sugar-inducible expression of seed maturation genes in *Arabidopsis* seedlings." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(7): 2543-7.
- Ullah, H., *et al.* (2002). "Role of a heterotrimeric G protein in regulation of *Arabidopsis* seed germination." *Plant Physiol* 129(2): 897-907.
- Vandepoele, K., *et al.* (2006). "Identification of novel regulatory modules in dicotyledonous plants using expression data and comparative genomics." *Genome Biol* 7(11): R103.
- Vierstra, R. D. (2003). "The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins." *Trends Plant Sci* 8(3): 135-42.
- Vierstra, R. D. (2009). "The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology." *Nat Rev Mol Cell Biol*.
- Wang, H. X., *et al.* (2006). "A Golgi-localized hexose transporter is involved in heterotrimeric G protein-mediated early development in *Arabidopsis*." *Mol Biol Cell* 17(10): 4257-69.
- Wasyluk, B., *et al.* (1993). "The Ets family of transcription factors." *Eur J Biochem* 211(1-2):7-18.
- Wiese, A., *et al.* (2004). "A conserved upstream open reading frame mediates sucrose-induced repression of translation." *Plant Cell* 16(7): 1717-29.
- Wiese, A., *et al.* (2005). "Sucrose-induced translational repression of plant bZIP-type transcription factors." *Biochem Soc Trans* 33(Pt 1): 272-5.
- Williams, L. E., *et al.* (2000). "Sugar transporters in higher plants--a diversity of roles and complex regulation." *Trends Plant Sci* 5(7): 283-90.
- Winter, D., *et al.* (2007). "An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets." *PLoS ONE* 2(8): e718.
- Wobus, U. y H. Weber (1999). "Sugars as signal molecules in plant seed development." *Biol Chem* 380(7-8): 937-44.
- Xiao, W., *et al.* (2000). "The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development." *Plant Mol Biol* 44(4): 451-61.
- Xiong, L., *et al.* (2001). "The *Arabidopsis* *LOS5/ABA3* locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression." *Plant Cell* 13(9): 2063-83.
- Yanagisawa, S., *et al.* (2003). "Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signalling in plants." *Nature* 425(6957): 521-5.
- Yin, Y., *et al.* (2002). "BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation." *Cell* 109(2): 181-91.
- Yin, Y., *et al.* (2005). "A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in *Arabidopsis*." *Cell* 120(2): 249-59.
- Yu, J., *et al.* (2002). "A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*)." *Science* 296(5565): 79-92.
- Zhang, W., *et al.* (2005). "Cis-regulatory element based targeted gene finding: genome-wide identification of abscisic acid- and abiotic stress-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*." *Bioinformatics* 21(14): 3074-81.
- Zhang, Y., *et al.* (2001). "Expression of antisense SnRK1 protein kinase sequence causes abnormal pollen development and male sterility in transgenic barley." *Plant J* 28(4): 431-441.
- Zhou, L., *et al.* (1998). "Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an *Arabidopsis* glucose-insensitive mutant." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(17): 10294-9.
- Zourelidou, M., *et al.* (2002). "Storekeeper defines a new class of plant-specific DNA-binding proteins and is a putative regulator of patatin expression." *Plant J* 30(4): 489-97.

Apéndice I

The Plant Journal (2009)

doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.03877.x

The Arabidopsis ABA-INSENSITIVE (ABI) 4 factor acts as a central transcription activator of the expression of its own gene, and for the induction of *ABI5* and *SBE2.2* genes during sugar signaling

Flavia Bossi†, Elizabeth Cordoba‡, Patricia Dupré, Mónica Santos Mendoza‡, Carolina San Román and Patricia León*

Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad # 2001, Col. Chamilpa, C.P. 62210, Cuernavaca, Morelos, México

Received 2 December 2008; revised 27 February 2009; accepted 6 March 2009.

*For correspondence (fax +52 777 313 9988; e-mail patricia@ibt.unam.mx).

†These authors contributed equally to this work.

SUMMARY

The transcription factor ABA INSENSITIVE 4 (ABI4), discovered nearly 10 years ago, plays a central role in a variety of functions in plants, including sugar responses. However, not until very recently has its mechanism of action begun to be elucidated. Modulating gene expression is one of the primary mechanisms of sugar regulation in plants. Nevertheless, the transcription factors involved in regulating sugar responses and their role(s) during the signal transduction cascade remain poorly defined. In this paper we analyzed the participation of ABI4, as it is one of the main transcription factors implicated in glucose signaling during early seedling development. Our studies show that ABI4 is an essential activator of its own expression during development, in ABA signaling and in sugar responses. It is also important for the glucose-mediated expression of the genes *ABI5* and *SBE2.2*. We demonstrate that ABI4 binds directly to the promoter region of all three genes and activates their expression *in vivo* through a CE-1-like element. Previous studies found that ABI4 also functions as a transcriptional repressor of sugar-regulated genes, therefore this transcription factor is a versatile protein with dual functions for modulating gene expression.

Keywords: ABI4, sugar regulation, early seedling development, ABA signaling, transcription factor, Arabidopsis.

The Arabidopsis ABA-INSENSITIVE (ABI) 4 factor acts as a central transcription activator of the expression of its own gene, and for the induction of *ABI5* and *SBE2.2* genes during sugar signaling

Flavia Bossi¹, Elizabeth Cordoba¹, Patricia Dupré, Mónica Santos Mendoza¹, Carolina San Román and Patricia León¹
Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad # 2001, Col. Chamilpa, C.P. 62210, Cuernavaca, Morelos, México

Received 2 December 2008; revised 27 February 2009; accepted 8 March 2009.

¹For correspondence: fax +52 777 313 9688; e-mail patricia@ib.unam.mx.

²These authors contributed equally to this work.

³Present address: Centro de Investigación CICY Calz 43# 130, Col. Chuburná de Hidalgo Mérida, Yucatán 97200, México.

SUMMARY

The transcription factor ABA INSENSITIVE 4 (ABI4), discovered nearly 10 years ago, plays a central role in a variety of functions in plants, including sugar responses. However, not until very recently has its mechanism of action begun to be elucidated. Modulating gene expression is one of the primary mechanisms of sugar regulation in plants. Nevertheless, the transcription factors involved in regulating sugar responses and their role(s) during the signal transduction cascade remain poorly defined. In this paper we analyzed the participation of ABI4, as it is one of the main transcription factors implicated in glucose signaling during early seedling development. Our studies show that ABI4 is an essential activator of its own expression during development, in ABA signaling and in sugar responses. It is also important for the glucose-mediated expression of the genes *ABI5* and *SBE2.2*. We demonstrate that ABI4 binds directly to the promoter region of all three genes and activates their expression *in vivo* through a CE1-like element. Previous studies found that ABI4 also functions as a transcriptional repressor of sugar-regulated genes, therefore this transcription factor is a versatile protein with dual functions for modulating gene expression.

Keywords: ABI4, sugar regulation, early seedling development, ABA signaling, transcription factor, Arabidopsis.

INTRODUCTION

Glucose is a universal energy source and, in polymeric form, it contributes to the essential structural components of cells. In addition sugars are recognized as signals that regulate a variety of metabolic, physiological, and developmental processes in plants in response to the availability of energy (Koch, 1996; Smeekens, 2000; Price *et al.*, 2004; Gibson, 2005; Rolland *et al.*, 2006). Changes in glucose levels result in changes in the transcript accumulation of nearly 1000 genes (Sheen, 1990; Koch, 1996; Price *et al.*, 2004), suggesting that transcriptional regulation is one of the most important mechanisms for sugar regulation in plants. Genome-wide transcriptome analyses support this conclusion (Palenchar *et al.*, 2004; Price *et al.*, 2004; Thum *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006; Gutierrez *et al.*, 2007; Osuna *et al.*, 2007).

Multiple signaling pathways for sugar regulation exist in plants (Xiao *et al.*, 2000; Ho *et al.*, 2001; Rolland *et al.*, 2002, 2006; Price *et al.*, 2003), though only a few components of these pathways have been identified (Rolland *et al.*, 2006). This has been accomplished, in part, through the characterization of mutants with altered sensitivity to exogenous sugar levels (Nemeth *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1998; Shaleroo *et al.*, 1999; Arenas-Huertero *et al.*, 2000; Laby *et al.*, 2000) and mutants with anomalous expression of sugar responsive promoters (Dijkwel *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 1997; Huijser *et al.*, 2000; Rook *et al.*, 2001; Baier *et al.*, 2004; Tsukagoshi *et al.*, 2005). From these analyses a major regulator, hexokinase 1 (HXK1), has been identified as an important sugar sensor in plants (Moore *et al.*, 2003; Cho

et al., 2006). Many sugar mutants have also shown the intimate relationship that exists between sugar signaling and responses to hormones including ABA, ethylene, cytokinins, and auxins (Finkelstein and Gibson, 2002; León and Sheen, 2003; Rolland et al., 2006; Rook et al., 2006).

Genetic approaches have supported the participation of some transcription factors as key elements of sugar signaling. Complementation analysis defined allelism of the *pin6*, *isi3*, *sis5* and *sun6* sugar mutants to the ABA responsive mutant *ABA insensitive 4* (*abi4*), classically related to ABA signaling (Arenas-Huertero et al., 2000; Huijser et al., 2000; Laby et al., 2000; Rook et al., 2001). Independent *abi4* mutant alleles have been isolated from most sugar screenings, suggesting that this factor plays an important role in sugar responses. However, the specific role of this factor and its mechanism of action in sugar responses are still poorly understood.

ABI4 encodes an AP2/ERF transcription factor that is important for ABA signaling during seed development and germination (Finkelstein et al., 1998). However, the function of this factor is also crucial for other aspects of plant development including lipid mobilization from the embryo (Penfield et al., 2006), chloroplast retrograde signaling (Koussevitzky et al., 2007), and glucose responses (Arenas-Huertero et al., 2000; Huijser et al., 2000; Laby et al., 2000). *ABI4* is expressed in discreet developmental windows, namely during seed maturation and in seedlings shortly after germination (Soderman et al., 2000; Arroyo et al., 2003). In seedlings, its expression pattern overlaps with the establishment of autotrophic growth following a similar pattern to the one observed for the transcription factor *AB5* (López-Molina et al., 2001; Brocard et al., 2002). In later developmental stages, *ABI4* is expressed at low but detectable levels (Soderman et al., 2000; Arroyo et al., 2003). The expression of *ABI4* is regulated by several factors such as ABA, glucose, and trehalose (Arenas-Huertero et al., 2000; Arroyo et al., 2003; Ramon et al., 2007). *abi4* mutant alleles display additional phenotypes including increased tolerance to osmotic and salt stress during germination and early seedling growth (Quesada et al., 2000).

Based on sequence similarity, *ABI4* is a unique gene in *Arabidopsis*; however, *ABI4* orthologs have been reported in the maize (*Zea mays*) and rice (*Oryza sativa*) genomes (Niu et al., 2002; Yu et al., 2002). *In vitro* the *ABI4* protein from maize binds to DNA through a CACCG sequence, which has similarity to the coupling element 1 (CE1) involved in ABA-induced gene expression (Busk et al., 1997; Niu et al., 2002). Although this CE1-like motif appears important for binding *ABI4*, degenerated bases of this sequence still retain some binding capacity. A recent report demonstrates that a smaller motif (called a CCAC motif) might function as the core *ABI4*-binding element in genes down-regulated by *ABI4* (Rook et al., 2006; Koussevitzky et al., 2007). Sequences with similarity to the two potential *ABI4*-binding sites are found in

the upstream sequences of several ABA- and sugar-regulated genes in maize, rice, barley (*Hordeum vulgare*), and *Arabidopsis* (Niu et al., 2002; Acevedo-Hernández et al., 2005; Koussevitzky et al., 2007). The CE1-like element is also found in the promoter regions of the *ABI4* genes of maize, rice, and *Arabidopsis*, where it was hypothesized that it could act as a negative regulator of its own expression (Niu et al., 2002).

Experimental evidence demonstrates that *ABI4* is required for the correct regulation of many genes by ABA and sugars. The sugar-mediated repression of various photosynthetic genes is lost in the *abi4* mutant (Dijkwel et al., 1997; Arenas-Huertero et al., 2000; Acevedo-Hernández et al., 2005; Koussevitzky et al., 2007). Similarly, the induction of various genes upon sugar treatment is dependent on the presence of *ABI4* (Arenas-Huertero et al., 2000; Rook et al., 2001; Arroyo et al., 2003; Koussevitzky et al., 2007). Recent studies have shown that the *Arabidopsis ABI4* acts as a direct negative regulator of the expression of *RBCS* and *Lhcb* genes in response to glucose (Acevedo-Hernández et al., 2005; Koussevitzky et al., 2007). However, the mechanism by which *ABI4* participates in the induction of genes is still unclear.

To advance our understanding of the role(s) of *ABI4* during sugar responses, in this work we demonstrate the capacity of *ABI4* to bind, *in vitro*, to *ABI4*, *AB5*, and *SBE2.2* regulatory sequences and that the CACCG box is required for this binding. Using a protoplast system, we show that *ABI4* directly activates transcription through the CACCG box of *ABI4*, *AB5*, and *SBE2.2* genes. Finally, *in planta* studies corroborate that *ABI4* is a major positive regulator of its own expression during development and in ABA and sugar signaling responses. In its absence its own expression is diminished in most conditions analyzed. This study provides important insights into the function of the *ABI4* transcription factor that will permit a better understanding of its function during the central processes of seedling development.

RESULTS

Previous work demonstrated that the sugar activation of several genes such as the starch biosynthetic ADP-glucose pyrophosphorylase (*APL3*), starch branching enzyme (*SBE2.2*) and the *ABI4* and *AB5* transcription factors is dependent on *ABI4* (Rook et al., 2001; Arroyo et al., 2003). To investigate whether these genes are direct targets of *ABI4*, we searched for the presence of putative *ABI4*-binding sites (CACCG) in the promoter regions of these genes. The analysis included 3.0 kb of *ABI4*, 1.7 kb of *SBE2.2* and 1.8 kb of *AB5* 5'-regulatory sequences upstream of the ATG (<http://www.arabidopsis.org>; Figure 1a). A putative *ABI4*-binding site was reported downstream of the TATA box in the *ABI4* promoter, suggesting that *ABI4* might suppresses its own transcription (Niu et al., 2002). Despite this observation, the expression of *ABI4* in *Arabidopsis* is upregulated by glucose

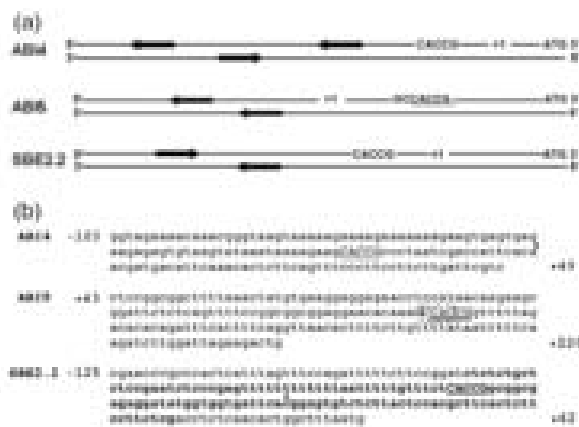


Figure 1. Putative ABI4-binding motifs in the *ABI4*, *ABI5*, and *SBE2.2* genes. (a) Schematic representation of the 5' upstream regulatory sequences of the *ABI4*, *ABI5*, and *SBE2.2* genes. The lines represent the coding strand (5' to 3') and the non-coding strand (3' to 5'). The putative ABI4-binding box analyzed by electrophoretic mobility shift assay (EMSA) is in capital letters. Other putative ABI4-binding boxes (arrows), transcription start site (+1), and ATG are indicated. The direction of the arrow reflects the orientation of the sequence.

(b) Nucleotide sequence of the *ABI4*, *ABI5*, and *SBE2.2* regulatory regions used in EMSA and protoplasts. The sequences are numbered relative to the transcription start site. The sequence in bold of *SBE2.2* corresponds to the fragment used in the EMSA whereas the fragment for protoplasts corresponds to the complete sequence. The *ABI4* CE1-like motif is underlined and the CCAC motif in the *ABI5* sequence is shown with a box. The numbers in each sequence are related to the transcription initiation start site for each gene that are marked by the star present on the top of the sequences.

in an ABI4-dependent manner (Arenas-Huertero *et al.*, 2000). Previous work has shown that the 3-kb upstream sequence of *ABI4* includes the cis-acting motifs necessary for sugar response (Arroyo *et al.*, 2003); therefore, this region was analyzed for additional ABI4 putative binding sites. To precisely locate these motifs within the 5'-regulatory sequence the transcription start site of the *ABI4* gene was determined using RNA ligase-mediated rapid amplification of 5' ends (RLM-RACE). A major transcription start site for *ABI4* is located at 136 bp upstream of the ATG (Figure 1a). Four putative CE1-like elements (-2341, -1497, -727, and -118) were found (Figure 1a). Only one motif is a typical CE-1 like element in direct orientation at -118 bp from the transcription start site; and that corresponds to the one previously identified by Niu *et al.* (2002).

ABI4 binds to *ABI4* promoter in vitro

To assay direct physical interaction with the purified ABI4 protein *in vitro* a double-stranded fragment of 152 bp from the *ABI4* 5' upstream sequence [including 103 bases of the promoter and 49 bases of the 5' untranslated region (UTR)] was amplified and used as probe in electrophoretic mobility shift assay (EMSA) analysis (Figure 1b). Our analysis was restricted to the element that displays the consensus CE1-

like sequence. The presence of CE1-like elements in the upstream sequence of a gene is not uncommon, and the binding capacity of these and related sequences *in vitro* has been previously demonstrated (Niu *et al.*, 2002). Thus in this study we included additional sequences around the CE1-like element that might be important for the functionality as a true ABI4-binding element. The EMSA was performed using recombinant GST:ABI4 fusion protein and similar results were observed with an ABI4:His recombinant protein (data not shown). As shown in Figure 2(a), recombinant ABI4 binds to the 152-bp *ABI4* promoter fragment. This protein-DNA interaction is fully dependent on the presence of ABI4, as demonstrated by using the GST protein alone (Figure S1a in Supporting Information). The specificity of the binding was corroborated through the use of the same fragment as a cold specific competitor (Figure 2a, lanes 3-5) and with a non-specific DNA fragment as a negative control (lanes 10-12). The function of the non-specific sequence as a negative control was corroborated by its inability to bind to ABI4 (Figure S1b).

A double-strand oligonucleotide containing four repeats of the CE-like element was also used as a specific competitor (Figure 2a, lanes 6-8). This sequence was found to compete very effectively, as the use of only 2x molar excess is sufficient to out-compete most of the labeled shifted fragment. This result supports the idea that the CE1-like motif is an important element for ABI4 binding. To provide further evidence of the participation of the CE1-like box in this binding and the specificity of this interaction, a double strand of a 25-bp sequence around the CACCG box was also used in EMSA analysis. As shown in Figure 2(b) a shifted band is clearly observed with this smaller fragment. Moreover, this interaction is completely lost when the 5 bp corresponding to the CE1-like motif (CACCG) were mutated (Figure 2b). These results demonstrate that the CE1-like element is necessary for the ABI4 interaction *in vitro*. As expected for a specific interaction, the molar excess of the same cold 25mer fragment acts as an efficient competitor (Figure 2c, lanes 3 and 4), as does the oligonucleotide containing four repeats of the CE-like element (Figure 2c, lanes 5 and 6). Also, as expected for a specific interaction, no competition was observed with increasing levels of the mutated version of this fragment or with an unrelated fragment of similar size containing the consensus binding site for the erythroid-specific transcription factor (Figure 2c, lanes 7-11) (Rincón-Arango *et al.*, 2005).

ABI4 binds to *ABI5* and *SBE2.2* 5' upstream regulatory regions in vitro

A similar analysis was performed with fragments of the *ABI5* and *SBE2.2* genes. In the case of *ABI5* and *SBE2.2*, our *in silico* analysis showed sequences identical to the consensus CE1-like motif in the regulatory region of both

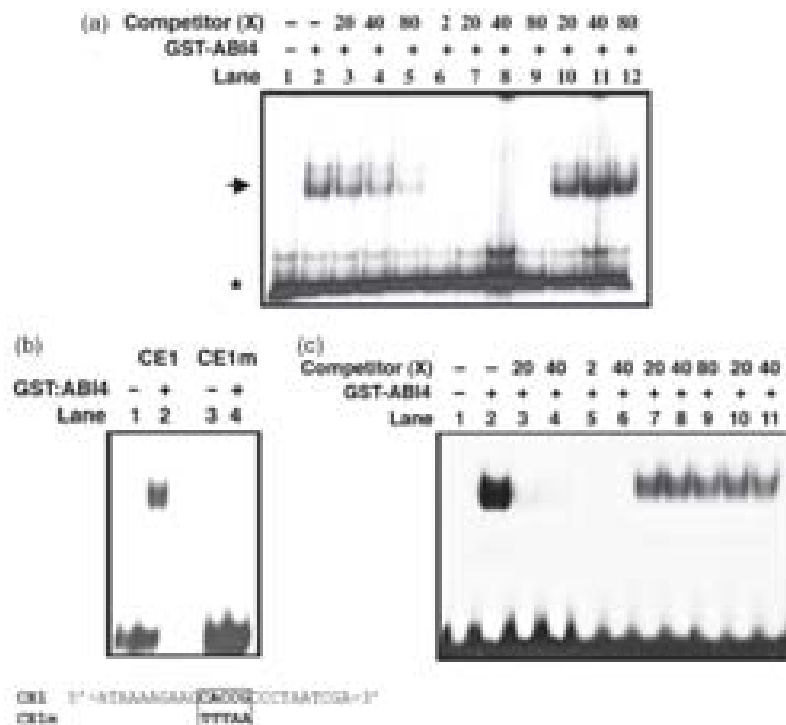


Figure 2. AB14 protein binds the AB14 promoter fragment containing the CE1-like element.

Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) were conducted using a 102-bp double-stranded fragment of the AB14 promoter (a) or a 25-bp sequence (b, c), that includes the CACCG box and a GST-AB14 protein.

(a) The 102-bp AB14 radiolabeled fragment in the presence (lanes 2–12) or absence (lane 1) of GST-AB14. Non-radiolabeled AB14 competitor was used at a 20- (2), 40- (4), or 80- (5) molar excess, and 2- (6), 20- (7), 40- (8), or 80- (9) molar of a oligonucleotide containing four repeats of the AB14 binding box. As an additional control a competition with 20- (10), 40- (11), and 80- (12) molar excess of a non-related DNA fragment obtained from the 3' untranslated region (UTR) of the of AB14 gene was included.

(b) Results of EMSA using radiolabeled 25-bp double-stranded fragments containing the CACCG element (lanes 1 and 2) or a version mutated in the CE1-like motif (lanes 3 and 4) and in the presence (2 and 4) or absence (1 and 3) of AB14 recombinant protein. The specific sequence of each oligonucleotide used is shown at the bottom.

(c) Specificity of the 25-bp double-stranded fragment binding (2) include the following controls: no protein (1), non-radiolabeled competitor 20- (3) and 40- (4) molar excess, 2- (5) and 40- (6) molar excess of non-radiolabeled 4- CE1-like fragment, 20-, 40-, and 80- (7–9) molar excess of the mutated CE1-like motif fragment, and 20- (10) and 40- (11) molar excess of a fragment containing a GATA motif. These EMSAs are representative of biologically independent experiments.

genes (Figure 1a). Three putative CE1 elements were found in the upstream sequence of *AB15* (Figure 1a), but only one motif is found in direct orientation at +134 relative to the transcription initiation site. In the promoter of *SBE2.2* three putative motifs were found in the 1.7-kb upstream region of this gene at positions -733, -569, and -27 relative to the transcription initiation-site (Figure 1a).

Our results demonstrated that the AB14 protein binds to a 177-bp double-stranded fragment of the regulatory regions of *AB15* (Figure 3a) containing the CE1-like motif located at 126 bp downstream from the transcription initiation site (Figure 1b). No binding was observed using an upstream fragment that includes the two additional putative CE1-like elements in reverse orientation (Figures 1a and S1c). This result suggests that additional sequences around the core CE1 element are important for AB14 binding. Specificity of the binding to the *AB15* fragment was followed by the competition with increasing molar excess of the unlabeled

AB15 fragment (Figure 3a, lanes 3 and 4) and with the oligonucleotide containing four repeats of the CE1-like element (lanes 7 and 8). In contrast, no competition was detected with an unrelated fragment (lanes 9–11). A recent report found that a CE1-related sequence CCAC/GT motif, is important for AB14 binding in some genes (Koussevitzky et al., 2007). Inspection of the *AB15* 5'-regulatory sequence showed the presence of the core sequence reported by Koussevitzky et al. (2007), in addition to the canonical CE1-like motif (Figure 1b). To gain further insight in the participation of this alternative sequence in the interaction of AB14 to the *AB15* promoter, a fragment containing the CCAC motif was substituted for an unrelated sequence and used as cold competitor. As shown in Figure 3(a), when using the same molar excess as the original 177-bp fragment no competition with this mutated fragment is observed (lanes 5 and 6). However, when this mutated fragment was radiolabeled and used in EMSA analysis the AB14 protein

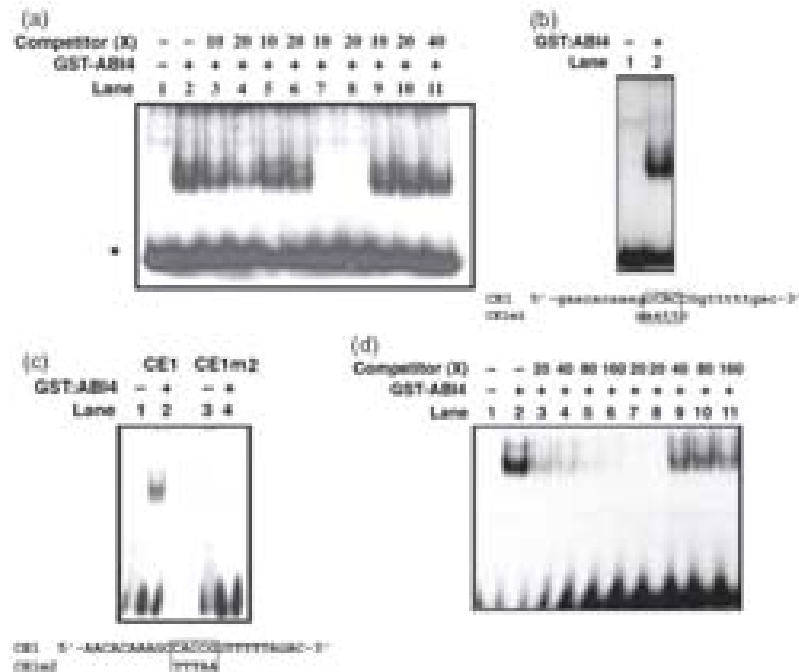


Figure 3. AB4 protein binds the AB5 5' regulatory region.
 (a) A 117-bp double-stranded AB5 probe (1) and interaction with GST:AB4 (2–11). Competition with 10× (3) or 20× (4) cold AB5 with 10× (5) or 20× (6) of the AB5 mutated fragment (CE1m1) and with a 36-bp oligonucleotide containing four repeats of the CE1-like sequence 10× (7) or 20× (8). For non-specific competitor 10× (9), 20× (10), or 40× (11) of the 3' untranslated region (UTR) of the AB4 fragment as in Figure 2.
 (b) Results of electrophoretic mobility shift assay (EMSA) using the 152-bp radiolabeled fragment CE1m2, where the motif CCAC was substituted (1) and with interaction with GST:AB4 (2). The sequence mutated in this fragment is showed at the bottom.
 (c) Results of EMSA using radiolabeled 25-bp double-stranded fragments around the CE1-like element (1 and 2) or a version mutated in this motif (3 and 4) and in the presence (2 and 4) or absence (1 and 3) of AB4 recombinant protein. The specific sequence mutated in each oligonucleotide used is shown at the bottom and in Table S1.
 (d) Specificity of the 25-bp double-stranded CE1 fragment binding (2) include the following controls: no AB4 recombinant protein (1), 20× (3), 40× (4), 80× (5), and 160× (6) molar excess of non-radiolabeled fragment; 20× non-radiolabeled AB4 25-bp double-stranded fragment (7) and 20× (8) molar excess of non-radiolabeled 4× CE1-like fragment; 40×, 80×, and 160× (9–11) molar excess of the mutated CE1-like motif fragment shown in (c). These EMSAs are representative of biologically independent experiments.

is still capable of binding (Figure 3b). This suggests that this sequence is not essential for this interaction. To further assess the specificity of the observed binding and to analyze the participation of the CE1-like element in this interaction a smaller fragment containing 25 bp around the CE1-like elements was used. This double-stranded 25-bp oligonucleotide efficiently interacts with the AB4:GST fusion protein (Figure 3c). This interaction is completely lost when the box corresponding to the core CE1-motif is mutated (Figure 3c, lanes 3 and 4). Specificity of this interaction is supported by the effective competition of molar excess of the 25-bp non-radioactive oligonucleotide and with the oligonucleotide containing the four repeats of the CE-like motif (Figure 3d, lanes 3–8). No significant competition was observed using increasing excess of the oligonucleotide carrying the mutation of the CE1-like motif (Figure 3d, lanes 9–11). These results demonstrate that AB4 interacts with the AB5 promoter sequence using the CE1-like motif.

In the case of *SBE2.2*, specific binding was also detected using a 121-bp fragment of the *SBE2.2* promoter around the CE-like motif closest to the ATG (Figures 1a and 4a). Molar excess of the corresponding cold fragment competes for this binding (Figure 4a, lanes 3 and 4); as well as the four repeats of the CE1-like 36-bp oligonucleotide (Figure 4a, lanes 5 and 6) and in contrast to the non-specific fragment (Figure 4a, lanes 7 and 8). To further corroborate specificity of the binding and the participation of the CE1-like motif, a 25-bp double-stranded oligonucleotide was used in additional EMSA analysis. Binding is observed in the presence of AB4 with this smaller fragment (Figure 4b, lanes 1 and 2). This interaction is mediated by the CE1-like element since a mutation in this motif substantially reduces binding but, in contrast to AB4 and AB5, does not abolish it (Figure 4b, lanes 3 and 4). Closer inspection of the sequence around this element revealed that a motif similar to the CE1-like element is present in the complementary strand of this fragment

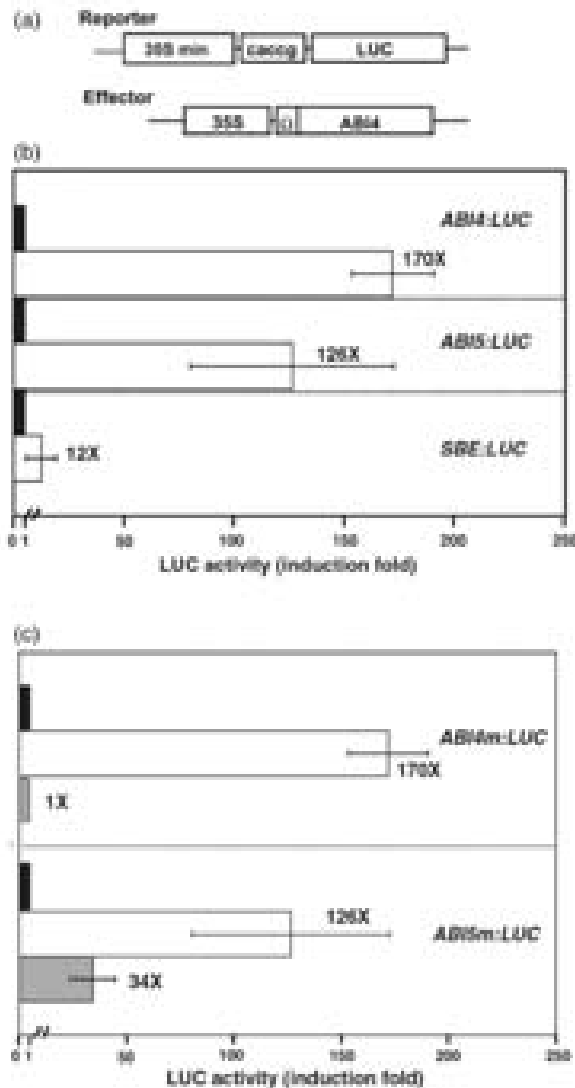


Figure 5. The CACCG sequence is involved in ABI4 protein binding *in vivo*. (a) Schematic diagram of the reporter and effector constructs used in (b) and (c). The reporter constructs contain the long fragments (Figure 1) used in electrophoretic mobility shift assay (EMSA) of ABI4 (152 bp), ABI5 (177 bp), and SBE2.2 (185 bp) expressed from the 35S minimal promoter (-90 bp upstream of the transcription start site) and fused to luciferase. The effector construct contains the CaMV 35S promoter and 5' untranslated region (UTR) translational enhancer (TME) (8 fused to ABI4 cDNA). (b) Relative LUC activity from Col protoplasts transfected with ABI4:LUC, ABI5:LUC or SBE2.2:LUC reporter constructs alone (black bar) or co-transfected with the effector 35S-ABI4 (white bar). LUC activity is expressed as the induction fold between the specific LUC activity in the presence of ABI4 and the activity without ABI4, taken as 1. (c) Relative LUC activity of protoplasts transfected with the same constructions as in (b) alone (black bars), in the presence of the effector 35S-ABI4 (white bars). Gray bars correspond to the LUC activity from a fragment containing a mutation in the CE1-like motif for ABI4 or in the CCAC motif for ABI5 in the presence of the effector. Each bar corresponds to the mean of at least three independent biological experiments. Transfection efficiency expression is given as LUC specific activity corrected by GUS specific activity. LUC activity is reported in relation to the activity of the 35S-LUC control taken as 1.

Protoplasts were obtained from wild-type plants (Col) and transformed with each reporter construct alone, or co-transformed with the 35S-ABI4 plasmid in addition to the reporter construct. The optimal ratio of the reporter and effector constructs was preliminarily determined and it was kept constant in all of the analyses (data not shown). The co-transfection of the 35S-ABI4 plasmid, that expresses the ABI4 protein, enhances LUC activity of each of the three reporter genes (Figure 5b) in comparison to protoplast transfected with only the reporter constructs and a control plasmid that does not express ABI4. The LUC activity in protoplasts from each of the reporter constructs lacking ABI4 effector was used as a comparison for the quantification of expression induction. In these experiments this control activity was adjusted to 1. The increases in LUC activity are 170-fold for ABI4:LUC, 126-fold for ABI5:LUC and 12-fold for SBE2.2:LUC (Figure 5b). These responses are reproducible and statistically significant to confidence levels of 99% (ABI4 and ABI5) and 90% (SBE2.2) according to the ANOVA and Tukey analyses. The increase in LUC activity by ABI4 is specific to the presence of the fragments containing the CE1-like elements for each gene, as it is not observed in a 35S-LUC construct that lacks these sequences (data not shown). These results further support the capacity of ABI4 to activate, *in vivo*, the expression of the ABI4, ABI5, and SBE2.2 genes.

The CACCG sequence in the ABI5 promoter is necessary for ABI4 trans-activation in Arabidopsis protoplasts

Our *in vitro* analyses showed that the CE1-like (CACCG) motif (Niu *et al.*, 2002) is a central element of the binding site for the Arabidopsis ABI4 protein in the ABI4, ABI5, and SBE2.2 genes. These analyses also demonstrated that the alternative motif, the CCAC motif, is not critical for *in vitro* ABI4 binding in the ABI5 regulatory region (Figure 3a). To further address the importance of these sequences for the trans-activation of LUC expression in the transient assay experiments, the mutations in ABI4 (eliminating the CE1-like motif) and in the ABI5 regulatory region (eliminating the CCAC motif) sequences were used. As shown in Figure 5(c), the mutation of the CE1 motif in the ABI4m:LUC construct reduced the LUC expression levels to those observed in the absence of ABI4 protein effector. These data further demonstrate that, in protoplasts, the CACCG sequence is also an essential element for the trans-activation mediated by ABI4. In contrast, a four fold reduction in the LUC activity is observed in the mutation that eliminates the CCAC-motif sequence from the ABI5 regulatory region. This still leaves a 34-fold induction in comparison to that in the absence of ABI4 protein. This result indicates that this sequence is not required for the trans-activation of this promoter by ABI4. These data correlate with the binding observed in this mutated sequence by the EMSA experiments.

ABI4 as an essential element for the activation of the *ABI4* gene during development and in glucose responses

The results presented thus far demonstrate that *in vitro* and in a transient assay system *ABI4* interacts with CE1-like fragments present in the regulatory regions of several glucose-regulated genes, including its own gene. Given that the *ABI4* binding appears weak *in vitro* we sought to document the importance of the *ABI4* interactions with its target genes *in vivo*. With this aim, we used a previously reported transgenic line that expresses the β -glucuronidase (*GUS*) reporter gene (*uidA*) driven by 3 kb of the 5' upstream promoter and untranslated regions of *ABI4* (*pABI4*:*GUS*). It has been shown that the expression pattern of the *GUS* transgene in this line correlates with the expression profile of the endogenous *ABI4* transcript (Soderman et al., 2000; Arroyo et al., 2003; Price et al., 2003; Penfield et al., 2006) and with the available public microarray data on *ABI4* expression (<http://www.geneinvestigator.com/>). In agreement with the *ABI4* endogenous transcript levels and, as reported for this transgenic line (Soderman et al., 2000) in the presence of endogenous *ABI4*, *GUS* activity is detected in seeds containing a U-stage embryo (Figure 6a). Also similar to the *ABI4* transcript, the *GUS* expression in this line decreases in dry seeds to low levels (Figure 6b) as previously reported (Arroyo et al., 2003) and then increases again during

germination (Figure 6c–k). Not only is the expression pattern of this line consistent with the endogenous *ABI4* transcript, but its tissue-specific expression pattern is also consistent. As reported by Penfield et al. (2006), during germination *ABI4* expression is confined to the embryo and detected in all visible tissues (Figure 6d,k). No expression is observed in the endosperm of imbibed seedlings (Figure 6c,e). In the germinated 3-day-old seedlings *ABI4* expression is found in most of the plant, including roots and cotyledons (Figure 6l). In 7-day-old seedlings *GUS* expression is restricted to the hypocotyls, cotyledons, and the tip of the root (Figure 6m). In the 10-day-old seedlings the level of *GUS* has been shown to decrease to very low levels (Arroyo et al., 2003), and no expression is detected in true leaves (Figure 6n). Finally, *GUS* expression is undetectable in older (14-day-old) developmental stages (Figure 6o). A similar decrease is documented for the endogenous transcript levels, although with a faster disappearance (Arroyo et al., 2003). As previously reported, this might reflect differences in transcript stability between the endogenous *ABI4* and the *GUS* transgene caused by the absence of the coding region or 3' untranslated sequences of the *ABI4* transcript in the *GUS* transgene.

As this transgene accurately reflects major aspects of *ABI4* gene expression it was introduced into the *abi4* mutant background to analyze the impact on its expression of the

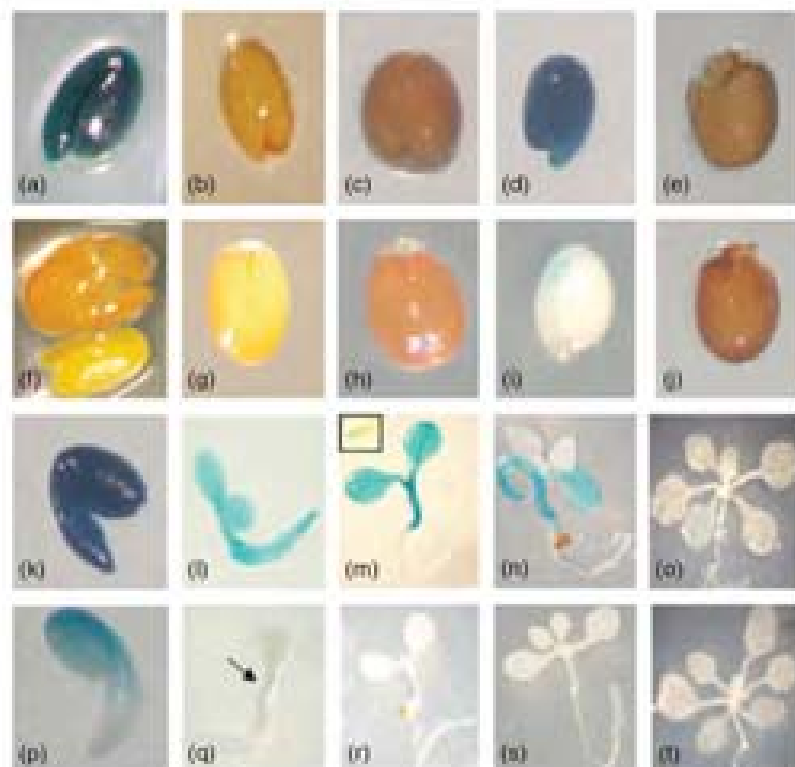


Figure 6. Requirement of *ABI4* for the expression of *pABI4*:*GUS* during early seedling development.

