

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL  
FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Cátedra de Biología Celular y Molecular

*“Estudios de interacción proteína-ADN de factores de transcripción  
reguladores del desarrollo vegetal”*

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTORA EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS

**AUTORA:** Lic. Ivana Lorena Viola  
**DIRECTOR:** Dr. Daniel H. Gonzalez

-2007-

Este trabajo de Tesis fue desarrollado en el Laboratorio de Investigación de la Cátedra de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Litoral.

Parte de los resultados expuestos fueron dados a conocer en las siguientes Publicaciones y Reuniones Científicas:

### **Publicaciones**

- **Viola I** and Gonzalez D (2006) Interaction of the BELL-like protein ATH1 with DNA. A role of homeodomain residue 54 in specifying the different binding properties of BELL and KNOX proteins. **Biological Chemistry** 387, 31-40.

- **Viola I** and Gonzalez D (2007) Interaction of the PHD finger homeodomain protein HAT3.1 from *Arabidopsis thaliana* with DNA. Specific DNA binding by a homeodomain with histidine at position 51. **Biochemistry** 46, 7416-7425.

- **Viola I** and Gonzalez D (2007) DNA binding properties of the complex formed by the Arabidopsis TALE homeodomain proteins STM and BLH3. Differential effect of complex formation on the binding to single and double target sites. *Enviado para su publicación.*

### **Publicaciones en temas relacionados con esta Tesis**

- Tioni M, **Viola I**, Chan R and Gonzalez D (2005) Site-directed mutagenesis and footprinting analysis of the interaction of the sunflower KNOX protein HAKN1 with DNA. **FEBS Journal** 272, 190-202.

### **Reuniones Científicas**

- **Viola I**, Chan R and Gonzalez D. Interaction of the plant homeodomain protein ATH1 with DNA. XL Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular, SAIB. Iguazú, Misiones, del 5 al 8 de diciembre de 2004.

- **Viola I**, Chan R y Gonzalez D. Estudio de la interacción de ATH1, un factor de transcripción de la familia Bel, con el ADN. III Encuentro Bioquímico del Litoral y VI Jornadas de comunicaciones técnico-científicas. Santa Fe, 16 al 18 de junio de 2005.

- **Viola I** and Gonzalez D. Determination of the DNA binding properties of HAT3.1, a plant protein with a non-canonical homeodomain. XLI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular, SAIB. Pinamar, Buenos Aires, Argentina. 3 al 6 de diciembre de 2005.

- **Viola I** and Gonzalez D. DNA-binding properties of HAT3.1, a PHD-finger homeodomain protein of Arabidopsis. XLII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular, SAIB. Rosario, Santa Fe, Argentina. 12 al 15 de noviembre de 2006.

- **Viola I** and Gonzalez D. Analysis of binding properties of BLH3-STM heterodimers and the individual proteins with DNA. XLIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular, SAIB. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. 17 al 20 de noviembre de 2007.

*Quiero expresar mi agradecimiento a aquellas personas que hicieron posible la realización de esta Tesis,*

*Al Dr. Daniel Gonzalez por brindarme su confianza para realizar este trabajo y compartir su sabiduría. Por guiarme en este apasionante camino, siempre con la idea correcta o el experimento más acertado. Por su buena predisposición. Por su compromiso y dedicación permanentes durante estos años. Por ser un director excelente.*

*A la Dra. Raquel Chan a quien admiro y respeto profundamente. Por introducirme en este mundo maravilloso y contagiarme de su entusiasmo por el trabajo en el laboratorio. Por sus aportes a mi formación y su ayuda incondicional.*

*Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por otorgarme la beca doctoral que me permitió llevar a cabo este trabajo de Tesis.*

*A los organismos que financiaron el proyecto en el que se encuadra este trabajo: CONICET, Fundación Antorchas, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y Universidad Nacional del Litoral.*

*Al Dr. Juan Claus por su amabilidad y su buena predisposición.*

*A la cátedra de Macro y al laboratorio de Sergio Guerrero, que rebosan de buena gente. Gracias por cederme los equipos tan gentilmente. A todos, gracias por su buena onda, la ayuda desinteresada y tantos buenos ratos.*

*A mis compañeros de laboratorio, los de antes y los de ahora. A Gabi, por su calidez y consejos. A Adri, por alegrar las horas de lucha en el cuarto de radioisótopos. A Mariana, que me enseñaste a caminar por el laboratorio, gracias por todo y por tu amistad. A Cuqui, siempre tan responsable y dedicada. Te extraño. Grace, por tus buenos consejos y tu estímulo permanente. Por confiar en nosotros más que uno mismo. A Eli, que hemos compartido tanto...qué decir!... Mil gracias por tu ayuda incondicional en los momentos difíciles. Por estar siempre ahí, por dar sin recibir y por ser una Gran amiga. Caro, por esas charlas entre ciencia y trivialidades, por la amistad sincera. Gracias por apagar mis "ausencias" con tu constante cercanía! A Eva, por compartir tu buena onda, por tu solidaridad y cariño. A Juli, que haces que tu alegría se respire entre centrifugas y tubos de ensayo. Fede, que compartimos tantas penurias científicas, gracias por tu amistad!. A Pablo, por tu buen humor siempre. A Agustín, por tu gran compañerismo. Al dúo Edu y Raulo, por los buenos momentos que hemos compartido. A Toto, por tu calidez.*

*A Carlos, que compartes tu conocimiento sin reparos, gracias por tus sabios consejos. Por haber estado siempre, por tu amistad, tu generosidad y tu inmenso amor.*

*A mi familia, que es mi orgullo. Gracias por darme fuerzas para seguir adelante. A mis hermanos, Maxi y Yanina, gracias por estar siempre a mi lado. Por su estímulo y contención constantes. A vos papá, ejemplo de bondad y lucha que sigue presente en nuestros corazones. A vos mamá, por tu esfuerzo y entrega infinitos.*

*A Ignacio. Perdón por las horas que le he robado a tu infancia. Eres sin duda quien más ha sufrido esta Tesis. Gracias por tu sacrificio y por tu alegría que me dan fuerzas siempre.*

*A mi hijo Ignacio...*



## ÍNDICE

ÍNDICE.....	i
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>vi</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN GENERAL .....</b>	<b>1</b>
1.1 EL DESARROLLO EN ORGANISMOS EUCARIOTAS MULTICELULARES .....	1
1.2 EL HOMEODOMINIO .....	3
1.2.1 Organización en el genoma .....	3
1.2.2 Especificidad funcional de las proteínas que contienen homeodominio .....	4
1.2.3 Estructura primaria .....	4
1.2.4 Estructura secundaria y terciaria .....	5
1.2.5 El complejo homeodominio-ADN .....	7
1.2.6 Especificidad funcional del homeodominio .....	13
1.3 HOMEODOMINIOS DE PLANTAS.....	15
1.3.1 Familia HD-Zip.....	16
1.3.2 Familia GLABRA .....	17
1.3.3 Familia ZF-HD .....	18
1.3.4 Familia WUSCHEL .....	19
1.3.5 Familia PHD finger.....	20
1.3.6 Familia KNOX.....	21
1.3.7 Familia BEL .....	25
1.3.8 Interacción entre los factores de transcripción de la superclase TALE .....	28
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>
<b>3 MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
3.1 CEPAS EMPLEADAS.....	32
3.2 VECTORES PLASMÍDICOS EMPLEADOS .....	32
3.3 MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS.....	33
3.3.1 Medios de cultivo para <i>Escherichia coli</i> .....	33
3.3.2 Medios de cultivo para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	34

---

3.4	OLIGONUCLEÓTIDOS EMPLEADOS COMO CEBADORES EN REACCIONES DE PCR, DETERMINACIÓN DE SECUENCIA Y MUTAGÉNESIS .....	35
3.5	OLIGONUCLEÓTIDOS SINTÉTICOS DOBLE HEBRA EMPLEADOS EN ENSAYOS DE RETARDO EN GELES .....	36
3.6	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) .....	36
3.7	ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS .....	37
3.7.1	Electroforesis en geles de agarosa .....	37
3.7.2	Electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes.....	37
3.8	PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN DE GELES DE AGAROSA.....	38
3.9	DIGESTIÓN DE ADN CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN.....	38
3.10	REACCIONES DE DESFOSFORILACIÓN Y LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN .....	39
3.11	TRANSFORMACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> CON ADN PLASMÍDICO .....	39
3.11.1	Método del CaCl <sub>2</sub> .....	39
3.11.2	Electrotransformación.....	40
3.12	TRANSFORMACIÓN DE <i>S. cerevisiae</i> EN PRESENCIA DE ACETATO DE LITIO.....	40
3.13	HIBRIDACIÓN EN COLONIA .....	41
3.13.1	Marcación radioactiva de sondas de ADN.....	42
3.13.2	Hibridación de membranas de nylon .....	42
3.14	PREPARACIÓN DE ADN PLASMÍDICO .....	43
3.14.1	Preparación de ADN plasmídico de <i>Escherichia coli</i> .....	43
3.14.2	Preparación de ADN plasmídico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	43
3.15	EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN <i>Escherichia coli</i> .....	44
3.15.1	Clonado y mutagénesis de proteínas recombinantes fusionadas a glutatión S-transferasa.....	44
3.15.2	Clonado y mutagénesis de las proteínas recombinantes fusionadas a la proteína de unión a maltosa .....	46
3.16	EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN <i>E. coli</i> .....	47
3.16.1	Purificación de las proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST).....	48
3.16.2	Purificación de las proteínas de fusión con la proteína de unión a maltosa (MBP) .....	48
3.16.3	Corte de las proteínas fusionadas a glutatión S-transferasa y a la proteína de unión a maltosa .....	49
3.17	ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON SDS .....	49
3.18	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	49

3.19	MARCACIÓN RADIOACTIVA DE FRAGMENTOS DE ADN PARA ENSAYOS DE UNIÓN.....	50
3.20	ENSAYOS DE RETARDO EN GEL.....	52
3.21	SELECCIÓN DE SITIOS DE UNIÓN ESPECÍFICOS.....	53
3.22	DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA CONSENSO PARA LA UNIÓN AL ADN DE LAS PROTEÍNAS ATH1 Y HAT3.1 .....	54
3.23	DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA DE FRAGMENTOS DE ADN CLONADOS.....	54
3.24	ENSAYOS DE PROTECCIÓN DE ADN AL TRATAMIENTO CON RADICAL HIDROXILO .....	55
3.25	ENSAYOS DE INTERFERENCIA POR TRATAMIENTO CON RADICAL HIDROXILO .....	56
3.26	ENSAYO DE ENTRECruzAMIENTO ADN-PROTEÍNA INDUCIDO POR LUZ UV .....	57
3.27	MÉTODOS INFORMÁTICOS DE MODELADO DE PROTEÍNAS .....	57
3.28	ENSAYOS DE INTERACCIÓN PROTEÍNA-ADN EN LEVADURA. ....	58
3.28.1	Obtención de la cepa con el gen reportero para el sistema de simple híbrido .....	59
3.28.2	Expresión de las proteínas de fusión en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	62
3.28.3	Ensayo de la expresión del gen reportero <i>HIS3</i> .....	64
3.28.4	Ensayo de la actividad $\beta$ -galactosidasa.....	65
<b>4</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>67</b>
<b>CAPÍTULO 1: Caracterización de la interacción con el ADN de ATH1, un factor de transcripción de la familia BEL. Estudio de la función del aminoácido 54 del homeodominio en las propiedades de unión de proteínas de las familias BEL y KNOX. ....</b>		
4.1.1	Introducción.....	67
4.1.2	Resultados.....	68
4.1.2.1	Determinación de la secuencia de ADN consenso para la unión al ADN del homeodominio de ATH1.....	68
4.1.2.2	Análisis de la especificidad en la unión al ADN de ATH1 <sub>HD</sub> y STM <sub>HD</sub> .....	74
4.1.2.3	Estudio de la unión de ATH1 <sub>HD</sub> al ADN mediante ensayos de protección y pérdida de nucleósido por ataque con radical hidroxilo.....	78
4.1.2.4	Estudio de la unión de STM <sub>HD</sub> al ADN mediante ensayos de protección y pérdida de nucleósido causada por ataque con radical hidroxilo .....	81
4.1.2.5	Análisis de la importancia del residuo 54 de los homeodominios de ATH1 y STM en la interacción con el ADN.....	84

4.1.3	Discusión.....	89
<b>CAPÍTULO 2: Análisis de la unión de los heterodímeros BEL-KNOX con el ADN. Estudio de las propiedades de interacción del complejo BLH3-STM con sitios de unión con uno o dos núcleos TGAC.....</b>		
4.2.1	Introducción.....	93
4.2.2	Resultados .....	95
4.2.2.1	Análisis de la unión al ADN del complejo BLH3-STM .....	95
4.2.2.2	Efecto de la concentración de BLH3 y STM sobre la afinidad de unión al ADN.....	99
4.2.2.3	Estudio de la interacción con BS1 y BS2 mediante ensayos de interferencia en la unión por tratamiento con radical hidroxilo .....	101
4.2.2.4	Estudio de la afinidad de unión al ADN de complejos proteína-proteína con un homeodominio no funcional .....	104
4.2.2.5	Estudio de la unión al ADN de STM, BLH3 y del complejo BLH3-STM in vivo en levaduras .....	107
4.2.2.6	Presencia de los sitios de unión simple y doble en las regiones promotoras de genes de Arabidopsis.....	111
4.2.3	Discusión.....	119
<b>4.3 CAPÍTULO 3: Interacción con el ADN de la proteína de la familia PHD finger, HAT3.1. Estudio de la especificidad de unión de un homeodominio particular con histidina en la posición 51.....</b>		
4.3.1	Introducción.....	123
4.3.2	Resultados.....	125
4.3.2.1	Análisis de la capacidad del homeodominio de HAT3.1 de discriminar específicamente secuencias de ADN a partir de una población de oligonucleótidos de 50 pb de longitud.....	125
4.3.2.2	Determinación de la secuencia consenso unida por HAT3.1 <sub>HD</sub> .....	127
4.3.2.3	Estudio de la capacidad de HAT3.1 de unir la secuencia de ADN seleccionada in vivo en levaduras.....	129
4.3.2.4	Análisis de la unión de HAT3.1 a su secuencia de ADN consenso mediante ensayos de interferencia en la unión por ataque con radical hidroxilo.....	131
4.3.2.5	Caracterización de la unión de HAT3.1 a la secuencia TGCACCATCTAAACCA .....	133
4.3.2.6	Análisis de la especificidad de unión de HAT3.1 <sub>HD</sub> a la secuencia TAAACCA.....	134
4.3.2.7	Identificación de los residuos de aminoácidos de la hélice III que son necesarios para la unión eficiente de HAT3.1 al ADN.....	136

4.3.2.8	Influencia del estado de protonación de H51 sobre la eficiencia de unión de HAT3.1 <sub>HD</sub> al ADN.....	138
4.3.2.9	Análisis de la especificidad de unión al ADN de las mutantes de HAT3.1 <sub>HD</sub> .....	141
4.3.3	Discusión.....	143
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>148</b>
<b>6</b>	<b>RESUMEN.....</b>	<b>153</b>
<b>7</b>	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>161</b>
<b>8</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>167</b>

---

**ABREVIATURAS**

Ac	acetato
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ARNasa	ribonucleasa
ARNt	ácido ribonucleico de transferencia
APS	persulfato de amonio
ATP	adenosina trifosfato
BSA	albúmina sérica bovina
col.	colaboradores
cpm	cuentas por minuto
Da	daltons
dATP	desoxiadenosina 5' trifosfato
dCTP	desoxicitidina 5' trifosfato
dGTP	desoxiguanosina 5' trifosfato
dNTP	mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP y dTTP.
DO	densidad óptica
DTT	ditiotreitól
dTTP	desoxitimidina 5' trifosfato
EDTA	sal sódica del ácido etilen diamino tetraacético
g	gravedad
GST	glutación S-transferasa
HEPES	ácido N-(2-hidroxietyl)-piperazina-N'-(2-etanosulfónico)
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
kpb	kilopares de bases
kDa	kilodalton
LB	medio de cultivo de Luria-Bertani
MBP	proteína de unión a maltosa
min	minuto/s
mmol	milimoles
MOPS	ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEG	polietilenglicol
PM	peso molecular
PMSF	fluoruro de fenil metil sulfonilo
Poli (dI-dC)	ácido polidesoxiinosínico-polidesoxicidínico
P/V	peso en volumen
rpm	revoluciones por minuto

SDS	dodecilsulfato de sodio
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TBE	Tris-Borato-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N',-tetrametiletilendiamina
Tris	N-tris-(hidroximetil)aminometano
UV	ultravioleta
V/V	volumen en volumen
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-galactósido

# **INTRODUCCIÓN GENERAL**

## **1 INTRODUCCIÓN GENERAL**

### **1.1 EL DESARROLLO EN ORGANISMOS EUCARIOTAS MULTICELULARES**

Todas las células de un organismo eucariota multicelular provienen de una única célula fecundada, el cigoto. Durante el desarrollo, proceso por el cual una célula inicial da origen a un cuerpo adulto, ocurren etapas coordinadas de división, expansión y diferenciación celular, mediante las cuales se origina una progenie de células morfológica y funcionalmente distinguibles. Esto lleva a la formación de estructuras particulares en el embrión y, posteriormente, de tejidos específicos en el organismo adulto. De esta manera se obtiene la formación de un sistema corporal ordenado con diferencias regionales de organización celular (Wolpert, 1994).

El desarrollo de los organismos eucariotas multicelulares requiere, por lo tanto, de la ejecución de un programa muy preciso que, además de especificar su plan corporal, determine la secuencia y el momento en que deben ocurrir cada uno de los eventos necesarios. Este programa de desarrollo está contenido en la secuencia de ADN del organismo (Gehring, 1987).

Los genes responsables de especificar la identidad morfológica de los grupos de células que constituirán los elementos fundamentales de la arquitectura corporal del organismo se denominan genes estructurales. El programa de desarrollo es, entonces, el patrón espacial y temporal preciso de la expresión de estos genes estructurales.

Durante el desarrollo de un organismo normal se requiere la expresión de numerosos genes estructurales de manera concertada, para que este programa no se ejecute en forma caótica. Para ello existen grupos de genes de control, responsables de la regulación coordinada de la expresión de los diversos genes estructurales. Estos genes se organizan en complejas redes jerárquicas, cuyas funciones son controlar y determinar el momento y el sitio en que los genes estructurales deben expresarse.

La regulación de la expresión génica a nivel transcripcional ocurre mediante la acción de proteínas reguladoras denominadas factores de transcripción. Estos factores contienen una variedad de motivos estructurales que interactúan con secuencias específicas de ADN y se clasifican de acuerdo al tipo de dominio de unión a ADN que contienen. De esta manera, cada

tipo celular es definido por la expresión diferencial de su información genética regulada en parte por una cascada de factores de transcripción interactuantes.

Los genes reguladores del desarrollo han sido extensamente estudiados mediante ensayos genéticos clásicos y moleculares en *Drosophila melanogaster*. El embrión de *Drosophila melanogaster* se desarrolla a través de un proceso de regionalización, donde diferentes segmentos dan lugar a estructuras anatómicas definidas en el embrión desarrollado y posteriormente en el organismo adulto. De esta manera, se observó que la mutación de un determinado gen o su expresión ectópica provocaba el fenómeno de homeosis, donde un segmento corporal completo, o una parte del mismo, era sustituido por una estructura normal pero correspondiente a otro segmento corporal (Lewis, 1978; Gehring, 1987). Como consecuencia, a estos genes se los denominó homeóticos.

