

ANÁLISIS DE LOS ELEMENTOS REGULATORIOS DE RESPUESTA A AZÚCARES Y ÁCIDO ABCSÍCO DEL GEN DE LA SUBUNIDAD PEQUEÑA DE RUBISCO (*RBCS*)

ANALYSIS OF THE REGULATORY ELEMENTS INVOLVED IN THE SUGAR AND ABSCISIC ACID RESPONSIVENESS OF THE RUBISCO SMALL SUBUNIT GENE (*RBCS*)

Fernanda Martínez-Rojo,
Gustavo Acevedo-Hernández*
Araceli Rodríguez-Sahagún,
Osvaldo A. Castellanos-
Hernández.

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA, CENTRO
UNIVERSITARIO DE LA CIÉNEGA.

*Autor responsable
fernanda.mtz89@outlook.com,
gustavo.acevedo@cuci.udg.mx

R E S U M E N

El gen de Rubisco (*RBCS*) presenta en su promotor el elemento CMA5, necesario para la inducción por luz, y represión por azúcares y ácido abscísico (ABA). Un análisis demuestra que este elemento no sólo se ha conservado evolutivamente en *RBCS*, sino también está presente en genes asociados a la fotosíntesis. En este trabajo se plantea verificar si el traslape encontrado entre los elementos caja-G y caja-S que se encuentran en CMA5 es lo que determina el mecanismo de regulación negativa por ABI4 en respuesta a azúcares y ABA.

Palabras clave:

ABI4, coexpresión, Rubisco, regulación por azúcares y ABA, fotosíntesis.

ABSTRACT: The promoter of the Rubisco gene (*RBCS*) contains the cis-element CMA5, which is necessary for light-induced expression, and is involved in the negative regulation by sugars and abscisic acid (ABA). Our analysis shows that CMA5 is evolutionarily conserved not only in the promoters of *RBCS* homologous genes, but also in other photosynthesis-associated nuclear genes. In this work we propose an experimental approach to determine whether the overlap of the G-box and S-box elements found in CMA5 is responsible for the negative regulation by sugars and ABA.

KEYWORDS:

ABI4, coexpression, Rubisco, regulation by sugars and ABA, photosynthesis

I N T R O D U C C I Ó N

En las plantas, la luz ejerce como una señal que controla la expresión de ciertos genes fotosintéticos que se encuentran en el genoma nuclear como *RBCS*, que codifica parte de la holoenzima responsable de la fijación de CO₂ (Rook *et al.*, 2006; Sawchuk *et al.*, 2008; Gregory MF, 1997), siendo captada por medio de un complejo sistema de fotorreceptores (López-Ochoa *et al.*, 2007). Un nivel adicional de control en la expresión de los genes fotosintéticos es la retroalimentación negativa debida a la acumulación de azúcares (Acevedo-Hernández *et al.*, 2005; Rolland *et al.*, 2006; Rook *et al.*, 2006). Por tanto, este último mecanismo de regulación parece ser el factor clave que limita la eficiencia fotosintética.

Además, un aumento en los niveles del regulador de crecimiento ácido abscísico (ABA) también está implicado en la vía de señalización de azúcares, siendo un efecto que ocurre primordialmente a nivel de la transcripción (Acevedo-Hernández *et al.*, 2005). Es probable que la participación de este regulador en la expresión de los genes asociados a la fotosíntesis sea importante para adaptar la actividad fotosintética a las condiciones ambientales extremas. El arreglo modular conservado 5 (CMA5), corresponde a un fragmento de 52 pb del promotor *rbcS8B* de *Nicotiana plumbaginifolia* y es la secuencia nativa más corta que se comporta como una unidad que responde a la luz con alta sensibilidad cuando se fusiona a un promotor mínimo heterólogo (Martínez-Hernández *et al.*, 2002). CMA5 contiene los elementos *cis* que han sido implicados en la regulación de genes fotosintéticos por luz, a saber: caja-I (GATAAGR) y caja-G (CACGTG) (López-Ochoa *et al.*, 2007). Se debe agregar que la distancia entre la caja-I y caja-G está conservada evolutivamente (13 pb) y que presenta cierta flexibilidad aunque es limitada, ya que una distancia mayor a 23 pb elimina por completo la actividad de CMA5 (López-Ochoa *et al.*, 2007).