ABI4:*GUS* staining in wild type (a–e, k–o) or in *abi4* (j–l, p–t) of seeds (a–j, k, pl) and in vegetative tissues (l–o, q–t). Seeds in U-stage embryos prior to desiccation (a, f), dry seeds (b, g), testa and aleurone of 24-h imbibed seeds (d, h, k), embryos of 24-h (d, l, i), tests and aleurone of 48-h (d, j, l, p), and embryos of 48-h (d, q, pl). Seedlings were analyzed from: 3-day-old (l, q), 7-day-old (m, r), 10-day-old (n, s), and 15-day-old (o, t) grown in MS media. The inset rectangle in (m) is a close-up of the root tip. Arrow points to the *GUS* stain observed in the 3-day-old seedlings.

absence of functional ABI4. Homozygous plants from five independent crosses between the *abi4* mutant and two independent *pABI4:GUS* transgenic lines display a similar GUS expression pattern (data not shown). The expression of only one representative line is shown here. In the *abi4* background GUS expression is very low in most of the developmental stages where high expression was detected in the wild-type background (Figure 6f–j,p–t). GUS expression is undetectable in seeds with a U-stage embryo (Figure 6f). Very low GUS expression is detected early in germination at 24 h (Figure 6i) or 48 h (Figure 6p) after imbibition in the *abi4* mutant background (Figure 6d,k). This very low signal demonstrates that the lack of expression in many stages is not a result of inactivation of the transgene. In 3-day-old *abi4* mutant seedlings GUS staining is confined only to the hypocotyl region (Figure 6g), which appears to be the site of highest expression of ABI4 in the presence of a functional ABI4 (Figure 6i). After this stage there is no detectable GUS in the *abi4* mutant seedling background (Figure 6r–t). These results demonstrate that ABI4 positively regulates the expression level of its own gene during development. The role of ABI4 as an activator of its own expression was also analyzed by direct measurement of the ABI4 transcript in the *abi4-1* mutant seedlings by RT-PCR in two representative developmental stages (Figure 7). Significantly lower ABI4 transcript levels are present in the *abi4-1* mutant in 48-h imbibed seeds compared to that found in wild-type plants (Figure 7a). A similar result is observed in the 3-day-old seedlings (Figure 7b) and confirmed by quantitative (q)RT-PCR (data not shown). These results

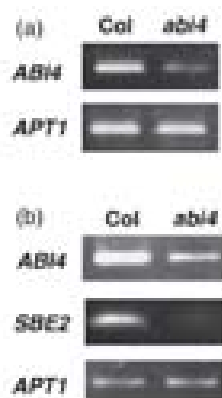


Figure 7. Expression analysis of the *ABI4* and *SBE2.2* genes during wild-type and *abi4* mutant seedling development.

(a) A RT-PCR analysis of total RNA from imbibed 48-h *Col-0* wild-type and *abi4-1* seeds.

(b) A RT-PCR analysis of total RNA from 3-day-old *Col-0* wild-type and *abi4-1* seedlings grown in MS media supplemented with 1% sucrose.

Linearity of the PCR was corroborated by analyzing in different cycles for each PCR product. The selected cycles were: 30 cycles for *ABI4*, for *SBE2.2*, and 23 for *APT1*. The *APT1* RT-PCR product was used as a cDNA internal control.

A representative experiment from two biological independent experiments is shown in the figure.

further support the role of ABI4 as an important activator for its transcription and further justify the use the *ABI4:GUS* transgenic line as good marker of the endogenous ABI4 transcript level.

Several lines of evidence have shown that ABI4 is an important factor for sugar responses in plants. ABI4 directly binds to the promoter of several genes repressed by sugars (Acevedo-Hernández et al., 2005; Koussevitzky et al., 2007). The sugar induction of genes including *ABI4*, *ABIS*, and *APL3* is affected in the *abi4* mutant background (Arenas-Huerta et al., 2000; Arroyo et al., 2003; Rook et al., 2006), and this suggests that ABI4 also interacts with the regulatory region of these genes. To further support this interaction *in vivo* during sugar responses, the GUS expression in the *ABI4:GUS* transgenic line was followed upon sugar treatment. In 6- to 7-day-old wild-type seedlings, the expression of *ABI4* transcript is low but detectable (Price et al., 2003). In agreement with this, GUS expression is detected at this stage in hypocotyls and cotyledons (Figure 8a) as in Arroyo et al. (2003). GUS activity is also present in wild-type background seedlings grown on 4% glucose (Figure 8b) that display similar development to plants grown under normal growth conditions. The presence of 4% glucose causes wild-type plants to maintain high *ABI4* expression later in development (Arroyo et al., 2003). As previously reported, the presence of 7% glucose causes development to arrest at an early stage in wild-type seedlings and significantly induces the expression of *ABI4* (Arenas-Huerta et al., 2000; Arroyo et al., 2003). Likewise, GUS expression is high in the wild-type background transgenic seedlings grown in 7% glucose media (Figure 8c,q), as previously reported (Arroyo et al., 2003). In contrast to this pattern, the *pABI4:GUS* transgene in the *abi4* background shows very low GUS activity in seedlings grown in 4% glucose, even though the mutant seedlings exhibit similar development to wild-type seedlings grown in the same conditions. In 7% glucose medium, GUS expression in the *abi4* background is restricted to the upper part of the hypocotyl (Figure 8g) in contrast to the high GUS activity present in the wild-type background (Figure 8c). Although *abi4* seedlings are not arrested by the presence of this high glucose level, the lack of GUS activity is probably not the result of their developmental stage because GUS activity is detected in the wild-type seedling background displaying a similar developmental stage (Figure 8a,b). Quantitative analysis of GUS levels corroborates that without ABI4 protein, induction of the *ABI4* transcript is reduced (Figure 8g). However, in the mutant background a low but reproducible increase in the levels of GUS are observed upon glucose treatment (Figure 8i). While these *in planta* results support that ABI4 is required for glucose responses of this gene, they also suggest that an additional factor(s) in the *abi4* mutant background also participates in the increase of the *ABI4* expression level in response to high glucose. All these data

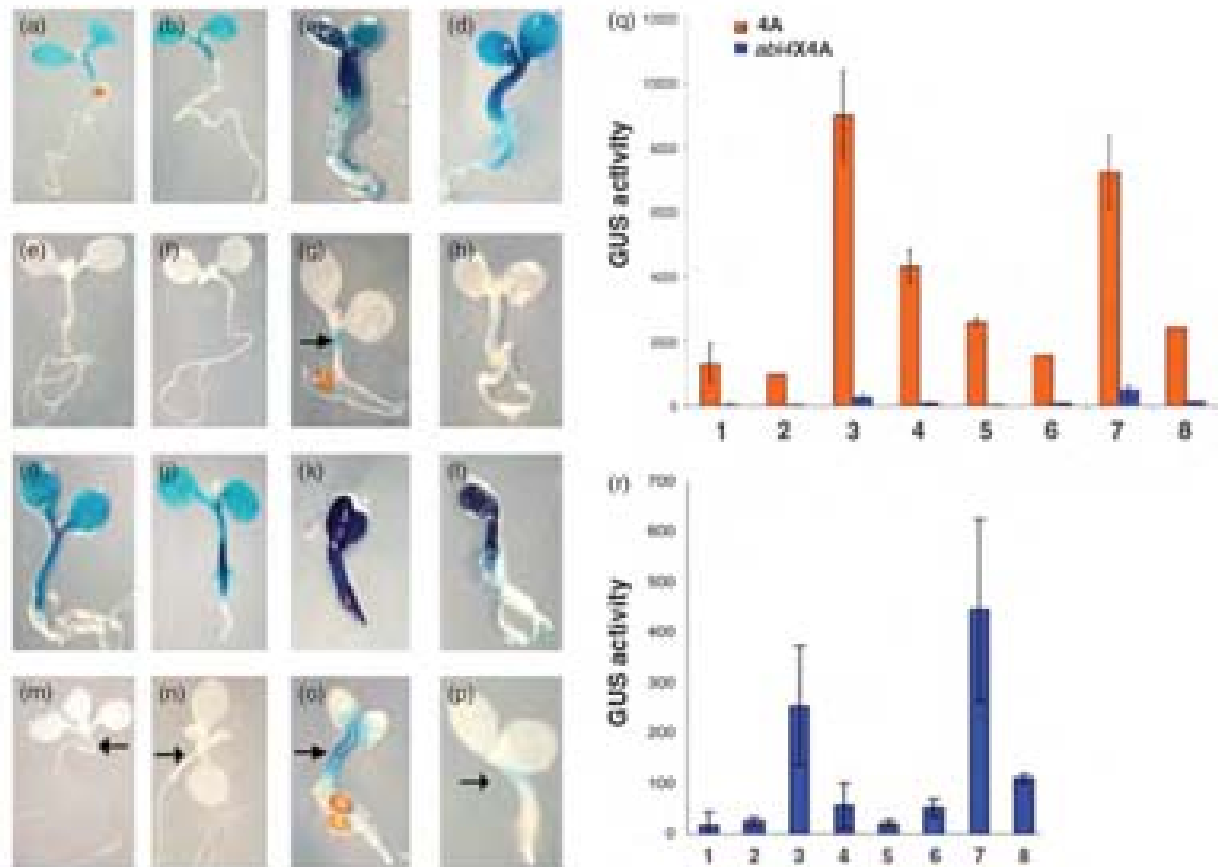


Figure 8. Requirement of *ABI4* for sugar and osmotic responses.

Histochemical analysis of p*ABI4*:GUS in 7-day-old wild type (a–d, i–l) and in *abid4* (e–h, m–p) seedlings grown in MS media (a, e) or MS supplemented with 4% glucose (b, f), 7% glucose (c, g), 7% mannitol (d, h), 100 nM ABA (i, m), 4% glucose + 100 nM ABA (j, n), 7% glucose + 100 nM ABA (k, o), and 7% mannitol + 100 nM ABA (l, p). The arrowheads point to the position of GUS expression in the *abid4* seedlings. (q) The GUS specific activity was measured in protein extracts from seedlings grown in the conditions specified. (r) The GUS activities from the *abid4* background. The GUS activities were obtained from seedlings of the transgenic p*ABI4*:GUS in wild type (orange bars) or in an *abid4* background (blue bars) growing in GM (1), 4% glucose (2), 7% glucose (3), 7% mannitol (4), 100 nM ABA (5), 100 nM ABA + 4% glucose (6), 100 nM ABA + 7% glucose (7), 100 nM ABA + 7% mannitol (8). Each bar corresponds to the mean of four independent experiments. Activity units are given in $\mu\text{mol methyl-umbelliferyl}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

strongly suggest that the low level of GUS activity observed in the mutant background seedlings is due to the lack of *ABI4*, and that *ABI4* is an activator of *ABI4* gene expression in response to sugars. This expression profile is in agreement with a low transcript abundance of *ABI4* in the *abid4* mutant upon sugar treatment (Figure S2a) as was previously reported (Arroyo et al., 2003).

Expression of the *ABI4* transcript is also induced by the presence of ABA and osmotic stress in wild-type seedlings (Figure S2a) and (Cheng et al., 1999; Arroyo et al., 2003; Penfield et al., 2006). As previously reported (Arroyo et al., 2003) this response is also observed in the GUS transgenic line (Figure 8q), where these plants show high GUS activity in most tissues of the plant (Figure 8d, i). This induction is also dependent on the presence of active *ABI4* (Figure 8h, m). In the absence of *ABI4* (i.e. in the *abid4* mutant background) the addition of 100 nM ABA, results in detectable

GUS activity only in the hypocotyl (Figure 8m), with a similar pattern to that observed with 7% glucose. Wild-type seedlings grown in 4% glucose (Figure 8j), and more dramatically 7% glucose plus ABA (Figure 8k), appear to have stronger GUS staining than glucose alone. This might suggest synergistic interactions between sugar and ABA. However, quantitative analysis of these samples demonstrates that the levels of GUS expression in these conditions are not significantly different from those grown only in glucose media (Figure 8q). We speculate that this appearance might be the result of seedling size in the presence of glucose and ABA, which is considerably smaller than for those grown only in glucose. This non-synergistic response between glucose and ABA is consistent with the proposed role of ABA hormone as a component of the sugar signal transduction cascade (Arenas-Huerta et al., 2000). Seedlings grown in mannitol plus ABA also show high levels of

GUS expression (Figure 8), which are significantly reduced in the absence of ABI4 (Figure 8p).

Our *in vitro* and protoplast data support the direct interaction of ABI4 with the *ABI5* and *SBE2.2* regulatory regions in addition to the *ABI4* gene. To further support this interaction *in vivo* we analyzed the endogenous levels of these genes in 3-day-old seedlings and upon sugar treatment in the wild type and in the *abi4* mutant seedlings. As shown in the Figure 7(b), similar to *ABI4*, the transcript level of the *SBE2.2* gene is very low in the *abi4* mutant seedlings. In contrast, no major difference was detected in *ABI5* transcript levels between wild-type and mutant seedlings in this developmental stage (data not shown). This result supports the positive role of ABI4 in *SBE2.2* gene expression during early seedling development. The sugar induction of *ABI4* and *ABI5* genes observed in the presence of an active ABI4 factor is diminished in the *abi4* mutant background (Figure S2a). These data are in agreement with previously published data (Arroyo *et al.*, 2003). A similar response is observed in the *SBE2* gene. In contrast to the transcript accumulation observed in the wild-type plants upon sugar treatment, the *SBE2* transcript levels in the *abi4* mutant background are basically unchanged (Figure S2b). All these *in vivo* data support the role of ABI4 as a transcription activator for each of these three genes under certain conditions.

DISCUSSION

Plants are autotrophic organisms; consequently the precise detection of endogenous sugar levels is fundamental for sugar synthesis and correct distribution to the plant tissues where it is required, ensuring the success of plant growth. During the past 15 years overwhelming evidence has accumulated that unequivocally demonstrates the role of glucose as a molecule capable of regulating a variety of central aspects of plant development.

The protein ABI4 was initially identified as an important factor for regulation of ABA during seed germination (Finkelstein *et al.*, 1998). However, independent evidence supports a role for ABI4 which extends beyond this function, playing a central part in integrating various aspects of carbohydrate utilization during early seedling development. This includes such processes as sugar signaling (Arenas-Huerta *et al.*, 2000; Huijser *et al.*, 2000; Laby *et al.*, 2000; Rook *et al.*, 2001; Arroyo *et al.*, 2003), where ABI4 has been the most often isolated gene in diverse sugar screenings. Also, recent evidence demonstrates that ABI4 is required for communication from the chloroplast to the nucleus (Koussevitzky *et al.*, 2007), for lipid mobilization from the embryo during germination (Penfield *et al.*, 2006), for starch breakdown (Ramon *et al.*, 2007) and for trehalose effects (Ramon *et al.*, 2007). In spite of the roles that this transcription factor plays, the precise mechanism of how it affects

these processes remains basically unknown. In this work we demonstrate that ABI4 functions as a positive regulator of the expression of various genes under certain conditions. Among the direct targets of ABI4 are its own gene and the *ABI5* transcription factor gene, as well as genes that participate in metabolic pathways like *SBE2.2*.

Previous studies using the orthologous *ABI4* gene from maize hypothesized that ABI4 acts as a negative regulator of transcription (Zhu *et al.*, 2002). The function of ABI4 as a transcriptional repressor was demonstrated for expression of the *RBCS* gene in response to sugars and ABA (Acevedo-Hernández *et al.*, 2005) and for the *Lhcb* gene (Koussevitzky *et al.*, 2007). However, this function could not explain previous data that showed that ABI4 is also important for the sugar-mediated induction of various other genes including *ABI4*, *ABI5*, *SBE2.2*, and *APL3* (Arenas-Huerta *et al.*, 2000; Huijser *et al.*, 2000; Rook *et al.*, 2001; Arroyo *et al.*, 2003). Here we demonstrate that ABI4 also has the capacity to act as a transcriptional activator. These data correlate with the function of ABI4 observed in a yeast heterologous system (Soderman *et al.*, 2000) and also with a report of the regulation of the *APL3* gene (Rook *et al.*, 2006). For example, our results show that ABI4 is a major activator of its own expression during some developmental stages and in response to glucose, osmotic stress, and ABA signaling. This is also supported by the low *ABI4* transcript levels found in the *abi4* mutant during specific developmental stages and upon glucose treatment. Of course the impact of this factor on the overall transcript level for a particular target gene might vary during development and other conditions depending on the participation of additional regulators and/or post-transcriptional regulatory events. This is an important aspect that will require detailed analysis in the future for each particular target gene.

The accumulated evidence indicates that ABI4 acts as a dual regulator during sugar signaling depending on the target gene. The mechanism of how this factor accomplishes this dual function is, as yet, unknown. There are various examples of transcription factors from eukaryotes that function as both activators and repressors, and in many cases this dual function depends on interaction with additional molecules or co-regulators (Mena *et al.*, 2002; Bruggmann *et al.*, 2004). One difference between the genes repressed by ABI4, like *RBCS*, and those activated, is that the ABI4-binding box in the former is in close association with a G-box, a light-responsive element (Acevedo-Hernández *et al.*, 2005; Rook *et al.*, 2006). This is also true for other photosynthetic genes downregulated by ABI4 (*CAB*, *PC*, *Lact*). This arrangement is not found in any of the genes induced by ABI4 analyzed in this work. It is possible that the function of ABI4 as an activator or a repressor depends on the sequence context near the ABI4-binding site or on the binding of other factors, as previously suggested (Acevedo-Hernández *et al.*, 2005; Rook *et al.*, 2006).

Initial analysis demonstrated that ABI4 from maize binds *in vitro* to a consensus 5-bp sequence that resembles the previously identified CE1 element (Niu et al., 2002). Additional data showed that an alternative sequence of 4 bp in length, known as the CCAC motif, might also function as the core sequence for ABI4 binding for some genes (Koussevitzky et al., 2007). Elements identical to one or both motifs are found in the upstream sequences of various ABA and sugar regulated genes, including the *ABI4* gene of *Arabidopsis*, maize, and rice. The role of these sequences as ABI4-binding sites has been demonstrated experimentally in the repression of *RBCS* and *Lhcb* genes (Acevedo-Hernandez et al., 2005; Koussevitzky et al., 2007). Our *in vitro* and *in vivo* studies provide additional experimental evidence indicating that the CE1-like element is an essential part of the ABI4-binding site in the genes induced by ABI4. Interestingly, in the 5' regulatory region of the *AB15* gene we also found a sequence that fits with the CCAC motif proposed by Koussevitzky et al. (2007) as part of the ABI4-binding site. However, our data show that mutation of this sequence did not eliminate ABI4 binding *in vitro* nor the induction of LUC expression in the protoplast system in the presence of ABI4. Taken together these results support the idea that ABI4-mediated induction of these three independent genes depends on the CE1-like element as proposed by Niu et al. (2002). Our data also support the observation that degenerate bases in the CE1-like motif retain ABI4-binding capacity, as we observed for *AB15* and *SBE2.2* fragments. This presents a dilemma due to the length of both ABI4-binding motifs. Statistically there is a high probability of finding these sequences randomly in the upstream regulatory region of any particular gene. Thus, one question that remains unanswered is how true ABI4-binding sites are discriminated. This does not appear to result from a particular position of the motif with respect to the basal transcription machinery, as the ABI4-binding site is found upstream (*SBE2.2*) or downstream (*ABI4*) of the TATA box and even in the untranslated leader sequences (*AB15* and *APL3*). However, a remarkable finding from this study is that only one of the three potential ABI4-binding sites present in the upstream region of *AB15* showed specific binding *in vitro* by the purified ABI4. This is different from the observed binding capacity of the sequences related to the CE1-like motif present in the complementary strand of the *SBE2.2* fragment (Figure 4b). In the *AB15* promoter no ABI4-binding is detected with a fragment containing the two upstream CE1-like elements found in the complementary strand. This is also consistent with previous studies in yeast, where no trans-activation of *AB15* was observed by ABI4: GAL fusions when sequences upstream of the *AB15* transcription start were analyzed (Brocard et al., 2002). These results together suggest that additional elements around the core CE1-like motif are needed for specific ABI4 binding, even though sequences around the CE1-like element of these three genes

did not show any additional sequence similarity. Recent analysis of genes downregulated in *abi4* mutant seeds did not find the presence of CE1-like elements in their promoters (Nakabayashi et al., 2005), suggesting that ABI4 might have additional binding sites. However, it is still necessary to determine whether these genes identified in the high-throughput transcriptome are truly direct targets of ABI4.