El primer gen homeótico de *Drosophila* identificado fue *Antennapedia* (*Antp*), cuya mutación trae como consecuencia un fenómeno de homeosis que se manifiesta en la aparición de patas en el lugar de las antenas (Garber y col., 1983). El análisis estructural de este gen y la comparación de su secuencia con las de genes homeóticos aislados posteriormente llevaron al descubrimiento de un fragmento de ADN muy conservado, de 180 pares de bases, denominado caja homeótica u homeobox (McGinnis y col., 1984, a y b). La comparación de las secuencias de diferentes cajas homeóticas condujo a la identificación de una secuencia de aminoácidos muy conservada que constituye un dominio proteico de unión a ADN llamado homeodominio (McGinnis y col., 1984, a y b).

Se debe efectuar una distinción entre el concepto de gen homeótico y el de caja homeótica u homeodominio. *Antennapedia* es un gen homeótico, ya que su mutación provoca el fenómeno de homeosis. Sin embargo, no todos los genes que contienen estas cajas se comportan como genes homeóticos, y a su vez hay genes homeóticos que no codifican un homeodominio, sino otro tipo de dominio proteico.

Luego del aislamiento de los genes homeóticos de *Drosophila*, se encontraron genes que codifican homeodominios en todos los organismos eucariotas analizados y en todos los casos se los ha vinculado a procesos de desarrollo (Banerjee-Basu, 2003).

## 1.2 EL HOMEODOMINIO

### 1.2.1 Organización en el genoma

En animales, los genes que codifican proteínas con homeodominio se organizan en complejos a lo largo del genoma. Los primeros estudios se llevaron a cabo en *Drosophila*, donde la mayoría de los genes que contienen cajas homeóticas se agrupan en dos complejos denominados *bithorax* y *Antennapedia*, en el cromosoma tres (Lewis, 1978; Kaufman y col., 1990).

Cuando se analizó la secuencia de los homeodominios pertenecientes a estos complejos, se observó un alto grado de homología, lo cual sugirió que dichos complejos podrían haber surgido por duplicación y divergencia de un único complejo ancestral y que por lo tanto serían parálogos entre sí (Gehring y col., 1994).

Por otra parte, se comprobó que la localización de estos genes en los complejos está estrechamente relacionada con el patrón de expresión espacio-temporal a través del eje antero-posterior del embrión en desarrollo, es decir que presentan co-linealidad (Graham y col., 1989).

En los mamíferos se identificaron cuatro complejos de genes HOX (A→D), presentes en cromosomas diferentes. Debido a la homología de secuencia observada entre los genes de distintos complejos se pensó del mismo modo que para *Drosophila*, que podrían haberse generado por duplicaciones de un único complejo ancestral donde los complejos resultantes se habrían distribuido en los diferentes cromosomas, y por esto deberían ser considerados parálogos entre sí (Acampora y col., 1989; Duboule, 1994; Maconochie y col., 1996).

Confirmando esta hipótesis, se observó que un insecto más primitivo que *Drosophila*, el escarabajo *Tribolium castaneum*, presenta un único complejo homeótico en su genoma, HOM C, el cual es equivalente a los complejos *bithorax* y *Antennapedia* (Beeman, 1989). También se pudieron identificar eventos de duplicación en los complejos HOX mediante estudios evolutivos de estos complejos en los cordados (Pendelton y col., 1993).

Basados en la identidad de sus homeodominios, co-linealidad y conservación de función, los genes con caja homeótica de *Drosophila* se consideraron ortólogos a los genes Hox de mamíferos. Esta ortología entre ciertos genes con homeobox de *Drosophila* y su

contraparte en mamíferos fue corroborada mediante estudios funcionales *in vivo* (Mc Ginnis y col., 1990; Malicki y col., 1990; Zhao y col., 1993).

### 1.2.2 Especificidad funcional de las proteínas que contienen homeodominio

El primer indicio respecto de la función del homeodominio surgió del análisis comparativo de las secuencias de aminoácidos, lo cual permitió determinar cierto grado de homología entre las proteínas con homeodominio de *Drosophila* y las proteínas MATa1 y MAT $\alpha$ 2 de levadura (Shepherd y col., 1984). Dichas proteínas controlan la diferenciación celular de *Saccharomyces cerevisiae*, uniéndose a secuencias específicas del ADN en regiones adyacentes a los genes que regulan, es decir que actúan como factores de transcripción.

Por otra parte, también se encontró homología con proteínas reguladoras de la transcripción en procariotas, que se caracterizan por presentar un motivo hélice-giro-hélice capaz de interactuar con nucleótidos específicos del ADN (Laughon y Scott, 1984; Pabo y Sauer, 1984). La presencia de este motivo helice-giro-hélice se comprobó, además, mediante estudios cristalográficos realizados con las proteínas engrailed y MAT $\alpha$ 2 (Kissinger y col., 1990; Wolberger y col. 1991) y de resonancia magnética nuclear llevados a cabo con Antennapedia (Qian y col. 1989).

Estos hallazgos sugirieron que el homeodominio podría ser un dominio de unión a ADN y que la función de las proteínas con homeodominio sería la de actuar como factores de transcripción (Levine y Hoey, 1988). Esto se comprobó con estudios de activación transcripcional *in vitro* (Nelson y col., 1988) y mediante el análisis de diferentes mutaciones en el homeodominio de la proteína MAT $\alpha$ 2 de levadura, lo cual indicó el rol crítico de esta región en el control de la expresión de genes *in vivo* (Porter y Smith, 1986).

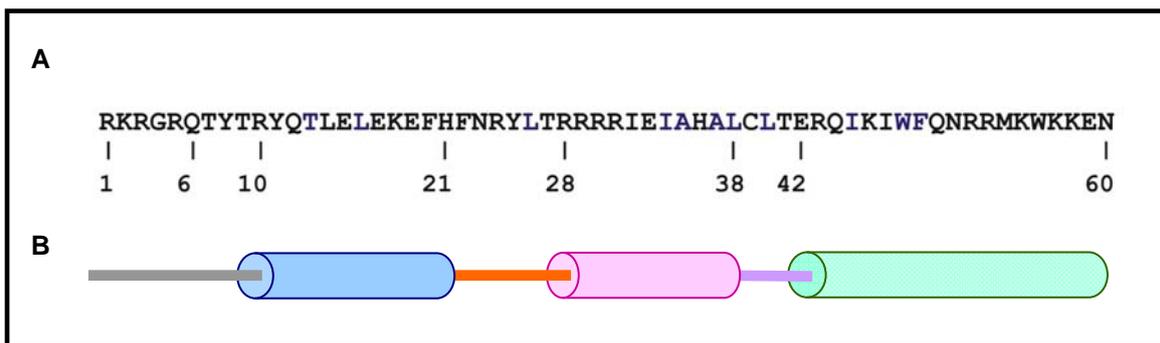
### 1.2.3 Estructura primaria

A partir de la comparación de homeodominios de diferentes organismos se encontró que su secuencia de aminoácidos se encuentra altamente conservada y se pudo determinar



- La hélice I comprende los residuos 10 a 22
- La hélice II está formada por los aminoácidos 28 a 37
- La hélice III abarca los residuos 42 a 58.

En particular, en Antennapedia la hélice III comprende los residuos 42 a 52 del homeodominio y se continúa en una cuarta hélice más flexible formada por los aminoácidos 53 a 60.



**Figura 2. Estructura primaria y secundaria del homeodominio de Antennapedia.** A. Estructura primaria. En azul se indican los residuos apolares que mantienen el núcleo hidrofóbico de la estructura globular. B. Diagrama de la estructura secundaria de dicho homeodominio. Con gris se indica el extremo N-terminal; las hélices  $\alpha$  I, II y III/IV se indican con cilindros celeste, rosado y verde, respectivamente; con naranja se muestra el rulo entre las hélices I y II y con violeta el giro entre las hélices II y III.

En la estructura tridimensional del homeodominio, las hélices I y II están dispuestas en forma antiparalela y la hélice III (y IV en el caso de Antennapedia), se ubica de manera perpendicular respecto de las otras dos.

Las hélices II y III están conectadas por un giro apretado, formando un motivo hélice-giro-hélice homólogo al informado previamente para proteínas reguladoras de genes procariontas (Pabo y Sauer, 1984), lo cual confirmó lo que se había postulado a partir del análisis de la secuencia de aminoácidos de los homeodominios.

El homeodominio se pliega adoptando una estructura globular compacta, con un núcleo hidrofóbico constituido por once aminoácidos no polares, invariables o muy conservados: las leucinas 16, 38 y 40, la isoleucina o valina 45, el triptofano 48 y la fenilalanina 49.

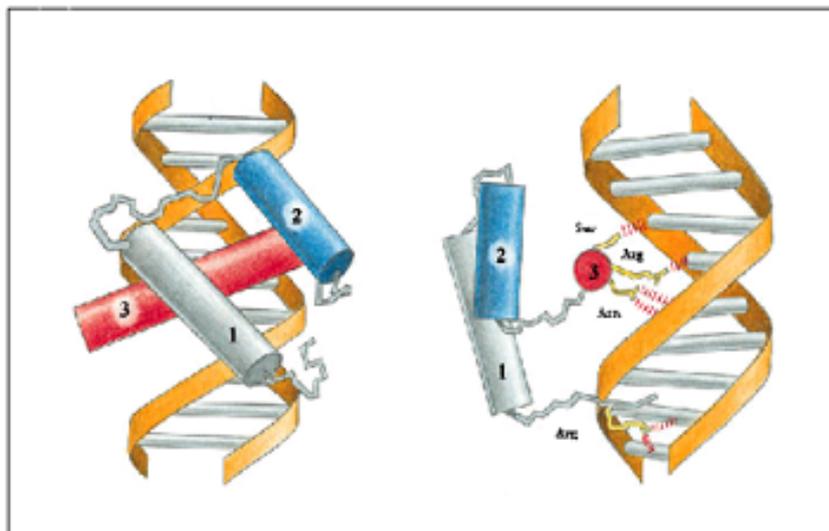
Como el núcleo hidrofóbico de una proteína es fundamental en la determinación de su estructura nativa y la mayoría de los aminoácidos del núcleo están altamente conservados, se podría predecir que homeodominios diferentes adoptarían una estructura tridimensional similar. Esta hipótesis fue confirmada mediante estudios cristalográficos de distintos homeodominios

como los de engrailed, MAT $\alpha$ 2 y fushi tarazu, donde pudo observarse un plegamiento globular idéntico al de Antennapedia (Kissinger y col., 1990; Wolberger y col., 1991; Qian y col., 1994).

### 1.2.5 El complejo homeodominio-ADN

El análisis de la estructura tridimensional de los complejos homeodominio-ADN (Kissinger y col., 1990; Otting y col., 1990; Wolberger y col., 1991) permitió determinar qué tipo de contactos se establecen en estos complejos.

En todos los casos se observó que en la interacción participan dos regiones del homeodominio: el brazo amino terminal flexible (aminoácidos 1 a 9), el cual establece contactos en el surco menor del ADN, y la hélice III, denominada hélice de reconocimiento, que se ajusta al surco mayor (Kissinger y col., 1990; Li y col., 1995; Passner y col., 1999). La estructura tridimensional del homeodominio permite que ambas regiones reconozcan bases en posiciones adyacentes en la secuencia de ADN unida (Figura 3).



**Figura 3. Estructura tridimensional del homeodominio.** Esquema de la disposición de las hélices  $\alpha$  y el brazo amino terminal del homeodominio de MAT $\alpha$ 2 de levaduras en contacto con el ADN. Se indican con números cada una de las tres hélices  $\alpha$ . Adaptado de Wolberger y col. (1991).

Fuera de la hélice de reconocimiento y el brazo amino terminal, sólo tres residuos del homeodominio, uno en posición 25 en el rulo entre las hélices I y II y dos en las posiciones 28 y 31 de la hélice II, establecen contactos con el esqueleto azúcar-fosfato de la doble hebra (Kissinger y col., 1990; Wolberger y col., 1991; Gehring y col., 1994).

Las hélices I y II del homeodominio se encuentran demasiado lejos del ADN como para establecer contactos directos, por lo que su función principal es estabilizar la estructura plegada y determinar la orientación relativa del brazo amino terminal y la hélice III (Kissinger y col., 1990).

En el contacto entre el homeodominio y el ADN participan distintos tipos de interacciones:

Puentes de hidrógeno, que pueden ser directos entre aminoácidos polares y las bases de ADN, o indirectos, cuando son mediados por moléculas de agua.

Interacciones iónicas, entre residuos básicos y los grupos fosfato de la doble hélice.

Interacciones hidrofóbicas y de van der Waals, entre grupos apolares y las bases del ADN (Gehring, 1994; Wilson y col., 1996).

A pesar del gran número de funciones biológicas que llevan a cabo las diferentes proteínas con homeodominio, se demostró, mediante ensayos de selección de sitio de unión y estudios estructurales, que la mayoría de los homeodominios reconocen la secuencia nucleotídica 5'-TAATNN-3'. Esto está de acuerdo con el alto grado de conservación que presentan los residuos involucrados en el contacto con el ADN. Los aminoácidos variables serían los responsables de interactuar con las bases NN adyacentes y de esta manera conferirían especificidades diferentes a los distintos homeodominios.

Igualmente, existen varias excepciones que unen secuencias relacionadas, como la proteína MAT $\alpha$ 2 de levaduras que reconoce la secuencia consenso 5'-TTACAT-3' (Li y col., 1995), la proteína TTF-1 (factor de transcripción tiroideo) que une la secuencia 5'-CAAG-3' (Damante y col., 1994), y la proteína Extradenticle (Exd) de *Drosophila* que une la secuencia 5'-TGATTT-3' (Passner y col., 1999), entre otras.

### **Contactos específicos establecidos por la hélice de reconocimiento**

Mientras que la superficie hidrofóbica de la hélice III, junto con las hélices I y II, forman el interior de la proteína, la superficie hidrofílica de la hélice de reconocimiento interactúa de manera específica con bases y con el esqueleto azúcar-fosfato en el surco mayor del ADN.

Un residuo clave en la interacción de la hélice de reconocimiento con el ADN es la asparagina **51**, invariable en prácticamente todos los homeodominios. Este residuo forma un puente de hidrógeno bidentado con una adenina de la tercera posición del núcleo TAAT. Este contacto estereoquímicamente preciso con la base del surco mayor del ADN explica la intolerancia a la sustitución de aminoácidos que presenta esta posición (Pomerantz y Sharp, 1994). Es por ello que el modelo de interacción y el núcleo reconocido se define en torno a la adenina contactada por la asparagina 51 del homeodominio (Wilson y col., 1996).

Otro aminoácido importante en la interacción de la hélice III con el ADN es el residuo en la posición **47**, que en más del 90% de los homeodominios es ocupada por isoleucina o valina. La cadena lateral de estos aminoácidos establece interacciones de tipo hidrofóbico con T4 (TAAI) (Gehring y col., 1994). En el caso de MAT $\alpha$ 2, la asparagina 47 no participa en la unión a ADN (Wolberger y col., 1991), mientras que valina 47 de Mata1 o isoleucina de Engrailed y Ultrabithorax establecen interacciones de tipo van der Waals con A<sub>3</sub> o T<sub>4</sub>, respectivamente (Li y col., 1995; Kissinger y col., 1990; Passner y col., 1999). Por otro lado, se ha demostrado que residuos con cadenas laterales estructuralmente diferentes en la posición 47 presentan especificidades de interacción similares (Pomerantz y Sharp, 1994). Se postuló, entonces, que residuos en otras posiciones del homeodominio especificarían la identidad del cuarto par de bases cuando este es distinto de T (Wilson y col., 1996).

Las bases en las posiciones 5 y 6 de la secuencia reconocida son contactadas por el residuo **50** del homeodominio. Este aminoácido sería el principal determinante de la especificidad de unión a ADN, permitiéndole al homeodominio distinguir sitios TAATNN diferentes (Ades y Sauer, 1994, Tucker-Kellogg y col., 1997; Mathias y col., 2001).

El cambio de la lisina 50 del homeodominio de bicoid por glutamina, un residuo que se encuentra en la misma posición en Antennapedia, cambia la especificidad de bicoid para activar la transcripción *in vivo* en un sistema de expresión de genes reporteros. De esta manera se elimina la capacidad de unión a la secuencia TAATCC y se adquiere capacidad para reconocer la secuencia TAATTG, normalmente reconocida por Antennapedia (Hanes y Brent, 1989; Hanes y Brent, 1991).

En los ensayos *in vitro* de unión a ADN realizados con la proteína paired, la cual reconoce específicamente la secuencia TAATCG, se observó que cuando la serina 50 era cambiada por glutamina (como en el homeodominio de fushi tarazu) o lisina (como en bicoid), las proteínas paired mutadas reconocían específicamente el sitio de unión de fushi tarazu (TAATTG) o bicoid (TAATCC), respectivamente (Treisman y col., 1989; Wilson y col., 1996).

Los estudios llevados a cabo con la proteína fushi tarazu Q50K, donde la glutamina 50 del homeodominio se había cambiado por lisina, mostraron que la especificidad de unión a ADN *in vitro* era similar a la del homeodominio de bicoid (Percival-Smith y col., 1990). También se demostró que esta posición es el principal determinante de la especificidad de unión *in vivo* de la proteína fushi tarazu en embriones de *Drosophila* (Schier y Gehring, 1992).

La estructura cristalina del complejo ADN-engrailed Q50K muestra que la lisina en posición 50, a través de su cadena lateral, establece dos uniones de hidrógeno con la G complementaria a C<sub>6</sub> y una con la G complementaria a C<sub>5</sub> de la secuencia TAATCC reconocida por ésta (Tucker-Kellogg y col., 1997). Estas uniones de hidrógeno son energéticamente más importantes que las interacciones de van der Waals entre la glutamina 50 de la proteína salvaje y la T complementaria a A<sub>6</sub> de la secuencia TAATTA (Kissinger y col., 1990).

Se ha demostrado en numerosos trabajos que el residuo lisina en posición 50 impone fuertes preferencias por bases C en las posiciones 5 y 6 de la secuencia unida. Sin embargo, se observa una mayor flexibilidad en el reconocimiento cuando dicha posición es ocupada por aminoácidos pequeños. Esto puede atribuirse al hecho de que estos residuos establecen contactos indirectos con el ADN, mediados por moléculas de agua, las cuales se repositionarían entre la proteína y la doble hebra en los distintos complejos (Mathias y col., 2001).

Otro residuo que participa en la determinación de la especificidad de unión al ADN es el presente en la posición **54** del homeodominio (Damante y col., 1996; Dave y col., 2000; Hovde y col., 2001; Koizumi y col., 2003). En la mayoría de los homeodominios estudiados, este residuo contacta las bases 4, 5 y/o 6 de la secuencia reconocida de ADN.

Según Li y col. (1995), la arginina 54 de MAT $\alpha$ 2 establece contactos con la G complementaria a C<sub>4</sub> y la metionina 54 de Mata1 interacciona con la C complementaria a G<sub>5</sub>.

Por otro lado, la posición 54 de engrailed no establece contactos con el ADN, ya que la cadena lateral del residuo alanina en esta posición no llega a interactuar con las bases del surco mayor (Kissinger y col., 1990).

En el caso de la proteína Antennapedia, los estudios estructurales indican que la metionina 54 interactúa con las bases 5 y 6 del núcleo TAATGG (Kissinger y col., 1990), mientras que en el homeodominio de bicoid la arginina 54 establece contactos alternativos con el tercer o tercer y cuarto par de bases (TAAT o TAAG), donde el modo de reconocimiento se “reprograma” según la secuencia blanco con la cual se establece la interacción (Dave y col., 2000).

