

RESUMEN / ABSTRACT

El Fototropismo en Plantas.

Juan Carlos Raya Pérez*.

El estudio del fototropismo ha llevado al aislamiento del gen que codifica para la fototropina. También se ha logrado el aislamiento de otros genes relacionados, como *nph4*, *nph3* y *rpt2*. Es de esperarse que en los próximos años se establezca la vía de señalización en que participan las fototropinas, vías poco dilucidadas hasta ahora.

Studies on the molecular basis of phototropism have led to the isolation of the phototropin gene. Others genes involved in the phototropic response such as *nph4*, *nph3* and *rpt2* have also been isolated. It is expected that in the near future it will be established what is the participation of the phototropins, unknown until now, by means of signalling.

Recibido: 7 de Noviembre de 2002

Aceptado: 12 de Junio de 2003

* Instituto de Biotecnología-UNAM.
Departamento de Biología Molecular
de Plantas. Av. Universidad 2001
Col. Chamilpa, Cuernavaca, More-
los 62210. Correo electrónico:
jcraya@ibt.unam.mx

INTRODUCCIÓN

El fototropismo es el crecimiento diferencial que presentan las plántulas hacia una fuente luminosa lateral, especialmente de luz azul. Este fenómeno ha llamado la atención de los científicos desde hace mucho tiempo y el propio Darwin se interesó en su estudio.

El descubrimiento de una proteína de aproximadamente 120 kDa que se fosforilaba cuando se le iluminaba con luz azul y que estaba presente en las plántulas de muchas especies de monocotiledóneas y dicotiledóneas como: trigo, chícharo, maíz, girasol, cebada, sorgo, cañamo, frijol mungo, jitomate; llevó a pensar que esta proteína podía ser la responsable de la respuesta fototrópica (Crosson y Moffat, 2001). Se hicieron un gran número de experimentos tratando de demostrar que, efectivamente, ésta era la proteína que iniciaba el crecimiento que presentaban las plántulas a la iluminación lateral. Aunque fue hasta la obtención del mutante de *Arabidopsis thaliana* *nph1* cuando se aceptó que este gen codificaba para la proteína que intervenía en el fototropismo y luego, con la clonación y la expresión heteróloga del gen que codifica para una de las fototropinas en células de insectos, se estableció fehacientemente que el receptor de luz azul responsable de la respuesta fototrópica es la proteína codificada por *nph1* (Christie *et al.*, 1999). Con la obtención del gen que la codifica y su expresión heteróloga se logró un avance muy importante en la investigación del fototropismo, pero todavía quedan muchos detalles por resolver, como los cambios que la fototropina experimenta al recibir la luz. Además de continuar la búsqueda de otros participantes en la vía de señalización. De hecho, se han encontrado dos clases de fototropinas, llamadas *phot1* y *phot2*; la primera participa en el movimiento de los cloroplastos bajo condiciones de luz tenue, en la inhibición rápida del crecimiento del hipocótilo y en la respuesta fototrópica de la planta a bajas tasas de luz, también regula la entrada de calcio a través de membrana plasmática desde el apoplasto. Asimismo, participa en la apertura estomatal en respuesta a la luz azul, aunque el tratamiento prolongado con esta clase de luz provoca una baja en la expresión del gen, que se expresa además en el gancho apical en las células en alarga-

PALABRAS CLAVE: Fototropismo; Fototropinas; Auxinas; Dominios LOV; FMN.

KEYWORDS: Phototropism; Phototropines; Auxin; LOV domains; FMN.

miento y en división y en la zona de alargamiento de la raíz (Sakamoto y Briggs, 2002). En arroz, *phot1* se produce en coleoptilos y un poco en hojas, mientras que *phot2* se expresa mucho en hojas y poco en coleoptilos (Kasahara *et al.*, 2002). La fototropina *phot2*, participa en el fototropismo a tasas de luz medias y altas y en el movimiento de los cloroplastos para eludir altas intensidades luminosas, además de regular la salida de calcio desde las endomembranas (Babourina *et al.*, 2002). Las fototropinas también están presentes en raíz, donde median un fototropismo negativo y no deja de ser interesante preguntarse a qué nivel de la vía de transducción de señales se da el cambio de positivo a negativo, pues los receptores de luz son fototropinas (Sakamoto y Briggs, 2002, Raya y González de la Vara, 2001, Okada y Shimura, 1992, Sakai *et al.*, 2000).