Por otro lado se encontró un elemento *cis* implicado en la disminución de la expresión por altos niveles de azúcar y ABA denominado caja-S (Acevedo-Hernández *et al.*, 2005). Estudios sobre la expresión de genes regulados por luz han demostrado que el factor de transcripción ABI4 (*abscisic acid- insensitive 4*) (Reeves *et al.*, 2011; Yu-Feng *et al.*, 2012), media la regulación por azúcares y ABA de los genes asociados a la fotosíntesis, a través de su unión a la caja-S (Acevedo-Hernández *et al.*, 2005).

En varios genes reprimidos por azúcar y ABA tales como *CAB* y *RBCS*, la caja-S, se superpone con la caja-G, elemento esencial para alcanzar altos niveles de expresión en muchos genes regulados por luz (Acevedo-Hernández *et al.*, 2005; Rook *et al.*, 2006).

Se ha propuesto un modelo sobre el mecanismo de regulación en respuesta a azúcar y ABA mediado por ABI4 que implica competición entre activadores y represores, puesto que para reducir la expresión génica, ABI4 compite con la proteína de unión a la caja-G (GBF) por su respectivo sitio de unión en promotores de genes fotosintéticos (Acevedo-Hernández *et al.*, 2005) (Fig. 1b).

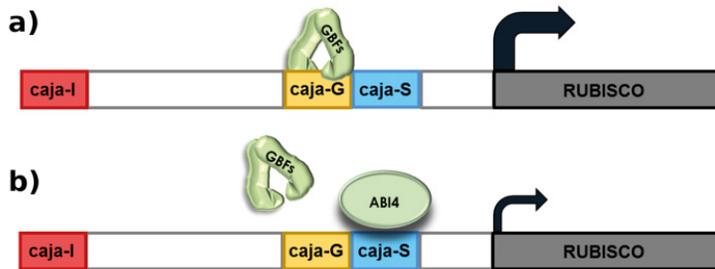


FIGURA 1.

Modelo propuesto para la regulación de CMA5 por ABI4. a) Respuesta positiva de CMA5 a luz a través de la unión de factores a la caja G (GBFs). b) Respuesta negativa de CMA5 a azúcares y ABA, por competencia de ABI4 con los GBFs por el sitio de unión. (Acevedo-Hernández *et al.*, 2005).

En este trabajo se establece la importancia de CMA5 como elemento regulatorio central para la expresión de *RBCS* y otros genes asociados a la fotosíntesis, además de abordar el mecanismo de regulación negativa mediado por ABI4.

M E T O D O L O G Í A

ANÁLISIS DE LA REGIÓN PROMOTORA DE GENES ORTÓLOGOS DE *RBCS* EN PLANTAS.

Se realizó una búsqueda usando la secuencia de nucleótidos de la región codificante del gen *RBCS1A* de *Arabidopsis* en la base de datos Phytozome (<http://www.phytozome.net>) con el fin de identificar sus genes ortólogos, posteriormente se examinaron 1000 pb de la región que precede a la región codificante, en la cual se asume se encuentra la región promotora de estos genes, para analizar con las herramientas MELINAII (<http://melina2.hgc.jp/public/index.html>) y SCOPE (<http://genie.dartmouth.edu/scope/>) los elementos correspondientes a CMA5, junto con la presencia de la caja-S y su relación con la caja-G. Además, se buscaron otros posibles elementos asociados a CMA5.

ANÁLISIS DE LA REGIÓN PROMOTORA DE GENES CONTENIENDO CMA5 EN *Arabidopsis thaliana*.