Previous analyses have determined that, in many promoters, CE1 elements are found in combination with the ABA response element (ABRE), and this arrangement results in synergistic responses to ABA treatment (Shen et al., 1993; Shen and Ho, 1995; Vasil et al., 1995). In the particular cases of *AB14*, *AB15*, and *SBE2.2* no putative ABRE motifs are found in proximity to the ABI4-binding site. This is true if we consider the G-box-like (CACGTG) ABRE sequence which is one of the prominent motifs in seed-expressed genes (Nakabayashi et al., 2005); however, as ABRE sequences are degenerate it is still possible that our search missed some degenerated motifs. Analysis of the *APL3* gene also showed a synergistic effect between the ABI4-binding site and other sugar response elements (S3S1) (Rook et al., 2006). S3S1-like elements are also found in the *SBE2.2* promoter near the ABI4-binding site, suggesting that maximal expression of this gene in response to sugars also needs additional elements. This might also explain the low induction levels found in the protoplast system with this promoter in comparison to those of *AB14* and *AB15* promoters. The *APL3* and *SBE2* genes encode proteins that participate in the synthesis of starch (Tetlow et al., 2004). Thus, common regulation might be advantageous to couple the expression of these and other genes in the pathway. Transcript analyses showed that the expression of *SBE2.2* and *APL3* are upregulated by sugars, and that this response is affected in *abi4* plants as shown here and previously reported (Rook et al., 2001, 2006). Based on the available data, a good hypothesis is that this induction by sugars in both genes is at least partially mediated by direct interaction of ABI4. This regulation might be important not only during early seedling development but also during vegetative growth, as it has been reported that the sugar response of *SBE2.2* is altered in leaves of 24-day-old *abi4* plants (Rook et al., 2001). This is also corroborated by our data that sugar induction of the *APL3* and *SBE2.2* genes is not observed in the *abi4* mutant plants and by the low basal transcript levels of *SBE2.2* present in the *abi4* seedlings early in germination. ABI4 appears to directly modulate metabolic genes and, in this role, its function could be placed at the bottom of the sugar and ABA signaling pathways. However, it is important to keep in mind that the regulation of these genes is probably modulated by additional factors. Thus, the ultimate impact of ABI4 regulation of these genes might vary in other stages of development or different growing conditions.

Germination and seedling establishment are among the most critical stages of plant development. Therefore, it is not surprising this process is tightly regulated to ensure successful plant survival. It has been shown that multiple transcription factors act in conjunction to regulate germination by modulating the expression of important groups of genes. Many of these transcription factors display complex interactions, functioning in many cases as heterodimers (Finkelstein *et al.*, 2005). Among these factors ABI5 has been shown to be an important regulator of the expression of many genes. Specifically, ABI5 interacts with ABRE elements during seed germination and post-germinative ABA-mediated growth arrest (Carles *et al.*, 2002). As observed for ABI4, the expression of ABI5 is temporally regulated during development with predominant expression in seeds and young seedlings (López-Molina *et al.*, 2001; Brocard *et al.*, 2002; Arroyo *et al.*, 2003). It has been proposed repeatedly that ABI5 and ABI4 could regulate each other (Nakamura *et al.*, 2001; Brocard *et al.*, 2002; Arroyo *et al.*, 2003). Our analysis provides experimental evidence of a direct association between these two central factors. ABI4 specifically binds to the upstream sequence of the ABI5 gene via the CE1-like element. This interaction, *in vivo*, is important to enhance ABI5 gene expression in response to sugars as shown by the ABI5 transcript level found in the *abi4* mutant plants (Figure S2a; Arroyo *et al.*, 2003). This also correlates with microarray data that show altered ABI5 transcript accumulation in *abi4* imbibed seeds and with ectopic expression of ABI4 in transgenic plants (Finkelstein and Lynch, 2000; Soderman *et al.*, 2000; Nakabayashi *et al.*, 2005). ABI5 is known to regulate a variety of genes and it has been proposed that it might act as an integrator during seed germination (Piskunowicz *et al.*, 2008). The regulation of ABI5 transcription by ABI4 could indirectly influence the expression of ABI5 regulated genes in response to sugar availability. Recent findings have shown that ABI5 expression and protein activity is regulated by several transcriptional factors and controlled by different hormones (Kang *et al.*, 2002). Thus, it would be interesting in this scenario to analyze in more detail the impact of ABI4 in the regulation of this gene under other growing conditions and developmental stages. Several transcription factors belonging to the b-ZIP transcription factor family with high similarity to ABI5 have been identified (Jakoby *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2002). Although some of these ABRE-binding factors (ABFs) appear partially redundant with ABI5, others appear to have specific functions with signals such as glucose (Kim *et al.*, 2002, 2004). It would be interesting to determine whether any of these factors might also be regulated by ABI4.

Our current view is that the ABI4 protein is a downstream element in the sugar signaling cascade, regulating final gene targets such as *SBE2.2* or triggering the expression of factors such as ABI5 that are involved in these processes. ABI4 may also be a convergence point of discrete sugar

signaling pathways and other signals such as osmotic stress and ABA. Mutant alleles of *abi4* have been isolated in nearly all sugar screenings reported, even those employing very divergent strategies. Future functional characterizations of the ABI4 protein should illuminate the features of ABI4 that allow it to undertake its diverse roles in sugar signaling.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plant material and growth conditions

Wildtype Col-0 and *abi4-1* mutants were obtained from the Arabidopsis Biological Resource Center. The *pABI4::GUS* transgenic plants (Col-0 background) were provided by Dr Ruth Finkelstein (University of California, Santa Barbara, CA, USA). Arabidopsis seeds were grown on 1× Murashige and Skoog basal salt mixture (Gibco BRL) supplemented with B₆ vitamins (Sigma, <http://www.sigmaaldrich.com/>), 0.05% 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES), and 0.7% phytoagar (MS). To break dormancy, seeds were incubated at 4°C for 3 days and then transferred to controlled growth chambers for the time indicated in each experiment. Adult plants were grown in Metro-Mix 200 (SunGro, <http://www.sunpro.com/>). Plants and seedlings were grown under a 16-h light/8-h dark cycle at 120 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{sec}^{-1}$ light conditions at 22°C. The *pABI4::GUS* × *abi4* lines were grown on media supplemented with 1% sucrose, 4% or 7% glucose, 7% mannitol, or the same media plus 100 nM ABA (Sigma) as indicated. The ABI4-GUS transgene was introduced into the *abi4* background by crossing the ABI4-GUS transgenic homozygous line with the homozygous *abi4* mutant. F₂ homozygous lines for the ABI4-GUS transgene and *abi4* were selected by their ability to grow in 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ kanamycin and 7% glucose.

Determination of transcription start site

Total RNA was isolated using TRIzol (Invitrogen, <http://www.invitrogen.com/>). RNA ligase-mediated rapid amplification of cDNA ends was performed using the FirstChoice[®] RLM-RACE kit (Ambion, <http://www.ambion.com/>). Total RNA (10 μg) of Col plants grown on 7% glucose for 10 days was used according to the manufacturer's instructions, except that a double amount of calf intestine alkaline phosphatase/nobacco acid pyrophosphatase (CP/TAP)-treated RNA was used. Nested PCR was done using the primers provided and two ABI4-specific primers (5'-CTGTTGGTGTGGGAATTGTCC-3' and 5'-ACGTGACCCGTATAGGTAAC-3').

Electrophoretic mobility shift assays

Electrophoretic mobility shift assay was performed using recombinant GST-ABI4 protein purified from *E. coli* following the manufacturer's instructions (Ausubel *et al.*, 1988). This construct was obtained by cloning the complete ABI4 cDNA into the pGEX2T vector. The promoter fragments used for the EMSA (Figures 2 and S1) were amplified by PCR. The primers used are listed in Table S1. For the 25mer oligonucleotides used in this work, the two complementary sequences were synthesized as shown in Table S1. Each of the fragments and oligonucleotides was 5'-end radiolabeled with ³²P using T4-poly nucleotide kinase (Invitrogen). After labeling, the 25mer oligonucleotides were annealed and then purified in acrylamide gel (19:1) containing 9% of urea. Binding reactions were

performed in 30 μ l of binding buffer (40 mM HEPES, pH 7.5; 100 mM KCl; 10 mM MgCl₂ and 10% glycerol) and in the presence of 1 μ g of poly(dI-deoxyinosine-deoxycytidylic) sodium salt [poly(dI-DC)] (Sigma). Binding reactions were done using 300 ng of GST-ABI4 protein for ABI4 and 500 ng for ABI5 and SBE2.2 fragments, and 100–200 ng for the 25mer oligonucleotides. Binding was performed at room temperature for 30 min for ABI4 fragment, whereas for ABI5 and SBE2.2 fragments and for the 25mer oligonucleotide samples were incubated for 15 min on ice followed by 15 min at room temperature (24°C). Samples were separated on a 5% or 6% polyacrylamide gel (29:1:0.8 acryl/bisacrylamide) in 0.25x TRIS-borate-EDTA (TBE; TRIS + 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol) buffer at 4°C and analyzed by autoradiography. Competition experiments were performed using from 2x to 80x molar excess of cold fragments, or a 25mer oligonucleotide containing four repeats of the AGCACGCC sequence that includes the ABI4-binding box, or 10x to 80x of the non-specific competitor DNA as indicated. For shift analysis of the SBE2.2 gene a smaller fragment than the one for the protoplast transient assay was used (Figure 1b) because of an anomalous migration in the EMSA gel of the bigger fragment that resulted in a lack of sharpness (Rincon-Arango et al., 2005).

Transient expression assays

Reporter plasmids used in the transient expression assays were constructed first by introducing the promoter fragments (Figure 1) between the 35S promoter and the luciferase gene into the LUC4 expression vector. The 35S minimal promoter constructs were obtained by PCR amplification from the -90 bp of the transcription initiation site to the end of the LUC gene. The primers used for this amplification were 5'-CACCGATGTGATATCTCCACTGAC-3' and 5'-TTACAATTTGGACTTTCCGC-3'. This fragment was cloned into the binary vector pGWB7. The site-specific mutations in the ABI4-binding motifs of the ABI4 and ABI5 promoter fragments were generated from two independent PCRs with primers. For ABI4: 5'-GTAAAACGACCGCCCA-3' and 5'-TGGTCGATTAGGGTAAACTTCTTTATTTATACTT ACA CTCTC-3', and 5'-CAG GAAACGCTATGACC-3' and 5'-TAAATAAAAGAAGTTTAAACCTAATGGACCATTCAACAGATG-3'. For ABI5: 5'-CGTCCGAGCCGACCGGATTC-3' and 5'-GTCTAAAACCGAAATCTTTGTGTTCCTC-3', and 5'-GAGGAA-CACAAGAATTCGGTTTTAGAC-3' and 5'-AAGCGAAGCTTACAA-CACAAG-3'. Reconstitution was done using equimolar quantities of the two fragments from the initial PCRs for each gene, and used as template of a third PCR, with the outer primers to generate the reporter plasmids mABI4:LUC and mABI5:LUC. The mutations were verified by sequence analysis. The effector plasmid was constructed by replacing the luciferase gene from the J0001 plasmid (León et al., 1991) with the ABI4 coding region.

Transient assays were performed using *Arabidopsis mesophyll* protoplasts from 3-week-old Col-0 plants. Protoplast isolation and PEG transformation procedures were done following the protocol from the Sheen laboratory (Yoo et al., 2007; http://genetics.mgh.harvard.edu/sheenweb/protocols_reg.html). For the assays, 10 μ g of reporter genes and 10 μ g of effector plasmid were used. The amount of effector plasmid used was maintained constant in all assays. In those samples where no effector was included, 10 μ g of empty vector was used to normalize total DNA concentration in all our samples. Luciferase activity was measured as recommended for the Luciferase Assay System (Promega, <http://www.promega.com/>) using a Monolight 2010 luminometer (Analytical Luminescence Laboratories.). To normalize transfection efficiency, the CaMV 35S promoter- β -glucuronidase (GUS) plasmid was co-transfected in each experiment (León et al., 1991). Expression analysis was done 12 h after transformation

and reported as luciferase-specific activity corrected by GUS-specific activity. The *anova* and Tukey statistical analyses were used to evaluate the confidence of these data (<http://www.r-project.org/>).

Histochemical and fluorometric analysis

The GUS histochemical and fluorometric assays were performed as reported (Jefferson et al., 1987). Total protein extracts were quantified using Bradford reagent (Bio-Rad Laboratories, <http://www.bio-rad.com/>). For each assay, 10 μ g of protein was incubated with 4-methylumbelliferyl- β -glucuronide (Inako Pharmaceuticals, <http://www.inakopharm.com/>) at 37°C for 30 min. Fluorescence was measured in a TXO DNA mini-fluorometer (Hofer Scientific Instruments, <http://www.hoferinc.com/>). Specific activity was determined as nMol methyl-umbelliferone (μ g protein)⁻¹ min⁻¹.

Expression analysis

Wild type Col-0 and *abi4-1* seedlings were imbibed in water for 48 h or grown for 3 days. Seedlings were grown on 1x MS medium supplemented with 1% sucrose. Total RNA was isolated using the GenElute Mammalian Total RNA Miniprep kit (Sigma-Aldrich) for the imbibed seeds or TRIzol (Invitrogen) for the 3-day-old seedlings. RNA was treated with DNase I (RNase free; Promega). For RT-PCR analysis, cDNA was synthesized with M-MLV RT (Invitrogen) using 100 ng of total RNA. A fraction (1/10) of the first-strand cDNA was used as a template for the PCR. Linearity was corroborated for each gene by comparisons of the PCR product at different cycles (23, 25, 28, 30, 32, 35, and 40). The selected cycles were: 30 cycles for ABI4, and for SBE2.2 and 23 for APT1. Each set of RT-PCR data reported in this work was repeated in two biologically independent experiments. The sequence of the primers used was as follows. For ABI4: 5'-ATGGACCCCTTTAGCTTCC-3', 5'-AAGCCACGGTAACGGAACT-3'; for SBE2.2: 5'-GAAGAAGCCGAGAAACAGA-3', 5'-GATGATTACGATGACTGTTC-3'; and for APT1: 5'-TGGAACAGATACGATTGA-3', 5'-CCITTCCTTAAGCTCTG-3'.

ACKNOWLEDGEMENTS

Many thanks to Dr Ruth Finkelstein for kindly providing the *pABI4:GUS* transgenic lines. We thank Martha Trujillo for technical support and Arturo Ocaño for computer support. We also thank Dr Mari Salmi for comments on the manuscript. We gratefully acknowledge the ABRC for providing seeds. This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (31791-NL, Dirección General de Asuntos para el Personal Académico-UNAM (IN218007), BASF, and Howard Hughes Medical Institute grants. FB was supported by a doctoral fellowship from DGEP-UNAM, PD and EC were supported during part of this work by post-doctoral fellowships from UNAM.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. Specificity of the binding of the GST:ABI4 protein.

Figure S2. Glucose regulation is affected in the *abi4* mutant plant.

Table S1. Sequence of oligonucleotide used for EMSA.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors.

REFERENCES

- Acévedo-Hernández, G.J., León, P. and Herrera-Estrella, L.R. (2005) Sugar and ABA responsiveness of a minimal RBCS light-responsive unit is mediated by direct binding of ABI4. *Plant J.* **43**, 506–519.
- Arenas-Huertos, F., Arroyo, A., Zhou, L., Sheen, J. and León, P. (2000) Analysis of Arabidopsis glucose insensitive mutants, *gin5* and *gin6*, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes Dev.* **14**, 2085–2096.
- Arroyo, A., Bossi, F., Finkelstein, R.R. and León, P. (2003) Three genes that affect sugar sensing (abscisic acid insensitive 4, abscisic acid insensitive 5, and constitutive triple response 1) are differentially regulated by glucose in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **133**, 231–242.
- Azizbaj, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Siedman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1988) *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley & Sons.
- Baier, M., Hemmann, G., Holman, R., Corbe, F., Card, R., Smith, C., Rock, F. and Bevan, M.W. (2004) Characterization of mutants in Arabidopsis showing increased sugar-specific gene expression, growth, and developmental responses. *Plant Physiol.* **134**, 81–91.
- Bhalerao, R.P., Salchert, K., Bako, L., Olcese, L., Szabados, L., Muranaka, T., Machida, Y., Scheff, J. and Koncz, C. (1999) Regulatory interaction of PRL1 WD protein with Arabidopsis SNF1-like protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 5323–5327.
- Breard, L.M., Lynch, T.J. and Finkelstein, R.R. (2002) Regulation and role of the Arabidopsis abscisic acid-insensitive 5 gene in abscisic acid, sugar, and stress response. *Plant Physiol.* **129**, 1533–1543.
- Brugmann, S.A., Pandar, P.D., Kanyon, K.L., Pignoni, F. and Moody, S.A. (2004) Six1 promotes a placodal fate within the lateral neurogenic ectoderm by functioning as both a transcriptional activator and repressor. *Development*, **131**, 5871–5881.
- Burk, P.K., Jensen, A.B. and Pages, M. (1997) Regulatory elements *in vivo* in the promoter of the abscisic acid responsive gene *rab17* from maize. *Plant J.* **11**, 1285–1295.
- Carles, C., Bies-Echeve, N., Aspar, L., Leon-Kloosterziel, K.M., Koomneel, M., Echeverria, M. and Delserre, M. (2002) Regulation of Arabidopsis thaliana *Em* genes: role of ABI5. *Plant J.* **30**, 373–383.
- Cheng, W.H., Talencia, E.W. and Chourey, P.S. (1999) Sugars modulate an unusual mode of control of the cell-wall invertase gene (*invt1*) through its 3' untranslated region in a cell suspension culture of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 10512–10517.
- Chu, Y.H., Yoo, S.D. and Sheen, J. (2006) Regulatory functions of nuclear hexokinase1 complex in glucose signaling. *Cell*, **127**, 579–589.
- Dijkwel, P.P., Huljser, C., Weisbeek, P.J., Chua, N.-H. and Smeekens, S.C.M. (1997) Sucrose control of phytochrome A signaling in Arabidopsis. *Plant Cell*, **9**, 583–595.
- Finkelstein, R.R. and Gibson, S.I. (2002) ABA and sugar interactions regulating development: cross-talk or voices in the crowd? *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 599–609.
- Finkelstein, R.R. and Lynch, T.J. (2000) The Arabidopsis abscisic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell*, **12**, 599–609.
- Finkelstein, R.R., Wang, M.L., Lynch, T.J., Rao, S. and Goodman, H.M. (1998) The Arabidopsis abscisic acid response locus ABI4 encodes an APETALA 2 domain protein. *Plant Cell*, **10**, 1043–1054.
- Finkelstein, R., Gampala, S.S., Lynch, T.J., Thomas, T.L. and Rock, C.D. (2005) Redundant and distinct functions of the ABA response loci ABA-INSENSITIVE1/ABI5 and ABRE-BINDING FACTOR (ABF3). *Plant Mol. Biol.* **58**, 263–267.
- Gibson, S.I. (2005) Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 93–102.
- Gutiérrez, R.A., Lejay, L.V., Dean, A., Chiaromonte, F., Shasha, D.E. and Coruzzi, G.M. (2007) Qualitative network models and genome-wide expression data define carbon/nitrogen-responsive molecular machines in Arabidopsis. *Genome Biol.* **8**, R7.
- Ho, S.-L., Chao, Y.-C., Tang, W.-F. and Yu, S.-M. (2001) Sugar coordinately and differentially regulates growth- and stress-related gene expression via a complex signal transduction network and multiple control mechanisms. *Plant Physiol.* **125**, 877–890.
- Huljser, C., Kortjes, A., Pego, J., Weisbeek, P., Wisman, E. and Smeekens, S. (2000) The Arabidopsis SUCROSE UNCOUPLED-6 gene is identical to ABSICISIC ACID INSENSITIVE-4: involvement of abscisic acid in sugar responses. *Plant J.* **23**, 577–585.
- Jakoby, M., Weishaar, B., Droge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Krol, T. and Parcy, F. (2002) bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci.* **7**, 106–111.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W. (1987) GUS fusion: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**, 3901–3907.
- Kang, J.Y., Choi, H.I., Im, M.Y. and Kim, S.Y. (2002) Arabidopsis basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. *Plant Cell*, **14**, 343–357.
- Kim, S.Y., Ma, J., Perret, P., Li, Z. and Thomas, T.L. (2002) Arabidopsis ABI5 subfamily members have distinct DNA-binding and transcriptional activities. *Plant Physiol.* **130**, 688–697.
- Kim, S., Kang, J.Y., Cho, D.I., Park, J.H. and Kim, S.Y. (2004) ABF2, an ABRE-binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its overexpression affects multiple stress tolerance. *Plant J.* **40**, 75–87.
- Koch, K.E. (1996) Carbohydrate modulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 509–540.
- Koussevitzky, S., Nott, A., Modder, T.C., Hong, F., Sachette-Martins, G., Surpin, M., Lim, J., Mittle, R. and Chory, J. (2007) Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. *Science*, **316**, 715–719.
- Laby, R.J., Kincaid, M.S., Kim, D. and Gibson, S.I. (2000) The Arabidopsis sugar-insensitive mutants *ais4* and *ais6* are defective in abscisic acid synthesis and response. *Plant J.* **23**, 587–598.
- León, P. and Sheen, J. (2003) Sugar and hormone connections. *Trends Plant Sci.* **8**, 110–116.
- León, P., Flanckaert, F. and Walbot, V. (1991) Transient gene expression in protoplasts of *Phaseolus vulgaris* isolated from a cell suspension culture. *Plant Physiol.* **95**, 968–972.
- Li, Y., Lee, K.K., Walsh, S., Smith, C., Hadingham, S., Sorfan, K., Cowley, G. and Bevan, M.W. (2006) Establishing glucose- and ABA-regulated transcription networks in Arabidopsis by microarray analysis and promoter classification using a Relevance Vector Machine. *Genome Res.* **16**, 414–427.
- López-Molina, L., Mongrand, S. and Chua, N.H. (2001) A post-germination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 4782–4787.
- Martin, T., Hellman, H., Schmidt, R., Willmitzer, L. and Frommer, W.B. (1997) Identification of mutants in metabolically regulated gene expression. *Plant J.* **11**, 53–62.
- Mena, M., Cejudo, F.J., Isabel-Lamonedá, I. and Carbonero, P. (2002) A role for the DOF transcription factor BPBF in the regulation of gibberellin-responsive genes in barley aleurone. *Plant Physiol.* **130**, 111–119.
- Moore, B., Zhou, L., Rolland, F., Hall, G., Cheng, W.-H., Liu, Y.-X., Huang, L., Jones, T. and Sheen, J. (2003) Role of the Arabidopsis

- glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science*, **308**, 332–336.
- Nakabayashi, K., Okamoto, M., Koshida, T., Kamiya, Y. and Nambara, E. (2005) Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. *Plant J.* **41**, 697–709.
- Nakamura, S., Lynch, T.J. and Finkelstein, R.R. (2001) Physical interactions between ABA response loci of *Arabidopsis*. *Plant J.* **26**, 627–636.
- Nemeth, K., Salchert, K., Putroky, P. et al. (1998) Phototropic control of glucose and hormone responses by PRL1, a nuclear WD protein, in *Arabidopsis*. *Gene Dev.* **12**, 3059–3073.
- Niu, X., Helemtjeris, T. and Bate, N.J. (2002) Maize AB14 binds coupling element1 in abscisic acid and sugar response genes. *Plant Cell* **14**, 2565–2575.
- Osuna, D., Usadel, B., Marcuenda, R. et al. (2007) Temporal responses of transcripts, enzyme activities and metabolites after adding sucrose to carbon-deprived *Arabidopsis* seedlings. *Plant J.* **49**, 463–491.
- Palencsar, P.M., Kouranov, A., Lejay, L.V. and Coruzzi, G.M. (2004) Genome-wide patterns of carbon and nitrogen regulation of gene expression validate the combined carbon and nitrogen (CN)-signaling hypothesis in plants. *Genome Biol.* **5**, R91.
- Penfield, S., Li, Y., Gilday, A.D., Graham, S. and Graham, I.A. (2006) *Arabidopsis* ABA INSENSITIVE4 regulates lipid mobilization in the embryo and reveals repression of seed germination by the endosperm. *Plant Cell* **18**, 1887–1899.
- Piskurewicz, U., Jikumaru, Y., Kinoshita, N., Nambara, E., Kamiya, Y. and Lopez-Molina, L. (2008) The gibberellic acid signaling repressor RGL2 inhibits *Arabidopsis* seed germination by stimulating abscisic acid synthesis and ABI5 activity. *Plant Cell* **20**, 2729–2745.
- Price, J., Li, T.C., Kang, S.G., Na, J.K. and Jang, J.C. (2003) Mechanisms of glucose signaling during germination of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **132**, 1424–1438.
- Price, J., Laxmi, A., St-Martin, S.K. and Jang, J.C. (2004) Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 2128–2150.
- Quesada, V., Foncea, M. and Micol, J. (2000) Genetic analysis of salt-tolerant mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, **154**, 421–426.
- Ramon, M., Rolland, F., Thevelein, J.M., Van Dijk, P. and Leyman, B. (2007) AB14 mediates the effects of exogenous trehalose on *Arabidopsis* growth and starch breakdown. *Plant Mol. Biol.* **63**, 195–206.
- Rincón-Arango, H., Valdeco-Graham, V., Guerrero, G., Escamilla-Del-Arenal, M. and Recillas-Targa, F. (2005) YY1 and GATA-1 interaction modulate the chicken 3'-side alpha-globin enhancer activity. *J. Mol. Biol.* **349**, 961–975.
- Rolland, F., Moore, B. and Sheen, J. (2002) Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell*, **14**, S185–S205.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E. and Sheen, J. (2006) SUGAR SENSING AND SIGNALING IN PLANTS: conserved and novel mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 675–709.
- Rook, F., Corke, F., Card, R., Munn, G., Smith, C. and Bevan, M.W. (2001) Impaired sucrose-induction mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signalling. *Plant J.* **26**, 421–433.
- Rook, F., Hadingham, S.A., Li, Y. and Bevan, M.W. (2006) Sugar and ABA response pathways and the control of gene expression. *Plant Cell Environ.* **29**, 425–434.
- Sheen, J. (1990) Metabolic repression of transcription in higher plants. *Plant Cell* **2**, 1027–1038.
- Shen, Q. and Ho, T.H. (1995) Functional dissection of an abscisic acid (ABA)-inducible gene reveals two independent ABA-responsive complexes each containing a G-box and a novel cis-acting element. *Plant Cell* **7**, 295–307.
- Shen, Q., Uknes, S.J. and Ho, T.H. (1992) Hormone response complex in a novel abscisic acid and cycloheximide-inducible barley gene. *J. Biol. Chem.* **268**, 23652–23660.
- Smeekens, S. (2000) Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**, 49–81.
- Soderman, E.M., Brocard, I.M., Lynch, T.J. and Finkelstein, R.R. (2000) Regulation and function of the *Arabidopsis* ABA-insensitive gene in seed and abscisic acid response signaling networks. *Plant Physiol.* **124**, 1752–1765.
- Tetlow, J.J., Morell, M.K. and Emes, M.J. (2004) Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. *J. Exp. Bot.* **55**, 2131–2145.
- Thum, K.E., Shin, M.J., Palencsar, P.M., Kouranov, A. and Coruzzi, G.M. (2006) Genome-wide investigation of light and carbon signaling interactions in *Arabidopsis*. *Genome Biol.* **5**, R10.
- Tsuikagoshi, H., Saigo, T., Shibata, D., Morikami, A. and Nakamura, K. (2005) Analysis of a sugar response mutant of *Arabidopsis* identified a novel B3 domain protein that functions as an active transcriptional repressor. *Plant Physiol.* **138**, 675–685.
- Vasil, V., Marcotte, W.R. Jr, Rosenkrans, L., Coccolone, S.M., Vasil, I.K., Quatrano, R.S. and McCarty, D.R. (1995) Overlap of Viviparous1 (VP1) and abscisic acid response elements in the Em promoter: G-box elements are sufficient but not necessary for VP1 transactivation. *Plant Cell* **7**, 1511–1518.
- Xiao, W., Sheen, J. and Jang, J.C. (2000) The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. *Plant Mol. Biol.* **44**, 451–461.
- Yoo, S.D., Cho, Y.H. and Sheen, J. (2007) *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat. Protoc.* **2**, 1569–1572.
- Yu, J., Hu, S., Wang, J. et al. (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica). *Science*, **296**, 79–82.
- Zhou, L., Jang, J.C., Jones, T.L. and Sheen, J. (1998) Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an *Arabidopsis* glucose-insensitive mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 10294–10299.

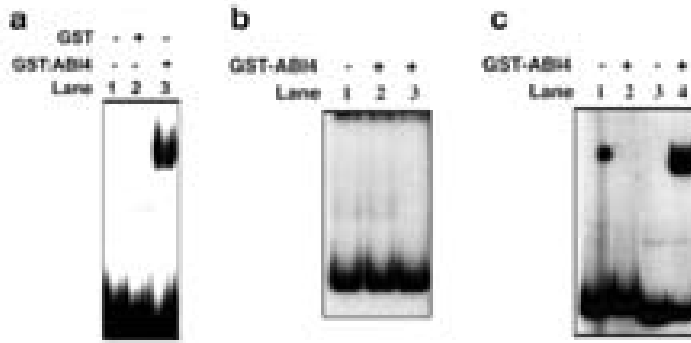


Figure S1 - Specificity of the binding of the GST-ABI4 protein. Controls for specificity of the EMSA experiment include corroboration that GST does not interact with *ABI4* fragment (panel a), that the unspecific competitor is not retarded by the GST-ABI4 protein (panel b), and that the GST-ABI4 protein do not bind to the upstream CE-like elements present in the *ABI5* upstream sequence (panel c).

(a) *ABI4* probe (L1), interaction with GST (L2) or with GST-ABI4 (L3).

(b) Unspecific fragment (L1), interaction with 300 ng of GST-ABI4 (L2) and interaction with 600 ng of GST-ABI4 (L3).

(c) *ABI5* probe 1 (L1), interaction with GST-ABI4 (L2), *ABI5* probe 2 (L3), interaction with GST:ABI4 (L4). The size of the *ABI5* probe 1 and *ABI5* probe 2 fragments are 172 bp and 185 bp.

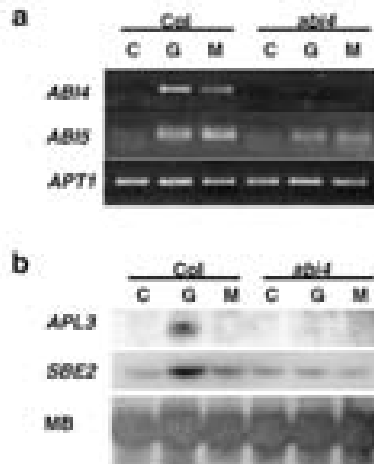


Figura S2 – *ABI4*, *ABI5*, *APL3* and *SBE2.2* transcripts accumulate after glucose treatment.

(a) RT-PCR analysis of Col-0 and *abi4* seedlings grown in MS supplemented with 2% sucrose (C), 7% glucose (G) and 7% mannitol (M) for 7 days.

(b) Blot hybridization analysis of Col-0 and *abi4* seedlings after induction with 3% glucose (G) or 3% mannitol (M) for 8 h. Lanes 1 and 4 are the untreated controls (C).

Supplementary Tabla 1. Sequence of oligonucleotide used for EMSA.

ABI4 152bp fragment	5' -GGTAGAAAACAAACGGGTAAG-3'
	5' -GACGAATCAAGAAGGAAGGG-3'
ABI5 177bp fragment	5' -CTCCGGCGGCTTTTAAACTATG -3'
	5' -CAGTCTTCTAATCCAAGATCTTG-3'
SBE2.2 121bp fragment	5' -CTCTCTGCTCTCCGAATCTC-3'
	5' -CGAGAAGGAAGAGTGAAGC-3'
ABI4 3'UTR fragment	5' -TTTGTTTTTGTGGAAGATCA-3'
	5' -ATAACCTCTGAAACTCGAACA-3'
abi4-CE1	5' -ATAAAAGAAGCACCGCCCTAATCGA-3'
	3' -TATTTTCTTCGTGGCGGGATTAGCT-5'
abi4-CE1m	5' -ATAAAAGAAGTTTAACCCTAATCGA-3'
	3' -TATTTTCTTCAAATTGGGATTAGCT-5'
abi5-CE1	5' -AACACAAAGCCACCGGTTTTTAGAC-3'
	3' -TTGTGTTTCGGTGGCCAAAAATCTG-5'
abi5-CE1m2	5' -AACACAAAGCTTTAAGTTTTTAGAC-3'
	3' -TTGTGTTTCGAAATTCAAAAAATCTG-3'
sbe2-CE1	5' -TTTTGTTTCTCACCGGCGGCGAGAG-3'
	3' -AAAACAAAGAGTGGCCGCCGCTCTC-3'
sbe2-CE1m1	5' -TTTTGTTTCTTTTAAGCGGCGAGAG-3'
	3' -AAAACAAAGAAAATTCGCCGCTCTC-3'
sbe2-CE1m2	5' -TTTTGTTTCTTTTAAGTTTAAAGAG-3'
	3' -AAAACAAAGAAAATTCAAATTTCTC-3'
GATA	5' -CACGCGGATAAGATAAGGCCGGGCT-3'
	3' -GTGCGCCTATTCTATTCCGGCCCGA-3'
4X-CE1	5' -AGCACCGCCAGCACCGCCAGCACCGCCAGCACCGCC-3'
	3' -TCGTGGCGGTTCGTGGCGGTTCGTGGCGGTTCGTGGCGG-5'

Apéndice II

Material Suplementario

Tabla S1 - Elementos *en cis* asociados a la respuesta a azúcares obtenidos a partir del análisis *in silico* de datos de expresión global del genoma

Motivo	Secuencia	ID en base de datos*	Posibles genes blancos	Referencia
C1	GAWYTGA W: A o T Y: C o T	nd**	- <i>Ferredoxina</i> - <i>Ferredoxina-NADP reductasa</i>	Palenchar <i>et al.</i> 2004
C2	ARNNGANNCAA R: A o G N: G, A, C o T	Nd	- <i>Ferredoxina</i> - <i>Ferredoxina-NADP reductasa</i>	Palenchar <i>et al.</i> 2004
C3	KMSAGAG K: G o T M: A o C S: G o C	Nd	- <i>Ferredoxina</i> - <i>Ferredoxina-NADP reductasa</i>	Palenchar <i>et al.</i> 2004
C4	WMNCHGAANC W: A o T M: A o C N: G, A, C o T H: A, C o T	Nd	- <i>Ferredoxina</i> - <i>Ferredoxina-NADP reductasa</i>	Palenchar <i>et al.</i> 2004
C5	GAGARRDDG R: A o G D: G, A o T	Nd	- <i>Ferredoxina</i> - <i>Ferredoxina-NADP reductasa</i>	Palenchar <i>et al.</i> 2004
C6	WKGGGCC W: A o T K: G o T	nd	- <i>proteína ribosomal L35a</i> - <i>proteína ribosomal L24</i> - <i>proteína ribosomal S4</i>	Palenchar <i>et al.</i> 2004
C7	GGCCSAW S: G o C W: A o T	nd	- <i>proteína ribosomal L35a</i> - <i>proteína ribosomal L24</i> - <i>proteína ribosomal S4</i>	Palenchar <i>et al.</i> 2004
C8	AAACYCNA Y: C o T N: G, A, C o T	nd	- <i>proteína ribosomal L35a</i> - <i>proteína ribosomal L24</i> - <i>proteína ribosomal S4</i>	Palenchar <i>et al.</i> 2004
C9	WTBGGCY W: A o T B: G, C o T Y: C o T	nd	- <i>proteína ribosomal L35a</i> - <i>proteína ribosomal L24</i> - <i>proteína ribosomal S4</i>	Palenchar <i>et al.</i> 2004
C10	GDNTTGKAM D: G, A o T N: G, A, C o T K: G o T M: A o C	nd	- <i>proteína ribosomal L35a</i> - <i>proteína ribosomal L24</i> - <i>proteína ribosomal S4</i>	Palenchar <i>et al.</i> 2004
C11	AAGAAAA	nd	- <i>proteína ribosomal L35a</i> - <i>proteína ribosomal L24</i> - <i>proteína ribosomal S4</i>	Palenchar <i>et al.</i> 2004
Motif55	<u>GGHNGGDCR</u> H: A, C o T N: G, A, C o T D: G, A o T R: A o G	- caja GCCCG - RE1 - sin nombre 1 (caja de unión de TEF1) - sin nombre 17	- metabolismo de carbono	Thum <i>et al.</i> 2004
Motif45/LCR1	SDHTHTGDKTG S: G o C D: G, A o T H: A, C o T K: G o T	ninguno	- <i>ADG1</i> - <i>SBE2.1</i> - <i>SBE2.2</i>	Thum <i>et al.</i> 2004
Motif23/LCR2	<u>YGGGITC</u> Y: C o T	- caja GCCCG	- <i>ADG1</i> - <i>SBE2.1</i> - <i>SBE2.2</i>	Thum <i>et al.</i> 2004
Motif58/LCR3	<u>ANKNGRNNGSNHC</u> N: G, A, C o T K: G o T R: A o G S: G o C H: A, C o T	- Chs-unidad 1 (respuesta a luz)	- <i>ADG1</i> - <i>SBE2.1</i> - <i>SBE2.2</i>	Thum <i>et al.</i> 2004

Motif 5	<u>GNKNCGGWG</u> N: G, A, C o T K: G o T W: A o T	- PE3 - RE1 - RbcS-CMA7c (respuesta a luz)	- ADG1 - SBE2.1 - SBE2.2	Thum <i>et al.</i> 2004
Motif2/LCR4	<u>CAAAAWT</u> W: A o T	- módulo DREP (respuesta a luz)	- ADG1 - SBE2.1 - SBE2.2	Thum <i>et al.</i> 2004
Motif10/LCR5	<u>GNKNYGGWG</u> N: G, A, C o T K: G o T Y: C o T W: A o T	- PE3 - RE1 - ACE - RbcS-CMA7c (respuesta a luz)	- ADG1 - SBE2.1 - SBE2.2	Thum <i>et al.</i> 2004
Motif51/LCR6	<u>ATTKTGVA</u> K: G o T V: G, A o C	- HSE (respuesta a choque térmico)	- ADG1 - SBE2.1 - SBE2.2	Thum <i>et al.</i> 2004
Motif12/LCR7	<u>ANCCANANHHMNN</u> <u>A</u> N: G, A, C o T H: A, C o T M: A o C	- caja H (respuesta a luz)	- SPDS1 - EXP1 - ATH-A - At2g33590 - At1g04680	Thum <i>et al.</i> 2004
Motif13/LCR8	<u>GDGDTKGTG</u> D: G, A o T K: G o T	- motivo GT-1 - ACE - RbcS-CMA7a (respuesta a luz)	- SPDS1 - EXP1 - ATH-A - At2g33590 - At1g04680	Thum <i>et al.</i> 2004
Motif20/LCR9	<u>GGTCNBNGWG</u> N: G, A, C o T B: G, C o T W: A o T	- caja G (respuesta a luz)	- SPDS1 - EXP1 - ATH-A - At2g33590 - At1g04680	Thum <i>et al.</i> 2004
Motif37/LCR10	<u>GNGRNNGNNNWGN</u> <u>NY</u> N: G, A, C o T R: A o G W: A o T Y: C o T	- caja Endosperma (regulación específica de endosperma)	- SPDS1 - EXP1 - ATH-A - At2g33590 - At1g04680	Thum <i>et al.</i> 2004
Motif6/LCR11	<u>GHTTNGAWTBDG</u> H: A, C o T W: A o T B: G, C o T	ninguno	- SPDS1 - EXP1 - ATH-A - At2g33590 - At1g04680	Thum <i>et al.</i> 2004
Motif24/LCR12	<u>GDGDTDGTG</u> D: G, A o T	- caja Endosperma (regulación específica de endosperma)	- SPDS1 - EXP1 - ATH-A - At2g33590 - At1g04680	Thum <i>et al.</i> 2004
Motif16/LCR13	<u>GARANNNARA</u> R: A o G N: G, A, C o T	- motivo CAG (respuesta a luz) - caja Prolamina (regulación específica de endosperma) - MPE	- SPDS1 - EXP1 - ATH-A - At2g33590 - At1g04680	Thum <i>et al.</i> 2004
Motif11/LCR14	<u>ANVNAANAAGHNG</u> N: G, A, C o T V: G, A o C H: A, C o T	- MPE	- SPDS1 - EXP1 - ATH-A - At2g33590 - At1g04680	Thum <i>et al.</i> 2004
Motif21/LCR15	<u>ARAGAGA</u> R: A o G	- motivo GAG - sitio de unión de 3-AFI (respuesta a luz)	- SPDS1 - EXP1 - ATH-A - At2g33590	Thum <i>et al.</i> 2004

			- <i>At1g04680</i>	
Motif36/LCR16	GGTYNNNGWG Y: C o T N: G, A, C o T W: A o T	- sitio O2 (regulación Zein)	- <i>SPDS1</i> - <i>EXP1</i> - <i>ATH-A</i> - <i>At2g33590</i> - <i>At1g04680</i>	Thum <i>et al.</i> 2004
AMMORESIIUD CRNIA1	GGWAGGGT W: A o T	AMMORESIIUDCRN IA1	- metabolismo de nucleótidos	Li <i>et al.</i> 2006
QARBNEXTA	AACGTGT	QARBNEXTA		Li <i>et al.</i> 2006
BS1EGCCR	AGCGGG	BS1EGCCR	- metabolismo de carbohidratos	Li <i>et al.</i> 2006
E2FBNTRNR	GCGGCAA	E2FBNTRNR	- síntesis de proteínas	Li <i>et al.</i> 2006
MYB26PS	GTTAGGT	MYB26PS	- metabolismo de carbono - entrada de S	Li <i>et al.</i> 2006
DRECRTCORE AT	RCCGAC R: A o G	DRECRTCOREAT	- respuesta a estrés abiótico	Li <i>et al.</i> 2006
IBOXCORENT	GATAAGR R: A o G	IBOXCORENT	- síntesis de trealosa	Li <i>et al.</i> 2006
IBOXCORE	GATAA	IBOXCORE	- respuesta a estrés abiótico	Li <i>et al.</i> 2006
IBOX	GATAAG	IBOX		Li <i>et al.</i> 2006
MYBST1	GGATA	MYBST1	- síntesis de trealosa - respuesta a estrés abiótico - degradación de aminoácidos	Li <i>et al.</i> 2006
LRENPCABE	ACGTGGCA	LRENPCABE	- metabolismo de carbono - metabolismo de lípidos - metabolismo de aminoácidos	Li <i>et al.</i> 2006
GARE2OSREP1	TAACGTA	GARE2OSREP1	- metabolismo secundario	Li <i>et al.</i> 2006
EVENINGAT	AAAATATCT	EVENINGAT	- síntesis de jasmonato - respuesta a estrés abiótico	Li <i>et al.</i> 2006
5-mero up1	ACCCT	TELOBOXATEEF1A A1	nd	Li <i>et al.</i> 2006
5-mero up2	GGGAG	AMMORESIIUDCRN IA1	nd	Li <i>et al.</i> 2006
5-mero up3	AGTGA	ninguno	nd	Li <i>et al.</i> 2006
5-mero up4	GAGAA	ninguno	nd	Li <i>et al.</i> 2006
5-mero up5	ATTAA	ninguno	nd	Li <i>et al.</i> 2006
5-mero up6	GAATA	ninguno	nd	Li <i>et al.</i> 2006
5-mero up7	GAATC	ninguno	nd	Li <i>et al.</i> 2006
5-mero up8	TAGGT	MYB26S	nd	Li <i>et al.</i> 2006
5-mero up9	AATAG	ninguno	nd	Li <i>et al.</i> 2006
5-mero up10	AATGT	ninguno	nd	Li <i>et al.</i> 2006
5-mero up11	CGGCA	E2FBNTRNR	nd	Li <i>et al.</i> 2006

