

VII - CAPITULO 4

HAHB4 se activa en oscuridad para actuar como un represor de la transcripción de genes que participan en la fotosíntesis

**No debe prometer andar en la oscuridad
quien no ha visto el anochecer
J.R.R. Tolkien**

VII. - CAPITULO 4

HAHB4 se activa en oscuridad para actuar como un represor de la transcripción de genes que participan en la fotosíntesis.

VII.1 – Introducción.

La luz juega un papel crítico en la regulación del crecimiento y del desarrollo de las plantas. En los ambientes terrestres la luz varía constantemente en la densidad de flujo, la composición espectral, la duración del fotoperíodo y la dirección. Estas variaciones en la calidad de luz permiten a las plantas identificar períodos estacionales peligrosos para su desarrollo. Por ejemplo, la detección de los cambios lumínicos entre estaciones es la que activa la transición entre los estadios vegetativo y reproductivo y la subsiguiente floración. Este proceso de floración es particularmente sensible al estrés y ocurre generalmente en momentos climáticamente favorables. Además de la influencia de la luz sobre el desarrollo, las plantas utilizan la luz como fuente de energía a través del proceso de fotosíntesis.

A pesar de que la luz es la fuente primaria de energía de las plantas, bajo ciertas circunstancias desfavorables, éstas reprimen la síntesis de los componentes de la maquinaria fotosintética, obligadas a ahorrar energía o para prevenir el daño causado por un exceso de electrones. De estas circunstancias desfavorables, las más típicas ocurren durante la senescencia y cuando las plantas se ven sometidas a estrés hídrico (Paul y Foyer, 2001; Flexas y Medrano, 2002; Medrano y col., 2002). Durante la senescencia, particularmente las plantas anuales, “apagan” su maquinaria fotosintética y usan toda la energía disponible para movilizar nutrientes hacia las semillas. En situaciones de déficit hídrico, las plantas reducen la biogénesis de la maquinaria fotosintética ya que el agua disponible es insuficiente para llevar a cabo la conversión de energía lumínica en energía química. Si no lo hicieran, el exceso de electrones disponibles terminaría generando un daño de origen foto-oxidativo en forma masiva.

En forma natural, la mayoría de las plantas frena la biosíntesis de componentes de la fotosíntesis durante las noches ya que al no disponer de iluminación, de alguna

forma sienten que producir estos componentes significaría un gasto energético innecesario (Hennessey y Field, 1991; Hwang y Herrin, 1994). Cuando el día comienza los fotorreceptores de luz azul y los fitocromos perciben el estímulo lumínico e inmediatamente activan la transcripción de los genes que codifican proteínas que conforman el aparato fotosintético, restituyendo completamente la maquinaria (Tobin y Silverthorne, 1985; Thompson y White, 1991). Los fotorreceptores son capaces de sentir y medir la cantidad y la calidad de la luz y activan las complejas vías de transducción de señales que modulan la actividad transcripcional de los genes implicados en la respuesta a luz (Kuhlemeier y col., 1987; Nagy y col., 1988; Nagatani, 2000). En la figura VII.1 se esquematiza a modo de ejemplo y en forma simplificada el mecanismo de regulación de algunos genes que presentan respuestas a la luz mediadas por el fitocromo B.

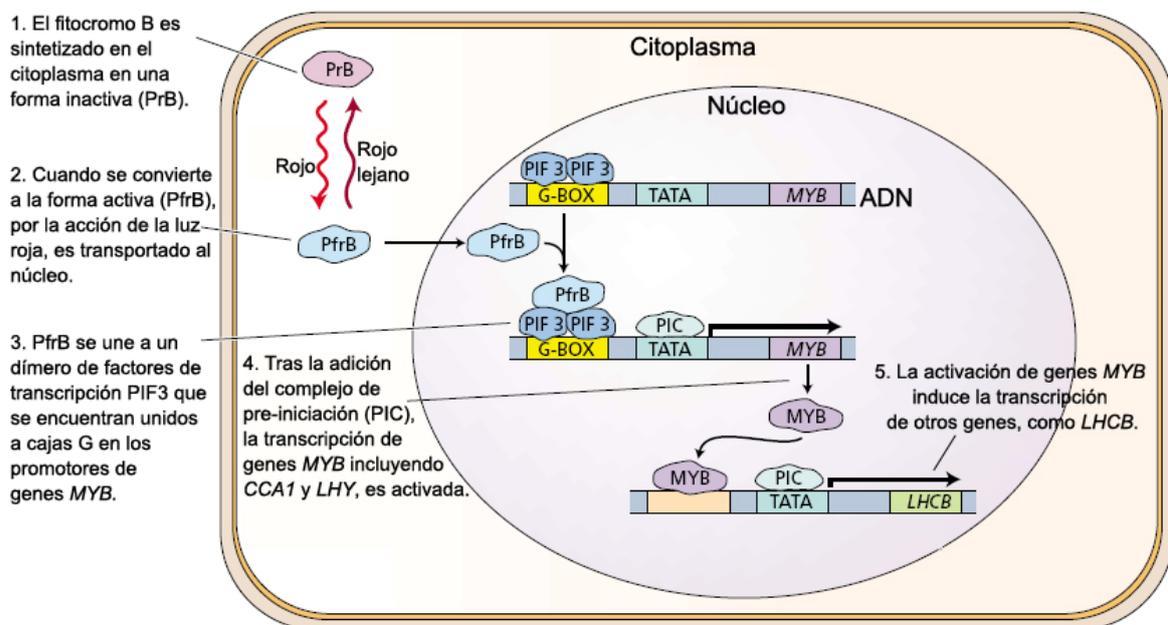


Figura VII.1: Representación esquemática de la regulación por luz de la expresión génica mediadas por las vías de transducción de señales en las que interviene el fitocromo B, según Quail (2002). Abreviaturas: PIF3: factor de transcripción PIF3 (del inglés *phytochrome interacting factor 3*); G-BOX: elemento de respuesta G; MYB: factores de transcripción de la familia MYB; LHCb: del inglés *light harvesting complex B*; PrB: forma inactiva del fitocromo B; PfrB: forma activa del fitocromo B; PIC: complejo de pre-iniciación; LHY: del inglés *late elongated hypocotyl*; CCA1: del inglés *circadian clock associated 1*.