Además, se ha observado una interferencia funcional entre los residuos 50 y 54 del homeodominio, ya que la función de cada uno de ellos depende del aminoácido presente en la otra posición. Esto se debe al estrecho contacto existente entre sus cadenas laterales. De esta manera, cuando lisina 50 es acompañada por tirosina 54 o alanina 54, y glutamina 50 es acompañada por metionina 54, las proteínas discriminan eficientemente entre las diferentes secuencias de ADN a unir. Esto no ocurre cuando la proteína con homeodominio posee lisina 50 y metionina 54. La presencia de metionina en posición 54 disminuye la capacidad para distinguir bases específicas propia de la lisina 50. Estos resultados explicarían la ausencia del par lisina 50-metionina 54 en los homeodominios naturales y apoyan la hipótesis de una acción combinada de ambos residuos en la determinación de la especificidad en las posiciones 5 y 6 (Damante y col., 1996; Pellizari y col., 1997). Por otro lado, también se ha comprobado que el residuo presente en la posición 54 cumple un papel determinante en la estabilización de la hélice de reconocimiento (Tell y col., 1999).

El residuo en posición **55** de los homeodominios es generalmente un residuo básico que establece contactos con el esqueleto fosfodiéster del ADN. En el caso de Mata1 y de las proteínas Pbx1 y extradenticle, la arginina presente en esta posición interactúa específicamente con una guanina contenida en el núcleo GATGT o TGAT, respectivamente (Li y col., 1995; Passner y col., 1999, LaRonde-LeBlanc y Wolberger, 2003). Se ha postulado que la arginina 55 determina la presencia de una guanina en posición 5' respecto de la adenina invariable contactada por la asparagina 51.

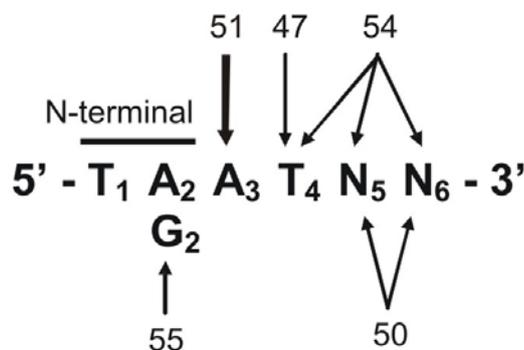
### Contactos específicos establecidos por el extremo amino terminal

El brazo amino terminal del homeodominio establece contactos fundamentalmente con el surco menor del ADN.

La estructura cristalográfica del complejo formado por el homeodominio de Antennapedia y la secuencia blanco TAAT muestra que la arginina 5 forma un puente de hidrógeno con la timina del primer par de bases (T<sub>1</sub>A<sub>2</sub>T), mientras que la cadena lateral del residuo arginina 3 de engrailed establece el mismo tipo de interacción con la timina complementaria a la adenina del segundo par de bases de dicha secuencia (A<sub>2</sub>T<sub>1</sub>T) (Kissinger y col., 1990; Qian y col., 1994). Sin embargo, tanto en la estructura de Oct-1 como en la de paired, es la arginina 2, más que la 3, la responsable de este contacto (Klemm y col., 1994; Wilson y col., 1995). Por otro lado, en MAT $\alpha$ 2 el residuo que media el contacto con el surco menor de la doble hebra es la arginina 7 (Wolberger y col., 1991).

El grado de flexibilidad observado en la interacción del brazo amino terminal con el surco menor del ADN está en relación con la estructura desordenada que adopta dicho extremo en solución. La eliminación del brazo amino terminal disminuye considerablemente la afinidad de unión de una proteína con homeodominio por su secuencia blanco. Tal efecto se observó en los homeodominios “truncos” de fushi tarazu y Msx (Percival-Smith y col., 1990; Shang y col., 1994).

En la siguiente figura se resumen los contactos establecidos entre el homeodominio y su secuencia blanco de ADN, comentados en detalle en los párrafos anteriores.



**Figura 4.** Esquema de las interacciones establecidas por los distintos aminoácidos y regiones del homeodominio en la interacción con la secuencia blanco TAATNN. La presencia de arginina 55 especificaría una G en la posición 2.

### 1.2.6 Especificidad funcional del homeodominio

Una gran cantidad de proteínas con homeodominio reconoce la secuencia consenso TAAT con afinidades de unión similares (Hoey y Levine, 1988). Si consideramos que todas ellas pueden estar expresándose en la célula en el mismo momento, entonces ¿cómo pueden llevar a cabo la regulación específica de la transcripción de sus genes blanco?

Se han postulado distintos mecanismos mediante los cuales las proteínas con homeodominio lograrían su especificidad funcional. Ellos son:

- Diferencias de afinidad por una misma secuencia de ADN

Se ha comprobado en ensayos *in vitro* que distintas proteínas con homeodominio pueden unirse a una misma secuencia con afinidades ligeramente distintas. *In vivo*, esa pequeña diferencia de afinidad genera una actividad transcripcional apreciablemente diferente, lo cual puede deberse a que los requisitos para la unión a ADN *in vivo* sean más estrictos que los observados *in vitro*.

- Interacciones con cofactores proteicos

En algunos casos, los contactos que establece el homeodominio con el ADN están mediados por interacciones cooperativas entre proteínas, que actúan alterando su afinidad o especificidad por el sitio de unión.

Tal es el caso de las proteínas con homeodominio de levadura MAT $\alpha$ 2 y Mata1, las cuales se unen cooperativamente al ADN para reprimir la transcripción de los genes específicos de tipo celular. Mientras que la especificidad y afinidad de Mata1 por el ADN es muy baja en ausencia de MAT $\alpha$ 2, éstas se incrementan al interactuar con el extremo carboxilo terminal de dicha proteína (Wolberger y col., 1991; Li y col., 1995). Se ha postulado que el aumento en la afinidad de Mata1 no se debe a un mecanismo de tipo alostérico, sino que responde a un modelo de acoplamiento energético en el cual la unión a ADN de Mata1 y MAT $\alpha$ 2 involucra estrictamente la heterodimerización de estas proteínas. Mata1 no puede disociarse del ADN sin romper los contactos establecidos con el extremo carboxilo terminal de MAT $\alpha$ 2. En tales circunstancias, la constante de disociación del heterodímero Mata1/MAT $\alpha$ 2 sería el producto de las constantes de disociación de las proteínas individuales. Esto da una

constante de disociación para el heterodímero de  $10^{-13}$ - $10^{-14}$  M<sup>2</sup>, lo cual coincide con lo observado en los ensayos de unión a ADN. La heterodimerización Mata1/MAT $\alpha$ 2 proveería la energía libre para la estabilización del extremo carboxilo terminal de Mata1, lo cual sólo se observa cuando esta proteína se encuentra unida al ADN (Ke y Wolberger, 2003).

Por otra parte, también se observó que las proteínas con homeodominio de animales HOX y PBC interaccionan a través de una secuencia peptídica corta denominada motivo YPWM, que se encuentra hacia el extremo amino terminal adyacente al homeodominio de la mayoría de las proteínas HOX. Estos heterodímeros HOX-PBC pueden ser activadores o represores de la transcripción, dependiendo de la presencia en los distintos tipos celulares de un tercer factor con el que formarían un complejo ternario (Mann y Chan, 1996; Chariot y col., 1999a; Saleh y col., 2000).

- Modificaciones post traduccionales

Las modificaciones post traduccionales modulan la función de numerosos factores de transcripción. Las mismas generalmente involucran eventos de fosforilación/desfosforilación reversibles, mediados por quinasas y fosfatasas, y reacciones de oxidación/reducción en las cuales participan enzimas dependientes de grupos tioles.

Estudios llevados a cabo con HOXA9 demostraron que la proteín quinasa C media la fosforilación de los residuos S204 y T205, ubicados en una secuencia muy conservada en la región amino terminal del homeodominio. Esta fosforilación genera una menor afinidad de unión a ADN *in vitro* y una disminución en la capacidad de HOXA9 para formar complejos de unión a ADN con PBX *in vivo* (Vijapurkar y col., 2004).

Por otro lado, aunque no han sido tan profundamente estudiadas como las modificaciones post traduccionales por fosforilación/desfosforilación, los cambios en el estado redox también pueden modular la actividad transcripcional de algunas proteínas con homeodominio (Tron y col., 2002). En estudios *in vitro* realizados con la proteína con homeodominio de rata Isl-1, se observó que la modificación química del grupo sulfhidrilo de la cisteína en posición 54 puede incrementar o disminuir su capacidad para interaccionar con el ADN. Así, mientras que en condiciones oxidantes no se detecta unión, esta es máxima cuando

se la incubaba con agentes reductores o cuando dicha cisteína es reemplazada por serina (Sanchez-Garcia y Rabbitts, 1993).

- Estructura de la cromatina

Se ha comprobado que la conformación de la cromatina cumple un rol importante en la determinación de la especificidad y afinidad de interacción entre las proteínas con homeodominio y el ADN.

Se demostró *in vitro* e *in vivo* que el complejo con actividad acetiltransferasa de histonas CBP/p300 interacciona físicamente con HOXB7 y su proteína transactivadora PBX, aumentando su potencial transcripcional. Múltiples mecanismos podrían mediar esta activación. Uno de los que se ha postulado involucra modificaciones en la conformación de la cromatina en el sitio de unión de HOX mediante la acetilación de histonas por CBP. Esto también lo podrían llevar a cabo otras acetiltransferasas de histonas tales como PCAF. Las lisinas acetiladas en el extremo amino terminal de las histonas desestabilizarían el nucleosoma y facilitarían el acceso del factor de transcripción al ADN (Yang y col., 1996; Chariot y col., 1999b).

### 1.3 HOMEODOMINIOS DE PLANTAS

El primer gen con homeobox identificado en plantas fue *Knotted-1* (Vollbrecht y col., 1991), que se aisló de plantas de maíz mutantes que se caracterizaban por la presencia de estructuras similares a nudos en las hojas. Estas alteraciones en el desarrollo se deben a que las células de la lámina asumen destinos celulares de regiones inferiores de la hoja, en donde persisten la indiferenciación y las divisiones celulares, como consecuencia de la expresión ectópica de *Knotted-1* (Hake, 1992; Smith y col., 1992). Posteriormente, el gen *Knotted-1* fue utilizado como sonda para aislar genes homólogos de diferentes especies vegetales.

Los primeros genes de *Arabidopsis thaliana* que codifican proteínas con homeodominio se aislaron poco tiempo después de la identificación del gen *Knotted-1* de maíz. Estos genes, denominados *Athb-1* y *Athb-2*, se aislaron de una biblioteca de *Arabidopsis* empleando como sonda un oligonucleótido degenerado diseñado a partir de la secuencia de la hélice III de los homeodominios animales (Ruberti y col., 1991).

Actualmente se conocen numerosos genes que codifican proteínas con homeodominio en vegetales (Chan y col., 1998; Reiser y col., 2000). Se ha podido determinar que la función de la mayoría de ellos *in vivo* es la de actuar como reguladores transcripcionales controlando fundamentalmente los procesos de desarrollo. Esta función es coincidente con la postulada para homeodominios animales, lo cual sugiere que los mecanismos de control transcripcional en los cuales participan las proteínas con homeodominio han permanecido conservados en todos los eucariotas a lo largo de millones de años de evolución (Ptashne, 1988). Sin embargo, actualmente se cree que, si bien los dominios funcionales de los factores de transcripción están conservados en especies muy distantes, no necesariamente éstos están involucrados en la regulación de los mismos eventos del desarrollo.

Las proteínas que contienen homeodominio de las distintas especies vegetales han sido divididas en diferentes familias y subfamilias de acuerdo a la conservación de la secuencia de aminoácidos dentro y fuera del homeodominio. Además de la homología a nivel del dominio de unión, los miembros de cada familia comparten otros dominios proteicos conservados y presentan características comunes como su tamaño y ubicación del homeodominio en la molécula. De esta manera las proteínas con homeodominio de vegetales han sido agrupadas en siete familias. A continuación, se describen las características de cada una de ellas y en la figura 5 se esquematiza la estructura general de los miembros de cada familia.

### **1.3.1 Familia HD-Zip**

Las proteínas de la familia **HD-Zip** poseen un homeodominio asociado a un cierre de leucinas. Este arreglo sólo fue encontrado en proteínas vegetales por lo que se especula que los genes que codifican estas proteínas han evolucionado dentro de las plantas para cumplir funciones propias del reino vegetal (Schena y Davis, 1992). El motivo cierre de leucinas, ubicado en posición carboxilo terminal respecto del homeodominio, tiene como función la formación de dímeros (Sessa y col., 1993). Estas proteínas fueron llamadas HD-Zip por analogía a la clase b-Zip de factores de transcripción que poseen un cierre de leucinas asociado a un elemento básico de unión a ADN. Las proteínas HD-Zip tienen aproximadamente 300 aminoácidos y el homeodominio está localizado en la mitad amino terminal de la proteína. Se clasifican en tres subfamilias de acuerdo a la secuencia de ADN reconocida, estructura

génica, presencia de motivos comunes adicionales y las funciones que cumplen en plantas (Ariel y col., 2007). Generalmente, presentan una región ácida adyacente al homeodominio hacia el extremo amino terminal.

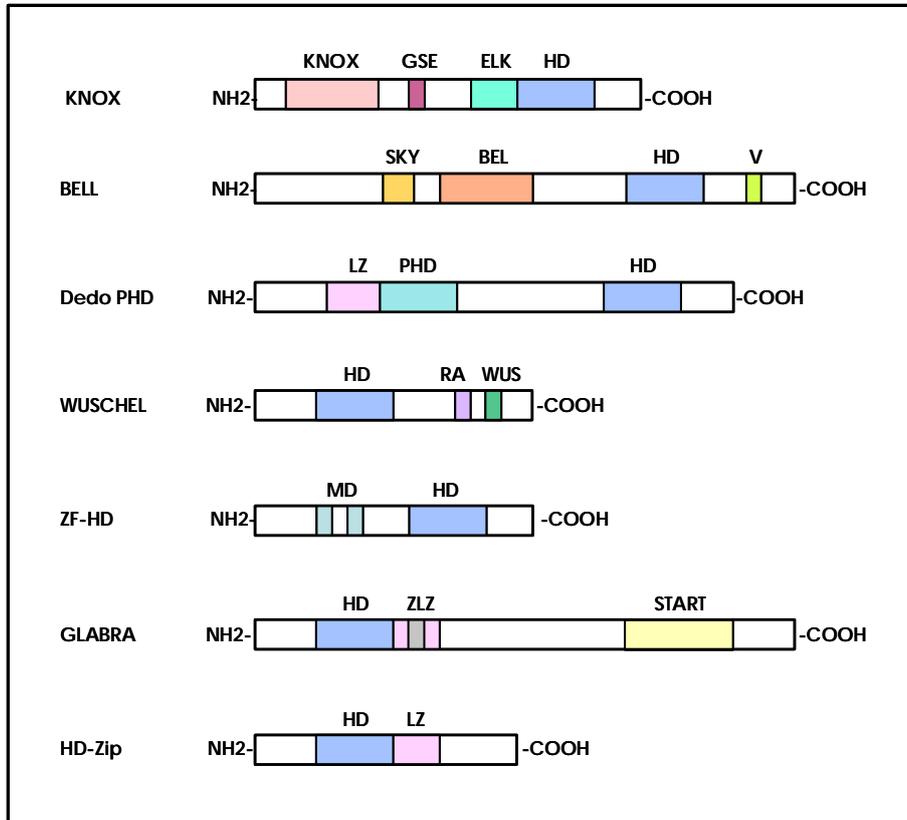
Los genes que codifican proteínas de la familia HD-Zip se expresan en distintos órganos de la planta y en estadios de desarrollo muy diversos. Algunos de ellos participan en el desarrollo vascular y de órganos o en el mantenimiento de los meristemas. En otros su expresión está regulada por factores responsables de provocar respuestas de desarrollo en las plantas como la luz, hormonas, estrés o heridas (Schena y Davis, 1992; Dezar y col., 2005). Este hecho, sumado a la capacidad de las proteínas HD-Zip de interactuar entre sí formando homo o heterodímeros, las hace buenas candidatas para regular la amplia variedad de respuestas de las plantas a factores ambientales, hormonales y/o nutricionales. Dentro de los genes agrupados en esta familia se encuentran los aislados por Ruberti y col. en 1991, que se mencionan al comienzo de este punto.

### 1.3.2 Familia **GLABRA**

Las proteínas de la familia **GLABRA** tienen alrededor de 800 aminoácidos y también unen ADN como dímeros. Poseen un dominio de dimerización, que se asemeja a un cierre de leucinas truncado, en la misma posición relativa al homeodominio que las proteínas HD-Zip. Este hecho ha originado que sean consideradas parte de la familia HD-Zip (como subfamilia HD-Zip IV) por algunos autores. El dominio de dimerización de las proteínas de la familia **GLABRA** consta de dos hélices separadas por un rulo. Se ha propuesto que la hélice más próxima al homeodominio es responsable del alineamiento correcto del homeodominio para la unión a ADN, mientras que la segunda hélice cumpliría la función de estabilizar el dímero (Palena y col., 1997).

La proteína **GLABRA2** de *Arabidopsis thaliana*, uno de los representantes de esta familia, está involucrada en el desarrollo de tricomas (pelos de hojas y tallos), y, a partir de estudios de expresión, se cree que cumpliría también un papel en la diferenciación de células epidérmicas de raíz (Rerie y col., 1994). En general, dado el patrón de expresión de este tipo de genes, se propone que **GLABRA2** y los genes relacionados se han especializado durante la

evolución para regular aspectos relativos al desarrollo de las células epidérmicas de las plantas.



**Figura 5. Características estructurales de las familias de proteínas con homeodominio de plantas.** Los dominios conservados en cada caso se indican como: HD (homeodominio), KNOX, ELK, GSE, SKY, BEL, V (caja VSLTLGL), PHD (PHD finger), RA (región ácida), WUS (caja WUS), MD (motivos de dimerización), LZ (cierres de leucinas), ZLZ (cierres de leucinas interrumpido por un rulo), START (dominio START).

### 1.3.3 Familia ZF-HD

Las proteínas de la familia **ZF-HD** poseen un homeodominio en el extremo carboxilo terminal, con cuatro aminoácidos adicionales en el rulo que une las hélices I y II. Hacia el extremo amino terminal de la proteína se encuentran dos regiones muy conservadas que serían necesarias para la dimerización de estos factores (Windhovel y col., 2001). Estos motivos presentan cinco residuos de cisteínas y tres de histidinas cuyas posiciones relativas se asemejan a las encontradas en los motivos de dimerización de tipo dedos de Zinc (por ello el nombre ZF-HD, por Zinc Finger HomeoDomain). Se identificaron miembros de esta familia en *Arabidopsis*, soja, arroz, tomate y dos especies del género *Flaveria*. En estas últimas dos

especies se comprobó que los genes ZF-HD se expresan en tejidos fotosintéticos y que participan de la regulación del gen de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (Windhovel y col., 2001).

En estudios recientes, realizados con los 14 genes de la familia ZF-HD de *Arabidopsis*, se vio que los mismos se expresan en tejidos florales y que algunos de ellos tendrían funciones redundantes en el control del desarrollo floral. La mayoría de las proteínas codificadas por estos genes son capaces de heterodimerizar con otros miembros de la familia (Tan e Irish, 2006).