Se efectuó una búsqueda en 1000 pb de la región promotora de genes presentes en *A. thaliana* utilizando la herramienta Patmatch que se encuentra en la base de datos TAIR (<http://www.arabidopsis.org>) con el propósito de localizar genes que presenten el elemento

CMA5. A diferencia de MELINA II y SCOPE, que localizan combinaciones de los elementos de interés en los promotores de grupos limitados de genes, Patmatch realiza esta búsqueda en el genoma completo de *Arabidopsis thaliana*. Enseguida, los genes obtenidos se introdujeron en la plataforma de análisis PRIME (<http://prime.psc.riken.jp>) para encontrar genes corregulados, después se examinó la región promotora de estos genes para identificar si existen otros elementos regulatorios diferentes de los asociados con respuesta a luz y caja-S, así como su localización relativa.

CONSTRUCCIÓN DE DIFERENTES VERSIONES DE LA UNIDAD CMA5 CON EL GEN REPORTERO GUS.

Se realizaron fusiones transcripcionales de diferentes versiones del arreglo CMA5 presentando variaciones en la distancia entre las cajas G y S, con una copia del promotor mínimo 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), río arriba del gen reportero *GUS* con el fin de analizar el mecanismo de regulación por ABI4. Se incluyeron dos controles: el promotor completo 35S CaMV que tiene una expresión constitutiva y el promotor completo de *RBCS1A* de *Arabidopsis*, ambos controlando la expresión del gen *GUS*.

R E S U L T A D O S Y D I S C U S I Ó N

Se identificaron 107 genes ortólogos de *RBCS1A* en 34 especies de plantas, los cuales tienen >60% de similitud. La región promotora se examinó y se determinó que 58 de estos genes contienen el elemento CMA5, asimismo se reveló que el único consenso adicional asociado a dicho elemento es la caja-S, y que ésta se encuentra traslapada a la caja-G lo que muestra la conservación evolutiva de estos elementos (Fig. 2b).

CMA5 se encuentra en la región proximal de los promotores de genes ortólogos de *RBCS1A* (Fig. 2c), además por lo menos una copia de este gen en cada especie contiene el arreglo CMA5. Se puede inferir que la presencia de CMA5 en el promotor de *RBCS* es una característica adquirida posteriormente a la divergencia del linaje de las angiospermas.