El movimiento de las hojas para seguir la luz del sol también parece estar mediado por las fototropinas, lo mismo que la expansión de la hoja (Sakamoto y Briggs, 2002). En el extendimiento que por la mañana presentan ciertas hojas, así como su cierre al oscurecer, no es descabellado pensar que también podrían estar implicadas las fototropinas, quizá con algún otro receptor de luz como algún fitocromo (Briggs y Olney, 2001; Kasahara *et al.*, 2002).

Resolución de los dominios LOV (Light Oxygen Voltaje)

Con la resolución de los dominios LOV del fitocromo de *Adiantum*, que lleva asimismo a la fototropina en una sola proteína, se le ha dado mucha atención a la estructura de estos dominios y a la manera en que, posiblemente, transmiten la señal flujo abajo (Crosson y Moffat, 2001).

La fototropina tiene dos dominios LOV del lado amino-terminal; estos están relacionados con los dominios PAS, que están muy conservados en mamíferos, hongos, bacterias, plantas y en general participan en la transducción de señales, realizando funciones sensoras y/o inter-

vinando en interacciones proteína-proteína (Gong *et al.*, 1998). Esto indica que los dominios LOV son ancestrales, aunque *phot1* y *phot2* pertenecen a grupos filogenéticos distintos (Crosson y Moffat, 2002; Kasahara *et al.*, 2002). Los dominios LOV presentan tres alfa-hélices que flanquean una hoja beta de cinco tiras antiparalelas. El dominio de la proteína FixL es comparado con la mano izquierda: los dedos forman el barril beta, incluido el pulgar, las alfa-hélices forman la palma, empuñando al cofactor que está inmerso en un bolsillo hidrofóbico (Gong *et al.*, 1998). Puede decirse que los mismos pliegues de la proteína unen distintos cofactores en la misma región; FixL une un grupo hemo, el de AHR une dioxina y otros hidrocarburos aromáticos, la proteína amarilla de *E. coli* tiene ácido 4-hidrocinámico, otras unen protoporfirina IX, FAD o FMN, como en el caso de la fototropina (Christie *et al.*, 1999). El FMN está fuertemente unido, entra por una vía hidrofílica (Crosson y Moffat, 2002) y se libera sólo al desnaturalizar la proteína (Salomon *et al.*, 2000). El dominio LOV2 de *Adiantum capillus-veneris* une una molécula de FMN mediante una red de puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas y puentes de van der Waals. La cadena ribitol termina en la superficie de la proteína, mientras que el azufre de la cisteína 966 está a 4.2 Å del carbono 4a (C4a) (Gong *et al.*, 1998). La absorción de fotones por el anillo de isoaloxasina causa una redistribución de las cargas electrónicas sobre el mismo, lo que lleva a N5 a extraer el protón, promoviendo el ataque nucleofílico del anión tiolato sobre el C4a para formar el aducto. Estos aductos son intermediarios de vida corta en la reacción y la recuperación de la actividad de cinasa de la proteína en la oscuridad podría requerir el rompimiento de este enlace entre el tío de la cisteína y el FMN, aunque la regeneración de LOV1 en la oscuridad es dos veces mayor que la de LOV2 y cuando se exponen a alta intensidad luminosa LOV2 reacciona completamente, en tanto que de LOV1 permanece un 40 % sin reaccionar (Salomon *et al.*, 1997). Reportes recientes indican que la eficiencia

cuántica relativa es mucho mayor para LOV2 que para LOV1 (Salomon *et al.*, 1997, Kasahara *et al.*, 2002), de hecho basta con la reacción de uno solo de los dominios (LOV2) para la señalización en la vía. Se sabía que la proteína mantenía su capacidad de fosforilación hasta por una hora después de haber recibido el pulso de luz, en presencia de compuestos reductores; esto se podría explicar por la formación del enlace entre la flavina y el residuo de cisteína (Salomon *et al.*, 1997). Se postuló que la formación del aducto, al recibir la luz, provocaría cambios conformacionales en la proteína que llevarían a la activación de su actividad de proteína-cinasa y/o provocarían cambios conformacionales que le permitirían tener interacciones entre los dominios LOV o con otras proteínas, llevando a la respuesta fototrópica (Salomon *et al.*, 2000). Sin embargo, sólo muy recientemente se observaron cambios conformacionales pero sólo a nivel de los dominios LOV (Crosson y Moffat, 2002). El decaimiento del aducto en la oscuridad restauraría la sensibilidad de la membrana a la luz, aunque *in vivo* es posible que los primeros eventos vayan más allá de la formación de éste y la recuperación de la sensibilidad de la membrana implique, entre otras cosas, la defosforilación de la proteína (Kasahara *et al.*, 2002).