#### **1.3.4 Familia WUSCHEL**

Las proteínas de la familia **WUSCHEL** tienen alrededor de 300 aminoácidos, con su homeodominio ubicado hacia el extremo amino terminal de la proteína (Mayer y col., 1998). En posición carboxilo terminal respecto del homeodominio se distingue una secuencia de ocho residuos conservados (TLPLFPMH) denominada caja WUS. También se identificó una región rica en aminoácidos ácidos separada por aproximadamente diez residuos de la caja WUS, hacia el amino terminal. Según estudios de predicción de estructura secundaria, este dominio ácido tendría la capacidad de formar una hélice  $\alpha$  anfipática que podría funcionar como dominio de transactivación (Mayer y col., 1998; Haecker y col., 2004).

Las proteínas de la familia WUSCHEL cumplen un rol importante estableciendo los programas transcripcionales en distintas regiones durante la embriogénesis de la planta. Es por esto que la expresión se inicia en la célula precursora en etapas muy tempranas del desarrollo embrionario (Haecker y col., 2004). Por ejemplo, la proteína WUSCHEL de *Arabidopsis* actúa estableciendo la identidad meristemática (o indiferenciada) de las células del ápice, expresándose en un centro organizador de células que afecta el destino de sus vecinas (Mayer y col., 1998).

La familia WUSCHEL de proteínas con homeodominios es específica de plantas. En la actualidad se han identificado miembros de esta familia en diferentes especies vegetales como *Petunia*, *Antirrhinum majus*, arroz y *Arabidopsis thaliana*.

### 1.3.5 Familia PHD finger

La familia de proteínas con **PHD finger** (por *Plant HomeoDomain*) se caracteriza por la presencia de una región rica en cisteínas en el extremo amino terminal de la proteína. Estos residuos se disponen regularmente de manera similar a la observada en los dominios de unión a metales. Se ha postulado que este dominio, denominado PHD finger, podría funcionar como un dominio de interacción proteína-proteína, como sensor redox de señales medioambientales o como una secuencia necesaria para la unión específica de la proteína al ADN (Schindler y col., 1993; Klinge y col., 1996). Por otra parte, Halbach y col. (2000) han demostrado que el motivo PHD finger actúa como activador general de la transcripción en células de plantas, levaduras y animales.

El primer miembro identificado de esta familia fue HAT3.1, aislado por Schindler y col. (1993) a partir de una biblioteca de ADNc de *Arabidopsis*, durante la búsqueda de proteínas que reconocieran un fragmento del promotor del gen *cab-E* de *Nicotiana plumbaginifolia*. Al analizar la secuencia de esta proteína, estos autores encontraron que codificaba un homeodominio que poseía poca similitud con los identificados hasta ese momento. Más interesante aún, posiciones conservadas estaban ocupadas por residuos no observados en ningún otro homeodominio. En aparente concordancia con esto, ensayos de unión a ADN *in vitro* mostraron que este motivo era capaz de interactuar con fragmentos de ADN mayores a 100 pb, sin ninguna especificidad de secuencia. Es más, la unión solamente era detectada si estaba presente el motivo PHD finger. A partir de estas observaciones, se propuso que el homeodominio de HAT3.1 contactaría el ADN y que el PHD finger mediaría interacciones proteína-proteína o proteína-ADN, estabilizando el complejo proteína-ADN (Schindler y col., 1993).

La expresión ectópica en tabaco de los genes codificantes de las proteínas con PHD finger *Zmhox1a* y *Zmhox1b* de maíz provoca alteraciones similares en el desarrollo vegetativo y floral, tal como la reducción en el tamaño de la planta, la formación de tallos adventicios y transformaciones florales homeóticas (Uberlacker y col., 1996). Esto está de acuerdo con el patrón de expresión observado, el cual se restringe a las etapas tempranas del desarrollo embrionario y a los tejidos meristemáticos (Klinge y col., 1996).

La proteína con PHD finger de arroz HAZ1 presenta 52% de identidad con Zmhox1a y 50% con Zmhox1b. Estudios llevados a cabo con esta proteína indicaron que su expresión a los tres días de la polinización se restringe a la superficie externa del embrión, mientras que a los cuatro y cinco días la expresión de HAZ1 se concentra en la región ventral del embrión. Se postuló que HAZ1 define la identidad de las células de la superficie del embrión antes de que tenga lugar ningún cambio morfológico (Ito y col., 2004).

La comparación de la secuencia de los genes de esta familia reveló la existencia de un cierre de leucinas (LZ) precediendo el dominio PHD finger (Halbach y col., 2000). Se ha encontrado que la activación transcripcional por parte del motivo PHD se encuentra enmascarada en presencia del cierre de leucinas y que el mismo interacciona con regiones conservadas de las proteínas 14-3-3. Estos hallazgos sugieren que el motivo LZ/PHD (Figura 5) representa un dominio regulador de la actividad de los factores de transcripción de la familia PHD finger.

### **1.3.6 Familia KNOX**

Las proteínas de la familia **KNOX** (*Knotted1-like homeobox*), pertenecen a la superclase TALE de proteínas con homeodominio (por las siglas en inglés: *Three Amino acid Loop Extension*), que comprende proteínas de distintos reinos que poseen tres aminoácidos extra en el rulo que conecta las hélices I y II del homeodominio (Bürglin, 1997). Los factores de transcripción de tipo KNOX poseen alrededor de 400 aminoácidos y en todos el homeodominio está ubicado cerca del extremo carboxilo terminal. Además, las proteínas de esta familia presentan tres regiones conservadas. Una de ellas es el dominio KNOX, de aproximadamente 100 aminoácidos, también denominado MEINOX debido a su alta homología con el dominio MEIS de la familia MEIS de proteínas con homeodominio de animales (Bürglin y col., 1997). Éste se ubica en el extremo amino terminal de la proteína y su función es establecer contactos proteína-proteína (Müller y col., 2001; Smith y col., 2002; Chen y col., 2003). Las otras dos regiones conservadas son la caja GSE, una región rica en residuos de prolina, serina y glutamato ubicada hacia el carboxilo terminal, que estaría implicada en la degradación proteica (Nagasaki y col., 2001), y el dominio ELK, cuyo nombre deriva de los primeros tres aminoácidos que lo componen, el cual se ubica en forma adyacente al extremo amino terminal

del homeodominio. Aunque aún no se ha establecido la función precisa de este dominio, se ha propuesto que estaría involucrado en interacciones proteína-proteína, mediando el transporte de estos factores al núcleo (Meisel y Lam, 1996).

Las proteínas de la familia KNOX se han agrupado en dos subfamilias, denominadas KNOX I y KNOX II, según la homología de secuencia dentro y fuera del homeodominio y la posición que ocupan los intrones en los genes (Kerstetter y col., 1994). Por otra parte, estos grupos se diferencian en sus patrones de expresión.

A partir del análisis de diversas mutantes y de estudios de sobreexpresión de genes KNOX de clase I (KNOX I) de diversas especies como maíz (Volbrecht y col., 1991), arroz (Matsuoka y col., 1993), *Arabidopsis* (Lincoln y col., 1994), y tabaco (Tamaoki y col., 1997), se determinó que estos genes son esenciales para el funcionamiento del meristema apical del vástago y que se expresan tanto en meristemas vegetativos como reproductivos. Sin embargo, a excepción de algunas especies que poseen hojas compuestas (Hareven y col., 1996), son regulados negativamente en los primordios de órganos laterales (Long y col., 1996).

El genoma de *Arabidopsis* codifica cuatro genes KNOX I: *STM*, *KNAT1* (*BP*), *KNAT2* y *KNAT6*. SHOOTMERISTEMLESS (*STM*) participa en la determinación y mantenimiento del meristema apical, manteniendo las células en un estado indiferenciado (Long y col., 1996) mediante la regulación negativa de *ASYMMETRIC LEAVES1* (*AS1*), que codifica un factor de transcripción (FT) de tipo myb, y de *ASYMMETRIC LEAVES2* (*AS2*), miembro de la familia LOB de FT (Byrne y col., 2000). *KNAT1* actúa en el establecimiento del patrón de elongación del entrenudo durante el desarrollo de la inflorescencia (Douglas y col., 2002; Venglat y col., 2002; Smith y Hake, 2003), y contribuye, junto con *STM*, al mantenimiento del meristema apical (Byrne y col., 2002).

Por otra parte, *KNAT2* se expresa en las zonas internas de los meristemas y es reprimido cuando se inician los primordios de hojas (Dockx y col., 1995). Además, se expresa en carpelos (Pautot y col., 2001) y se ha postulado que actuaría en el desarrollo de los mismos. Recientemente, se encontró que *STM* promueve el desarrollo de carpelos (Scofield y col., 2007). En conjunto, estos resultados, y los comentados más arriba, sugieren que *KNAT1* y *KNAT2* serían funcionalmente redundantes con *STM* en el desarrollo del meristema apical del tallo y de los carpelos, respectivamente (Scofield y col., 2007).

Estudios llevados a cabo por Dean y col. (2004) indicaron que *KNAT6* tendría funciones en el desarrollo de las raíces laterales. Por otro lado, se ha demostrado que está involucrado en el mantenimiento del meristema apical y en el establecimiento de los límites durante la embriogénesis (Belles-Boix y col., 2006).

Mientras que la expresión de los genes de clase I se localiza principalmente en tejidos meristemáticos, los genes de clase 2 (KNOX II) presentan dominios de expresión más extendidos, abarcando casi todos los tejidos de la planta. Aunque hasta el momento no se ha podido caracterizar la función de estos factores de transcripción, se ha involucrado a los genes KNOX II de *Arabidopsis*, *KNAT3*, *KNAT4*, *KNAT5*, y *KNAT7*, en el control del desarrollo de raíces junto con *KNAT1* y *KNAT6*, ya que los mismos se expresan en distintos tipos celulares a lo largo del eje longitudinal de la raíz y en los primordios de las raíces laterales (Truenit y col., 2006). En este sentido, diversos estudios llevados a cabo con *KNAT1*, 2, 3, 4, 5 y 6 han aportado evidencias que involucran a los genes KNOX de *Arabidopsis* en el desarrollo de raíces (Serikawa y col., 1996 y 1997; Hamant y col., 2002; Dean y col., 2004; Truenit y col., 2006).

### **Interacciones entre los genes KNOX y las hormonas vegetales**

Sakamoto y col. (2001) observaron que las células meristemáticas que expresan los genes KNOX I se dividen en forma aleatoria, en tanto que las células en P<sub>0</sub> y estadios sucesivos en el desarrollo de los primordios foliares, que no expresan genes KNOX I y poseen niveles superiores de giberelinas activas, muestran un patrón ordenado de divisiones celulares. Dado que en los primordios de órganos las giberelinas inducen la división celular transversal y la expansión longitudinal, participando en el ordenamiento de las microfibrillas de celulosa en las paredes celulares (Gunning, 1982), se propuso que los genes KNOX podrían mantener la flexibilidad en la orientación de las divisiones celulares para preservar las propiedades indeterminadas de las células en las capas interiores del meristema, a través de la reducción de los niveles de giberelinas (Sakamoto y col., 2001).

Por otra parte, dado que el normal funcionamiento del meristema apical del vástago requiere también de una producción continua de órganos a partir de sus bordes, se estableció

un modelo donde los genes KNOX I y las citoquininas determinan el mantenimiento de los meristemas, mientras que las giberelinas y auxinas son necesarias para la iniciación de las hojas (Sakamoto y col., 2001; Hay y col., 2004).

En los últimos años los genes KNOX han empezado a considerarse como los principales reguladores de los niveles de hormonas en los meristemas promoviendo la síntesis de citoquininas y reprimiendo la de giberelinas, y estableciendo los límites entre el meristema y los primordios de hojas (Hay y col., 2004). Al mismo tiempo, estos factores de transcripción son regulados negativamente en el sitio de iniciación de las hojas, probablemente por la acción de las auxinas, permitiendo la acumulación de giberelinas.

Los primeros indicios de la existencia de una correlación entre los genes KNOX y las vías de acción de las fitohormonas surgieron de observar que plantas de tabaco que sobreexpresaban el gen KNOX I *NTH15* mostraban niveles reducidos de giberelinas (Tamaoki y col., 1997). Posteriormente, Sakamoto y col. (2001) vieron que *NTH15* reprime directamente la expresión del gen *Ntc12*, que codifica la GA-20-oxidasa, una enzima clave en la síntesis de giberelinas a partir de precursores inactivos. Además, en ensayos en *Arabidopsis* y papa también se comprobó que *STM* y *POTH1*, respectivamente, impiden la transcripción de genes de GA-20-oxidasa en el meristema apical del tallo (Hay y col., 2002; Rosin y col., 2003).

Como se ha mencionado, las giberelinas no son las únicas fitohormonas cuyos niveles se ven afectados en plantas transgénicas que expresan los genes KNOX en forma ectópica. Los niveles de citoquininas, por ejemplo, se ven considerablemente aumentados en plantas de tabaco que sobreexpresan los genes *OSH1* de arroz (Kusaba y col., 1998), *Knotted-1 (KN1)* de maíz (Hewelt y col., 2000), o *NTH15* de tabaco (Tamaoki y col., 1997) y en plantas de lechuga que expresan ectópicamente el gen *KNAT1* de *Arabidopsis* (Frugis y col., 2001). Recientemente, Yanai y col. (2005) encontraron que la sobreexpresión de *STM*, *KNAT2* y *KN1* produce la activación transcripcional del gen *AtIPT7* de biosíntesis de citoquininas.

Por otra parte, se comprobó que plantas de *Arabidopsis* que producen citoquininas en exceso exhiben niveles aumentados de los transcritos de los genes *STM* y *KNAT1* (Rupp y col., 1999) y que el promotor del gen *KNAT2* es activado por agregado de citoquininas exógenas. El efecto contrario fue mostrado por el etileno, que parecería regular negativamente tanto la transcripción del promotor de *KNAT2*, como la actividad de la proteína correspondiente

(Hamant y col., 2002). Estos hallazgos llevaron a proponer que el etileno y las citoquininas regularían en forma antagónica la actividad de los meristemas a través de *KNAT2*.

En cuanto a la relación entre las auxinas y los genes *KNOX I*, se ha comprobado que estas hormonas reprimen la expresión de los genes *KNOX* en los meristemas en los puntos donde el gradiente de auxinas determina la iniciación de las hojas. Se observó que en plantas tratadas con un inhibidor del transporte polar de auxinas la expresión de los genes *KNOX* no se reprime en los meristemas y por ende se mantiene la identidad meristemática de las células interfiriendo en el desarrollo de las hojas (Scanlon, 2003).

### **1.3.7 Familia BEL**

Durante el aislamiento de plantas de *Arabidopsis* con defectos en el desarrollo del óvulo se encontró que en las mutantes *Bell1* (*Bel1*) ocurrían alteraciones en la morfogénesis e identidad del integumento (Modrusan y col., 1994). En estas mutantes, no se formaban el integumento interno y externo del óvulo y en su lugar aparecía un tejido en forma de collar que posteriormente se desarrollaba en estructuras carpeloides. Posteriormente Reiser y col. (1995) observaron que el gen *Bell1* codificaba un factor de transcripción similar a los de tipo *KNOX*, pero carecía del dominio ELK que distingue a esta clase. No obstante, *BEL1* tenía gran similitud con *ATH1* (*ARABIDOPSIS THALIANA* HOMEODOMINIO 1), un factor de transcripción regulado por luz (Quaedvlieg y col., 1995). A partir de esto, se identificó una nueva familia de proteínas con homeodominio de plantas que se denominó **BEL** por BEL1-LIKE.

En las proteínas de la familia *BEL* el homeodominio se ubica en el tercio carboxilo terminal (Reiser y col., 1995) y, al igual que en las proteínas *KNOX*, posee tres aminoácidos extras en el rulo que une las hélices I y II, por lo que estas proteínas pertenecen también a la superfamilia *TALE* de proteínas con homeodominio (Bürglin, 1997).

Hacia el amino terminal de las proteínas *BEL* se encuentra una secuencia de 20 aminoácidos, formada por residuos serina, lisina y tirosina, denominada caja *SKY*, y entre este elemento y el homeodominio existe una región de 120 aminoácidos llamada dominio *BEL*. Según predicciones realizadas en función de la secuencia de aminoácidos, la caja *SKY* y el dominio *BEL* formarían hélices  $\alpha$ , lo que les conferiría capacidad para mediar contactos entre proteínas (Bellaoui y col., 2001; Chen y col., 2003). Por último, en posición carboxilo terminal

respecto del homeodominio se encuentra la caja VSLTLGL, un elemento conservado cuya función se desconoce hasta el momento.

*ATH1* codifica una proteína BEL cuya expresión se restringe a los meristemas apicales vegetativos y es reprimida tan pronto como se inician los meristemas de inflorescencia. Durante esta etapa, *ATH1* se expresa en bajos niveles en los tejidos vasculares en desarrollo del tallo. Posteriormente, cuando las flores aparecen, se expresa en el receptáculo, sépalos y los tejidos vasculares de los estambres de las flores jóvenes. Estas observaciones sugirieron que *ATH1* controla la transición floral, determinando la transición del meristema apical vegetativo a meristema de inflorescencia. Esta hipótesis fue comprobada mediante estudios de sobreexpresión del ARN sentido y antisentido, en los que se vio que plantas que sobreexpresaban *ATH1* florecían más tarde que las plantas salvajes, mientras que la supresión de *ATH1* conducía a una floración más temprana (Smeekens y col., 1998). Además, estas plantas a menudo tenían flores incompletas o con órganos mutados y presentaban una reducción en la longitud del hipocotilo que, en los casos más severos, era semejante a lo que ocurre en plantas mutantes en el gen que codifica para PhyB. Estos resultados sugirieron que *ATH1* podría estar involucrada en los procesos de *shade avoidance* (Smeekens y col., 1998).

Dado que el efecto de la expresión constitutiva de *ATH1* en tabaco era revertido por el agregado de giberelinas exógenas se dedujo que esta proteína actuaría reprimiendo la síntesis de giberelinas o, alternativamente, las vías de respuesta a esta hormona. En conjunto los resultados obtenidos por Smeekens y col. (1998) indican que *ATH1* actúa de nexo entre las señales luminosas y la inhibición de la biosíntesis de giberelinas que ocurre en la transición floral.

Luego del aislamiento de BEL1 y *ATH1*, se encontraron otros miembros de la misma familia en distintas especies. Así, a través del análisis de mutantes o de plantas que expresan de manera ectópica genes BEL se pudo determinar que las proteínas de esta familia actúan regulando una gran variedad de procesos en plantas, más allá del control del desarrollo del óvulo o de la inflorescencia. Por ejemplo, se ha observado que la sobreexpresión de *MDH1* (*Malus domestica homeodomain 1*), un gen BEL de manzana, produce plantas enanas, de fertilidad reducida y con modificaciones en la forma de carpelos y frutos (Dong y col., 2000). Por otra parte, la sobreexpresión de *JuBel2* de cebada en tabaco genera plantas enanas, que

presentan malformaciones en las hojas y flores y disminución de la dominancia apical (Müller y col., 2001).

Por su parte, Luo y col. (2005) han identificado una proteína BEL de arroz, *OsBIHD1*, involucrada en mediar la defensa frente a patógenos y la resistencia a enfermedades. La sobreexpresión de *OsBIHD1* en tabaco produce plantas con mayor resistencia contra la infección por el virus del mosaico del tomate, el virus del mosaico de tabaco y *Phytophthora parasitica var. Nicotianae*. No obstante, estas plantas muestran mayor sensibilidad al estrés salino y oxidativo que las plantas salvajes (Luo y col., 2005).