De los genes regulados por la luz, uno de los grupos más importantes es el conjunto que codifica las proteínas involucradas en la fotosíntesis. A través de estudios moleculares y genéticos en *Arabidopsis* realizados con plantas mutantes en distintos

genes, se identificaron numerosas señales intermediarias específicas para cada fotorreceptor y también puntos de convergencia entre estos fotorreceptores (Neff y col., 2000; Quail, 2002). Muchas de estas moléculas identificadas codifican factores de transcripción o reguladores transcripcionales. Entre ellos se destacan algunos pertenecientes a las familias b-Zip, FRS, HD-Zip, Myb, bHLH, GRAS y DOF (Oyama y col., 1997; Ni y col., 1998; Hudson y col., 1999; Fairchild y col., 2000; Bolle y col., 2000; Ballesteros y col., 2001; Huq y Quail, 2002; Holm y col., 2002; Wang y Deng, 2002; Park y col., 2003; Huq y col., 2004; Ward y col., 2005). Sin embargo, en la mayoría de los casos no se ha establecido qué función cumplen en estas vías.

Algunos de los miembros de la familia de factores de transcripción HD-Zip, en especial los que conforman las subfamilias I y II, se regulan a nivel transcripcional por las condiciones lumínicas y participan de procesos fisiológicos activados por la luz (Morelli y Ruberti 2002; Wang y col., 2003; Sessa y col., 2005). En algunos casos como el de *ATHB7* y *52*, la activación transcripcional se produce por la condición contraria, la oscuridad (Henriksson y col., 2005).

La oscuridad puede ser definida como la falta completa de luz. Los procesos metabólicos y moleculares que ocurren en la planta durante los períodos de oscuridad no han sido bien estudiados. Se sabe que durante la noche las plantas activan la transcripción de los componentes de la cadena respiratoria mitocondrial con el objeto de obtener energía. También se ha asumido y demostrado experimentalmente que la biogénesis de la maquinaria fotosintética se activa por la presencia de luz. Sin embargo, el hecho de que la ausencia de luz sea un motivo suficiente para reprimir esta síntesis, ya sea de forma indirecta (por falta de las señales inductoras presentes en luz) o directamente a través de la síntesis de represores transcripcionales, no ha sido debidamente caracterizado. Algunos informes recientes indican que la regulación de genes de respuesta a luz, dista mucho de ser inactiva durante la noche (Nakahira y col., 1998, Bläsing y col., 2005; Dodd y col., 2005; McClung 2006). En la figura VII.2 se muestra un modelo esquemático que explica la participación y acción de todas, las hasta ahora conocidas, moléculas involucradas en la regulación por luz de la expresión génica. Asimismo, se señalizan algunos de los procesos regulados que ocurren en oscuridad.