5-mero up12	ACCGT	ninguno	nd	Li <i>et al.</i> 2006
5-mero up13	ACTCT	ninguno	nd	Li <i>et al.</i> 2006
5-mero down1	GGATA	- MYBST1 - motivo de represión por azúcar (TATCCA) -motivoOSRAMY3D (TATCCAY)	nd	Li <i>et al.</i> 2006
5-mero down2	GATAA	- IBOXCORE - sitio de unión del factor GATA	nd	Li <i>et al.</i> 2006
5-mero down3	TATCT	EVENINGGAT	nd	Li <i>et al.</i> 2006
5-mero down4	CATCC	ninguno	nd	Li <i>et al.</i> 2006
5-mero down5	AAGAT	ninguno	nd	Li <i>et al.</i> 2006
5-mero down6	CAATG	ninguno	nd	Li <i>et al.</i> 2006
5-mero down7	AATCC	ninguno	nd	Li <i>et al.</i> 2006
5-mero down8	GATTA	ninguno	nd	Li <i>et al.</i> 2006
5-mero down9	GACTC	ninguno	nd	Li <i>et al.</i> 2006
5-mero down10	CATCG	ninguno	nd	Li <i>et al.</i> 2006
5-mero down11	CACAC	ninguno	nd	Li <i>et al.</i> 2006
5-mero down12	CGTGG	- core de caja G - LRENPCABE	nd	Li <i>et al.</i> 2006
5-mero down13	GACCC	ninguno	nd	Li <i>et al.</i> 2006

* ID en base de datos: nombre o identificación de la secuencia en la base de datos conocida; los datos se obtuvieron a partir de PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) para los elementos reportados por Thum *et al.* 2004 y de PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) para aquellos reportados por Li *et al.* 2006.

** nd: no determinado

Tabla S2. Búsqueda *in silico* de genes de *Arabidopsis* cuyos promotores incluyen los motivos seleccionados (criterio 1) empleado el programa PatMatch (<http://www.arabidopsis.org/cgi-bin/patmatch/nph-patmatch.pl>). Los candidatos se filtraron posteriormente teniendo en cuenta si su expresión en las semillas de la mutante *abi4* está desregulada con respecto a las semillas silvestres.

Criterio 1	Candidatos	Criterio 2 (gen desregulado en semillas <i>abi4</i>)	Candidatos	Resultado
Secuencia CACCGN{30,40}CTYTT en promotor (1 kb)	966 genes		27 genes	Tabla S2.1
Secuencia CACCGN{1,40}AACACTYTT en promotor (1 kb)	15 genes		1 gen	<i>ABI4</i> (*)
Secuencia CACCGN{1,40}AACACTYTTC en promotor (1 kb)	8 genes		1 gen	<i>ABI4</i> (*)

(*) El gen *ABI5* no se detecta como candidato según esta estrategia (contrario a lo que indica la figura 21) debido a que el programa Patmatch sólo considera promotores y no regiones 5' no traducidas.

Tabla S2.1. Lista de genes candidatos según los criterios empleados en la Tabla S2.

ID	Función	Veces de desregulación en semilla seca	Veces de desregulación en semilla embebida
AT1G17850	expressed protein	2.05	n.a.
AT1G25375	metallo-beta-lactamase family protein	3.12	n.a.
AT1G27990	expressed protein	n.a.	3.86
AT1G48470	glutamine synthetase, putative similar to glutamine synthetase, cytosolic isozyme (glutamate-- ammonia ligase, GS1) [Arabidopsis thaliana] SWISS-PROT:Q9LVI8	n.a.	3.17
AT1G63120	rhomboid family protein contains PFAM domain PF01694, Rhomboid family	n.a.	2.54
AT1G66760	MATE efflux family protein contains TIGRfam profile: TIGR00797: MATE efflux family protein, Pfam profile PF01554: Uncharacterized membrane protein family	3.44	n.a.
AT2G21800	expressed protein	n.a.	2.02
AT2G26210	ankyrin repeat family protein contains ankyrin repeats, Pfam:PF00023	2.42	n.a.
AT2G40220	ABI4	4.25	5.08
AT2G43520	trypsin inhibitor, putative similar to SP P26780 Trypsin inhibitor 2 precursor (MTI-2) {Sinapis alba}	2.19	n.a.
AT2G47180	galactinol synthase, putative similar to galactinol synthase, isoform GolS-1 Gl:5608497 from [Ajuga reptans]	n.a.	2.86
AT3G10930	expressed protein	n.a.	13.28
AT3G18630	uracil DNA glycosylase family protein contains Pfam profile: PF03167 uracil DNA glycosylase superfamily	n.a.	6.39
AT3G30300	expressed protein contains Pfam PF03138: Plant protein family. The function of this family of plant proteins is unknown; previously annotated as 'auxin-independent growth promoter - related' based on similarity to axi 1 protein (GB:X80301) (Gl:559920) from [Nicotiana tabacum], which, due to scientific fraud was retracted. Retraction in: Schell J. EMBO J 1999 May 17;18(10):2908. PMID:10400497.	n.a.	3.88
AT3G45970	[AT3G45970, expansin family protein (EXPL1) similar to cim1 induced allergen, Glycine max, EMBL:U03860; expansin-like gene, PMID:11641069, www.bio.psu.edu/expansins];[AT3G45980, histone H2B identical to histone H2B Arabidopsis thaliana Gl:2407802; contains Pfam profile PF00125 Core histone H2A/H2B/H3/H4]	n.a.	2.14
AT3G50980	dehydrin, putative similar to dehydrin Xero 1 [Arabidopsis thaliana] SWISS-PROT:P25863	2.32	6.29
AT3G56360	expressed protein unknown protein 110K5.12 - Sorghum bicolor, TREMBL:AF124045_5	2.39	n.a.
AT4G01460	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein contains Pfam profile: PF00010 helix-loop-helix DNA-binding domain polyubiquitin (UBQ14) identical to Gl:166795; similar to N. sylvestris hexameric polyubiquitin, GenBank accession number M74101	2.38	n.a.
AT4G02890		2.03	n.a.
AT4G18920	expressed protein	n.a.	3.54
AT4G30280	[AT4G30280, xyloglucan:xyloglucosyl transferase, putative / xyloglucan endotransglycosylase, putative / endo-xyloglucan transferase, putative similar to xyloglucan endotransglycosylase TCH4 Gl:886116 from [Arabidopsis thaliana]];[AT4G30290, xyloglucan:xyloglucosyl transferase, putative / xyloglucan endotransglycosylase, putative / endo-xyloglucan transferase, putative similar to xyloglucan endotransglycosylase TCH4 Gl:886116 from [Arabidopsis thaliana]];[AT1G65310, xyloglucan:xyloglucosyl transferase, putative / xyloglucan endotransglycosylase, putative / endo-xyloglucan transferase, putative similar to xyloglucan endotransglycosylase TCH4 Gl:886116 from [Arabidopsis thaliana]]	n.a.	2.04
AT4G30450	glycine-rich protein	n.a.	3.11

AT4G37870	phosphoenolpyruvate carboxykinase [ATP], putative / PEP carboxykinase, putative / PEPCK, putative similar to phosphoenolpyruvate carboxykinase [Lycopersicon esculentum] GI:16950587, SP Q9SLZ0 Phosphoenolpyruvate carboxykinase [ATP] (EC 4.1.1.49) (PEP carboxykinase) (Phosphoenolpyruvate carboxylase) (PEPCK) {Zea mays}; contains Pfam profile PF01293: phosphoenolpyruvate carboxykinase	n.a.	2.52
AT5G05410	DRE-binding protein (DREB2A) identical to DREB2A GI:3738230 from [Arabidopsis thaliana] ; supported by cDNA:gi_3738229_dbj_AB007790.1_AB007790	n.a.	2.04
AT5G13870	xyloglucan:xyloglucosyl transferase / xyloglucan endotransglycosylase / endo-xyloglucan transferase (EXGT-A4) identical to endoxyloglucan transferase EXGT-A4 GI:5533315 from [Arabidopsis thaliana]	n.a.	2.61
AT5G22470	poly (ADP-ribose) polymerase family protein similar to poly(ADP)-ribose polymerase [Zea mays] GI:3928871; contains Pfam profiles PF00644: Poly(ADP-ribose) polymerase catalytic domain, PF00533: BRCA1 C Terminus (BRCT) domain, PF05406: WGR domain	n.a.	7.75
AT5G51760	protein phosphatase 2C, putative / PP2C, putative contains PF00481: Protein phosphatase 2C domain; similar to protein phosphatase 2C (GI:10432446) [Nicotiana tabacum]	n.a.	3.2
Total = 27 genes		10 genes	19 genes

Tabla S3. Búsqueda *in silico* de genes que se co-regulan con *ABI4* (coeficiente de correlación Pearson (r) mayor 0.75, que potencialmente podrían estar regulados por la proteína ABI4.

Criterio 1	Software	Candidatos	Criterio 2	Software	Candidatos
Genes que se co-regulan con <i>ABI4</i>	Expresión angler (http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_expression_angler.cgi)	551 genes	Presencia de caja CACCG en las regiones promotoras	Promomer (http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/BAR_Promomer.cgi)	123 genes

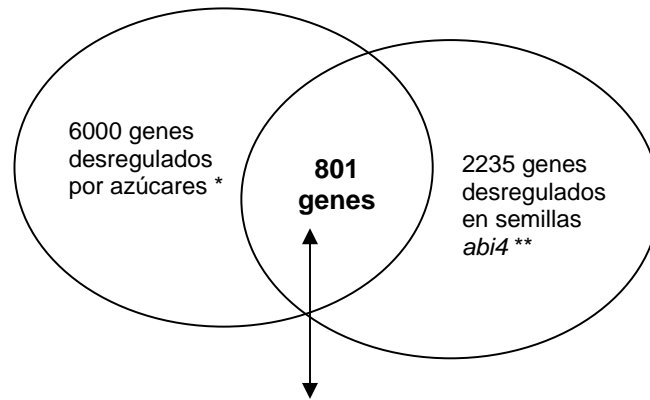
Criterio 3	Candidatos	ID	Función	
a- responden a azúcares	2 genes	AT2G14660	similar to Protein of unknown function DUF589 [Medicago truncatula] (GB:ABE89772.1); contains InterPro domain Protein of unknown function DUF589; (InterPro:IPR007628)	
		AT2G14520	CBS domain-containing protein; similar to CBS domain-containing protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT4G33700.1); similar to hypothetical protein [Vitis vinifera] (GB:CAN61244.1); contains InterPro domain Cystathionine beta-synthase, core (InterPro:IPR000644); contains InterPro domain Protein of unknown function DUF21 (InterPro:IPR002550)	
b- desregulados en semillas <i>abi4</i> (ACTIVADOR)	6 genes	AT1G61460	S-locus protein kinase, putative contains similarity to KI domain interacting kinase 1 [Zea mays] gi 2735017 gb AAB93834; contains S-locus glycoprotein family domain, Pfam:PF00954	semilla seca (11.86)
		AT5G38390	F-box family protein contains F-box domain Pfam:PF00646	semilla seca (8.01)
		AT1G76770	heat shock protein-related contains similarity to 17.9 kDa heat-shock protein [Helianthus annuus] gi 11990130 emb CAB55634	semilla seca (7.51)
		AT2G40220	ABI4	semilla seca y embebida
		AT2G14520	CBS domain-containing protein contains Pfam profiles PF00571: CBS domain, PF01595: Domain of unknown function	semilla embebida (3.36)
		AT3G57900	hypothetical protein hypothetical protein T24P15.12 - Arabidopsis thaliana, PIR:T00930	semilla embebida (2.88)
c- desregulados en semillas <i>abi4</i> (REPRESOR)	7 genes	AT5G38390	F-box family protein contains F-box domain Pfam:PF00646	semilla embebida (6.55)
		AT3G28960	amino acid transporter family protein low similarity to vesicular inhibitory amino acid transporter [Mus musculus] GI:2826776; contains INTERPRO:IPR002422 amino acid/polyamine transporter, family II	semilla embebida (3.85)
		AT2G20100	ethylene-responsive family protein similar to Ethylene-regulated ER33 protein (gi:5669656) [Lycopersicon esculentum]; PMID: 12679534; putative bHLH133 transcription factor SS 2.20	semilla embebida (2.82)
		AT3G32140	hypothetical protein contains Pfam profile PF03384: Drosophila protein of unknown function, DUF287	semilla embebida (2.24)

Criterio 3	Candidatos	ID	Función	
		AT3G50420	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein contains INTERPRO:IPR002885 PPR repeats	semilla embebida (2.23)
		AT3G44210	hypothetical protein	semilla seca (2.67)
		AT2G46020	transcription regulatory protein SNF2, putative similar to SP P22082 Transcription regulatory protein SNF2 (SWI/SNF complex component SNF2) {Saccharomyces cerevisiae}; contains Pfam profiles PF00271: Helicase conserved C-terminal domain, PF00176: SNF2 family N-terminal domain	semilla seca (2.29)

Tabla S4. Búsqueda de genes que se regulen en respuesta a azúcares, cuya expresión esté desregulada en semillas *abi4*.

* genes extraídos de datos de microarreglos (Palenchar *et al.* 2004, Price *et al.* 2004, Li *et al.* 2006)

** genes extraídos de Nakabayashi *et al.* 2005



801 genes candidatos	Criterio	Software	Candidatos	Regulacion	Candidatos
	Presencia caja CACCG	Promomer	140	Positiva	57
	Presencia caja CCAC	Promomer	464	Negativa	323

Tabla S5. Genes desregulados en semillas *abi4* que presentan en sus promotores cajas *en cis* reportadas como elementos de unión al DNA de la proteína ABI4.

Criterio 1	Candidatos	Criterio 2	Candidatos	Resultado
Genes desregulados en semillas wt versus <i>abi4</i> (positivo)	- 459 genes (semilla seca) - 310 genes (semilla embebida)	Presencia de caja CACCG	- 12 genes (semilla seca) - 46 genes (semilla embebida)	Tabla S5.1
Genes desregulados en semillas wt versus <i>abi4</i> (negativo)	- 346 genes (semilla seca) - 1081 genes (semilla embebida)	Presencia de caja CCAC	- 68 genes (semilla seca) - 9 genes (semilla embebida)	Tabla S5.2

Tabla S5.1. Lista de genes desregulados en semillas *abi4* que contienen la secuencia CACCG en sus regiones promotoras.

ID	Función	Semilla	CACCGN{20, 50}CTc/tTT
AT1G04560	AWPM-19-like membrane family protein contains Pfam PF05512: AWPM-19-like family; similar to late embryogenesis abundant protein, (Lea) with hydrophobic domain, high pI value (11.6); 15kD protein; putative (GI:310570) {Glycine max}	seca y embebida	NO
AT1G47350	F-box family protein-related contains TIGR01640: F-box protein interaction domain	seca	SI
AT1G50340	invertase/pectin methylesterase inhibitor family protein low similarity to SP P83326 Pectinesterase inhibitor (Pectin methylesterase inhibitor) (PMEI) {Actinidia chinensis}; contains Pfam profile PF04043: Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor	seca	NO
AT1G61460	S-locus protein kinase, putative contains similarity to KI domain interacting kinase 1 [Zea mays] gi 2735017 gb AAB93834; contains S-locus glycoprotein family domain, Pfam:PF00954	seca	NO
AT1G69526	UbiE/COQ5 methyltransferase family protein low similarity to SP Q05197 Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (EC 2.1.1.17) [Rhodospseudomonas sphaeroides] {Rhodobacter sphaeroides}; contains Pfam profile PF01209: methyltransferase, UbiE/COQ5 family	seca	NO
AT1G76770	heat shock protein-related contains similarity to 17.9 kDa heat-shock protein [Helianthus annuus] gi 11990130 emb CAB55634	seca	SI
AT2G21490	dehydrin family protein contains Pfam domain, PF00257: Dehydrin	seca y embebida	NO
AT3G25440	group II intron splicing factor CRS1-related contains weak similarity to CRS1 [Zea mays] gi 9837550 gb AAG00595	seca	NO
AT3G27990	expressed protein Unusual gene which contains a pectinesterase gene within a downstream UTR intron, transcribed on the opposite strand; supported by cDNA gi:14596042	seca	SI
AT5G38170	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein contains Pfam profile: PF00234 protease inhibitor/seed storage/LTP family	seca	NO
AT5G38390	F-box family protein contains F-box domain Pfam:PF00646	seca	NO
AT5G66400	dehydrin (RAB18) nearly identical to SP P30185 Dehydrin Rab18	seca	NO
AT1G02700	expressed protein similar to hypothetical protein GB:CAB80707 GI:7268598 from [Arabidopsis thaliana]	embebida	NO
AT1G16730	expressed protein	embebida	NO
AT1G17810	major intrinsic family protein / MIP family protein contains Pfam profile: MIP PF00230	embebida	NO
AT1G60190	armadillo/beta-catenin repeat family protein / U-box domain-containing protein contains Pfam domain, PF00514: Armadillo/beta-catenin-like repeats and Pfam, PF04564: U-box domain	embebida	NO
AT1G72100	late embryogenesis abundant domain-containing protein / LEA domain-containing protein low similarity to embryogenic gene [Betula pendula] GI:4539485; contains Pfam profile PF02987: Late embryogenesis	embebida	NO

	abundant protein		
AT1G78070	WD-40 repeat family protein contains Pfam profile PF00400: WD domain, G-beta repeat	embebida	NO
AT2G02250	F-box family protein / SKP1 interacting partner 3-related contains similarity to SKP1 interacting partner 3 gl:10716951 from [Arabidopsis thaliana]	embebida	NO
AT2G15490	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein contains Pfam profile: PF00201 UDP-glucuronosyl and UDP-glucosyl transferase	embebida	NO
AT2G23640	reticulon family protein (RTNLB13) weak similarity to Nogo-C protein [Rattus norvegicus] gl:6822251; contains Pfam profile PF02453: Reticulon	embebida	NO
AT2G28420	lactoylglutathione lyase family protein / glyoxalase I family protein contains glyoxalase family protein domain, Pfam:PF00903	embebida	SI
AT2G35300	late embryogenesis abundant group 1 domain-containing protein / LEA group 1 domain-containing protein contains Pfam domain, PF03760: Late embryogenesis abundant (LEA) group 1	embebida	NO
AT2G40220	ABI4	embebida	SI
AT2G41280	late embryogenesis abundant protein (M10) / LEA protein M10 identical to gB:AF076979	embebida	NO
AT3G01500	carbonic anhydrase 1, chloroplast / carbonate dehydratase 1 (CA1) nearly identical to SP P27140 Carbonic anhydrase, chloroplast precursor (EC 4.2.1.1) (Carbonate dehydratase) {Arabidopsis thaliana}	embebida	NO
AT3G02480	ABA-responsive protein-related similar to ABA-inducible protein [Fagus sylvatica] GI:3901016, cold-induced protein kin1 [Brassica napus] GI:167146	embebida	NO
AT3G04630	expressed protein	embebida	SI
AT3G10930	expressed protein	embebida	NO
AT3G11050	ferritin, putative similar to ferritin subunit cowpea2 precursor GI:2970654 (Vigna unguiculata); contains Pfam profile PF00210: Ferritin-like domain	embebida	SI
AT3G12960	expressed protein similar to seed maturation protein PM28 GB:AAD30427 from [Glycine max]	embebida	NO
AT3G17520	late embryogenesis abundant domain-containing protein / LEA domain-containing protein low similarity to PIR S04045 S04045 embryonic abundant protein D-29 [Gossypium hirsutum]; contains Pfam profile PF02987: Late embryogenesis abundant protein	embebida	NO
AT3G18630	uracil DNA glycosylase family protein contains Pfam profile: PF03167 uracil DNA glycosylase superfamily	embebida	SI
AT3G21720	isocitrate lyase, putative similar to isocitrate lyase GI:167144 from [Brassica napus]	embebida	NO
AT3G21800	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein contains Pfam profile: PF00201 UDP-glucuronosyl and UDP-glucosyl transferase	embebida	NO
AT3G22500	late embryogenesis abundant protein (ECP31) / LEA protein identical to LEA protein in group 5 (AtECP31) [Arabidopsis thaliana] GI:1526422; contains Pfam profile PF04927: Seed maturation protein	embebida	SI