A través del estudio de *StBEL5*, una proteína BEL involucrada en la inducción de la tuberización en papa (Chen y col., 2003), se descubrió que el fotoperíodo regula el movimiento del ARNm de este gen a través del floema hacia los sitios de iniciación de tubérculos (Banerjee y col., 2006). Por otro lado, se ha encontrado recientemente que la transcripción de *StBEL5* es activada por la luz roja y azul (independientemente del fotoperíodo) en hojas, mientras que longitudes de onda correspondientes al rojo lejano no tienen efecto en su expresión (Chatterjee y col., 2007). A partir de todas estas observaciones se ha propuesto un modelo de la regulación de la actividad de *StBEL5* por el fotoperíodo y su efecto en la inducción de la tuberización en papa.

En el genoma de *Arabidopsis* se encuentran codificadas 10 proteínas BEL, además de *BEL1* y *ATH1*, denominadas en forma sistemática desde *BLH1* a *BLH10* (por BEL1-Like Homeodomain). Dos de estos genes, *PENNYWISE* (*PNY/BLH9*; también llamado *BELLRINGER* o *VAAMANA*) y *POUND-FOOLISH* (*PNF/BLH8*) codifican proteínas que son esenciales para el desarrollo de la inflorescencia y regulan la elongación del entrenudo de la misma. A partir de estudios genéticos se encontró que *PNY* es necesario también durante la maduración del fruto (Byrne y col. 2003; Roeder y col. 2003; Smith y Hake 2003; Bhatt y col. 2004; Roeder y col. 2003).

Si bien el desarrollo de la inflorescencia en las plantas mutantes *pnf* es normal, las mutantes dobles *pnf pny* son incapaces de florecer, interrumpiéndose la transición del meristema apical vegetativo a meristema de inflorescencia, a pesar de que el primero presenta los cambios morfológicos y moleculares correspondientes a una normal recepción de las señales de inducción de la floración (Smith y col., 2004). De esta manera, estos genes son

necesarios para la evocación floral y actuarían regulando la re-estructuración de los patrones de crecimiento del meristema apical vegetativo para el desarrollo de la inflorescencia (Smith y col., 2004), probablemente controlando la expresión de los genes de identidad del meristema floral.

Como se mencionó más arriba, se ha propuesto que *BEL1* controla la región meristemática que forma el integumento del óvulo dirigiendo la diferenciación en dos estructuras diferentes: el integumento interno y el externo. Como en las mutantes en *BEL1* los integumentos son reemplazados por estructuras carpeloides, en un principio se pensó que *BEL1* actuaba regulando negativamente a *AGAMOUS* (*AG*) (Modrusan y col., 1994; Ray y col., 1994). Sin embargo, el análisis de expresión de *AG* en las mutantes *Bel1* indicó que esto no estaría dado a nivel transcripcional (Reiser y col., 1995). En efecto, recientemente se ha descubierto que *BEL1* interacciona con el dímero *AG-SEP3* (*AGAMOUS-SEPALLATA 3*) para gobernar la identidad y formación de los integumentos del óvulo (Brambilla y col. 2007).

Desde un principio se ha postulado que la función de las proteínas *BEL* estaría modulada por la interacción con otros factores proteicos y se ha comprobado en ensayos *in vitro* e *in vivo* que las mismas son capaces de formar dímeros con las proteínas *KNOX* (Bellaoui y col., 2001; Chen y col., 2003).

### **1.3.8 Interacción entre los factores de transcripción de la superclase TALE**

Numerosos estudios han demostrado que los miembros de la superclase TALE de animales interactúan físicamente entre sí y con otros factores de transcripción para regular la expresión de sus genes blanco. A través de motivos conservados en sus porciones N-terminales las proteínas de la familia PBC heterodimerizan con las proteínas *MEIS* que contienen el dominio *MEINOX* (término establecido por Bürglin en 1997) necesario para esta interacción.

En plantas, se ha propuesto hace varios años que las proteínas *MEINOX*, representadas por la familia *KNOX*, también interactuarían con otros miembros de la clase TALE formando homo y heterodímeros (Bürglin, 1997). Confirmando esta hipótesis, en los últimos años se han reportado diversos estudios que demuestran que las proteínas *KNOX* de *Arabidopsis* interactúan de manera selectiva con determinados miembros de la familia *BEL*.

(Bellaoui y col., 2001; Smith y col., 2002; Byrne y col., 2003; Smith y Hake, 2003; Bhatt y col., 2004; Hackbusch y col., 2005; Kanrar y col., 2006). De esta manera, se piensa que combinaciones específicas BEL/KNOX determinarían funciones únicas para los diferentes heterodímeros, dependiendo de los dominios de expresión de estas proteínas.

Como se ha comentado anteriormente, las proteínas PNY y BP (KNAT1) se expresan en los límites de los primordios florales en desarrollo. Dado que estas proteínas son capaces de interactuar entre sí, se ha sugerido que constituyen una unidad transcripcional requerida para el desarrollo del entrenudo de la inflorescencia (Smith y Hake, 2003). Además, PNY es capaz de interactuar también con STM, sugiriendo que este heterodímero participaría en el funcionamiento del meristema apical del tallo (Byrne y col. 2003; Smith y Hake 2003; Bhatt y col. 2004).

En estudios llevados a cabo por Kanrar y col. (2006) se ha encontrado que diferentes heterodímeros KNOX/BEL controlan el desarrollo de la inflorescencia de *Arabidopsis* y se ha propuesto un modelo en el cual los heterodímeros PNY-BP, PNF-BP, PNY-STM y PNF-STM controlarían el patrón de los entrenudos en el meristema de inflorescencia, mientras que los complejos PNY-STM y PNF-STM determinarían además los límites entre el meristema de inflorescencia y los primordios florales.

Las interacciones entre miembros de la familia TALE han sido reportadas también en otras especies como cebada (Müller y col., 2001) y papa (Chen y col., 2003), indicando que las mismas están conservadas evolutivamente.

Dada la similitud que existe en el modo de interacción entre las proteínas KNOX-BEL y MEIS-PBC, y la hipótesis de que estos genes derivan de un ancestro común, se ha propuesto que varios aspectos propios de las interacciones MEIS-PBC se mantendrían para los complejos KNOX-BEL. Como prueba de esto se ha encontrado que la formación de complejos STM-BLH3 y STM-BLH9 es esencial para la localización nuclear de STM (Cole y col., 2006) y que la interacción de VAN (PNY/BLH9) con STM, KNAT1 o KNAT6 es necesaria para su translocación al núcleo (Bhatt y col., 2004; Cole y col., 2006).

Como se ha descrito a lo largo de esta Introducción general, la regulación de la transcripción llevada a cabo por las proteínas con homeodominio depende de la especificidad de sus interacciones con el ADN. Sin embargo, aunque se han realizado numerosos estudios, aún no se ha logrado establecer un código universal de reconocimiento que permita correlacionar la identidad de los aminoácidos implicados en la interacción con la secuencia de nucleótidos reconocida.

Nos planteamos entonces como objetivo general de este trabajo de Tesis profundizar el conocimiento sobre los mecanismos de interacción con el ADN de proteínas de las familias BEL, KNOX y PHD finger de *Arabidopsis thaliana*, dado que las mismas poseen aminoácidos particulares en sus respectivas hélices de reconocimiento.

## **OBJETIVOS**

## 2 OBJETIVOS

Las proteínas de la superfamilia TALE presentan diferencias importantes en algunos aminoácidos del homeodominio y en el tipo de secuencia de ADN que reconocen. Esto hace que los conocimientos obtenidos en levaduras y animales no se puedan extrapolar a las proteínas de las familias BEL y KNOX.

Aún más interesante es el hecho de que los miembros de la familia PHD finger difieren notoriamente entre sí en la secuencia del homeodominio, especialmente en los residuos que normalmente contactan el ADN.

Entendemos entonces que estudiar los mecanismos moleculares involucrados en la interacción de proteínas de estas familias con el ADN es un paso fundamental para entender los procesos que regulan el desarrollo en vegetales.

Es por esto que el presente trabajo de Tesis tiene como objetivo general profundizar el conocimiento sobre los mecanismos de interacción con el ADN de proteínas BEL, KNOX y PHD finger de *Arabidopsis thaliana*.

En relación a esto, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- Determinar la secuencia de ADN reconocida específicamente por factores de transcripción pertenecientes a la familia BEL de *Arabidopsis*.
- Analizar comparativamente las propiedades de unión al ADN de homeodominios de las familias BEL y KNOX, con el objetivo de determinar qué residuos determinan las propiedades de unión de los miembros de cada una de estas familias.
- Estudiar la interacción entre proteínas de las familias BEL y KNOX y el efecto de esta interacción sobre las propiedades de unión a ADN.
- Determinar la especificidad de unión a ADN de proteínas PHD finger.
- Identificar los aminoácidos que participan en la unión y qué nucleótidos de la secuencia blanco son contactados, de manera de establecer un modelo de la interacción de estas proteínas con el ADN.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 CEPAS EMPLEADAS

##### Cepas de *Escherichia coli*

**DH5 $\alpha$** : *supE44* ( $\Delta$ *lacU169* ( $\phi$ 80*lacZ*M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi1 relA1* (Hanahan, 1983).

**JM109**: F' [*traD36 proAB<sup>+</sup> lac<sup>f</sup> lacZ* $\Delta$ M15] / *recA1 endA1 gyrA96 (Naf<sup>r</sup>) thi1 hsdR17 supE44 relA1*

$\Delta$ (*lac-proAB*) *mcrA* (Yanisch-Perron y col., 1985)

**BL21(DE3)**: *hsdS gal* ( $\lambda$ *clts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1*) (Studier y col., 1986)

##### Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

**Y187** : *MAT $\alpha$ , ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, met-, gal4 $\Delta$ , gal80 $\Delta$ ,*

*URA3::GAL1UAS-GAL1TATA-lacZ* (Harper y col., 1993)

**aW303**: *MAT $\alpha$  ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1* (Thomas y Rothstein, 1989)

#### 3.2 VECTORES PLASMÍDICOS EMPLEADOS

En la Tabla 1 se describen los plásmidos utilizados para el clonado de fragmentos de ADN, la determinación de la secuencia de fragmentos de ADN seleccionados y la expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*.

**Tabla 1:** Plásmidos empleados en *Escherichia coli*.

Plásmido	Características relevantes	Origen/Referencia
<b>pUC119</b>	pMB1ori, Amp <sup>r</sup> , P <sub>lac</sub> , <i>lacZ</i> $\alpha$	New England Biolabs
<b>pBluescript SK<sup>-</sup></b>	f1(-) ori, pMB1 ori, Amp <sup>r</sup> , P <sub>lac</sub> , <i>lacZ</i> $\alpha$	Stratagene Cloning Systems
<b>pCR 2.1-TOPO</b>	Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , P <sub>lac</sub> , <i>lacZ</i> $\alpha$ , P <sub>T7</sub> , f1(-) y pMB1 ori	Invitrogen
<b>pGEX-3X</b>	P <sub>lac</sub> , <i>gst</i> , <i>lacI<sup>q</sup></i> , pBR322 ori, Amp <sup>r</sup>	Amersham Pharmacia Biotech
<b>pMal-c2</b>	pBR322 ori, P <sub>lac</sub> , <i>malE</i> , T <sub>rmB</sub> , Amp <sup>r</sup>	New England Biolabs
<b>pHIS3-NX</b>	<i>His3</i> , Amp <sup>r</sup> , pMB1 ori, P <sub>HIS3</sub>	Meijer y col., 1998

pMB1 y pBR322 ori: origen de replicación en *E. coli*. Amp<sup>r</sup>: resistencia a ampicilina. Kan<sup>r</sup>: resistencia a kanamicina. *lacZ* $\alpha$ : región 5' del gen *LacZ* que codifica para el fragmento  $\alpha$  de la  $\beta$ -galactosidasa. *malE*: gen de la proteína de unión a maltosa. *His3*: gen reportero en levadura. P<sub>HIS3</sub>: promotor mínimo del gen *his3* de levadura.

A continuación se detallan los plásmidos empleados en estudios de interacción proteína-ADN en *Saccharomyces cerevisiae*.

**Tabla 2:** Plásmidos empleados en levadura

Plásmido	Características relevantes	Origen/Referencia
<b>pGADT7</b>	Amp <sup>r</sup> , <i>LEU2</i> , <i>GAL4</i> <sub>(768-881)</sub> AD, P <sub>ADH1</sub> , T <sub>T7</sub> & ADH1, P <sub>T7</sub> , NLS SV40 T-antigen, c-Myc pUC ori y 2 $\mu$ ori	CLONTECH; Louret y col., 1997
<b>pGBKT7</b>	Kan <sup>r</sup> , <i>TRP1</i> , <i>GAL4</i> <sub>(1-147)</sub> BD, P <sub>ADH1</sub> (700 pb), T <sub>T7</sub> & ADH1, P <sub>T7</sub> , NLS SV40 T-antigen, c-Myc, pUC ori y 2 $\mu$ ori	CLONTECH; Louret y col., 1997
<b>pGAD424</b>	Amp <sup>r</sup> , <i>LEU2</i> , <i>GAL4</i> <sub>(768-881)</sub> AD, P <sub>ADH1</sub> (410 pb), T <sub>T7</sub> & ADH1, P <sub>T7</sub> , NLS SV40 T-antigen, c-Myc, pUC ori y 2 $\mu$ ori	CLONTECH; Bartel y col., 1993
<b>pGBT9</b>	Amp <sup>r</sup> , <i>TRP1</i> , <i>GAL4</i> <sub>(1-147)</sub> BD, P <sub>ADH1</sub> (410 pb), T <sub>T7</sub> & ADH1, P <sub>T7</sub> , NLS SV40 T-antigen, c-Myc, pUC ori y 2 $\mu$ ori	CLONTECH; Bartel y col., 1993
<b>pINT1</b>	Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , <i>APT1</i> , <i>PDC6</i> , pUC ori, T <sub>CYC1</sub>	Meijer y col., 1998
<b>pLacZi</b>	P <sub>CYC1</sub> , <i>lacZ</i> , <i>URA3</i> , Amp <sup>r</sup> , Col E1 ori, <i>URA3</i>	CLONTECH; Luo y col., 1996

Col E1 y pMB1 ori: origen de replicación en *E. coli*. Amp<sup>r</sup>: Resistencia a ampicilina. Kan<sup>r</sup>: Resistencia a kanamicina. *APT1*: Resistencia a G418 en levadura. *TRP1*, *LEU2* y *URA3*: marcadores de selección en levadura. *GAL4* BD: dominio de unión a DNA del activador transcripcional de levadura *GAL4*. *GAL4* AD: dominio de activación del activador transcripcional de levadura *GAL4*. P<sub>ADH1</sub>: promotor constitutivo *ADH1* para la expresión de la fusión proteica. P<sub>T7</sub>: promotor para transcripción y traducción *in vitro*. T<sub>T7</sub> & ADH1: señal de terminación de la transcripción. C-Myc: epítipo tag para la inmunoprecipitación de las fusiones proteicas. 2  $\mu$  ori: origen de replicación en *S. cerevisiae*. NLS SV40 T-antigen: señal de localización nuclear del antígeno T del virus SV40. P<sub>CYC1</sub>: promotor mínimo del gen de citocromo *c* de levadura. *PDC6*: locus para integración en el genoma de levadura.

### 3.3 MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS

#### 3.3.1 Medios de cultivo para *Escherichia coli*

##### Medio LB (Luria-Bertani)

Peptona de carne	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
NaCl	10 g/l

### 3.3.2 Medios de cultivo para *Saccharomyces cerevisiae*

#### MEDIO YPAD

Peptona de carne	20 g/l
Extracto de levadura	10 g/l
Glucosa	20 g/l
Adenina (sulfato)	0.02g/l

#### MEDIO MÍNIMO

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 g/l
Glucosa	20 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g/l
MgSO <sub>4</sub>	0.5 g/l
NaCl	0.1 g/l
CaCl <sub>2</sub>	0.1 g/l
Inositol	0.1 g/l
Piridoxina HCl	1mg/l
Ac. Nicotínico	1 mg/l
Tiamina HCl	10 mg/l

En función de las auxotrofías de las cepas de *S. cerevisiae* empleadas y las transformantes a seleccionar en cada caso, el medio mínimo fue suplementado con las siguientes concentraciones finales de aminoácidos y bases:

Adenina (sulfato)	40 mg/l
Uracilo	20 mg/l
L-Histidina	20 mg/l
Triptofano	40 mg/l
L-Leucina	57 mg/l

Para los medios sólidos se adicionó agar como agente solidificante a una concentración final de 15 g/l.

### 3.4 OLIGONUCLEÓTIDOS EMPLEADOS COMO CEBADORES EN REACCIONES DE PCR, DETERMINACIÓN DE SECUENCIA Y MUTAGÉNESIS

**Tabla 3:** Secuencia de los oligonucleótidos empleados como cebadores. En negrita se muestran los sitios de restricción y con verde los nucleótidos que no hibridan con el molde original.

NOMBRE	SECUENCIA (5' → 3')	USO
R1	GAT <b>GAA GCT</b> TCC TGG ACA AT	Amplificación de ciclos de SELEX
R2	CAG <b>AAT TCT</b> TCA GTG ACT GC	Amplificación de ciclos de SELEX
R2'	CAG <b>AAT TCT</b> ACA GTG GCT GC	Amplificación de ciclos de SELEX
P-40	GTT TTC CCA GTC ACG AC	Cebador universal forward
PRLAR	AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA	Cebador universal reverse
PGEX1	GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG	Secuenciación en pGEX-3X
PGEX2	CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GG	Secuenciación en pGEX-3X
ATH11	GGC <b>GGA TCC</b> AGC AGC TGA AAC GAA AGA	Clonado de ATH1 <sub>HD</sub>
ATH12	GGC <b>GAA TTC</b> CAA AGT TGG TAA ACA CAA T	Clonado de ATH1 <sub>HD</sub>
V54KF	TAT AAA TGC TCG <b>GAA AAG</b> GCT ATG G	Mutante ATH1 <sub>HD</sub> -V54K
V54KR	CCA TAG CCT <b>TTT</b> CCG AGC ATT TAT A	Mutante ATH1 <sub>HD</sub> -V54K
STM1	CCG <b>GGA TCC</b> TAG GGA GCC TCA AGC AAG	Clonado de STM <sub>HD</sub>
STM2	GGC <b>GAA TTC</b> TCA AAG CAT GGT GGA GGA	Clonado de STM <sub>HD</sub>
K54VF	TAA ACC <b>ARA GGG TGC</b> GGC <b>AYT</b> GGA	Mutante STM <sub>HD</sub> -K54V
K54VR	TCC <b>ART</b> GCC <b>GCA CCC</b> TYT GGT TTA	Mutante STM <sub>HD</sub> -K54V
STM-N	CCG <b>GGA TCC</b> AGA GTG GTT CCA ACA GCA	Clonado de STM
BH-R55KF	GCG AGA GTT AAA CTA TGG AAA C	Mutante BLH3-R55K
BH-R55KR	GTT TCC ATA GTT TAA CTC TCG C	Mutante BLH3-R55K
SM-R55KF	ACC AGA <b>GAA AAA AGC ACT</b> GGA AG	Mutante STM-R55K
SM-R55KR	CTT CCA <b>GTG CTT</b> TTT <b>TCT</b> CTG GT	Mutante STM-R55K
BEL1	GGC <b>GAA TTC</b> GCA AGA GAT CAG TTC T	Clonado de BEL1
BEL2	GGC <b>CTG CAG</b> TTT AAT CTC AAA CAA TAT CAT	Clonado de BEL1
ATH-N	GCC <b>GAA TTC</b> GAC AAC AAC AAC AAC	Clonado de ATH1
HAT31-1	GGC <b>GGA TCC</b> ATG GTG GTT CTG GTG AAA T	Clonado de HAT3.1 <sub>HD</sub>
HAT31-2	GGC <b>GAA TTC</b> TGA TTG AAT CTA AAG TCT AC	Clonado de HAT3.1 <sub>HD</sub>
H51NF	C TGG TTT AAG <b>AAT</b> AGG CGT TGG	Mutante HAT3.1 <sub>HD</sub> -H51N
H51NR	CCA ACG CCT <b>ATT</b> CTT AAA CCA G	Mutante HAT3.1 <sub>HD</sub> -H51N
H51AF	C TGG TTT AAG <b>GCT</b> AGG CGT TGG	Mutante HAT3.1 <sub>HD</sub> -H51A
H51AR	CCA ACG CCT <b>AGC</b> CTT AAA CCA G	Mutante HAT3.1 <sub>HD</sub> -H51A
K50QF	T AAC TGG TTT <b>CAG</b> CAT AGG CGT	Mutante HAT3.1 <sub>HD</sub> -K50Q
K50QR	ACG CCT ATG <b>CTG</b> AAA CCA GTT A	Mutante HAT3.1 <sub>HD</sub> -K50Q
K50AF	T AAC TGG TTT <b>GCA</b> CAT AGG CGT TG	Mutante HAT3.1 <sub>HD</sub> -K50A
K50AR	CA ACG CCT ATG <b>TGC</b> AAA CCA GTT A	Mutante HAT3.1 <sub>HD</sub> -K50A
N47AF	CAA GTT AAT <b>GCC</b> TGG TTT AAG	Mutante HAT3.1 <sub>HD</sub> -N47A
N47AR	CTT AAA CCA <b>GGC</b> ATT AAC TTG	Mutante HAT3.1 <sub>HD</sub> -N47A
N47VF	CAA GTT AAT <b>GTC</b> TGG TTT AAG	Mutante HAT3.1 <sub>HD</sub> -N47V
N47VR	CTT AAA CCA <b>GAC</b> ATT AAC TTG	Mutante HAT3.1 <sub>HD</sub> -N47V
W54AF	G CAT AGG CGT <b>GCG</b> TCG ATA AAC	Mutante HAT3.1 <sub>HD</sub> -W54A
W54AR	GTT TAT CGA <b>GCG</b> ACG CCT ATG C	Mutante HAT3.1 <sub>HD</sub> -W54A

### 3.5 OLIGONUCLEÓTIDOS SINTÉTICOS DOBLE HEBRA EMPLEADOS EN ENSAYOS DE RETARDO EN GELES

**Tabla 4:** Secuencia de los oligonucleótidos doble hebra empleados. Los nucleótidos que difieren de la secuencia de unión (en negrita) de los oligonucleótidos BSC y BS se muestran en rojo.