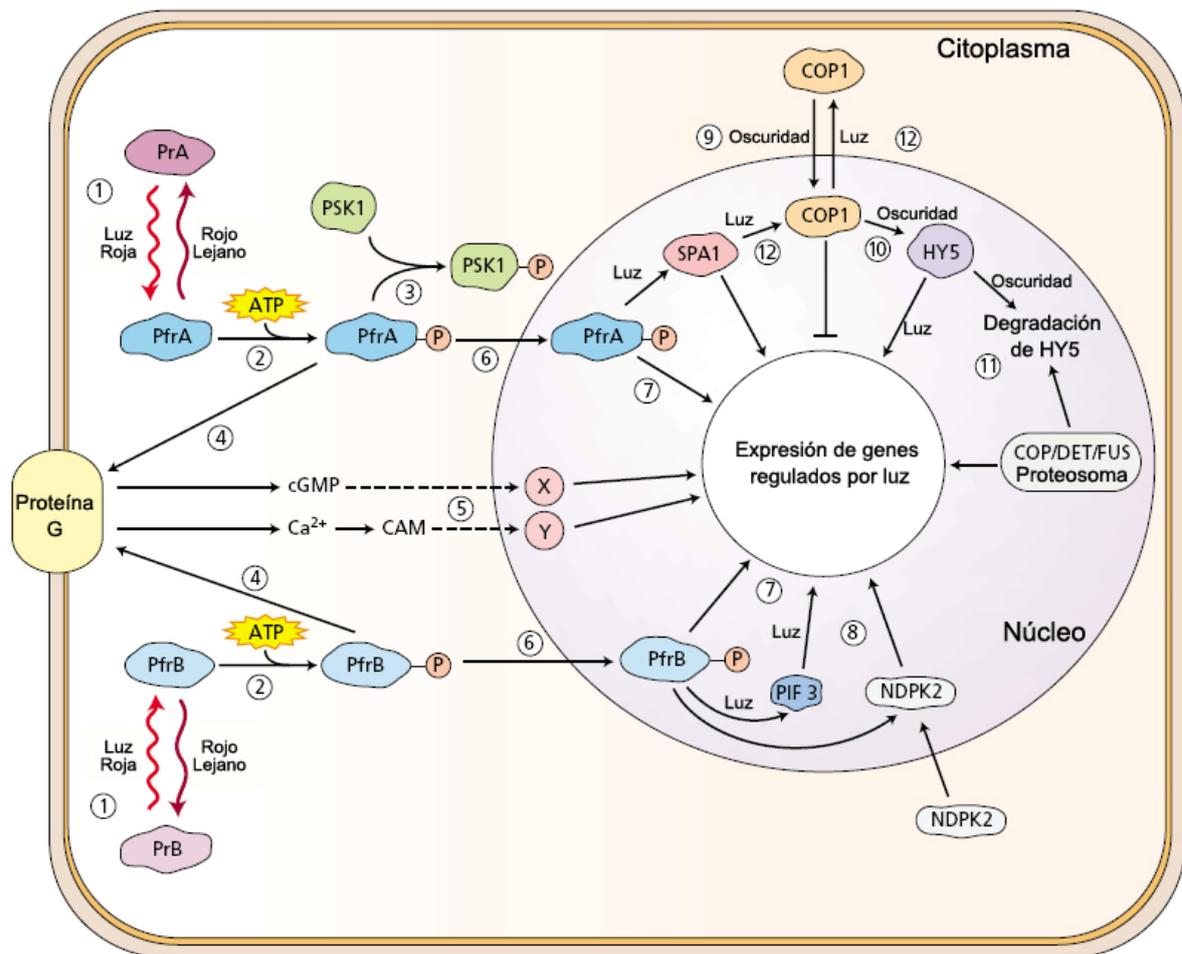


Figura VII.2: Diagrama resumido de los eventos importantes y los componentes que participan en la regulación de la expresión génica por luz mediada por fitocromos. Diagrama extraído de Taiz (2006).

1. La luz roja convierte a los PrA y PrB en sus formas activas Pfr.
2. Las formas activas de ambos fitocromos pueden auto-fosforilarse.
3. PfrA fosforila a la quinasa que actúa como sustrato de fitocromo 1 (PKS1).
4. PfrA y PfrB pueden interactuar con proteínas G, aunque aún no está completamente establecido que esto suceda.
5. La calmodulina (CAM), el GMP cíclico (cGMP) y el calcio (Ca^{2+}) pueden activar factores de transcripción no identificados aún (X e Y).
6. Las formas activadas de los fitocromos entran al núcleo.
7. PfrA y B pueden regular la transcripción directamente o a través del factor de interacción con fitocromo 3 (PIF3).
8. La enzima nucleósido-difosfato-quinasa 2 (NDPK2) es activada por PfrB.
9. En oscuridad, la proteína de fotomorfogénesis constitutiva 1 (COP1) entra en el núcleo y reprime genes que se activan por luz.
10. En oscuridad, COP1 (una ligasa del tipo E3) ubiquitina al factor de transcripción b-Zip HY5.
11. En oscuridad, HY5 es degradado en el proteosoma.
12. En luz, COP1 interacciona directamente con SPA1 y es exportada al citoplasma.

HAHB4 presenta una alta homología con ATHB7 y 12 de Arabidopsis, como ya ha sido mencionado anteriormente. Teniendo en cuenta que estos dos factores de transcripción son regulados transcripcionalmente por las condiciones de iluminación, más exactamente activados en oscuridad, y que los datos obtenidos en los ensayos de microarreglos indican que en las plantas que expresan constitutivamente *HAHB4* muchos transcritos correspondientes a genes relacionados con procesos regulados por luz están marcadamente reprimidos, nos planteamos investigar si *HAHB4* jugaba un papel activo en estos procesos.

En este capítulo presentamos evidencias que indican que este factor de transcripción de girasol actúa reprimiendo la expresión de genes involucrados en la biogénesis de la maquinaria fotosintética, particularmente cuando la planta se encuentra privada de luz.

VII.2 – Resultados.

VII.2.1 – La expresión de HAHB4 aumenta en oscuridad.

Los transcritos de *HAHB4* son prácticamente indetectables en plantas crecidas en condiciones normales. Sin embargo, la actividad del promotor de este gen, medida por histoquímica como su capacidad para dirigir la expresión del gen reportero *GUS* en plantas transgénicas de Arabidopsis, fue siempre muy alta independientemente de cuál fuera la condición de crecimiento de las plantas. La técnica histoquímica utilizada implica la incubación de las plantas transgénicas en oscuridad durante 12-24 hs a 37°C. Sabiendo que uno de los genes de Arabidopsis más homólogos a *HAHB4*, *ATHB7*, aumenta su expresión en oscuridad, consideramos como posible explicación a la alta actividad histoquímica detectada una regulación positiva de *HAHB4* en esta condición.

Con el fin de evaluar esta hipótesis decidimos medir los niveles del transcrita *GUS* por otras técnicas que no implicaran incubaciones en oscuridad y elegimos la RT-PCR cuantitativa y el *northern blot* para realizar ensayos independientes. Las plantas transformadas con la construcción *PEL:GUS* (promotor de *HAHB4* + gen reportero *GUS*) se incubaron en oscuridad durante distintos períodos de tiempo, luego de lo cual se les extrajeron los ARNs totales para ser cuantificados por las metodologías seleccionadas. Las figuras VII.3A (*northern blot*) y VII.3C (RT-PCR) muestran cómo el promotor de *HAHB4* se induce rápidamente en oscuridad, alcanzando niveles de

expresión máximos a los 30 minutos de comenzado el ensayo. Estos niveles se mantienen elevados durante al menos dos horas.