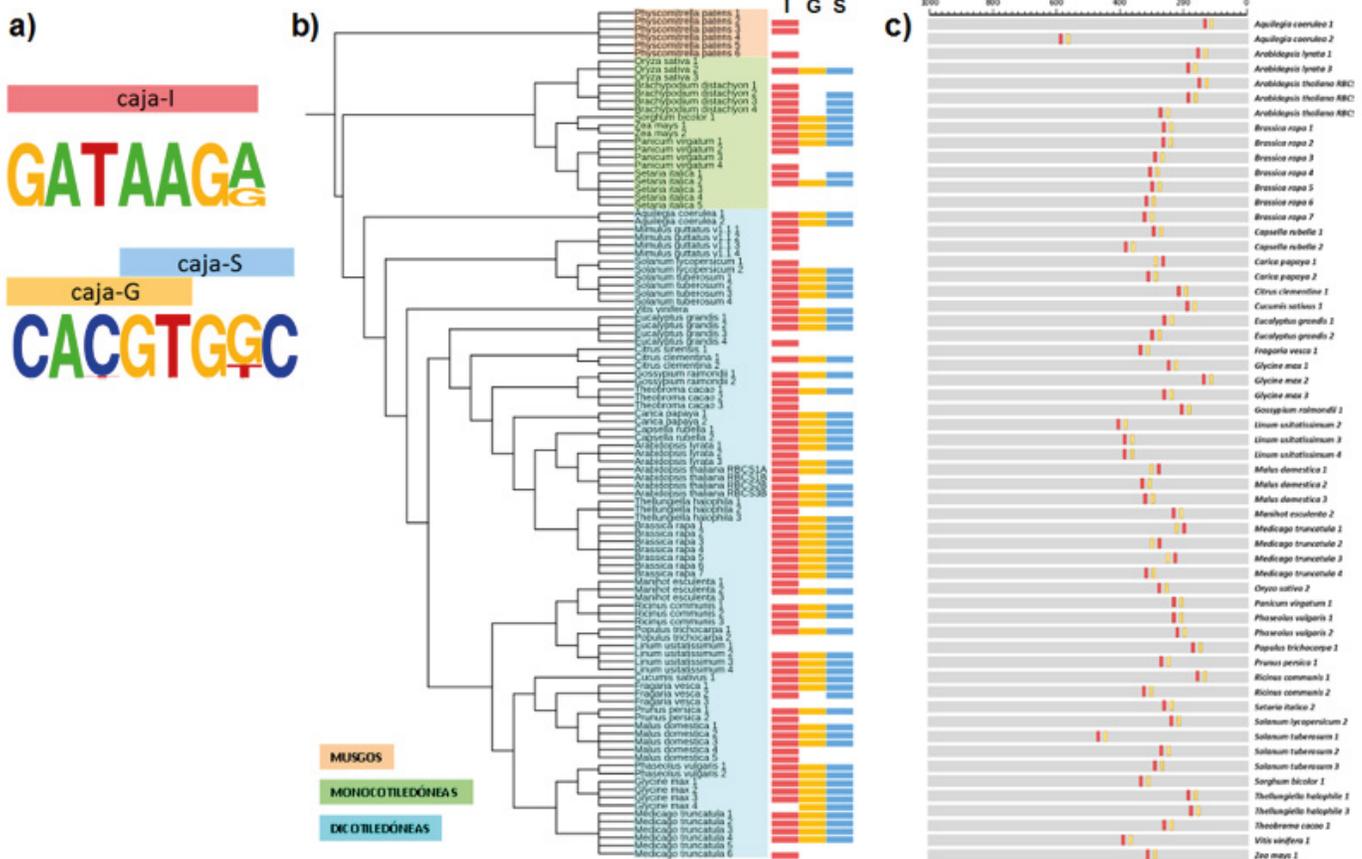


FIGURA 2.

Análisis de promotores ortólogos de *RBCS*. a) Secuencia consenso para la caja-I, caja-G y caja S. b) Árbol filogenético señalando la presencia de las cajas en cada promotor, realizado con iTOL (<https://itol.embl.de/>). c) representación esquemática de los promotores ortólogos de *RBCS* mostrando la posición de CMA5 realizado con SCOPE (<http://genie.dartmouth.edu/scope/>).

El análisis de la región promotora de genes en *A. thaliana* indica que CMA5 no sólo se presenta en *RBCS* sino también en otros genes, de los 107 genes obtenidos 61 muestran la caja-S traslapada con la caja-G. Además 24 de estos genes están en la misma red de coexpresión, y al analizar su promotor no se encontraron otros elementos comunes a ellos. Se debe agregar que la presencia de CMA5 y la caja-S traslapada con la caja-G sugiere que esos elementos son los que hacen que estos genes se expresen de manera similar (Fig. 3a). Existe una característica importante en los genes que se encuentran dentro de la red de coexpresión y es que la mayoría participan en la fotosíntesis, por lo que se infiere que el arreglo CMA5 es importante en la regulación de los genes asociados a este proceso (Fig. 3b). En esta red de coexpresión existe un gen (*AT4G14540*) que codifica al único factor de transcripción encontrado dentro de ella denominado NF-YB3, por lo que se propone que podría tener algún papel en la regulación de esta red.