Las auxinas en el fototropismo

La necesidad de la presencia de auxinas en los coleóptilos cortados a fin de observar la curvatura fototrópica llevó a postular que había una transferencia de electrones, empujada por la luz, hacia la molécula de auxina para formar un compuesto que bloquearía el transporte de ésta en el lado iluminado, provocando un gradiente de concentración, con mayor cantidad en el lado oscuro. La teoría de Cholodny-Went propuso que la curvatura en el coleóptilo era iniciada por el transporte longitudinal y lateral que llevaba finalmente a la distribución asimétrica de auxinas y provocaría el crecimiento diferencial (Horwitz, 1994; Yi y Guilfoyle, 1991). Las plantas puestas en posición horizontal muestran una distribución asimétrica de SAUR's, RNA's pequeños que responden a auxinas, entre la mi-

tad inferior y la superior; esta posición lleva a la respuesta gravitrópica, que se cree, también es debida a las auxinas. Un promotor SAUR fusionado al gen reportero GUS empuja la expresión de este de modo asimétrico durante el gravitropismo y el fototropismo y los inhibidores del transporte de auxinas inhiben su expresión asimétrica. Debido a que el gen responde a las auxinas activas en una manera dosis-dependiente, se sugiere que éstas están asimétricamente distribuidas durante las respuestas fototrópica y gravitrópica (Horwitz, 1994). La luz, aparentemente, no afecta la sensibilidad a auxinas pues las plantas mantenidas en luz u oscuridad responden de manera casi idéntica a la inducción con auxinas del gen reportero GUS. La exposición a la luz de plántulas etioladas reduce la expresión del promotor SAUR, lo que sugiere que hay una reducción de los niveles de auxinas, lo que podría deberse a bloqueo en el transporte, secuestro de estas, su inactivación o su fotodestrucción (Yi y Guilfoyle, 1991). En plántulas de girasol también se reportó una disminución en la concentración de auxinas cuando éstas mostraban menor respuesta a la iluminación con luz azul (Feyerabend y Weiler, 1999). El papel de las auxinas es aún más evi-



dente ahora que sabemos que el locus NPH4 codifica para un activador transcripcional de respuesta a estas hormonas (Harper *et al.*, 2000).

Posibles complejos de proteínas (Transdusomas)

La fototropina en condiciones no desnaturalizantes migra con un peso molecular aparente de 335 kDa (Short *et al.*, 1994), lo que indica la formación de un complejo multiprotéico. En coleptilos de avena de 5 días hay al menos tres bandas, de 116, 100 y 95 kDa que aparecen fosforiladas en respuesta a la luz azul, con las dos últimas pudiendo fosforilarse independientemente de la de 116 kDa (Salomon *et al.*, 1997); en otro reporte se señala la existencia de una proteína glicosilada, lo que confirmaría su pertenencia a membrana plasmática, de 120 kDa de peso molecular y que se fosforila en respuesta a la luz azul, aunque la actividad de cinasa parece residir en una proteína distinta pues ésta pierde actividad a medida que se purifica (Raya y González de la Vara, 2001). Recientemente también se aisló el gen que codifica para una fototropina en *Chlamydomonas* y se calcula un peso de 81.4 kDa para la proteína, similar a otros reportados para plantas superiores, como girasol (Huang *et al.*, 2002).

Phot 1 está asociada al plasmalema en plántulas cultivadas en la oscuridad y su patrón de expresión es muy similar a la de los transportadores de auxinas PIN1, PIN2 y PIN3, que muestran una localización adyacente a los extremos de la pared en células corticales de tejido en alargamiento, como el hipocótilo, la raíz y las células parenquimatosas del tallo de la inflorescencia. Que el patrón de expresión entre los transportadores y la fototropina 1 no sea exactamente igual, podría explicarse por los múltiples papeles que tienen las fototropinas (Sakamoto y Briggs, 2002). Por otra parte, NPH3 parece ser una proteína adaptadora, que podría permitir la interacción entre Phot1 y los transportadores de auxinas, quizá fosforilándolos e interviniendo así en el intercambio que tienen