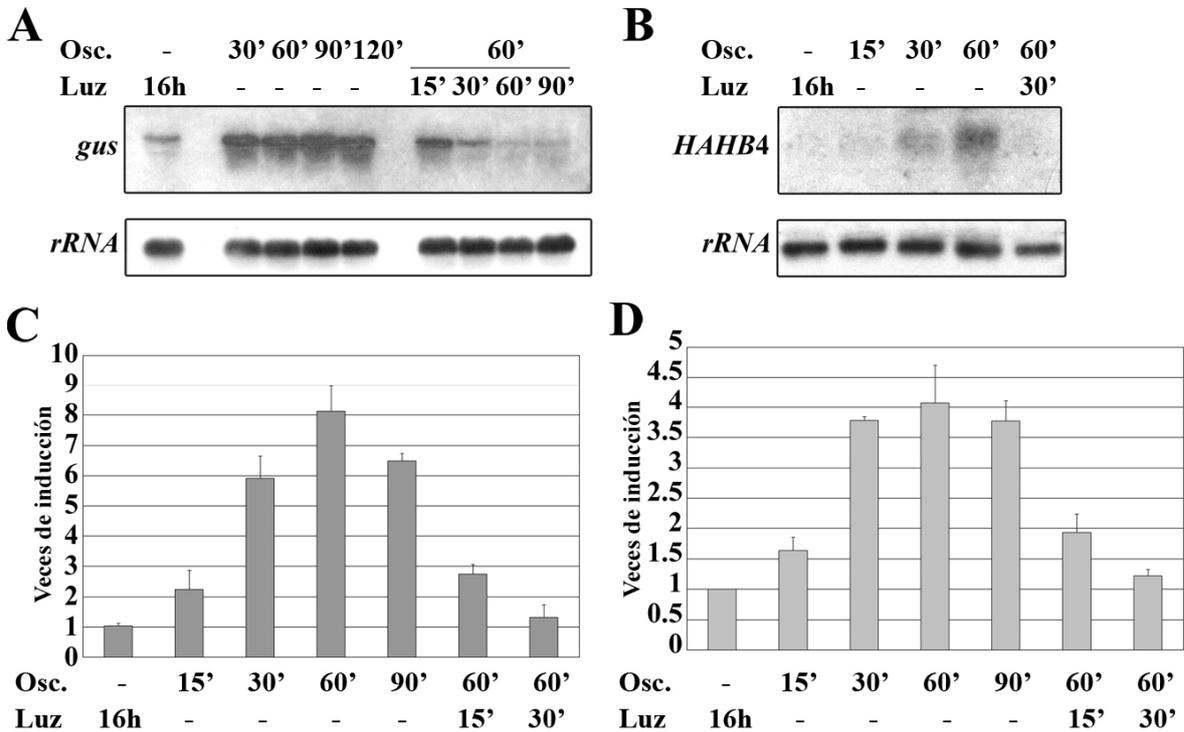


Figura VII.3: La expresión de *HAHB4* es regulada a nivel transcripcional por las condiciones de iluminación. **A:** hibridación de tipo *northern blot* de ARN total (10 µg/calle) obtenido de plantas de *Arabidopsis* transformadas con *PEL:GUS*, incubadas en oscuridad por los períodos de tiempo indicados y puestas nuevamente en luz 60 minutos más tarde; **B:** *northern blot* de de ARNs obtenidos de plantas de girasol (10 µg/calle) hibridado con una sonda para detectar los transcritos de *HAHB4*. En ambos casos los filtros fueron re-hibridados con una sonda que permite detectar ARN ribosomal como un control de carga y transferencia (panel inferior de ambas figuras). **C** y **F:** niveles de transcritos medidos por RT-PCR cuantitativa en plantas de *Arabidopsis* (midiendo *GUS*) y girasol (midiendo *HAHB4*) respectivamente. Las plantas fueron incubadas en oscuridad o luz durante los períodos de tiempo indicados en la figura (expresados en minutos). Sólo se consideraron significativos aquellos experimentos con un valor p estadístico menor a 0,05.

Una vez que establecimos que la alta coloración observada en la histoquímica se debía a una activación del promotor en oscuridad, nos planteamos corroborar que esta regulación ocurría en el ambiente genómico natural de *HAHB4*, el girasol. Con este objetivo, hicimos ensayos similares utilizando plántulas de girasol y una sonda (u oligonucleótidos) que permitiera detectar los transcritos de *HAHB4*. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras VII.3B y D e indican una concordancia con lo

observado en *Arabidopsis* midiendo los transcritos correspondientes a *GUS*. El conjunto de experimentos permite concluir que *HAHB4* se regula positivamente en oscuridad alcanzando un máximo de expresión una hora después del comienzo del ensayo.

El tipo de regulación presentada fue totalmente reversible ya que, al transferir las plantas de la oscuridad a la luz, bastaron treinta minutos para que tanto los niveles de *HAHB4* en girasol como los de *GUS* en *Arabidopsis*, volvieran a sus valores basales y prácticamente indetectables. Tratando de relacionar los resultados obtenidos con lo que podría estar pasando en la naturaleza en cuanto a los ciclos de luz/oscuridad que constituyen un factor fundamental en el desarrollo vegetal, nos planteamos determinar si la regulación de la expresión de este gen se relacionaba con el ciclo día/noche. Se midieron los niveles de *HAHB4* en plantas de girasol durante las últimas horas de luz en un ciclo de día largo y durante las siguientes 8 hs nocturnas, así como también cuando se inició nuevamente el día. Los resultados obtenidos y representados en la figura VII.4 indicaron que los niveles de *HAHB4* además de aumentar rápidamente cuando empieza la noche se mantienen prácticamente constantes durante toda esta fase (8 hs), para luego decaer abruptamente cuando comienza el día.