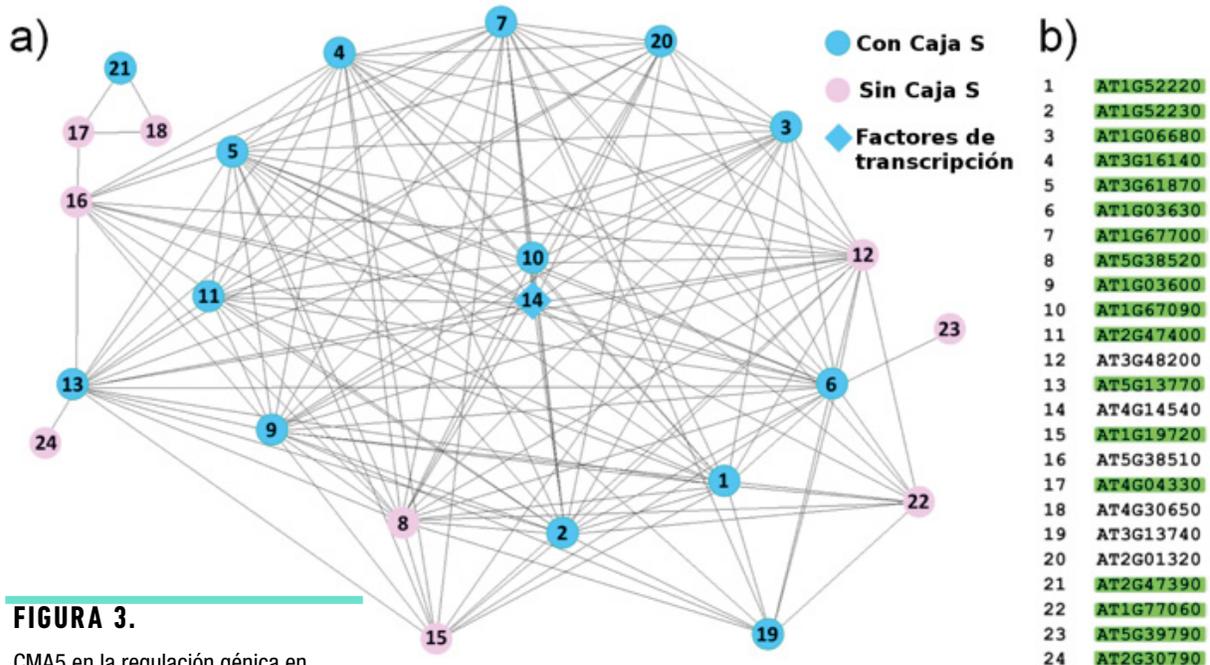


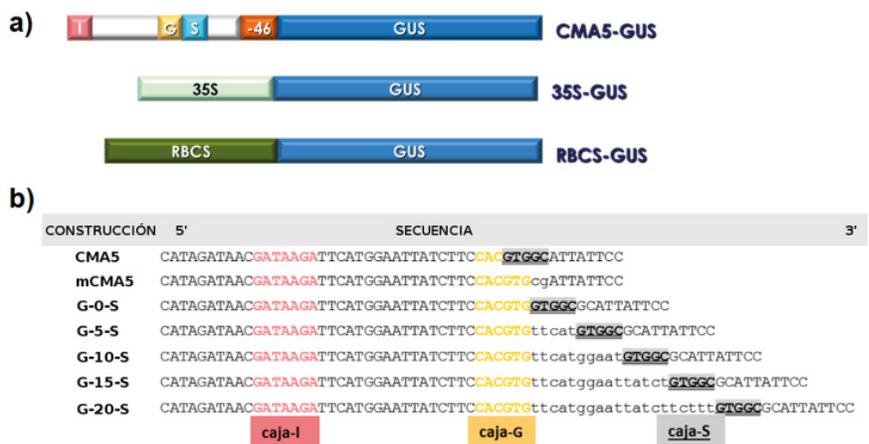
FIGURA 3.

CMA5 en la regulación génica en *Arabidopsis*. a) Red de coexpresión de los genes que contienen CMA5 dentro del genoma de *Arabidopsis thaliana*, realizada utilizando PRIME (<http://prime.psc.riken.jp>) b) Genes presentes en la red de coexpresión, señalando en verde aquellos que participan en la fotosíntesis.

Para probar el modelo propuesto para la regulación de CMA5 por azúcar y ABA (Fig. 4b) se realizaron 6 versiones distintas de este arreglo modular, las cuales tienen variación en la presencia de la caja-S y su distancia relativa a la caja-G, con la intención de comprobar si el traslape entre estas cajas es responsable de la regulación negativa por azúcares y ABA. Simultáneamente se elaboraron las construcciones control mencionadas en la metodología (Fig. 4a).