éstos entre la membrana plasmática y algún compartimiento intracelular; para este ir y venir de los transportadores entre la membrana plasmática y ese otro compartimiento celular se requiere además de la participación de la actina (Crosson y Moffat, 2002; Estelle, 2001). Asimismo, la proteína que une NPA (ácido N-naftiltalamico, un inhibidor del transporte de auxinas) parece ser una proteína periférica que se asocia con la cara interna de la membrana y es distinta al transportador que interviene en la salida de auxinas desde la célula (PIN1,2,3). Otra proteína que participa en el alargamiento diferencial de la raíz, la proteína-fosfatasa PP2A podría participar también a nivel de las redes de actina en el fototropismo. Los cables de actina se requieren para llevar al transportador de auxinas hasta algún compartimiento intracelular y traerlo de regreso a la membrana. Este ir y venir de PIN de la membrana plasmática al interior de la célula y del interior a la membrana es también impedido por la brefeldina A (Muday y Delong, 2001). La brefeldina A tiene como blanco a una proteína que activa a una proteína G pequeña, que interviene en la formación de vesículas de transporte (Nebenführ

et al., 2002). Los microtúbulos también pasan de un estado desorganizado a uno organizado durante la respuesta fototrópica y gravitropica, pero parecen tener un papel posterior, como asegurando que el crecimiento se de en la dirección correcta (Fischer y Schopfer, 1998). Es hasta recientemente que se ha dado atención a otros posibles participantes de la vía del fototropismo, como los transportadores de auxinas, la actina, NPH3, NPH4, sin olvidar que se reportó la existencia de otras proteínas, la de 95 y la de 100, además de la glicoproteína presente en betabel (raíces de almacenamiento), que parece servir como sustrato a la cinasa que se activa con luz azul. De las revisiones recientes sobre el tema sólo en una (Muday y Delong, 2001), se aborda con un poco de mayor amplitud la posible existencia de complejos multiprotéicos con la fototropina como el receptor que prende la vía de señalización, aunque en otros artículos se considera someramente esta posibilidad. Cabe mencionar que en otros casos ya reportados se ha encontrado a los receptores formando complejos con varias proteínas más, como aquel de CLAVATA1 con CLAVATA2, que regula el desarrollo de los meristemas y los órganos en plantas (Jeong *et al.*, 1999) y el de Cf-9, que forma parte de un complejo de 420 kDa, implicado en la resistencia a *Cladosporium fulvum* (Rivas *et al.*, 2002). Estos antecedentes llevan a pensar que, seguramente, las fototropinas están formando parte de un gran complejo multiprotéico que sería el responsable en parte de transmitir la señal, además de las moléculas de fototropina que son liberadas desde la membrana al citosol luego de iluminar con luz azul las plántulas (Sakamoto y Briggs, 2002). Hasta ahora la fototropina 1 podría interactuar con la fototropina 2, con nph3, nph4, rpt2 que es una proteína de 65.8 kDa con probables sitios de fosforilación, posible señal de localización nuclear y dominio coiled-coil, una fosfatasa (probablemente del tipo 2A), los transportadores de auxinas, la proteína que une NPA, el citoesqueleto (actina), la glicoproteína de 120 kDa unida a membrana plasmática y, seguramente, algunos otros componentes cuando deja

la membrana y pasa a citosol. En este último compartimento podría interactuar con RPT2, y de alguna manera también con los canales de calcio de las endomembranas. Dada su localización en membrana plasmática, de la fototropina, es en cierto modo más fácil que interactúe con los canales iónicos localizados en ésta. Las evidencias apoyan la idea que en el caso de la vía del fototropismo participan una gran variedad de proteínas con distintos mecanismos para transducir la señal, además de otros participantes, como las auxinas.

REFERENCIAS

- Babourina, O., I. Newman, S. Shabala (2002). Blue light-induced kinetics of H⁺ and Ca²⁺ fluxes in etiolated wild type and phototropin mutant *Arabidopsis* seedlings. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:2433-2438.
- Baum G., J.C. Long, G.I. Jenkins, A.J. Trewavas (1999). Stimulation of the blue light phototropic receptor NPH1 causes a transient increase in cytosolic Ca²⁺. *Proc Natl Acad Sci* 96:13554-13559.
- Briggs W.R. y Christie J.M. (2002). Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends Plant Science* 7:204-210.
- Briggs W.R. y Olney M.A. (2001). Photoreceptors in plant photomorphogenesis to date: five phytochromes, two cryptochromes, one phototropin, and one superchrome. *Plant Physiol* 125:85-88.
- Christie J.M., Reymond P., Powell G.K., Bernasconi P., Raibekas A..A, Liscum E., Briggs W.R. (1998). *Arabidopsis* NPH1: a flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. *Science* 282:1698-1701.
- Christie J.M, Salomon M., Nosue K., Wada M., Briggs W.R. (1999). LOV (light, oxygen, voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (nph1): binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proc Nat Acad Sci* 98:2995-3000.
- Crosson, S., K. Moffat (2002). Photoexcited structure of a plant photoreceptor domain reveals a light-driven molecular switch. *Plant Cell* 14:1067-1075.
- Estelle M. (2001). Transporters on the move. *Nature* 413:374-375.
- Feyerabend M. y Weiler E.W. 1988. Immunological estimation of growth regulator distribution in