NOMBRE	SECUENCIA (5' → 3')	
BSC	5' AATTCAGATCTTGT <b>AGACAGA</b> AAGAG 3'	3' GTCTAGAACACTGTCTTCTCCTAGG 5'
BS(-1)	5' AATTCAGATCTT <b>C</b> TGACAGAAGAG 3'	3' GTCTAGAA <b>G</b> ACTGTCTTCTCCTAGG 5'
BS1	5' AATTCAGATCTT <b>AG</b> ACTGAAGAG 3'	3' GTCTAGAAC <b>T</b> CTGACTTCTCCTAGG 5'
BS2	5' AATTCAGATCTTGT <b>A</b> ACAGAAGAG 3'	3' GTCTAGAACA <b>T</b> TGTCTTCTCCTAGG 5'
BS3	5' AATTCAGATCTTGT <b>G</b> CAGAAGAG 3'	3' GTCTAGAACACT <b>T</b> GTCTTCTCCTAGG 5'
BS4A	5' AATTCAGATCTTGTGA <b>A</b> AGAAGAG 3'	3' GTCTAGAACACT <b>T</b> TCTTCTCCTAGG 5'
BS4G	5' AATTCAGATCTTGTGA <b>G</b> AGAAGAG 3'	3' GTCTAGAACACT <b>C</b> TCTTCTCCTAGG 5'
BS5,6	5' AATTCAGATCTTGTGAC <b>CCA</b> AAGAG 3'	3' GTCTAGAACACTG <b>GG</b> TCTCCTAGG 5'
BS2	5' AATTCAGATCT <b>TGACTTGACAGG</b> TAGAG 3'	3' GTCTAGAACTGAACTGTCCATCTCCTAGG 5'
BS	5' AATTCGCT <b>TGCACCATCTAAACC</b> ATTG 3'	3' GCGACGTGGTAGATTTGGTAACCTAGG 5'
BS-1	5' AATTCGCTGCACCATC <b>G</b> AAACCATTG 3'	3' GCGACGTGGTAG <b>C</b> TTTGGTAACCTAGG 5'
BS-4	5' AATTCGCTGCACCATCTAA <b>T</b> CCATTG 3'	3' GCGACGTGGTAGAT <b>TAG</b> GTAACCTAGG 5'
BS-5	5' AATTCGCTGCACCATCTAAA <b>G</b> CATTG 3'	3' GCGACGTGGTAGATTT <b>C</b> GTAACCTAGG 5'
BS-6	5' AATTCGCTGCACCATCTAAAC <b>G</b> ATTG 3'	3' GCGACGTGGTAGATTT <b>G</b> CTAACCTAGG 5'
BS-7	5' AATTCGCTGCACCATCTAAACC <b>T</b> TTG 3'	3' GCGACGTGGTAGATTT <b>GGA</b> ACCTAGG 5'
BS-8	5' AATTCGCTGCAT <b>TA</b> ATCTAAACCATTG 3'	3' GCGACGT <b>AT</b> TAGATTTGGTAACCTAGG 5'
BS-9	5' AATTCGCTGCACCATCTAAA <b>TA</b> ATTG 3'	3' GCGACGTGGTAGATTT <b>AT</b> TAACCTAGG 5'

### 3.6 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 50-100  $\mu$ l, en solución Tris-HCl (pH 9 a 25°C) 10 mM, KCl 50 mM, Tritón X-100 0,1%, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, 0,2 mM de cada dNTP, 400 ng de cada oligonucleótido cebador, ADN molde y 2-5 U de ADN polimerasa termoestable. Cuando se amplificaron secuencias para la obtención de proteínas recombinantes, se empleó la polimerasa *Pfu*, en tanto que para los demás casos se usó la

enzima *Taq* polimerasa. Las mezclas se cubrieron con aceite mineral para evitar la evaporación por calentamiento y se sometieron al programa de amplificación correspondiente.

Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador *PT-100™* (MJ Research, Inc.) utilizando los programas apropiados para cada caso y en donde la temperatura de hibridación se estableció de acuerdo a la secuencia de los oligonucleótidos utilizados y el perfil de cada ciclo se ajustó a las características de cada reacción.

### **3.7 ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

#### **3.7.1 Electroforesis en geles de agarosa**

Se utilizó la técnica de electroforesis en geles de agarosa de tipo submarino de acuerdo a lo descrito por Sambrook y col. (1989). La concentración de agarosa utilizada varió entre 0,7 y 2% (P/V) de acuerdo con el tamaño de los fragmentos analizados. Los geles fueron preparados en solución TAE 1X [Tris-acetato (pH 8) 40 mM, EDTA (pH 8) 1 mM]. Las muestras se sembraron con 0,1 volumen de solución de siembra de ácidos nucleicos [azul de bromofenol 0,25% (P/V), xilencianol 0,25% (P/V), glicerol 30% (V/V)] y éstos se visualizaron por tinción con bromuro de etidio 0,3 µg/ml. Las corridas electroforéticas se realizaron en solución TAE 1X a un voltaje constante de 5 V/cm hasta lograr una adecuada separación de los colorantes. Como marcador de tamaño de los fragmentos de ADN se utilizó el bacteriófago  $\lambda$  digerido con la enzima de restricción *HindIII* que genera fragmentos de 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 y 125 pb. Para la visualización de los geles se utilizó un transiluminador de luz UV ( $\lambda=310$  nm). El registro de los geles se llevó a cabo empleando un sistema de captura de imágenes (UVP Lab. Prod.).

#### **3.7.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes**

La separación de fragmentos de ADN de bajo peso molecular (20-150 pb) se llevó a cabo en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes verticales. Los geles se prepararon con una relación en peso de acrilamida:bis-acrilamida de 38:2, a una concentración final de acrilamida de entre 10 y 15% (P/V) dependiendo de las muestras a analizar, en solución TBE 0,5X [Tris-HCl (pH 8) 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA (pH 8,0) 10 mM]. Las soluciones de

ácidos nucleicos se sembraron como se describió en el punto anterior. La corrida electroforética se realizó en TBE 0,5X a un voltaje constante de 10 V/cm de gel hasta lograr la separación deseada de los colorantes. Para la visualización de los fragmentos de ADN, los geles fueron sumergidos durante 15 min en TBE 1X adicionado de bromuro de etidio 0,3 µg/ml, y posteriormente se observaron sobre un transiluminador de radiación UV.

### **3.8 PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN DE GELES DE AGAROSA**

Para purificar fragmentos de ADN provenientes de reacciones de PCR o de digestión, se emplearon geles de agarosa de bajo punto de fusión. La concentración de agarosa en cada caso dependió de los tamaños de los fragmentos a separar. Para la corrida electroforética se aplicó la metodología descrita en el punto 3.7.1. Una vez identificadas mediante visualización sobre transiluminador UV, las bandas correspondientes a los fragmentos de interés se escindieron e incubaron con 1-2 volúmenes de agua destilada estéril en un baño de agua a 65°C, hasta observar la completa disolución de la agarosa. Posteriormente se llevaron a cabo 2 extracciones sucesivas con 1 volumen de fenol y a continuación una extracción con 1 volumen de cloroformo. El ADN presente en la fase acuosa fue precipitado mediante el agregado de 0,1 volumen de acetato de sodio 3 M (pH 5,2) y 2 volúmenes de etanol absoluto. En algunos casos, para facilitar la precipitación de fragmentos de bajo peso molecular, se adicionó 1 µg de ARN<sub>t</sub> (Sigma). El ADN purificado se resuspendió en agua destilada estéril y se conservó a –20°C hasta el momento de su empleo.

Cuando se requirió un grado especial de pureza del ADN, se empleó para su aislamiento a partir de geles de agarosa el equipo comercial *GFX<sup>®</sup> PCR DNA and Gel Band Purification* (Amersham Pharmacia Biotech Inc.), según las especificaciones de su fabricante.

### **3.9 DIGESTIÓN DE ADN CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN**

Para la digestión del ADN con enzimas de restricción, se emplearon las condiciones de reacción indicadas por los proveedores de cada enzima en particular. En todos los casos fueron utilizadas de 1 a 5 U de enzima por cada microgramo de ADN, en un volumen final que varió entre 20 y 50 µl, dependiendo de la cantidad de ADN a digerir.

### 3.10 REACCIONES DE DESFOSFORILACIÓN Y LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN

Cuando se debieron realizar clonados en un único sitio de restricción, se procedió previamente a la desfosforilación de los extremos 5' de los vectores a ligar. Para esto se empleó la enzima fosfatasa alcalina intestinal, CIP (New England Biolabs). En todos los casos la reacción se llevó a cabo a 37°C durante 30 min en la misma solución usada para la digestión del plásmido, con 0,5 U de enzima.

La ligación de los fragmentos de ADN se llevó a cabo utilizando 1 U de T4 ADN ligasa (Promega), en un volumen de 10 µl, y empleando la solución de reacción provista por el fabricante de la enzima. Se utilizaron cantidades de inserto y vector tales que la relación molar entre ambos fuera de 5 a 1 respectivamente. La incubación se realizó a 4°C durante 16 h.

### 3.11 TRANSFORMACIÓN DE *Escherichia coli* CON ADN PLASMÍDICO

#### 3.11.1 Método del CaCl<sub>2</sub>

La transformación de células de *Escherichia coli* por el procedimiento del CaCl<sub>2</sub> (Kushner, 1978) se llevó a cabo básicamente según se describe en Sambrook y col. (1982). Se cultivaron células de la cepa correspondiente en cada caso, en medio LB con agitación a 37°C hasta saturación del cultivo. Se realizó una dilución 1/100 de este cultivo en medio LB fresco y se creció hasta una DO<sub>600</sub> de 0,4. Una vez alcanzado este grado de crecimiento, las células se cosecharon por centrifugación durante 5 min a 4000 x g, 4°C, y se resuspendieron en 500 µl de solución I de transformación [MOPS (pH 7,0) 10 mM, KCl 10 mM]. Posteriormente las células fueron centrifugadas a 4°C durante 5 min a 4000 x g y el sedimento fue resuspendido en 500 µl de solución II de transformación [MOPS (pH 6,5) 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 50 mM, KCl 10 mM]. Luego de incubarse en hielo durante 15 min y centrifugarse 5 min a 4000 x g, las células fueron resuspendidas en 100 µl de la misma solución. A estas células, ya competentes, se les agregó el producto de la ligación (en un volumen no mayor a 5 µl), y la mezcla se incubó en hielo durante 1 h. Posteriormente, la mezcla se sometió a un golpe térmico por incubación a 42°C durante un minuto, e inmediatamente después se le agregó 1 ml de LB y se incubó 1 h a 37°C. Las células fueron recolectadas por centrifugación a 4000 x g durante 5 min y resuspendidas en 100 µl de LB. Luego se sembraron en placas de Petri con medio base LB-agar en presencia

del marcador de selección correspondiente y además X-gal 0,006% (P/V) e IPTG 0,3 mM en aquellos casos donde el vector utilizado posee el sitio múltiple de clonado interrumpiendo la secuencia codificante para la  $\beta$ -galactosidasa. Las placas de Petri se incubaron 16 h a 37°C.

### **3.11.2 Electrotransformación**

La preparación de las células competentes y las condiciones de electroporación empleadas fueron las recomendadas en el manual del fabricante del equipo (*Gene Pulser™*, Bio-Rad Laboratories Inc., USA).

El choque eléctrico se realizó en cubetas de 0,1 cm de separación entre los electrodos (Bio-Rad). Inmediatamente después del disparo se adicionó 1 ml de medio LB a la suspensión de células y se las incubó durante 1 h a 37°C. Después de centrifugar a 4000 x g durante 5 min, el sedimento celular se resuspendió en 100  $\mu$ l de medio LB y una alícuota (50  $\mu$ l) se sembró en placas de Petri con medio LB-agar como se describe en el punto anterior. Las placas de Petri se incubaron 16 h a 37°C.

### **3.12 TRANSFORMACIÓN DE *Saccharomyces cerevisiae* EN PRESENCIA DE ACETATO DE LITIO**

Las transformaciones de levaduras se realizaron según el método descrito por Gietz y col. (1992) con algunas modificaciones tomadas de Ausubel y col. (1987).

Las levaduras se cultivaron en 20 ml de medio líquido YPAD durante toda la noche a 30°C con agitación. Posteriormente se diluyó el cultivo en 300 ml de medio fresco y se dejó crecer en las mismas condiciones hasta  $DO_{600} = 0,25-0,5$ . Las células se cosecharon por centrifugación a 2500 x g durante 2 min a 20°C, y el precipitado celular se lavó con 50 ml de agua estéril. Luego de centrifugar las células nuevamente se las resuspendió en 1 ml de una solución de TE/LiAc [TE 1X, LiAc 100 mM (pH 7,5)], preparada a partir de soluciones madres 10X. A continuación se realizó una centrifugación a 12000 rpm, 30 segundos y el precipitado se resuspendió en 250  $\mu$ l de solución TE/LiAc. Para cada transformación se emplearon 50  $\mu$ l de células competentes que se incubaron con un volumen no mayor a 10  $\mu$ l del ADN correspondiente y 300  $\mu$ l de solución PEG 40%/TE 1X/LiAc 100 mM, durante 30 min a 30°C

con agitación. Posteriormente las células se sometieron a 42°C durante 15 min e inmediatamente se las centrifugó a 12000 x g durante 30 segundos. El sedimento celular se lavó con 200 µl de solución TE 1X estéril y se resuspendió en 100 µl de TE para ser sembrado en placas de Petri que contenían el medio de cultivo mínimo adicionado de los aminoácidos y bases correspondientes.

Cuando se transformaron las levaduras con construcciones que debían integrarse en el genoma se utilizó el procedimiento descrito por Meijer y col. (1998). Luego del tratamiento a 42°C las células se resuspendieron en 1 ml de medio YPAD y se transfirieron a tubos de 10-15 ml estériles para ser incubadas entre 3 a 6 horas a 30°C con agitación. Luego de este paso de recuperación, se centrifugó a 12000 x g durante 30 segundos. Las células se resuspendieron en 100 µl de TE y se sembraron en placas de Petri que contenían el medio de cultivo correspondiente.

### **3.13 HIBRIDACIÓN EN COLONIA**

Las colonias obtenidas en los experimentos de transformación se repicaron por duplicado en placas con grillas numeradas, que contenían medio LB agar suplementado con ampicilina (100 µg/ml). Se las incubó 16 h a 37°C, una de ellas se guardó a 4°C y sobre la otra se colocó una membrana de nylon *Hybond-N* (Amersham Pharmacia Biotech Inc.). Una vez que la membrana se hidrató completamente, se realizaron marcas asimétricas que permitieron luego identificar las colonias con exactitud.

La membrana (con la superficie que contenía las colonias hacia arriba) se dejó secar sobre un papel de filtro. Luego se la incubó sobre papeles de filtro saturados con solución de desnaturalización [NaOH 0,2 N, NaCl 1,5 M], de neutralización [Tris-HCl (pH 7,5) 0,4 N, SSC 2X (NaCl 0,3 M, citrato de sodio 0,03 M)], y SSC 2X, durante 1 min en cada solución. Una vez seca la membrana, el ADN plasmídico presente en las colonias se fijó por exposición a luz UV (310 nm) durante 3-5 min. La membrana se hibridó con la sonda adecuada y se analizó según el protocolo descrito en el punto 3.13.2.

### 3.13.1 Marcación radioactiva de sondas de ADN

La marcación de ADN doble hebra se realizó utilizando el método de cebado al azar (Feinberg y Vogelstein, 1983). Para la desnaturalización del ADN doble hebra, se incubaron aproximadamente 100 ng de ADN en un volumen de 35  $\mu$ l de agua durante 3 min a 100°C, seguido de transferencia a hielo. Se agregaron 10  $\mu$ l de solución OLB [Tris-HCl (pH 8,0) 0,25 M, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, HEPES (pH 6,6) 1 M, dCTP, dGTP, dTTP 1 mM c/u,  $\beta$ -mercaptoetanol 65 mM, hexanucleótidos de secuencia al azar (dN6)], 2  $\mu$ l de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma) 10 mg/ml, 20  $\mu$ Ci de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP (3000Ci/mmol) y 2 U del fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* (Promega, Madison, WI, USA). La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente entre 3 y 15 h, se diluyó en 200  $\mu$ l finales de agua y se filtró a través de una columna de Sephadex G-50 según el método de Penefsky descrito por Ausubel y col. (1987), para eliminar el exceso de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP no incorporado. La sonda purificada (actividad específica de aproximadamente 10<sup>8</sup> cpm/ $\mu$ g), fue desnaturalizada a 100°C durante 3 min, transferida inmediatamente a hielo y diluida en una cantidad adecuada de solución de prehibridación [SSC 6X, polivinilpirrolidona 0,1% (P/V), Ficoll 0,1% (P/V), BSA 0,1% (P/V), SDS 0,5% (P/V)].