FIGURA 4.

Construcciones para el estudio del mecanismo de regulación mediado por ABI4. a) Se presentan las diferentes fusiones transcripcionales que se construirán utilizando el gen reportero *GUS*, donde a se emplearán distintas versiones de CMA5-*GUS*. b) Secuencia de nucleótidos de las diferentes versiones de CMA5. Se señalan en color los elementos caja-I y caja-G y se subraya la caja-S.



CONCLUSIONES

El elemento CMA5 demuestra estar filogenéticamente conservado, puesto que no sólo se presenta en el promotor del gen *RBCS* de *A. thaliana* sino también en 33 especies y mayoritariamente en dicotiledóneas. El análisis de los genes que presentan CMA5 en *Arabidopsis* revela que algunos de estos genes se encuentran en la misma red de coexpresión y la mayoría de ellos están asociados con la fotosíntesis. Teniendo en cuenta que no se presenta otro consenso en la región promotora de dichos genes, se infiere que CMA5 es responsable de la regulación común que presentan estos genes. Por otro lado, se plantea un posible papel dentro de esta red de coexpresión del factor de transcripción NF-YB3, el cual ha sido implicado en la señalización por estrés hídrico a través de ABA. Se cuenta con diferentes versiones de CMA5, con la intención de verificar si el traslape entre los elementos caja-G y caja-S es lo que determina el mecanismo de regulación en respuesta a azúcar y ácido abscísico.

AGRADECIMIENTOS

El apoyo financiero brindado a este trabajo es a través del proyecto PRO-MEP/103.5/13/7001.

REFERENCIAS

- ACEVEDO-HERNÁNDEZ GJ, León P, Herrera-Estrella LR. 2005. Sugar and ABA responsiveness of a minimal RBCS light-responsive unit is mediated by direct binding of ABI4. *The Plant Journal* 43, 506–519.
- GREGORY MF, Watson GMF, Tabita FR. 1997. Microbial ribulose 1.5-bisphosphate carboxylase/oxygenase: a molecule for phylogenetic and enzymological investigation. *FEMS Microbiology Letters* 146, 13–26.
- HU YF, Li YP, Zhang JJ, Liu HM, Tia M, Huang YB. 2012. Binding of ABI4 to a CACCG motif mediates the ABA-induced expression of the ZmSSI gene in maize (*Zea mays* L.) endosperm. *Journal of Experimental Botany* 63, 5979–5989.
- LÓPEZ-OCHOA L, Acevedo-Hernández GJ, Martínez-Hernández A, Arguello-Astorga G, Herrera-Estrella LR. 2007. Structural relationships between diverse cis-acting elements are critical for the functional properties of a *rbcS* minimal light regulatory unit. *Journal of experimental botany* 58, 4397–4406.
- MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ A, López-Ochoa L, Arguello-Astorga G, Herrera-Estrella L. 2002. Functional properties and regulatory complexity of a minimal RBCS light-responsive unit activated by phytochrome, cryptochrome, and plastid signals. *Plant Physiology* 128, 1223–1233.
- REEVES WM, Lynch TJ, Mobin R, Finkelstein RR. 2011. Direct targets of the transcription factors ABA-Insensitive(ABI)4 and ABI5 reveal synergistic action by ABI4 and several bZIP ABA response factors. *Plant molecular biology* 75, 347–363.
- ROLLAND F, Baena-Gonzalez E, Sheen J. 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual review of plant biology* 57, 675–709.
- ROOK F, Hadingham SA, Li Y, Bevan MW. 2006. Sugar and ABA response pathways and the control of gene expression. *Plant, Cell and Environment* 29, 426–434.
- SAWCHUK MG, Donner TJ, Head P, Scarpella E. 2008. Unique and overlapping expression patterns among members of photosynthesis-associated nuclear gene families in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 148, 1908–1924.