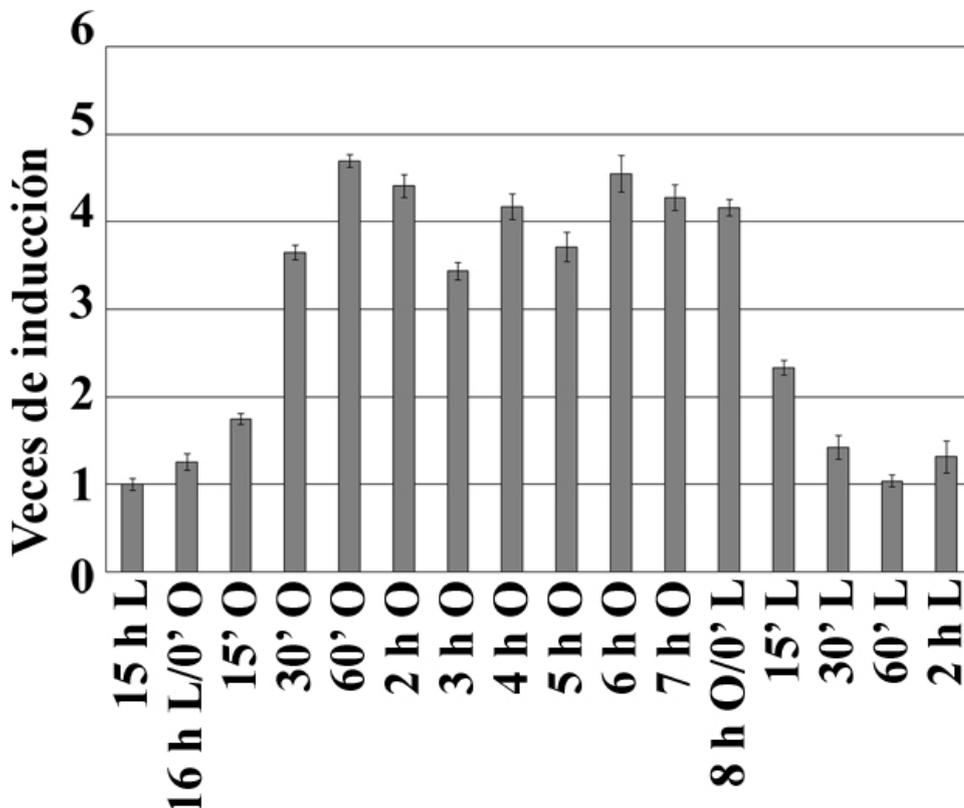


Figura VII.4: La expresión de *HAHB4* se mantiene elevada durante toda la noche. Cuantificación de los transcritos de *HAHB4* en plantas de girasol durante un ciclo de

día largo. Abreviaturas L: luz; O: oscuridad. Las notaciones L/O u O/L indican los momentos en los que se iniciaron los cambios en las condiciones lumínicas.

VII.2.2 – La activación de *HAHB4* por oscuridad ocurre solamente en tejidos fotosintéticos.

Nuestro siguiente objetivo fue el de investigar el comportamiento de *HAHB4* en los distintos órganos de la planta para obtener un panorama más detallado de la conducta y regulación del gen en función de las diferentes condiciones, en este caso de iluminación. Se extrajeron los ARNs totales de los distintos órganos y tejidos de plantas de girasol de 25 días. En este tiempo las plantas ya tienen hojas verdaderas, los cotiledones se muestran cloróticos y las raíces están bien desarrolladas. Las plantas fueron previamente incubadas en luz y en oscuridad y las distintas muestras sacadas de un mismo individuo. Para complementar el estudio y dado el estado de los cotiledones en estas plantas, se extrajeron también los ARNs de estos órganos provenientes de plantas más jóvenes en las que se encontraban fotosintéticamente activos. Las cuantificaciones del transcripto de *HAHB4* se hicieron por RT-PCR en tiempo real y mostraron aumentos de la expresión en oscuridad mayores a 2,5 veces en los tallos, hipocotilos, cotiledones fotosintéticamente activos y hojas (Figura VII.5). El transcripto no pudo ser detectado en los tejidos no fotosintéticos o fotosintéticamente inactivos (raíces o cotiledones senescentes). Los valores de estas cuantificaciones se muestran en la figura VII.5 y se expresan de forma relativa a los medidos en el mismo tejido de una planta puesta en luz, a los que se les asignó arbitrariamente el valor de uno (1), por lo que este gráfico no permite diferenciar los niveles de expresión entre los distintos tejidos. Los resultados permiten concluir que la activación de la expresión de este gen en oscuridad ocurre exclusivamente en tejidos fotosintéticamente activos, lo que sugiere que *HAHB4* cumpliría alguna función relacionada con esta vía metabólica.