### 3.13.2 Hibridación de membranas de nylon

La membrana a la cual se fijaron los ácidos nucleicos se prehibridó 2-4 horas a 65°C en solución de prehibridación. La hibridación se realizó durante toda la noche en las mismas condiciones que la prehibridación, utilizando la sonda correspondiente cuya preparación se detalla en el punto anterior. Luego, la membrana se lavó durante 15 min a 65°C con SSC 2X y SDS 0,1% (P/V). Este procedimiento se repitió 2 veces más. Una vez que la membrana se secó, se cubrió con papel de nylon y se expuso a placa radiográfica (Kodak MXG/Plus) con pantalla intensificadora a -80°C durante tiempos variables según la intensidad de la señal.

### 3.14 PREPARACIÓN DE ADN PLASMÍDICO

#### 3.14.1 Preparación de ADN plasmídico de *Escherichia coli*.

La preparación de ADN plasmídico de *Escherichia coli* se realizó de acuerdo al método de lisis alcalina de Birnboim y Dolly (1979) descrito en Sambrook y col. (1989).

Un volumen de 1,5 ml de un cultivo saturado de células cultivadas en presencia del antibiótico correspondiente, se centrifugó durante 5 min a 4000 x g. El sedimento celular se resuspendió en 100 µl de solución GTE [glucosa 50 mM, Tris-HCl (pH 8,0) 25 mM, EDTA (pH 8,0) 10 mM] y se incubó 5 min en hielo. Luego se agregaron 200 µl de una solución de lisis compuesta por NaOH 0,2 N y SDS 1% (P/V) y la suspensión se incubó en hielo durante 5 min. Finalmente se neutralizó con 150 µl de acetato de potasio 5 M (pH 4,8) y, después de incubarse 5 min en hielo, las células lisadas se centrifugaron 15 min a 10000 x g. El sobrenadante fue recuperado y tratado con fenol/cloroformo. A la fase acuosa se le realizó una precipitación alcohólica y el precipitado se resuspendió en 30 µl de una solución de ARNasa 50 µg/ml.

Para las preparaciones de plásmidos a ser usados en reacciones de determinación de secuencia se empleó el equipo comercial de minipreparación de ADN plasmídico *Wizard Minipreps* (Promega), de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

#### 3.14.2 Preparación de ADN plasmídico de *Saccharomyces cerevisiae*.

La preparación de ADN plasmídico de levadura se realizó en base a los métodos descritos por Hoffman y Winston (1987) y Kaiser y Auer (1993).

Se inocularon 3 ml de medio de cultivo selectivo con una colonia de levadura y se incubó a 30°C con agitación durante 16 horas. Luego de centrifugar 30 segundos a 12000 x g, las células se resuspendieron en 200 µl de solución de lisis [Tritón X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) y EDTA 1 mM]. Se agregaron 200 µl de fenol/cloroformo [fenol 50% (pH 8,0) y cloroformo 50%] y 100 mg de esferas de vidrio (212-300 µm de diámetro) estériles. A continuación, se agitó en vortex durante 2 min y se centrifugó a 12000 x g durante 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo para precipitar el

ADN por agregado de 1 ml de etanol absoluto. Se centrifugó a 12000 x g, 30 min, se lavó el precipitado con etanol 70% y se lo resuspendió en 20 µl de una solución de ARNasa 50 µg/ml.

Generalmente el ADN plasmídico aislado por este procedimiento es escaso y está contaminado con ADN genómico. En consecuencia no es adecuado para ensayos de restricción o secuenciación, pero puede ser utilizado en reacciones de PCR.

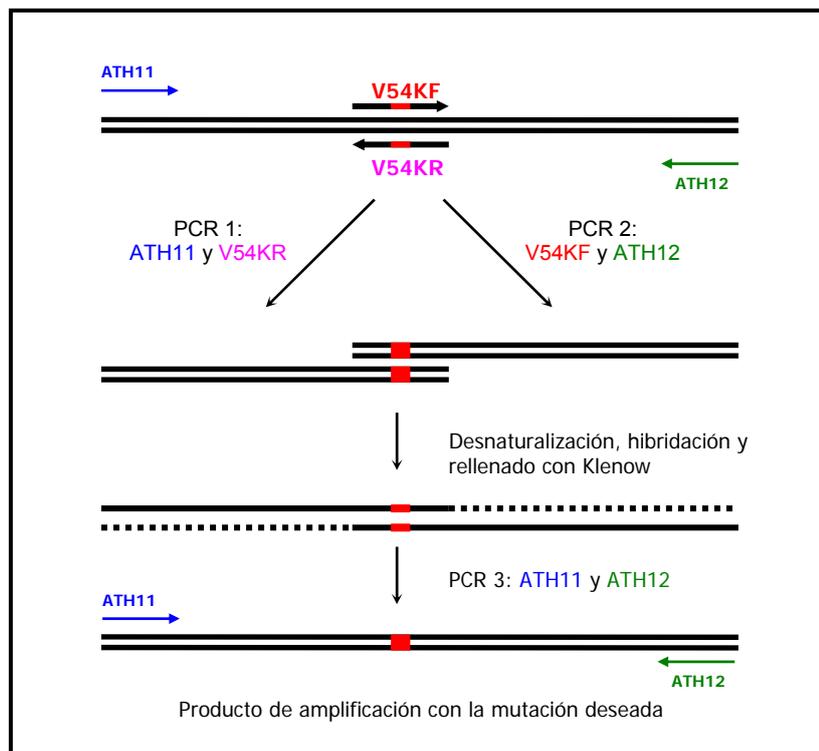
### 3.15 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN *Escherichia coli*

Para la expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*, se utilizaron los plásmidos **pGEX-3X** (Amersham Pharmacia Biotech) y **pMal-c2** (New England Biolabs). Estos vectores permiten la obtención de las proteínas de interés como productos de fusión con la proteína glutatión S-transferasa de *Schistosoma japonicum* y con la proteína de unión a maltosa de *E. coli*, respectivamente. Este hecho favorece la solubilidad de las proteínas recombinantes y brinda la posibilidad de purificarlas por cromatografía de afinidad empleando columnas de glutatión-agarosa o de amilosa-agarosa según la proteína de fusión presente. Por otra parte, el vector pMAL-c2 posee el sitio de múltiple clonado entre los genes *malE* y *lacZα*. En consecuencia, la inserción de la secuencia de interés interrumpe la fusión *malE-lacZα* y permite seleccionar los plásmidos que han recibido el inserto por pérdida de  $\alpha$ -complementación.

#### 3.15.1 Clonado y mutagénesis de proteínas recombinantes fusionadas a glutatión S-transferasa (GST)

Para el clonado de las distintas proteínas como productos de fusión a GST, se recurrió a una estrategia de PCR con cebadores específicos que incorporan los sitios de restricción *Bam*HI y *Eco*RI a los fragmentos amplificados, a fin de lograr la introducción de los insertos en fase en el vector pGEX-3X. Para cada construcción se llevaron a cabo reacciones de amplificación con la enzima *Pfu*II como se explica en los capítulos correspondientes de la sección Resultados y Discusión y se emplearon los oligonucleótidos cuya secuencia se detalla en la tabla 3.

Las proteínas mutantes se obtuvieron mediante el método de mutagénesis por PCR con 4 cebadores descrito por Silver y col. (1995). En la Figura 6 se esquematiza esta estrategia para la construcción de la proteína **ATH1<sub>HD</sub>-V54K** para el reemplazo del aminoácido valina de la posición 54 del HD por lisina.



**Figura 6.** Esquema de la estrategia de mutagénesis sitio-dirigida empleada para la obtención de la proteína recombinante **ATH1<sub>HD</sub>-V54K**. En rojo se indica la mutación puntual.

Resumidamente, los productos de las PCR 1 y 2 se aislaron de geles de agarosa de bajo punto de fusión, se mezclaron y se desnaturalizaron por calentamiento a 94°C durante 5 min, en la solución de reacción de la enzima Klenow provista por el fabricante (Promega). Se dejó bajar la temperatura lentamente para favorecer la hibridación. Cuando se llegó a 37°C, se agregaron dNTPs hasta una concentración final de 1 mM c/u, se agregaron 2 U de Klenow y se incubó a 37°C durante una hora. Un décimo de este producto fue empleado como molde en la reacción de PCR 3 con los cebadores ATH11 y ATH12, que hibridan en los extremos de la construcción completa e incorporan los sitios de restricción *Bam*HI y *Eco*RI. A continuación, el fragmento amplificado se aisló de geles de agarosa de bajo punto de fusión y se clonó en los mismos sitios del vector pGEX-3X (Amersham Pharmacia Biotech).

En todos los casos, la presencia del inserto esperado en los clones resultantes se comprobó mediante análisis de los productos de digestión con las enzimas indicadas y, posteriormente, por determinación de la secuencia de ADN.

El resto de las mutantes puntuales clonadas en el vector pGEX-3X empleadas en esta tesis (**STM<sub>HD</sub>-K54V**; **STM R55K**; **HAT3.1<sub>HD</sub>-K50Q**, **K50A**, **N47V**, **N47A**, **H51A**, **H51N** y **W54A**) se obtuvo siguiendo la misma estrategia. Los cebadores usados para cada caso se indican en la tabla 3 de esta sección.

### 3.15.2 Clonado y mutagénesis de las proteínas recombinantes fusionadas a la proteína de unión a maltosa (MBP)

Los fragmentos de ADN codificantes para las proteínas BEL1, BLH3, MID-BLH3, y BLH3-R55K, se clonaron en el vector pMal-c2 (New England Biolabs), a fin de lograr su expresión como proteínas de fusión con la proteína de unión a maltosa de *Escherichia coli* (MBP). Esta fusión favorece la solubilidad de la proteína clonada y posibilita su purificación por cromatografía de afinidad en columnas de amilosa-agarosa (New England Biolabs).

Para efectuar el clonado de la región codificante para **BLH3** se realizó una digestión del ADN del clon RAFL08-17-K12 (Seki y col., 2002) en los sitios de restricción *Bgl*II y *Bam*HI. El inserto obtenido se ligó al vector pUC119 digerido en el sitio *Bam*HI. El clon resultante fue empleado a continuación para ligar el inserto en los sitios *Eco*RI y *Bam*HI del plásmido pMAL-c2, en fase con la MBP.

Para la construcción de la mutante **BLH3-R55K** se empleó un protocolo similar al utilizado para la construcción de las proteínas mutantes clonadas en pGEX-3X (esquemático en la Figura 6). Para esta mutante se realizó una reacción de amplificación utilizando como molde el clon en pUC119 de BLH3 y los pares de cebadores P-40/BH-R55KR y PRLAR/BH-R55KF (tabla 3).

Para llevar a cabo el clonado de la proteína **BEL1** se empleó la estrategia de PCR descrita en la sección anterior, 3.15.2, pero utilizando como cebadores oligonucleótidos que incorporan los sitios de restricción *Eco*RI y *Pst*I para el adecuado clonado en el vector de expresión (descritos en la tabla 3). De manera similar, se amplificó la región codificante para los dominios M1 y M2 de BLH3 (**MID-BLH3**) con los cebadores P-40 y MID empleando como

molde el clon de la proteína nativa en el vector pUC119. El producto obtenido se ligó al plásmido pMAL-c2 en los sitios *EcoRI* y *PstI*.

En todos los casos, los productos de PCR fueron purificados a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión. Las colonias transformantes de *E. coli* (cepa DH5 $\alpha$  o JM109, según el caso) se eligieron por diferenciación entre colonias blancas y azules ( $\alpha$ -complementación de la actividad beta-galactosidasa de la cepa de origen). La presencia del inserto se comprobó mediante análisis de los productos de digestión con las enzimas indicadas más arriba y, posteriormente, se realizaron reacciones de secuenciación de ADN para comprobar la secuencia de los clones obtenidos.

### 3.16 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN *E. coli*

La expresión de las proteínas recombinantes fusionadas a GST se llevó a cabo teniendo en cuenta las indicaciones del fabricante del sistema pGEX (Amersham Pharmacia Biotech).

Un cultivo saturado de células que contenían el clon de interés se diluyó en una proporción de 1/100 en un volumen final de 100 ml de LB con ampicilina 100  $\mu$ g/ml y se dejó crecer entre dos y tres horas a 37°C con agitación continua, en un agitador orbital a 180 rpm. Una vez que se alcanzó una DO<sub>600</sub> de 0,8, se indujo la expresión de las proteínas recombinantes por el agregado de IPTG a una concentración final de 0,5 mM. El cultivo se incubó durante tres horas a 28 ó 37°C, de acuerdo a las construcciones empleadas, con agitación. Posteriormente las células se cosecharon por centrifugación a 5000 x g y se lavaron con solución TE 1X [Tris-HCl (pH 8,0) 40 mM, EDTA 1 mM]. Después de centrifugar en las mismas condiciones anteriores, el sedimento celular fue resuspendido en 10 ml de TE (1/10 volúmenes con respecto al volumen de medio de cultivo procesado) con el agregado del inhibidor de proteasas PMSF, a una concentración final de 1 mM. Las células se rompieron con tres pulsos de 10 s de ultrasonido, en un procesador ultrasónico de alta intensidad (Vibra-cell<sup>TM</sup> VCX-600, Sonics & Materials). Posteriormente se separó la fracción soluble de la insoluble por centrifugación a 10000 x g durante 10 min a 4°C.

Cuando se realizó la expresión de las proteínas recombinantes fusionadas a la proteína de unión a maltosa (MBP) se usó solución amortiguadora de columna de amilosa [Tris-HCl (pH

7,4) 10 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM] para la resuspensión de los precipitados celulares, de acuerdo a lo recomendado por los fabricantes del sistema pMal (New England Biolabs).

### 3.16.1 Purificación de las proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST)

La purificación de las proteínas recombinantes expresadas en *E. coli* como productos de fusión con la enzima GST de *Schistosoma japonicum* fue llevada a cabo según el método desarrollado por Smith y Johnson (1988), con modificaciones descritas por Palena y col. (1998).

El extracto proteico soluble obtenido se incubó en una columna de glutatión-agarosa (Sigma), previamente equilibrada en solución PBS 1X (pH 7,3) [NaCl 150 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 16 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM]. Se emplearon aproximadamente 500  $\mu$ l de una matriz de agarosa unida a glutatión para un volumen de medio de cultivo de partida de 100 ml. El extracto proteico se hizo recircular por la columna mantenida a 4°C entre tres a cinco veces. Luego se lavó la columna con tres volúmenes de solución PBS y un volumen de Tris-HCl 50 mM (pH 8,0). Para la elución de la proteína unida a la glutatión-agarosa se empleó una solución de glutatión reducido (GSH) 10 mM en Tris-HCl 50 mM (pH 8,0).

### 3.16.2 Purificación de las proteínas de fusión con la proteína de unión a maltosa (MBP)

El extracto proteico soluble obtenido se incubó con 500  $\mu$ l de una matriz de agarosa unida a amilosa (New England Biolabs) durante dos a cuatro horas con agitación suave a 4°C. La mezcla se vertió en una columna y se lavó varias veces con solución amortiguadora de columna de amilosa. Para realizar la elución se empleó maltosa 20 mM en la misma solución.

En todos los casos, la pureza y concentración proteica de las alícuotas obtenidas fueron estimadas en geles de poliacrilamida con SDS y tinción con azul de Coomassie, como se describe en el punto 3.17.

### **3.16.3 Corte de las proteínas fusionadas a glutatión S-transferasa y a la proteína de unión a maltosa**

Para el corte con Factor Xa (New England Biolabs) de las proteínas de fusión a GST y a MBP purificadas, se incubaron las proteínas correspondientes con 10 µg de Factor Xa por mg de proteína de fusión en Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), NaCl 100 mM y CaCl<sub>2</sub> 1mM, a 4°C durante 4 h. La eficiencia de la digestión se comprobó en geles de poliacrilamida en presencia de SDS y tinción con azul de Coomassie como se describe a continuación.

### **3.17 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON SDS**

La electroforesis de proteínas en presencia de SDS fue llevada a cabo según el método de Laemmli (1970), empleando sistemas de geles verticales. En todos los casos se utilizó una relación de acrilamida:bis-acrilamida de 30:0,8 (P:P). El gel de separación se preparó en solución Tris-HCl 375 mM (pH 8,8), SDS 0,1% (P/V), con una concentración de acrilamida final de 10% (P/V). El gel de concentración se preparó con acrilamida al 4,5% (P/V), en solución Tris-HCl 125 mM (pH 6,8), SDS 0,1% (P/V). La separación electroforética fue llevada a cabo en solución LAEMMLI 1X [Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM (pH 8,3), SDS 0,1% (P/V)], aplicando un voltaje constante de 10 V/cm de gel.

Las muestras a sembrar fueron previamente desnaturalizadas mediante incubación durante 3 min a 100°C en solución de siembra para proteínas [Tris-HCl (pH 7,0) 10 mM, EDTA (pH 8,0) 2 mM, SDS 2% (P/V), β-mercaptoetanol 0,5% (V/V), azul de bromofenol 0,5 mg/ml].

Una vez finalizada la separación por electroforesis, los geles fueron sumergidos en solución colorante de proteínas [Coomassie Brilliant Blue R-250 1% (P/V) en una mezcla de etanol:ácido acético:agua (50:10:40)] y se visualizaron las bandas correspondientes a las proteínas luego de tratar los geles coloreados con la solución decolorante [mezcla etanol:ácido acético:agua, 25:10:65].

### **3.18 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS**

La concentración de proteínas totales fue determinada mediante el método descrito por Sedmak y Grossberg (1977). Como patrón se utilizó una solución de albúmina sérica

bovina (BSA, Sigma) cuya concentración se determinó espectrofotométricamente, considerando 0,667 unidades de  $Abs_{280} = 1$  mg/ml de BSA en solución.

### 3.19 MARCACIÓN RADIOACTIVA DE FRAGMENTOS DE ADN PARA ENSAYOS DE UNIÓN

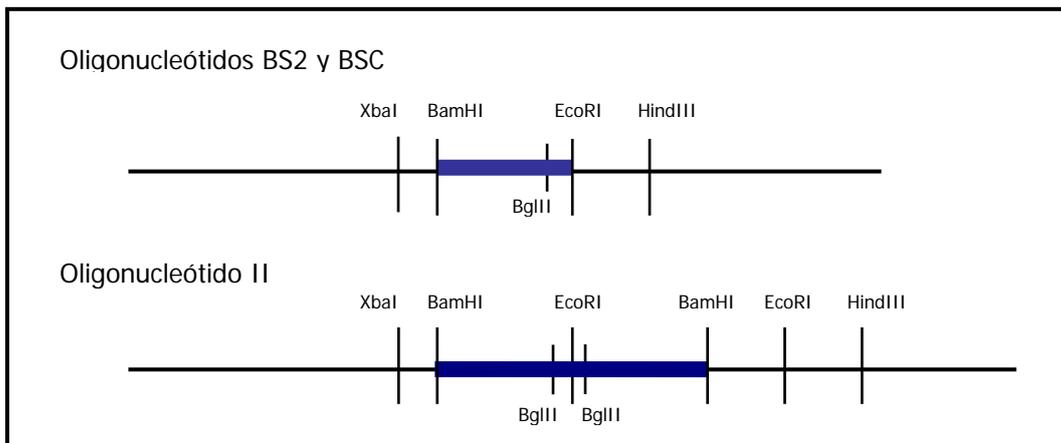
La marcación de los oligonucleótidos doble hebra empleados en los experimentos de retardo en geles se llevó a cabo utilizando el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*.