AT3G23800	selenium-binding family protein contains Pfam profile: PF05694 56kDa selenium binding protein (SBP56)	embebida	NO
AT3G56980	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein	embebida	NO
AT4G02380	late embryogenesis abundant 3 family protein / LEA3 family protein similar to several small proteins (~100 aa) that are induced by heat, auxin, ethylene and wounding such as Phaseolus aureus indole-3-acetic acid induced protein ARG (SW:32292); contains Pfam profile PF03242: Late embryogenesis abundant protein	embebida	NO
AT4G17550	transporter-related similar to cAMP inducible 2 protein [Mus musculus] GI:4580997, glycerol 3-phosphate permease [Homo sapiens] GI:7543982; contains Pfam profile PF00083: major facilitator superfamily protein	embebida	SI
AT4G21020	late embryogenesis abundant domain-containing protein / LEA domain-containing protein low similarity to SP P23283 Desiccation-related protein (Craterostigma plantagineum); contains Pfam profile PF02987: Late embryogenesis abundant protein	embebida	NO
AT4G26740	embryo-specific protein 1 (ATS1) identical to embryo-specific protein 1 [Arabidopsis thaliana] GI:3335169	embebida	NO
AT4G27150	2S seed storage protein 2 / 2S albumin storage protein / NWMU2-2S albumin 2 identical to SP P15458	embebida	SI
AT4G31830	expressed protein	embebida	NO
AT5G01520	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein similar to MTD2 [Medicago truncatula] GI:9294812; contains Pfam profile PF00097: Zinc finger, C3HC4 type (RING finger)	embebida	NO
AT5G04000	expressed protein	embebida	NO
AT5G06760	late embryogenesis abundant group 1 domain-containing protein / LEA group 1 domain-containing protein low similarity to SP P46515 11 kDa late embryogenesis abundant protein (DS11) (Helianthus annuus); contains Pfam profile PF03760: Late embryogenesis abundant (LEA) group 1	embebida	NO
AT5G06980	expressed protein	embebida	NO
AT5G07360	amidase family protein low similarity to enantiomerase-selective amidase [Rhodococcus sp.] GI:152052; contains Pfam profile PF01425: Amidase	embebida	NO
AT5G22470	poly (ADP-ribose) polymerase family protein similar to poly(ADP)-ribose polymerase [Zea mays] GI:3928871; contains Pfam profiles PF00644: Poly(ADP-ribose) polymerase catalytic domain, PF00533: BRCA1 C Terminus (BRCT) domain, PF05406: WGR domain	embebida	SI
AT5G50360	expressed protein	embebida	NO
AT5G50700	[AT5G50700, short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein contains oxidoreductase, short chain dehydrogenase/reductase family domain, Pfam:PF00106];[AT5G50600, short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein similar to sterol-binding dehydrogenase steroleosin GI:15824408 from [Sesamum indicum]]	embebida	NO
AT5G57790	expressed protein	embebida	SI
AT5G62490	ABA-responsive protein (HVA22b) identical to AtHVA22b [Arabidopsis thaliana] GI:4884934	embebida	NO

AT5G64210	alternative oxidase 2, mitochondrial (AOX2) nearly identical to SP O22049	embebida	NO
AT5G66780	expressed protein	embebida	NO

Tabla S5.2. Lista de genes desregulados en semillas *abi4* que contienen la secuencia CCAC en sus regiones promotoras.

ID	Función	Semilla
AT1G16070	tubby family protein similar to Tubby related protein 1 (Tubby-like protein 1) (Swiss-Prot:Q9Z273) [Mus musculus]; low similarity to Tubby related protein 1 (Tubby-like protein 1) (Swiss-Prot:O0029) [Homo sapiens]; similar to phosphodiesterase (GI:467578) [Mus musculus]; contains Pfam profile PF01167: Tub family	seca
AT1G18860	WRKY family transcription factor contains Pfam profile: PF03106 WRKY DNA -binding domain	seca
AT1G26360	hydrolase, alpha/beta fold family protein similar to SP Q40708 PIR7A protein (Oryza sativa), ethylene-induced esterase [Citrus sinensis] GI:14279437, polynuridine aldehyde esterase [Rauvolfia serpentina] GI:6651393; contains Pfam profile PF00561: alpha/beta hydrolase fold	embebida
AT1G28160	ethylene-responsive element-binding family protein contains similarity to ethylene-responsive element binding factor GI:8809573 from (Nicotiana sylvestris)	seca
AT1G35210	expressed protein	seca
AT1G35513	isochorismate synthase-related / isochorismate mutase-related similar to SP Q9S7H8 Isochorismate synthase 1, chloroplast precursor (EC 5.4.99.6) (Icsl) (Isochorismate mutase) (Salicylic acid induction deficient 2) (Sid2) (Enhanced disease susceptibility 16) (Eds16) [Arabidopsis thaliana]	seca
AT1G50720	stigma-specific Stig1 family protein similar to stigma-specific protein STIG1 [Nicotiana tabacum] GI:496647; contains Pfam profile PF04885: Stigma-specific protein, Stig1	seca
AT1G51805	leucine-rich repeat protein kinase, putative similar to light repressible receptor protein kinase [Arabidopsis thaliana] gi 1321686 emb CAA66376; contains leucine rich repeat (LRR) domains, Pfam:PF00560; contains protein kinase domain, Pfam:PF00069	seca
AT1G52180	major intrinsic family protein / MIP family protein contains Pfam profile: MIP PF00230	Seca
AT1G55120	beta-fructosidase, putative / beta-fructofuranosidase, putative similar to beta-fructofuranosidase GI:402740	Embebida
AT1G68460	adenylate isopentenyltransferase 1 / cytokinin synthase (IPT1) identical to adenylate isopentenyltransferase (IPT1) [Arabidopsis thaliana] GI:14279054	Seca
AT1G68875	expressed protein	Seca
AT1G69550	disease resistance protein (TIR-NBS class), putative domain signature TIR-NBS exists, suggestive of a disease resistance protein.	Seca
AT1G69780	homeobox-leucine zipper protein 13 (HB-13) / HD-ZIP transcription factor 13 identical to homeobox gene 13 protein (GP:12325190) [Arabidopsis thaliana]	Embebida
AT1G71420	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein contains Pfam profile PF01535: PPR repeat	Seca
AT1G72870	disease resistance protein (TIR-NBS class), putative domain signature TIR-NBS exists, suggestive of a disease resistance protein.	Seca
AT1G73630	calcium-binding protein, putative similar to calcium binding protein GI:14589311 from [Sesbania rostrata]; contains Pfam profile: PF00036 EF hand (4 copies)	Seca
AT1G78020	senescence-associated protein-related similar to senescence-associated protein SAG102 (GI:22331931) [Arabidopsis thaliana]	Embebida
AT2G04680	DC1 domain-containing protein contains Pfam profile PF03107: DC1 domain	Seca

AT2G05030	hypothetical protein	Seca
AT2G05520	glycine-rich protein (gRP) identical to glycine-rich protein; atgRP (gl:259447) [Arabidopsis thaliana]	Seca
AT2G05850	serine carboxypeptidase S10 family protein similar to SP P52711 Serine carboxypeptidase II-3 precursor (EC 3.4.16.6) Hordeum vulgare; contains Pfam profile PF0450 serine carboxypeptidase	Seca
AT2G06120	hypothetical protein contains Pfam profile PF03384: Drosophila protein of unknown function, DUF287	Seca
AT2G15325	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein contains Pfam protease inhibitor/seed storage/LTP family domain PF00234	Seca
AT2G16010	hypothetical protein	Seca
AT2G22180	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	Seca
AT2G25450	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, putative similar to 2A6 (gl:599622) and tomato ethylene synthesis regulatory protein E8 (SP P10967)	Seca
AT2G27240	expressed protein contains Pfam profile PF01027: Uncharacterized protein family UPF0005	Seca
AT2G32100	ovate protein-related contains TlgRFAM TlgR01568 : uncharacterized plant-specific domain TlgR01568	Seca
AT2G36040	expressed protein ; expression supported by MPSS	Seca
AT2G38540	nonspecific lipid transfer protein 1 (LTP1) identical to SP Q42589	Seca
AT2G42540	cold-responsive protein / cold-regulated protein (cor15a) identical to cold-regulated protein cor15a [Arabidopsis thaliana] Gl:507149; contains Pfam profile PF02987: Late embryogenesis abundant protein	Seca
AT2G46720	[AT2g46720, fatty acid elongase 3-ketoacyl-CoA synthase, putative similar to gl:4091810; contains Pfam profile PF02797: Chalcone and stilbene synthases, C-terminal domain];[AT3g10280, fatty acid elongase 3-ketoacyl-CoA synthase, putative similar to fatty acid elongase 3-ketoacyl-CoA synthase 1 gB:AAC99312 [Arabidopsis thaliana]]	Seca
AT3G05610	pectinesterase family protein contains Pfam profile: PF01095 pectinesterase	Seca
AT3G11060	hypothetical protein	Seca
AT3G16040	expressed protein	Seca
AT3G19160	adenylate isopentenyltransferase 8 / adenylate dimethylallyltransferase / cytokinin synthase (IPT8) identical to adenylate isopentenyltransferase (IPT8) [Arabidopsis thaliana] Gl:14279068	Seca
AT3G19230	leucine-rich repeat family protein contains Pfam profile:PF00560 LRR:Leucine Rich Repeat domains; similar to light repressible receptor protein kinase (Gl:1321686)[Arabidopsis thaliana]	Seca
AT3G19320	leucine-rich repeat family protein contains leucine-rich repeats, Pfam:PF00560;	Seca
AT3G19390	cysteine proteinase, putative / thiol protease, putative contains similarity to cysteine proteinase RD21A (thiol protease) Gl:435619, SP:P43297 from [Arabidopsis thaliana]	Embebida
AT3G29300	hypothetical protein	Seca
AT3G30260	MADS-box protein (AGL79) similar to GB:Q38876 from [Arabidopsis thaliana] (Plant Cell 7 (11), 1763-1771 (1995)); contains Pfam profile PF00319: SRF-type transcription factor (DNA-binding and dimerisation domain)	Seca

AT3G49120	peroxidase, putative identical to peroxidase [Arabidopsis thaliana] gi 405611 emb CAA50677	Seca
AT3G54260	expressed protein various predicted proteins, Arabidopsis thaliana	Seca
AT4G20790	leucine-rich repeat family protein contains leucine rich repeat (LRR) domains, Pfam:PF00560;	Embebida
AT4G04610	5'-adenylylsulfate reductase (APR1) / PAPS reductase homolog (PRH19) identical to 5'-adenylylsulfate reductase [Arabidopsis thaliana] GI:2738756; identical to cDNA PAPS reductase homolog (PRH19) GI:1710111	Seca
AT4G04635	hypothetical protein	Seca
AT4G14020	rapid alkalization factor (RALF) family protein	Seca
AT4G16190	cysteine proteinase, putative contains similarity to papain-like cysteine proteinase isoform I GI:7381219 from [Ipomoea batatas]	Seca
AT4G16990	disease resistance protein (TIR-NBS class), putative domain signature TIR-NBS exists, suggestive of a disease resistance protein.	Seca
AT4G18395	expressed protein	Seca
AT4G23670	major latex protein-related / MLP-related low similarity to major latex protein {Papaver somniferum}[GI:294060] contains Pfam profile PF00407: Pathogenesis-related protein Bet v I family	Embebida
AT4G23760	expressed protein	Seca
AT4G24450	starch excess protein-related similar to SEX1 [Arabidopsis thaliana] GI:12044358	Seca
AT4G28010	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein contains Pfam profile PF01535: PPR repeat	Seca
AT4G28220	NADH dehydrogenase-related similar to 64 kDa mitochondrial NADH dehydrogenase [Neurospora crassa] GI:4753821, alternative NADH-dehydrogenase [Yarrowia lipolytica] GI:3718005; contains Pfam profile PF00070: Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase	Seca
AT4G33450	myb family transcription factor (MYB69) contains PFAM profile: Myb DNA binding domain PF00249; identical to cDNA putative transcription factor (MYB69) mRNA, partial cds GI:3941495	Seca
AT5G01820	CBL-interacting protein kinase 14 (CIPK14) identical to CBL-interacting protein kinase 14 [Arabidopsis thaliana] gi 13249127 gb AAK16689; contains Pfam profiles PF00069: Protein kinase domain and PF03822: NAF domain; identical to cDNA CBL-interacting protein kinase 14 (CIPK14) GI:13249126	Seca
AT5G02600	heavy-metal-associated domain-containing protein low similarity to gi:3168840 copper homeostasis factor; contains Pfam heavy-metal-associated domain PF00403; predicted proteins, Arabidopsis thaliana	Seca
AT5G11300	cyclin, putative (CYC3b) similar to cyclin 3a [Arabidopsis thaliana] GI:509425; contains Pfam profiles PF00134: Cyclin, N-terminal domain, PF02984: Cyclin, C-terminal domain; identical to cDNA cyc3b mRNA for cyclin 3b protein GI:728520	Seca
AT5G12330	lateral root primordium 1 (LRP1) identical to lateral root primordium 1 (LRP1) [Arabidopsis thaliana] GI:882341; contains Pfam profile PF05142: Domain of unknown function (DUF702)	Seca
AT5G14410	expressed protein	Seca
AT5G14870	cyclic nucleotide-regulated ion channel, putative (CNGC18) similar to cyclic nucleotide and calmodulin-regulated ion channel (cngc6) GI:4581207 from [Arabidopsis thaliana]	Seca
AT5G16030	expressed protein	embebida

AT5G25610	dehydration-responsive protein (RD22) identical to SP Q08298 Dehydration-responsive protein RD22 precursor {Arabidopsis thaliana}	Seca
AT5G28770	bZIP transcription factor family protein similar to seed storage protein opaque-2(bZIP family)GI:168428 from Zea mays; contains Pfam profile PF00170: bZIP transcription factor; identical to cDNA bZIP protein BZO2H3 GI:10954098	Seca
AT5G34450	replication protein-related weak similarity to Replication Protein A 70 kDa DNA-binding subunit (RP-A) (RF-A) (Replication factor-A protein 1) (Single-stranded DNA-binding protein) (DMRPA1) (GI:2498844)(SP:Q24492) [Drosophila melanogaster]	embebida
AT5G35480	expressed protein	Seca
AT5G39230	transcription initiation factor-related contains weak similarity to Transcription initiation factor IIB (General transcription factor TFIIIB) (Swiss-Prot:Q8W0W3) [Oryza sativa]	Seca
AT5G40155	expressed protein	Seca
AT5G45650	subtilase family protein contains Pfam domain, PF00082: Subtilase family; contains Pfam domain, PF02225: protease associated (PA) domain	Seca
AT5G56070	hypothetical protein	Seca
AT5G57560	xyloglucan:xyloglucosyl transferase / xyloglucan endotransglycosylase / endo-xyloglucan transferase (TCH4) identical to xyloglucan endotransglycosylase TCH4 protein GI:886116	Seca
AT5G59310	lipid transfer protein 4 (LTP4) identical to lipid transfer protein 4 from Arabidopsis thaliana [gi:8571923]; contains Pfam protease inhibitor/seed storage/LTP family domain PF00234	Seca
AT5G60320	lectin protein kinase family protein contains Pfam domains, PF00069: Protein kinase domain, PF00139: Legume lectins beta domain, and PF00138: Legume lectins alpha domain	Seca
AT5G61470	zinc finger (C2H2 type) family protein contains Pfam profile: PF00096 zinc finger, C2H2 type	Seca
AT5G63140	calcineurin-like phosphoesterase family protein contains Pfam profile: PF00149 calcineurin-like phosphoesterase	Seca

Tabla S6. Lista de genes compartidos entre las distintas estrategias *in silico* empleadas según las Tablas S2.1, S3, S4, S5.1 y S5.2.

ID	Función	Semilla	Regulación
AT3G18630	uracil DNA glycosylase family protein contains Pfam profile: PF03167 uracil DNA glycosylase superfamily	Embebida	Positiva
AT4G17550	transporter-related similar to cAMP inducible 2 protein [Mus musculus] GI:4580997, glycerol 3-phosphate permease [Homo sapiens] GI:7543982; contains Pfam profile PF00083: major facilitator superfamily protein	Embebida	Positiva
AT1G78020	senescence-associated protein-related similar to senescence-associated protein SAG102 (GI:22331931) [Arabidopsis thaliana]	Embebida	Negativa
AT1G73630	calcium-binding protein, putative similar to calcium binding protein GI:14589311 from [Sesbania rostrata]; contains Pfam profile: PF00036 EF hand (4 copies)	Seca	Negativa
AT2G32100	ovate protein-related contains TlGRFAM TlGR01568 : uncharacterized plant-specific domain TlGR01568	Seca	Negativa
AT2G42540	cold-responsive protein / cold-regulated protein (cor15a) identical to cold-regulated protein cor15a [Arabidopsis thaliana] GI:507149; contains Pfam profile PF02987: Late embryogenesis abundant protein	Seca	Negativa
AT2G25450	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, putative similar to 2A6 (gi:599622) and tomato ethylene synthesis regulatory protein E8 (SP P10967)	Seca	Negativa
AT3G54260	expressed protein various predicted proteins, Arabidopsis thaliana	Seca	Negativa
AT3G19390	cysteine proteinase, putative / thiol protease, putative contains similarity to cysteine proteinase RD21A (thiol protease) GI:435619, SP:P43297 from [Arabidopsis thaliana]	Embebida	Negativa
AT4G04610	5'-adenylylsulfate reductase (APR1) / PAPS reductase homolog (PRH19) identical to 5'-adenylylsulfate reductase [Arabidopsis thaliana] GI:2738756; identical to cDNA PAPS reductase homolog (PRH19) GI:1710111	Seca	Negativa
AT4G14020	rapid alkalization factor (RALF) family protein	Seca	Negativa
AT4G16190	cysteine proteinase, putative contains similarity to papain-like cysteine proteinase isoform I GI:7381219 from [Ipomoea batatas]	Seca	Negativa
AT5G59310	lipid transfer protein 4 (LTP4) identical to lipid transfer protein 4 from Arabidopsis thaliana [gi:8571923]; contains Pfam protease inhibitor/seed storage/LTP family domain PF00234	Seca	Negativa
AT5G14410	expressed protein	Seca	Negativa
AT5G45650	subtilase family protein contains Pfam domain, PF00082: Subtilase family; contains Pfam domain, PF02225: protease associated (PA) domain	Seca	Negativa
AT5G28770	bZIP transcription factor family protein similar to seed storage protein opaque-2(bZIP family)GI:168428 from Zea mays; contains Pfam profile PF00170: bZIP transcription factor; identical to cDNA bZIP protein BZO2H3 GI:10954098	Seca	Negativa
AT5G25610	dehydration-responsive protein (RD22) identical to SP Q08298 Dehydration-responsive protein RD22 precursor {Arabidopsis thaliana}	Seca	Negativa
AT5G01820	CBL-interacting protein kinase 14 (CIPK14) identical to CBL-interacting protein kinase 14 [Arabidopsis thaliana] gi 13249127 gb AAK16689; contains Pfam profiles PF00069: Protein kinase domain and PF03822: NAF domain; identical to cDNA CBL-interacting protein kinase 14 (CIPK14) GI:13249126	Seca	Negativa
AT5G57560	xyloglucan:xyloglucosyl transferase / xyloglucan endotransglycosylase / endo-xyloglucan transferase (TCH4) identical to xyloglucan endotransglycosylase TCH4 protein GI:886116	Seca	Negativa

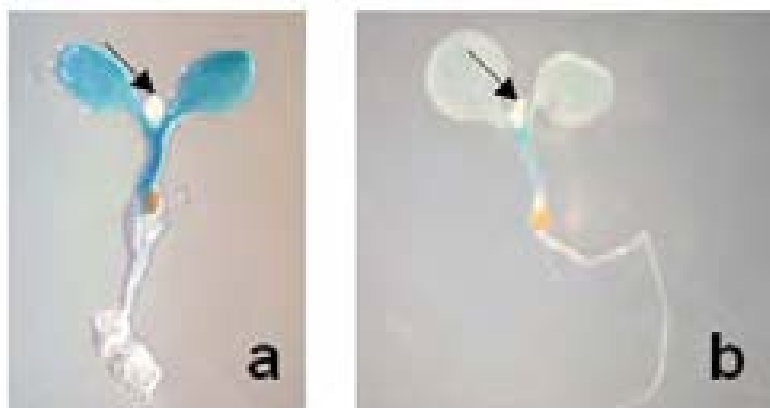


Figura S1. Análisis de la actividad de GUS por tinción histoquímica en plántulas *pABI4::GUS* de 7 días (a) y 10 días (b) crecidas en medio GM. La flecha indica las primeras hojas verdaderas emergentes.