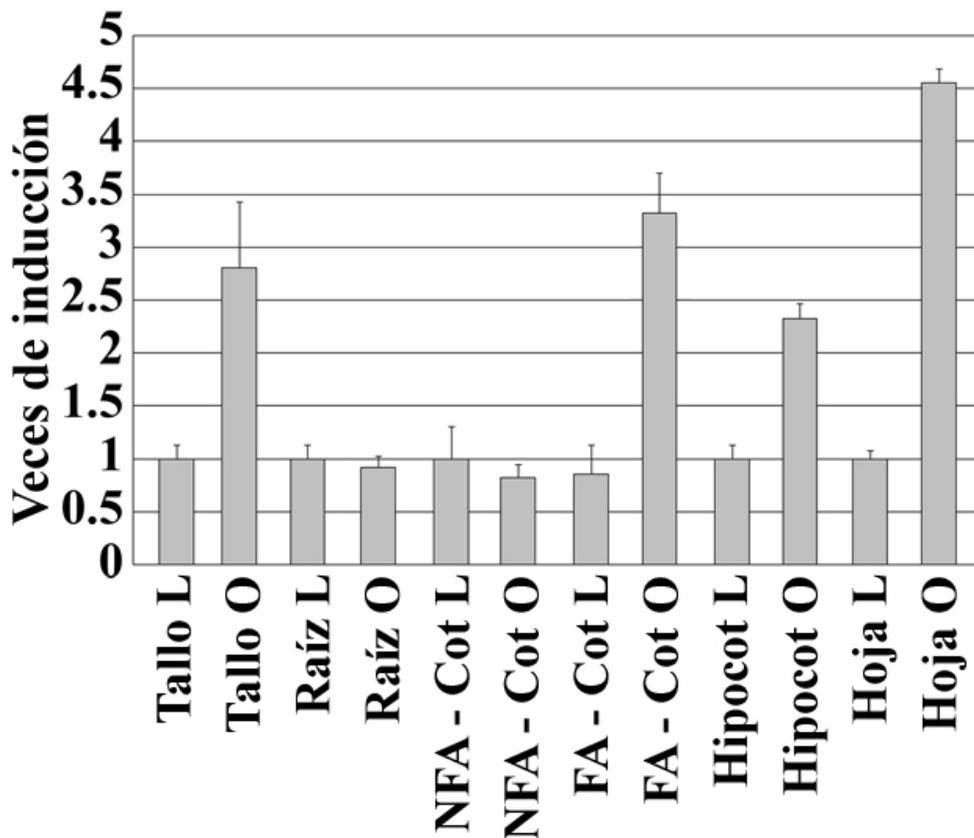


Figura VII.5: La regulación de *HAHB4* por oscuridad ocurre exclusivamente en tejidos fotosintéticamente activos. Niveles de transcritos de *HAHB4* en distintos órganos/tejidos de plantas de girasol incubadas en luz u oscuridad. O: oscuridad; L: luz; NFA: no fotosintéticamente activo; FA: fotosintéticamente activo; Cot: cotiledones; Hipocot: hipocotilo. Los resultados relevantes fueron aquellos cuyas diferencias tenían un valor p estadístico <0,05.

VII.2.3 – Un elemento de regulación en cis, localizado entre los nucleótidos -400 y -300 del promotor de *HAHB4*, es responsable de la activación de este gen en oscuridad.

Sabiendo que la regulación por oscuridad de *HAHB4* se producía a nivel transcripcional, nos planteamos identificar las secuencias responsables de esta regulación dentro del promotor. Con este objetivo utilizamos plantas transgénicas obtenidas previamente en el laboratorio (Dezar y col., 2005b) que contenían construcciones que incluyen distintos fragmentos de este promotor dirigiendo la expresión del reportero *GUS* e hicimos una nueva serie de construcciones y plantas transgénicas, diseñadas especialmente para este fin. En todos los casos, se midieron los niveles del transcritpo *GUS* por RT-PCR cuantitativa de plantas incubadas en luz o en

oscuridad. En una primera instancia comparamos la respuesta de las dos formas alélicas de este promotor (*PEL* y *PEC*, Dezar y col., 2005b) y comprobamos un comportamiento casi idéntico frente al estímulo, como se muestra en la figura VII.6. Todas las construcciones que incluyen al menos las primeras 514 pb aguas arriba del sitio de inicio de transcripción también responden al estímulo de la oscuridad mientras que las llamadas -300 y -200 no muestran ningún tipo de regulación ni actividad en las condiciones ensayadas. Los experimentos hechos con las construcciones quiméricas Δ 2:1 y Δ 6:1 nos permitieron establecer que no existen cajas de respuesta en las regiones ubicadas corriente arriba de -600 y/o -1009. El conjunto de observaciones nos permitió restringir la región responsable de la inducción por oscuridad a la comprendida entre los nucleótidos -514 y -301.

Con el fin de localizar con mayor precisión la o las cajas de respuesta, se realizaron construcciones quiméricas que incluían distintos fragmentos de esta sección. Con ellas se transformaron plantas y se prosiguió con la misma metodología. Teniendo en cuenta que la región 5' del promotor carece de alguna secuencia responsable de esta regulación (ver párrafo anterior), una comparación entre las construcciones Δ 2:4 y la llamada -300 nos permitió limitar la región de estudio a los nucleótidos ubicados entre las posiciones -416 y -301. Como se puede observar en la figura VII.6, la construcción que incluye las primeras 416 bases del promotor más las últimas 200 de la región 5' (Δ 2:4) presentó la tasa más alta de inducción por oscuridad mientras que las construcciones -300 y Δ 2:1 no presentaron actividad. Dada la alta actividad regulatoria de la construcción Δ 2:4 supusimos que dentro de la región comprendida entre -1221 y -1009 existía una caja amplificadora del tipo “*enhancer*”. Esta idea original fue confirmada por el hecho de que todas las construcciones que incluían este segmento presentaron una actividad basal mucho mayor que sus contrapartes que no la incluían.