- phototropically reacting sunflower seedlings. *Physiol Plant* 74:185-193.
- Fischer K. y Schopfer P. (1998). Physical strain mediated microtubule reorientation in the epidermis of gravitropically stimulated maize coleoptiles. *Plant J.* 15:119-123.
- Gong W., Hao B., Mansy S.S., González G., Gilles-González M.A., Chan M.K. (1998). Structure of a biological oxygen sensor: a new mechanism for heme-driven signal transduction. *Proc Natl Acad Sci* 95:15177-15182.
- Harper R.M., Stowe-Evans E.L., Luesse D.R., Muto H., Tatematsu K., Watahiki M.K., Yamamoto K., Liscum E. (2000). The *NPH4* Locus encodes the auxin response factor ARF7, a conditional regulator of differential growth in aerial *Arabidopsis* tissue. *Plant Cell* 12:757-770.
- Horwitz, B.A (1994). Properties and transducers chains of the UV and the blue light photoreceptors. In: *Photomorphogenesis in plants*. 2 edición (Eds) Kendrick, R.E., G.H.M. Kronenberg. Kluwer Academic Publishers Netherlands pp. 327-350.
- Huala E., Oeller P. W., Liscum E., Han I.S., Larsen e., Briggs W.R. (1997) *Arabidopsis* NPH1: A protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* 278:2120-2123.
- Huang K., T. Merkle, C.F. Beck (2002). Isolation and characterization of a *Chlamydomonas* gene that encodes a putative blue-light photoreceptor of the phototropin family. *Physiol Plant* 115 613-622.
- Jeong S., A.E. Trotochaud, S.E. Clark (1999). The *Arabidopsis* CLAVATA2 gene encodes a receptor like protein required for the stability of the CLAVATA1 receptor-like kinase. *Plant Cell* 11:1925-1934.
- Kasahara, M., T.E. Swartz, M.A. Olney, A. Onodera, N. Mochizuki, H. Fukuzawa, E. Asamizu, S. Tabata, H. Kanegae, M. Takano, J.M. Christie, A. Nagatani, W.R. Briggs (2002). Photochemical properties of the flavin mononucleotide binding domains of the phototropins from *Arabidopsis*, rice, and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 129:762-773.
- Li Yi, Hagen G., Guilfoyle T.J. (1991). An auxin responsive promoter is differentially induced by auxin gradients during tropisms. *Plant Cell* 3: 1167-1175.
- Motchoulski A., Liscum E. (1991). *Arabidopsis* NPH3: A NPH1 photoreceptor-interacting protein essential for phototropism. *Science* 286:961-964.
- Muday G.K., Delong A. (2001). Polar auxin transport: controlling where and how much. *Trends Plant Science* 6:535-542.
- Nebenführ A., C. Ritzenthaler, D.G. Robinson 2002. Brefeldin A: deciphering an enigmatic inhibitor of secretion. *Plant Physiol* 130:1102-1108.
- Okada K., Y. Shimura (1992). Mutational analysis of root gravitropism and phototropism of *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Aust. J. Plant Physiol* 19:439-448.
- Pellequer J.L., Wager-Smith K.A., Kay S.A., Getzoff E.D. (1998). Photoactive yellow protein: A structural prototype for the three-dimensional fold of the PAS domain superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci* 95:5884-5890.
- Raya, J.C., Gonzalez de la Vara L.E. (2001). Purification and characterization of a probable light receptor with kinase activity from beet root plasma membranes. *Planta* 213:802-810.
- Rivas S., Romeins T., Jones J.D.G. (2002). The cf-9 disease resistance protein is present in an ~420 Kda Heteromultimeric membrane-associated complex at one molecule per complex. *Plant Cell* 14:689-702.
- Sakai T., Wada T., Ishiguro s., Okada K. (2000). RPT2: A signal transducer of the phototropic response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 225-236.
- Sakamoto K. y Briggs W.R. (2002). Cellular y subCellular localization of phototropin 1. *Plant Cell* 14: 1723-1735.
- Salomon M., Christie J.M., Knieb E., Lempert U., Briggs W.R. (2000). Photochemical and mutational analysis of the FMN- binding domains of the plant blue light receptor, phototropin. *Biochem.* 39:9401-9401.