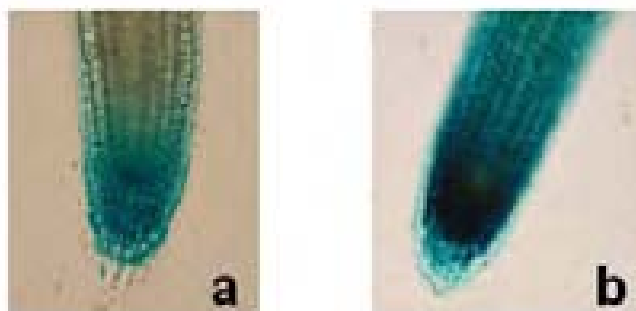


Figura S2. Actividad de GUS en el ápice de las raíces de plantulas *pABI4::GUS* de 3 días crecidas en GM (a) y 7% de glucosa (b).

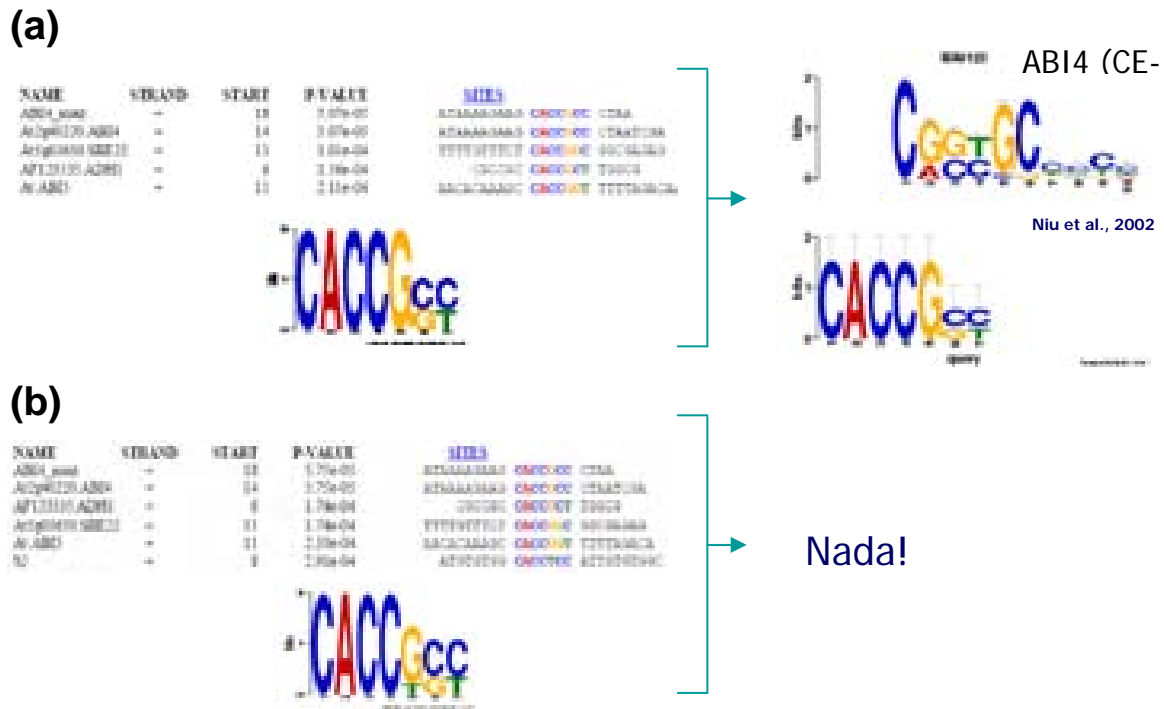


Figura S3. Comparación in silico de la similitud entre los motivos CACCG y la caja S.
 (a) La comparación entre las secuencias de los genes *ABI4* y *ADH1* de maíz, y *ABI4*, *ABI5* y *SBE2.2* de *Arabidopsis* detalladas en la parte superior indicó que todas ellas comparten la caja CACCG y que este motivo es similar estadísticamente a la caja tipo-CE-1 propuesta como el sitio de unión a *ABI4* (Niu *et al.* 2002).
 (b) Cuando a la muestra empleada para la comparación en (a) se le agrega la secuencia de unión a *ABI4* en RBCS denominada caja S, el motivo en común que se obtiene es CACC. Este motivo ya no se parece estadísticamente a la caja CACCG, lo cual sugiere que la caja tipo CE-1 y la caja S son diferentes.

Apéndice III

Análisis exploratorios

Durante este proyecto se realizaron varios estudios exploratorios relacionados a diferentes aspectos de la regulación del gen y la proteína ABI4. Estos análisis se realizaron de manera paralela al cumplimiento de los objetivos de esta tesis y estuvieron encaminados a ampliar el conocimiento sobre ABI4 y abrir nuevas posibilidades de estudio.

Análisis exploratorio 1.

Justificación: Las vías de señalización por azúcares interactúan con vías de transducción activadas por señales ambientales y señales asociadas al desarrollo (Rolland *et al.* 2006)). Por lo tanto, para analizar correctamente un fenómeno tan complejo como parece ser la expresión del gen *ABI4* y la función de la proteína correspondiente es necesario considerar todas las posibles inter-relaciones que están interactuando en un proceso determinado. Por ello analizamos la expresión del gen *ABI4* en respuesta a diferentes fitohormonas; y los resultados preliminares obtenidos indicaron que la expresión del promotor de *ABI4* aumenta en respuesta a auxinas (Bossi *et al.* 2002). Las auxinas participan en diversos procesos fisiológicos como la dominancia apical, los tropismos, la elongación del tallo y la iniciación de la raíz y, además, son capaces de regular la división, elongación y diferenciación celular mediante la acción coordinada con otras fitohormonas implicando la interacción de varias vías de señalización (Swarup *et al.* 2002). Además, un análisis teórico del promotor de *ABI4* utilizando la base de datos del programa PLACE (Higo *et al.* 1999) reconoció que esta secuencia regulatoria contiene una variedad de elementos *cis*-reguladores entre los que destacan 7 secuencias de tres elementos diferentes de respuesta a auxinas (Bossi *et al.* 2002), cuya funcionalidad queda por demostrarse. Recientemente, se ha reportado que la proteína ABI4 participa en la regulación mediada por nitrato del desarrollo de raíces laterales (Signora *et al.* 2001) y debido a que las auxinas son importantes reguladores del desarrollo y crecimiento de la raíz, resulta lógico especular que la inducción del promotor del gen *ABI4* en respuesta a auxinas se relacione de alguna manera a la participación de esta proteína en respuestas específicas del desarrollo de la raíz.

Objetivo: Analizar la inducción del promotor de *ABI4* en respuesta a auxinas.

Estrategia experimental: Con el objetivo de esclarecer la participación de las

auxinas en la regulación del gen *ABI4* se analizó la actividad de GUS en la parte aérea y en la raíz de plantas crecidas en GM, 7% de glucosa y 1 µg/ml ácido indol-acético para determinar si las auxinas inducen preferencialmente la expresión del promotor de *ABI4* en parte aérea o raíces respecto a la glucosa. Por otro lado, resulta interesante analizar el efecto conjunto producido por la glucosa y las auxinas con la idea de verificar si estos inductores actúan sobre la misma vía de señalización o si sus efectos son independientes.

Resultados: El análisis de la inducción del promotor de *ABI4* en respuesta a auxinas en 4 líneas independientes de plantas transgénicas *pABI4:GUS* indicó que el promotor de *ABI4* se induce por auxinas, siendo su nivel de inducción mayor en raíces (3.5 veces) que en la parte aérea (2 veces) de la plántula de 5 días (Figura 1a), aunque la actividad específica es mayor en la parte aérea (Figura 1b).

La Figura 1c muestra que el promotor de *ABI4* se induce 3 veces en respuesta a auxinas, 26 veces en presencia de 7% de glucosa y 23 veces en respuesta a 7% de sorbitol, siendo las veces de inducción en respuesta a glucosa similar a lo observado en respuesta a sorbitol, y ambas mayores a la respuesta del promotor a las auxinas. Curiosamente, la inducción del promotor de *ABI4* en respuesta a glucosa más auxinas es menor a su inducción en respuesta a glucosa solamente, sugiriendo que el efecto de ambas señales juntas sobre la regulación del promotor de *ABI4* es antagónico (Figura 1c).

Adicionalmente, el promotor de *ABI4* se induce en respuesta a sorbitol y a sorbitol más auxinas (Figura 1d). El análisis estadístico de los datos indica que las respuestas a sorbitol y auxinas son sinérgicas sugiriendo que ambas vías inducen independientemente la expresión de *ABI4* (Figura 1d).

Conclusión: La respuesta a auxinas del promotor de *ABI4* es débil comparada con aquella generada por la glucosa. Sin embargo, resulta interesante el hecho de que la respuesta del promotor de *ABI4* a glucosa más auxinas son antagónicas, a pesar de que ambas señales por separado tienen un efecto positivo sobre la expresión del promotor de *ABI4*. Estos datos sugieren que la regulación de la expresión del promotor de *ABI4* depende de una interacción compleja entre las señales de glucosa y auxinas (Figura 1d).

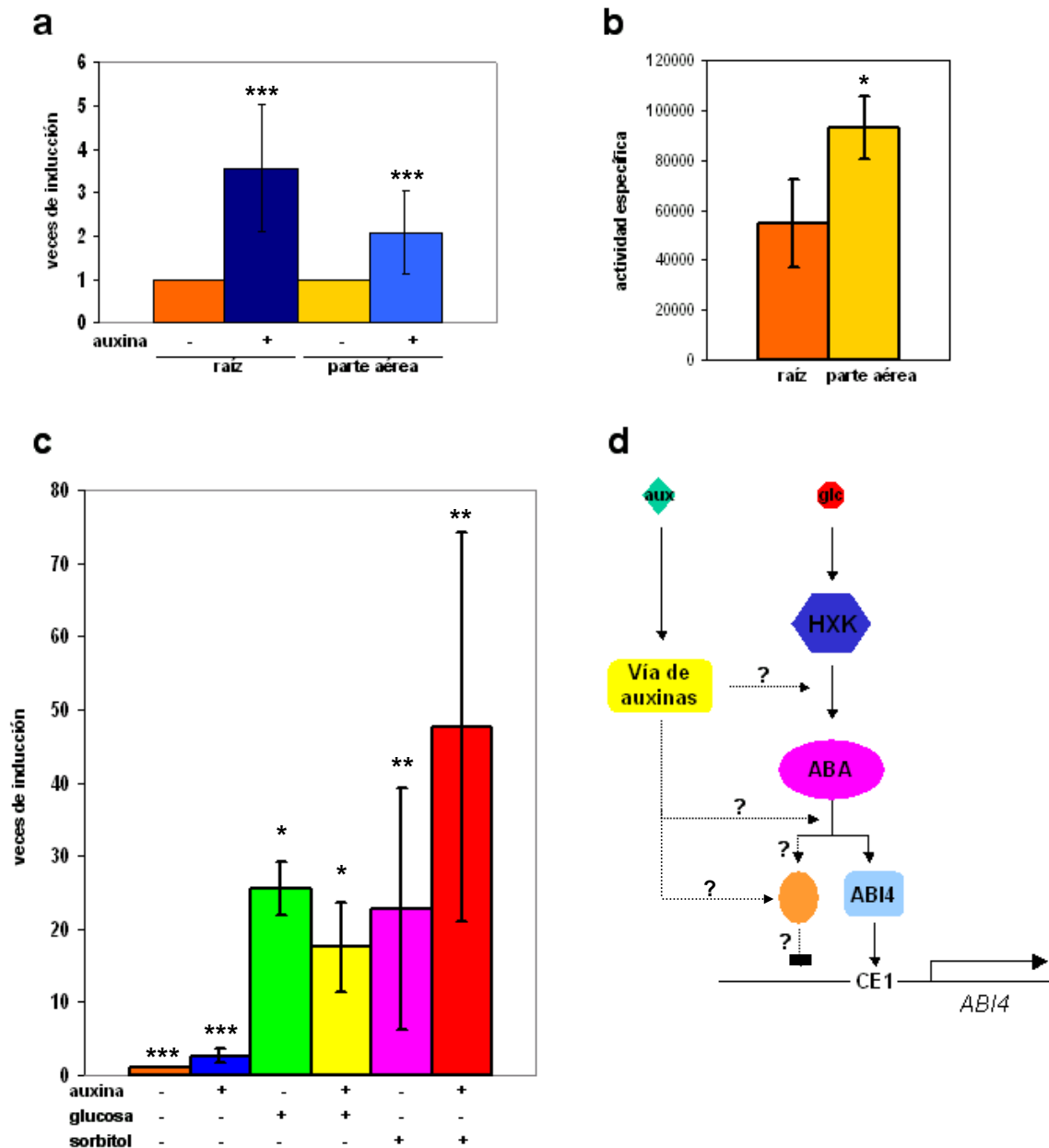


Figura 1 – Análisis de la inducción del promotor de *ABI4* en respuesta a auxinas.

(a) Actividad de β -glucuronidasa en la raíz y la parte aérea de plántulas transgénicas *pABI4::GUS* crecidas durante 5 días en ausencia (-) y presencia (+) de $1\mu\text{g/ml}$ de ácido indol-acético. La actividad se reporta como veces de inducción en relación a la actividad sin auxina. Los resultados corresponden al promedio de 4 líneas transgénicas independientes.

(b) Medición cuantitativa de la actividad de GUS en la raíz y la parte aérea de plántulas transgénicas *pABI4::GUS* crecidas durante 5 días en medio normal de crecimiento. La actividad específica se reporta en $\mu\text{g producto/}\mu\text{g proteína total/ minuto}$. Los resultados corresponden a una línea transgénica representativa.

(c) Cuantificación fluorimétrica de la actividad de GUS en plántulas transgénicas *pABI4::GUS* de 5 días crecidas en presencia de $1\mu\text{g/ml}$ de ácido indol-acético, 7% glucosa, 7% sorbitol y las combinaciones indicadas. La actividad se reporta como veces de inducción en relación a la actividad control (barra anaranjada). Los resultados corresponden a una línea transgénica representativa.

Los asteriscos indican las diferencias significativas según análisis ANOVA con 90% (*), 95% (**) y 99.9% (***) nivel de confianza.

(d) Esquema del posible modelo de interacción entre las señales de glucosa y auxinas para modular la expresión del gen *ABI4*.

Análisis exploratorio 2.

Justificación: La detección del factor ABI4 en extractos vegetales empleando anticuerpos específicos no fue exitosa. Por lo cual se dedicaron numerosos esfuerzos al diseño de diferentes estrategias con el objetivo de aumentar los niveles internos de proteína ABI4 *in planta*. Ninguna de ellas logró su objetivo, sugiriendo que los niveles de ABI4 en las células son bajos. Este resultado indicó que es probable que para detectar a la proteína ABI4 sea necesario un método más sensible que el análisis mediante ensayos de tipo western blot. Durante la realización de esta tesis se optimizó el ensayo de movilidad electroforética (EMSA), generando así una herramienta útil y altamente sensible para explorar la presencia de la proteína ABI4 en extractos vegetales.

Objetivo: Determinar la existencia de la proteína ABI4 en extractos vegetales.

Estrategia experimental: Con el objetivo de encontrar alguna evidencia indirecta de la existencia de la proteína ABI4 endógena, se analizaron extractos totales de proteínas de plántulas de *Arabidopsis* a través de ensayos EMSA. Previamente, se ha demostrado que la proteína recombinante GST-ABI4 es capaz de unirse a una región de 152 pb del promotor de ABI4 (Bossi *et al* 2009), por lo tanto se decidió utilizar esta secuencia como sonda de DNA. Como fuente de proteína para los EMSA, se emplearon extractos proteicos completos provenientes de plántulas Columbia crecidas en medio GM y en alta glucosa, y de plántulas *abi4* crecidas en alta glucosa.

Resultados: Los resultados indicaron que una proteína presente en el extracto de alta glucosa se une fuertemente a la sonda de ABI4 (Figura 2, carriles 6, 9 y 11). Este complejo proteína/DNA desaparece cuando se utiliza el extracto proteico de plántulas *abi4* crecidas en alta glucosa sugiriendo que la proteína ABI4 es quien se une a la región de 152 pb del promotor de *ABI4* (Figura 2, carriles 7 y 10). El competidor específico CE-1x3 evita la interacción entre el fragmento del promotor de *ABI4* y el extracto proteico de *Arabidopsis* (Figura 2, carril 12). Este resultado indica indirectamente que la proteína del complejo de interacción es capaz de unirse al elemento CE-1 de manera específica, y sugiere a la proteína ABI4 como un fuerte candidato.

Conclusión: El promotor de *ABI4* une específicamente a una proteína presente en extractos proteicos completos de *Arabidopsis* cuya presencia en los extractos depende de la concentración de glucosa y de la integridad de la proteína ABI4. El factor ABI4 parece el candidato ideal. Sin embargo es probable que la sonda utilizada en el EMSA incluya otros elementos *en cis* funcionales, y por lo tanto no es posible descartar

la posibilidad de que una proteína regulada por ABI4 en presencia de glucosa sea la responsable de la banda de retardo observada. Un análisis EMSA utilizando solo el elemento CACCG como sonda y/o un ensayo EMSA tipo supershift donde se analice la interacción entre la sonda de DNA, el extracto de proteínas totales y el anticuerpo anti-ABI4, serían necesarios para confirmar la identidad de la proteína que une a la sonda.

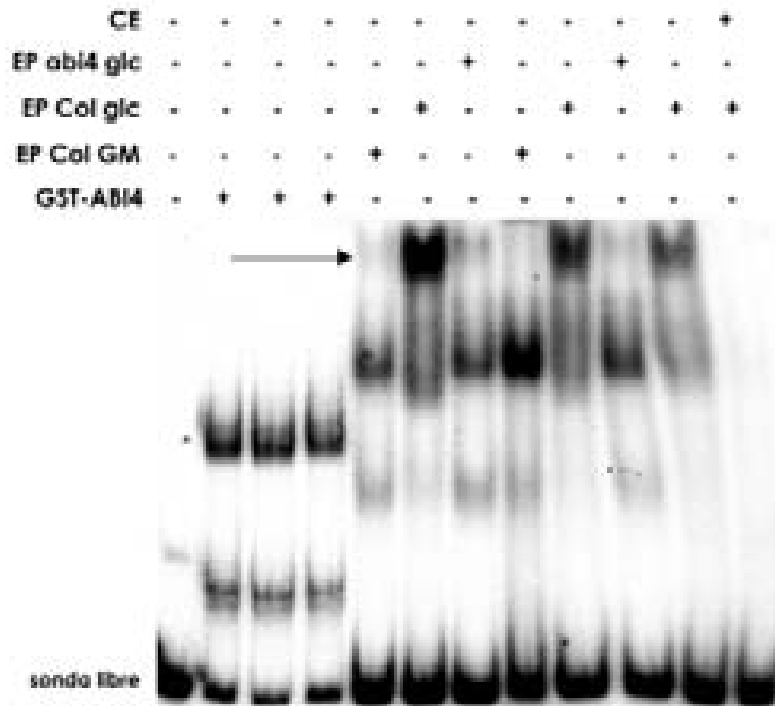


Figura 2. Análisis de interacción DNA-proteína (EMSA).

En todas las reacciones de interacción se empleó un fragmento de 152pb del promotor de *ABI4* como sonda de DNA para el EMSA (sonda libre).

Los signos - sobre los carriles indican ausencia, y los signos + indican presencia de las siguientes fuentes de proteínas: GST-ABI4: proteína recombinante pura GST-ABI4; EP Col GM: extracto proteico total de plántulas Columbia crecidas en medio GM; EP Col glc: extracto proteico total de plántulas Columbia crecidas en 7% de glucosa; EP *abi4* glc: extracto proteico total de plántulas *abi4* crecidas en 7% de glucosa.

CE corresponde a un oligo de 36 pb que contiene 4 cajas CACCG repetidas en su secuencia, el cual se utilizó como competidor específico de la interacción entre el DNA de *ABI4* y los extractos proteicos de plántulas Columbia crecidas en 7% de glucosa. Su presencia en la reacción se indica con un signo + en el carril y su ausencia con un signo -.

El asterisco (*) indica la interacción entre la sonda de 152pb y la proteína GST-ABI4. La flecha indica la interacción entre la sonda de 152pb y una proteína del extracto total de plántulas silvestres crecidas en 7% de glucosa.