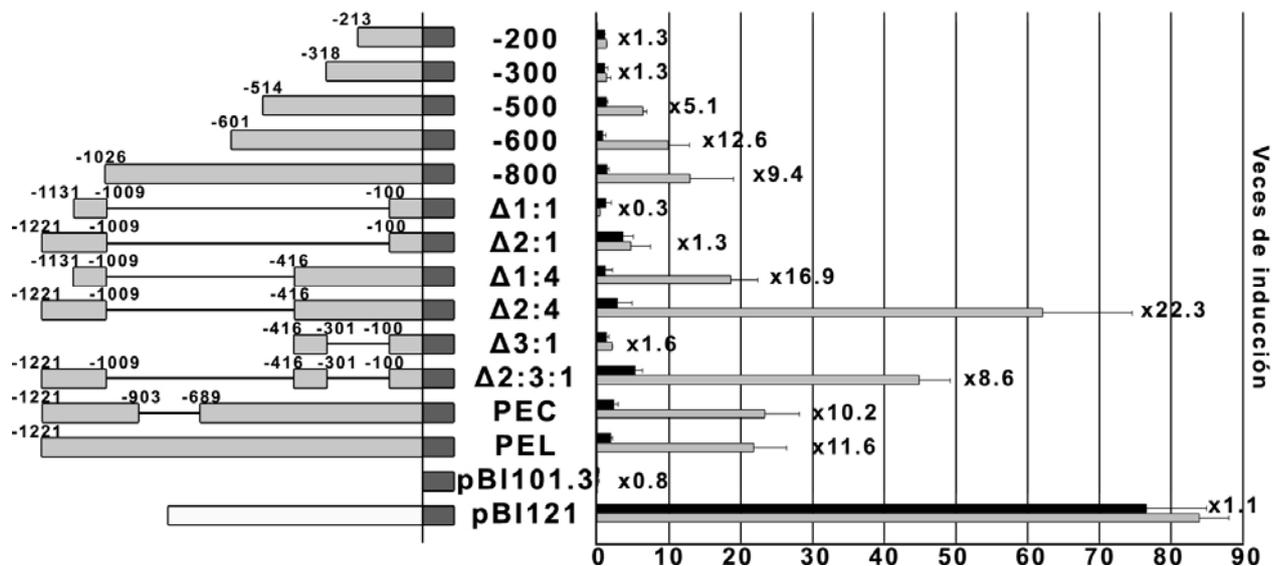


Figura VII.6: La/s caja/s responsables de la respuesta a oscuridad se encuentran localizadas entre los nucleótidos -416 y -301 del promotor de *HAHB4*. Panel izquierdo: representación esquemática de las construcciones utilizadas; los números sobre las barras grises indican las regiones incluidas en cada construcción. A la derecha de este panel se encuentran los nombres asignados a cada construcción. Los vectores pBI101.3 y pBI121 fueron usados como control positivo y negativo respectivamente. Panel derecho: niveles del transcrito *GUS* medido por RT-PCR en tiempo real de tres líneas independientes de plantas de *Arabidopsis* transformadas con las construcciones representadas a la izquierda. Todos los valores están expresados en forma relativa a los correspondientes de las plantas transformadas con la construcción -200 crecidas en condiciones óptimas de luz (tomados arbitrariamente como uno). Barras grises: niveles de expresión de *GUS* en plantas incubadas una hora en oscuridad. Barras negras: niveles de expresión en plantas incubadas en luz. A la derecha de cada par de barras se encuentra indicada la relación entre los valores representados en las barras grises y negras. Los experimentos se repitieron al menos tres veces y los valores se usaron para establecer los parámetros estadísticos.

Para fortalecer las observaciones hechas con estas construcciones y confirmar la localización de los sitios de respuesta a oscuridad en la región entre los nucleótidos -416 y -301, se realizó una nueva construcción, que en principio es idéntica a la construcción $\Delta 2:1$ (la cual es incapaz de responder a oscuridad), y se le incorporó la región de interés (-416 a -301). Esta nueva construcción, llamada $\Delta 2:3:1$ confirmó nuestras observaciones previas ya que la sola inclusión de la región en cuestión restableció la capacidad de inducción de este promotor por oscuridad.

VII.2.4 – Un elemento GT localizado en la posición -320/-315 sería el responsable de la regulación por las condiciones de iluminación de *HAHB4*.

El análisis bioinformático, en busca de elementos en *cis* putativos en la región antes identificada como responsable de la respuesta a oscuridad, reveló la existencia de dos cajas GT (TTAACC, Dehesh y col., 1990; Gilmartin y col., 1992), descritas como responsables de la regulación por luz de otros genes (Green y col., 1988; Dehesh y col., 1990). Con el fin de definir si alguno o ambos elementos eran funcionales en el promotor de *HAHB4*, realizamos construcciones en las que cada una de estas cajas, o ambas, fueron mutadas. Las construcciones obtenidas y las posiciones relativas de cada una de estas cajas están representadas en la figura VII.7A. Las plantas transformadas con estas construcciones fueron incubadas tanto en luz como en oscuridad y la expresión de *GUS* determinada por RT-PCR cuantitativa. La figura VII.7B muestra los resultados obtenidos con estas mutantes, comparados con los correspondientes a las mismas construcciones sin mutar.

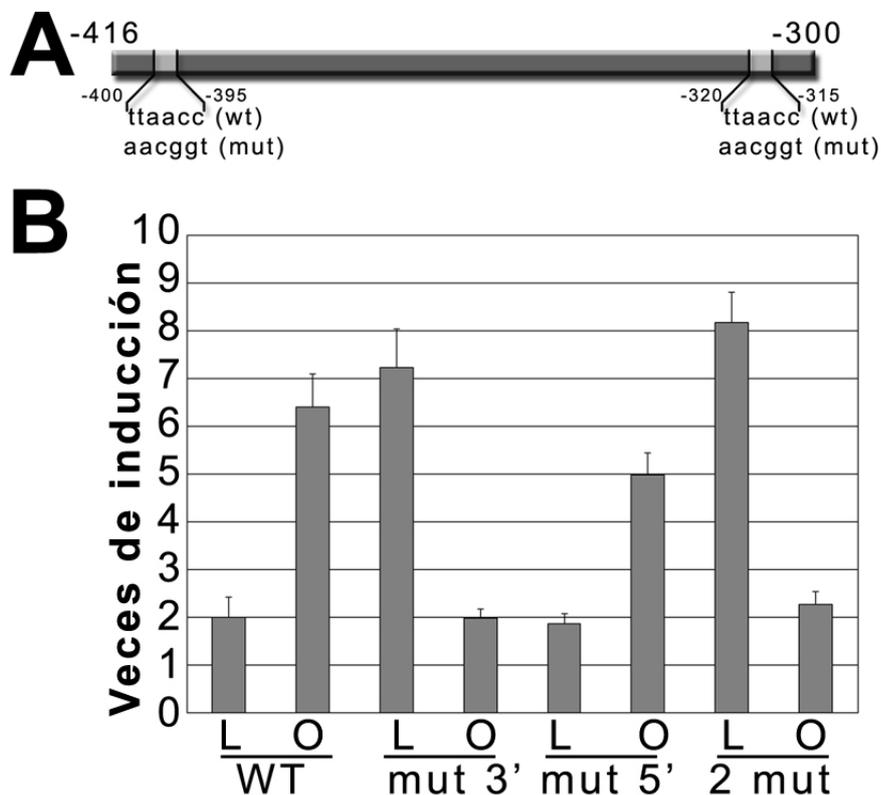


Figura VII.7: El elemento GT localizado en la posición -315/-320 es el responsable de la regulación de *HAHB4* por oscuridad. **A:** Representación esquemática de de la localización de los elementos GT en la región previamente delimitada como responsable de la regulación por oscuridad de este gen. **B:** Niveles de expresión de *GUS* correspondientes a las distintas construcciones en luz y oscuridad. WT: construcción no mutada; mut 3',5' o 2 mut: construcciones mutantes en el sitio localizado en la región 3', 5' o en ambos sitios respectivamente; L: luz; O: oscuridad.

Nuestros resultados indican que la mutación del elemento GT localizado en la región 3' anula completamente la capacidad del promotor de activarse en oscuridad. La mutación en el sitio ubicado en la región 5' conserva esta capacidad mientras que la doble mutación, como es de esperar, presenta el mismo comportamiento que la mutante 3'. Además de este claro resultado, se observó en este ensayo uno un poco inusual: la mutante en el sitio 3', no sólo pierde la capacidad de inducirse por oscuridad sino que presenta niveles de transcritos en luz mucho más elevados que los observados para la construcción sin mutar. Esto pone de manifiesto la importancia de esta caja GT en la regulación del gen *HAHB4*, tanto en oscuridad como en luz y nos indica que no sólo existe la activación por oscuridad sino que en luz coexiste una fuerte represión de la actividad transcripcional. Estas evidencias se correlacionan con nuestras observaciones previas que indicaban que la expresión de este gen aumentaba y disminuía abrupta y rápidamente cuando las condiciones de luz/oscuridad cambiaban.

Para profundizar la caracterización de esta caja, realizamos ensayos de retardo en geles con extractos nucleares de girasol, obtenidos de plantas incubadas en luz o en oscuridad. La hipótesis de trabajo fue que, si realmente este sitio era funcional debería unirse algún complejo proteico a esta secuencia en ambas condiciones.

Se diseñaron oligonucleótidos de doble hebra que contenían al sitio GT presente en la posición -320/-315 o alternativamente, una secuencia al azar (la caja GGTTAA fue remplazada por ACCGTT). En ambos casos, el entorno de esta secuencia fue el natural del promotor de *HAHB4*. Se marcaron radioactivamente y se los confrontó con los extractos nucleares provenientes de plantas incubadas en luz o en oscuridad. La figura VII.8 muestra un ensayo de retardo en gel, en el que el elemento GT ubicado en la región 3' es reconocido por un complejo proteico. La banda de retardo desaparece si el elemento GT es mutado, indicando la especificidad de esta unión. Esta banda apareció tanto cuando los extractos provenían de plantas incubadas en luz o en oscuridad, indicando que este sitio es reconocido en ambas condiciones. Aunque no nos fue posible identificar la/s proteína/s interactuantes, este ensayo reforzó la conclusión referente a la funcionalidad de este elemento GT. .

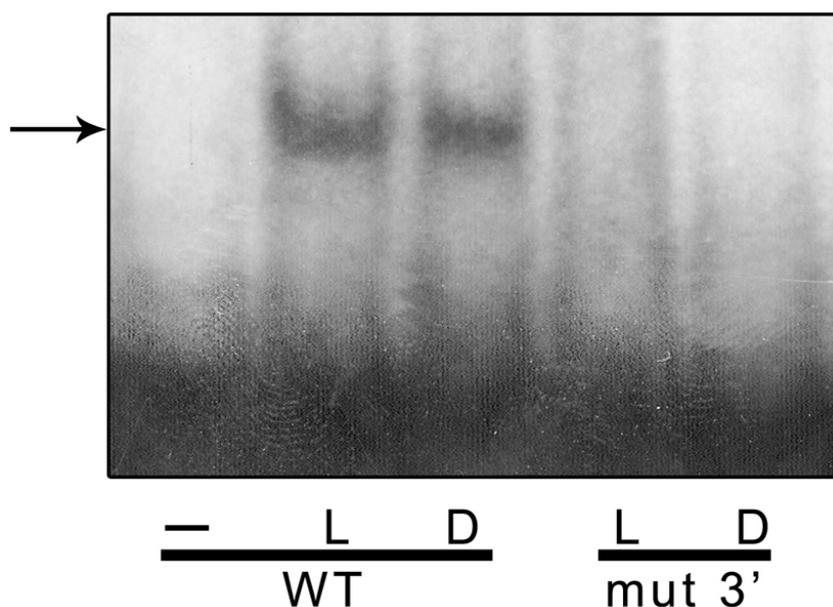


Figura VII.8: Al menos un complejo proteico reconoce y se une al sitio GT en luz y en oscuridad. Ensayo de retardo en gel de poliacrilamida llevado a cabo con 8 μ g de proteínas nucleares de girasoles incubados en oscuridad (O) o en luz (L). Los extractos nucleares fueron confrontados con oligonucleótidos marcados radioactivamente que incluían el sitio GT ubicado en la región 3' (WT) o al los que se le mutó este sitio (mut 3'). La primera calle muestra la corrida de los oligonucleótidos marcados en ausencia de proteínas.

VII.2.5 – HAHB4 reprime la transcripción de genes involucrados en la biogénesis de la maquinaria fotosintética

Los resultados obtenidos hasta este punto indican claramente una inducción de la expresión de *HAHB4* en oscuridad así como su represión en luz. La siguiente pregunta es por qué sucede esto o, formulado de otra manera, cuál es la función de *HAHB4* como factor de transcripción en los procesos regulados por las condiciones de iluminación.

Una nueva revisión y análisis de los resultados del ensayo de microarreglos descrito en el capítulo 1 de este trabajo de Tesis, nos permitió visualizar que un amplio grupo de genes que codifican proteínas que participan en la fotosíntesis se reprimen en presencia del transgén. En la figura VII.9 se muestra un esquema de la cadena de transporte de electrones incluyendo el complejo ATP-sintasa y del ciclo de Calvin. En este esquema se señalizan los genes reprimidos por la acción de *HAHB4* en las plantas transgénicas de *Arabidopsis*.