En el caso de los oligonucleótidos obtenidos por síntesis química (provistos por Biosynthesis Inc., USA o Alpha DNA, Canadá), se emplearon 10 ng de oligonucleótido doble hebra (24-mer) por reacción de marcación. El oligonucleótido doble hebra se obtuvo mezclando 600 ng de cada oligonucleótido simple hebra en un volumen final de 20  $\mu$ l. La mezcla de oligonucleótidos simple hebra se calentó a 80°C durante 5 min y se dejó llegar a temperatura ambiente lentamente para favorecer la hibridación. Los pares de oligonucleótidos simple hebra no son completamente complementarios sino que dejan a cada uno de los lados del fragmento doble hebra extremos cohesivos compatibles con las enzimas *Bam*HI o *Eco*RI. Estos extremos cohesivos fueron rellenados en presencia de 5  $\mu$ Ci de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP (3000Ci/mmol), dCTP, dGTP y dTTP 0,2 mM cada uno, solución tampón 1X suministrada por el fabricante de la enzima y 2 U de Klenow. La reacción de marcación se llevó a cabo a temperatura ambiente entre 3 y 16 horas. El exceso de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP no incorporado se eliminó según el protocolo descrito en el punto anterior.

Los oligonucleótidos doble hebra BS2 y BS usados como blanco en los ensayos de protección e interferencia con radicales hidroxilo se clonaron en los sitios *Bam*HI y *Eco*RI del vector pBluescript SK<sup>-</sup>, a partir de los extremos cohesivos descritos más arriba. Por otra parte, en el laboratorio donde se desarrolló el presente Trabajo de Tesis, previamente se había clonado el oligonucleótido II en tándem. En este caso, los oligonucleótidos habían sido previamente fosforilados y ligados entre sí, y luego se insertaron en el sitio *Bam*HI del plásmido pBluescript SK<sup>-</sup>. La reacción de fosforilación se realizó como se indica en Ausubel y col. (1987). El medio de reacción contenía Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 5 mM, ATP 1 mM, 80 ng de oligonucleótido doble hebra y 10 U de la enzima polinucleótido quinasa del fago T4

(Promega). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10  $\mu$ l, durante una hora a 37°C. Luego, la enzima se inactivó por calentamiento a 75°C durante 10 min. Los oligonucleótidos así fosforilados se usaron en una reacción de ligación convencional durante una noche y posteriormente se emplearon en la reacción de ligación con el vector pBluescript SK<sup>-</sup>, digerido con la enzima *Bam*HI.

En la Figura 7 se esquematizan las construcciones resultantes indicando la posición de los sitios de restricción más relevantes.



**Figura 7. Esquema de los oligonucleótidos doble hebra clonados en el vector pBluescript SK<sup>-</sup>.**

Para la marcación radiactiva en una sola hebra de los fragmentos de ADN clonados en el vector pBluescript SK<sup>-</sup>, estos fueron amplificados por PCR con los oligonucleótidos universales PRLAR y P-40 que hibridan sobre el vector. Los fragmentos amplificados se purificaron de geles de agarosa al 2% (P/V) empleando el sistema comercial *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (Amersham Pharmacia Biotech Inc.). Luego, se realizaron digestiones con las enzimas *Xba*I/*Hind*III (presentes en el sitio múltiple de clonado del vector, Figura 7), como se indica a continuación. En primer lugar se realizó una digestión con una de estas enzimas en las soluciones amortiguadoras y condiciones sugeridas por el fabricante. A continuación, con el agregado de 5  $\mu$ Ci de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP (3000Ci/mmol), dCTP, dGTP y dTTP 0,2 mM cada uno, y 2 U de Klenow, se realizó la reacción de marcación a temperatura ambiente entre 3 y 16 h. Luego de esto, previa precipitación del ADN, se procedió a cortar el mismo con la segunda enzima. Los productos obtenidos se sembraron en geles verticales de poliacrilamida [acrilamida 5% (P/V), bis-acrilamida 0,08% (P/V), TBE 0,5 X, glicerol 2,5% (V/V)]

usando la solución de siembra para ADN descripta. La corrida se realizó en solución amortiguadora TBE 0,5X a 30 mA durante 1,5 h. Los geles se desarmaron y se expusieron 5 min a placas radiográficas. Las señales en las placas autorradiográficas permitieron reconocer en el gel la posición de la banda de interés, la que fue escindida y sumergida en 1 ml de solución de elución de oligonucleótidos [Tris-HCl (pH 8,0) 50 mM, NaCl 500 mM, EDTA (pH 8,0) 20 mM] durante toda la noche a 4°C. Se centrifugó 1 min a 12000 x g para provocar que la acrilamida se depositara en el fondo del tubo, se tomó el sobrenadante que contenía el fragmento de ADN marcado y se lo precipitó en etanol 70% (V/V) con acetato de sodio 0,3 M (pH 5,2) y 1 µg de ARNt (Sigma), durante 30 minutos a -80°C. El oligonucleótido purificado fue resuspendido en agua destilada estéril, libre de nucleasas, y conservado a -20°C hasta su uso en los ensayos de unión.

Para llevar a cabo ensayos de retardo en geles con los oligonucleótidos obtenidos en los experimentos de selección, se realizaron reacciones de PCR usando como molde los clones obtenidos y los cebadores R1 y R2' (Tabla 3). Los fragmentos resultantes fueron purificados a partir de geles de poliacrilamida nativos y digeridos con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*. Posteriormente, se marcaron por rellenado de estos sitios cohesivos como se indica más arriba. Por otra parte, con el fin de obtener oligonucleótidos marcados en una sola hebra a partir de los fragmentos amplificados se realizó la digestión con una de estas enzimas, se rellenó el extremo generado con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP, y luego se escindió con la segunda enzima como se describe en los párrafos anteriores.

### 3.20 ENSAYOS DE RETARDO EN GEL

Los ensayos de retardo en gel fueron llevados a cabo según el protocolo descrito por Sessa y col. (1993). Las reacciones de unión se realizaron en un volumen de 18 µl con 3-1000 ng de proteína de fusión purificada y la cantidad de oligonucleótido marcado correspondiente a aproximadamente 30000 cpm, en la solución de unión [HEPES (pH 7,5) 20 mM, glicerol 10% (V/V), Tritón X-100 0,5% (V/V), EDTA (pH 8,0) 0,5 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, BSA 22 ng/µl, DTT 1 mM]. Una vez agregados todos los componentes, las mezclas se incubaron 20 min a 25°C, se les adicionó Ficoll al 2,5% (P/V) y se las sembró en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes [acrilamida 5% (P/V), bis-acrilamida 0,08% (P/V), TBE 0,5X y glicerol 2,5%

(V/V)] previamente recorridos a un voltaje constante de 100 V durante 90 min, sin cortar la corriente. La electroforesis se dejó transcurrir durante 90 minutos a corriente constante en solución amortiguadora TBE 0,5X, al cabo de los cuales se secó el gel y se expuso a placa radiográfica (Kodak MXG/Plus) con pantalla intensificadora a -80°C durante toda la noche.

En los ensayos cuantitativos, una vez reveladas las placas autorradiográficas, se identificaron las bandas correspondientes al ADN libre (de movilidad electroforética mayor) y a los complejos ADN-proteína (de movilidad menor) en el gel y las mismas fueron escindidas y sumergidas en 1 ml de agua destilada. La radioactividad presente se determinó utilizando un contador de centelleo líquido (Triathler<sup>TM</sup>). El procesamiento de los datos y el ajuste de las curvas correspondientes se realizó mediante el programa Sigma plot.

### 3.21 SELECCIÓN DE SITIOS DE UNIÓN ESPECÍFICOS

Para seleccionar las moléculas de ADN reconocidas específicamente por las proteínas ATH1 y HAT3.1, se aplicó la técnica de selección de oligonucleótidos de secuencia al azar descrita por Oliphant y col. (1989) y Blackwell y Weintraub (1990). La separación de los oligonucleótidos unidos a la proteína y libres, o no unidos, se logró sembrando la mezcla de unión en un gel no desnaturalizante, que permite separar de acuerdo a su movilidad electroforética al ADN libre (de mayor movilidad electroforética), de los complejos ADN-proteína (de movilidad menor).

Se empleó un oligonucleótido doble hebra de 52 pb marcado radioactivamente cuya secuencia es: 5'-GATGAAGCTTCCTGGACAAT(N)<sub>12</sub>GCAGTCACTGAAGAATTCTG-3'. Las reacciones de unión se llevaron a cabo como se describe en la sección anterior, utilizando las proteínas de fusión purificadas a partir de extractos de *E. coli*. Después de la incubación, las mezclas se sembraron en geles de retardo, y luego del revelado de las placas autorradiográficas, pudieron escindirse del gel seco las zonas de migración de los complejos ADN-proteína. Los oligonucleótidos se purificaron del gel empleando 0,5 ml de solución de elución de oligonucleótidos. Luego de 16 horas de elución a 4°C se precipitó el ADN en presencia de 2 µg de ARNt.

Tanto el oligonucleótido simple hebra como el ADN unido y eluido de los geles de retardo se amplificaron por PCR empleando los oligonucleótidos R1 (5'-

GATGAAGCTTCCTGGACAAT-3') y R2 (5'-CAGAATTCTTCAGTACTGC-3'), en 20 ciclos de reacción de 45 segundos a 94°C, 1 min a 53°C y 1 min 30 segundos a 72°C. Posteriormente los oligonucleótidos amplificados fueron purificados en geles de poliacrilamida al 10% (P/V) y la mezcla se sometió a nuevos ciclos de selección y amplificación.

Para comprobar el progresivo enriquecimiento de la mezcla de oligonucleótidos en moléculas que son específicamente unidas por la proteína, se hicieron ensayos de competencia en geles de retardo. Estos experimentos se hicieron agregando a la mezcla de reacción un exceso molar de entre 10 y 30 veces de las diferentes mezclas de oligonucleótidos sin marcar, antes de agregar el oligonucleótido marcado radioactivamente. La cuantificación del ADN empleado se realizó por comparación visual con un marcador de tamaño molecular en geles de poliacrilamida nativos al 10 % (P/V).

### **3.22 DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA CONSENSO PARA LA UNIÓN AL ADN DE LAS PROTEÍNAS ATH1 Y HAT3.1**

Después de realizar los sucesivos pasos de selección y amplificación, y habiendo comprobado mediante ensayos de competencia en geles de retardo un eficiente enriquecimiento en secuencias específicas, la población de oligonucleótidos resultante fue analizada a fin de determinar la secuencia de ADN consenso para la unión de las proteínas. Para esto, una alícuota de la mezcla de oligonucleótidos correspondiente al último paso realizado se ligó en el vector pCR 2.1-TOPO para la posterior determinación de su secuencia.

Entre 20 y 30 clones resultantes de la transformación se analizaron según se explica a continuación y las secuencias resultantes fueron alineadas en busca de un consenso para la unión al ADN por parte de las proteínas.

### **3.23 DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA DE FRAGMENTOS DE ADN CLONADOS**

Para determinar la secuencia de ADN se empleó el equipo comercial *T7 sequencing kit* (USB) basado en el método desarrollado por Sanger y col. (1977). La estrategia consiste en una primera etapa de marcación seguida de una etapa de terminación por incorporación de didesoxinucleótidos a las cadenas crecientes de ADN.

Para llevar a cabo las reacciones, se respetaron las condiciones sugeridas por el fabricante del equipo y se utilizaron cebadores universales correspondientes a los plásmidos utilizados o cebadores específicos, según el caso.

La separación electroforética de los fragmentos de ADN generados por la incorporación aleatoria de didesoxinucleótidos se realizó en geles de poliacrilamida al 6% (P/V) con urea 8 M en solución amortiguadora TBE 1X. Las corridas electroforéticas se realizaron en TBE 0,5X manteniendo un voltaje de 2000-2500 V, luego de una precorrida de una hora en las mismas condiciones. Una vez finalizada la corrida, los geles se colocaron sobre papel Whatman 3MM (Sigma Chemical Company), se cubrieron con papel de nylon y se secaron al vacío durante 30 min a 80°C. Una vez secos, los geles se expusieron a una placa radiográfica con pantalla intensificadora a -80°C durante 18 h.

### **3.24 ENSAYOS DE PROTECCIÓN DE ADN AL TRATAMIENTO CON RADICAL HIDROXILO**

Los oligonucleótidos empleados en ensayos de protección al tratamiento con radical hidroxilo se prepararon esencialmente como se describe en el punto 3.19.

La reacción de unión del oligonucleótido a la proteína de interés se realizó en 15 µl de una solución de unión libre de glicerol [HEPES (pH 7,5) 20 mM, Tritón X-100 0,5% (V/V), EDTA (pH 8,0) 0,5 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, BSA 22 ng/µl, DTT 1 mM]. Para cada ensayo se emplearon alrededor de 0,4-1 µg de proteína de fusión y 250000 cpm del oligonucleótido marcado, que correspondían aproximadamente a 100 ng de ADN. Las mezclas de unión se incubaron 20 minutos a 25°C, luego de los cuales se las sometió al tratamiento con radical hidroxilo. El radical se generó *in situ* por el agregado de 10,5 µl de una mezcla de ascorbato de sodio 6,6 mM, EDTA 0,66 mM (pH 8,0), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 0,33 mM y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,2% (V/V) (Levin y col., 1991; Dixon y col., 1991). La interacción entre estos reactivos debe ocurrir inmediatamente antes de la exposición al ADN por lo que la mezcla de las soluciones madre de estos agentes se realizó sobre las paredes del tubo que contenía la mezcla de unión ADN-proteína, y luego se agregó al seno de la solución. La reacción de ataque se dejó transcurrir a temperatura ambiente durante 15 minutos y se detuvo por el agregado de glicerol 10%. A cada tubo se le adicionó Ficoll al 2,5% (P/V) y las mezclas de reacción se sembraron en geles de poliacrilamida

no desnaturalizantes precorridos a 100 V durante 90 min. La electroforesis se llevó a cabo en solución amortiguadora TBE 0,5X, durante 60 min a una corriente constante de 30 mA. Luego, los geles se desarmaron y expusieron a placas radiográficas durante 2-4 h. Las señales en las placas permitieron identificar las zonas del gel a escindir para eluir las fracciones correspondientes a oligonucleótido libre y oligonucleótido unido a proteína. La elución y purificación de los oligonucleótidos del gel se realizó como se describe en el punto 3.19.

Los oligonucleótidos así obtenidos se resuspendieron en una solución de siembra desnaturalizante que contenía formamida 97,5% (V/V) y EDTA 10 mM (pH 8,0), se calentaron a 90°C durante 2 min y se sembraron en geles desnaturalizantes de poli(acrilamida) al 12% de 40 cm de alto (del tipo de los geles descritos para la determinación de la secuencia de ADN). Las corridas electroforéticas se dejaron transcurrir alrededor de 3 horas a 3000 V (aproximadamente a 20 mA y 60 W). Los geles se levantaron en papel Whatman 3MM (Sigma Chemical Company), se cubrieron con papel de nylon y se secaron al vacío durante 40 min a 80°C. Una vez secos, se expusieron a placas radiográficas (Kodak MXG/Plus) con pantalla intensificadora a -80°C durante varios días. En algunos casos, dada la baja intensidad de las señales obtenidas, se debió reexponer en películas Kodak BioMax MS, con el sistema de BioMax Transcreen-HE.

### **3.25 ENSAYOS DE INTERFERENCIA POR TRATAMIENTO CON RADICAL HIDROXILO**

La marcación de los fragmentos de ADN utilizados en los ensayos de interferencia en la unión por ataque con radical hidroxilo se realizó según se ha descrito en el punto 3.19, utilizando cantidades equivalentes de ADN con la misma radiactividad específica (2500 cpm/ng de ADN). En este caso, el tratamiento con radical hidroxilo se llevó a cabo antes de la unión a las proteínas (Hayes y Tullius, 1989). El ADN tratado se precipitó 30 min a -80°C en etanol 70% (V/V) y acetato de sodio 0,3 M con el agregado de 1 µg de ARNt (Sigma). Se lavó con etanol 70% (V/V) y se resuspendió en agua destilada estéril. Este oligonucleótido fue entonces empleado en reacciones de unión a proteínas según el protocolo descrito en el punto 3.20, utilizando 0,4-1 µg de proteína y 250000 cpm de oligonucleótido. Luego de 20 min a 25°C, se agregó Ficoll 2,5% (P/V) a las mezclas de unión y éstas se sembraron en geles de poli(acrilamida) no desnaturalizantes al 5% (P/V), precorridos durante 90 min a 100 V en TBE

0,5X. La electroforesis se llevó a cabo durante una hora, al cabo de la cual se procedió a la purificación de los oligonucleótidos de las distintas bandas según se detalla en el punto anterior para los ensayos de protección. La separación de los fragmentos generados se realizó en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 12% (P/V), que se procesaron como se indicó anteriormente.

### **3.26 ENSAYO DE ENTRECruzAMIENTO ADN-PROTEÍNA INDUCIDO POR LUZ UV**

Los ensayos de entrecruzamiento entre ADN y proteínas unidas a dicha molécula se realizaron de acuerdo al método desarrollado por Sauer (1991) y Kneale (1994). Las reacciones de unión se llevaron a cabo según el protocolo descrito en el punto anterior para ensayos de retardo en geles, pero en ausencia de BSA. Luego de la incubación a 25°C durante 20 min, las mezclas de unión se colocaron en hielo y se sometieron a tratamiento con luz UV por exposición a una lámpara germicida de 15 W de luz UV de 260 nm, a una distancia de 5 cm. Inmediatamente después de la irradiación, se adicionó solución de siembra para proteínas y se sembró la muestra en un gel de poliacrilamida en presencia de SDS, según se describe en el punto 3.17. Se sembró además una mezcla de proteínas como marcadores de peso molecular (Amersham Biosciences).

Una vez finalizada la separación electroforética, se secó el gel y se expuso a placa radiográfica (Kodak MXG/Plus) con pantalla intensificadora a -80°C durante 18 h. Después del revelado de la placa, se rehidrató el gel y se sumergió en solución colorante de proteínas para identificar las bandas correspondientes a los marcadores de peso molecular.

### **3.27 MÉTODOS INFORMÁTICOS DE MODELADO DE PROTEÍNAS**

Para el modelado de las estructuras de los homeodominios unidos al ADN se recurrió al servidor SwissModel (SwissModel Protein Modelling Server, SWISS-MODEL Version 36.0003, Schwede y col., 2003) al que puede accederse desde la URL: [www.expasy.org](http://www.expasy.org). Para esto debió procesarse la secuencia de aminoácidos de dichos homeodominios con el programa SwissViewer (disponible en Internet en la misma URL), ajustándola sobre modelos publicados en la base de datos de estructuras de proteínas del *National Center for Biotechnology*

Information ([www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)). Para la visualización del modelo obtenido, se empleó el programa *RasWin Molecular Graphics*.

### 3.28 ENSAYOS DE INTERACCIÓN PROTEÍNA-ADN EN LEVADURA.

El sistema de simple híbrido en levadura (Y1H) desarrollado inicialmente por Li y col. (1993) constituye una herramienta eficaz para identificar o confirmar interacciones entre un factor de transcripción heterólogo y una secuencia de ADN específica.

En la técnica de Y1H, que deriva del sistema de doble híbrido en levadura (Y2H), un fragmento de un promotor o varias copias en tandem de un elemento de ADN conocido se insertan corriente arriba de un gen reportero (*HIS3* o *LacZ*, por ejemplo). Esta construcción es integrada al genoma de la levadura por recombinación homóloga y la cepa reportera obtenida es transformada a continuación con una biblioteca de expresión, o con un vector que expresa una proteína en estudio fusionada al dominio de activación (AD) de GAL4. De esta manera, la interacción entre la proteína híbrida y la secuencia de ADN en estudio se determina mediante la detección de la expresión del gen reportero (Figura 8).

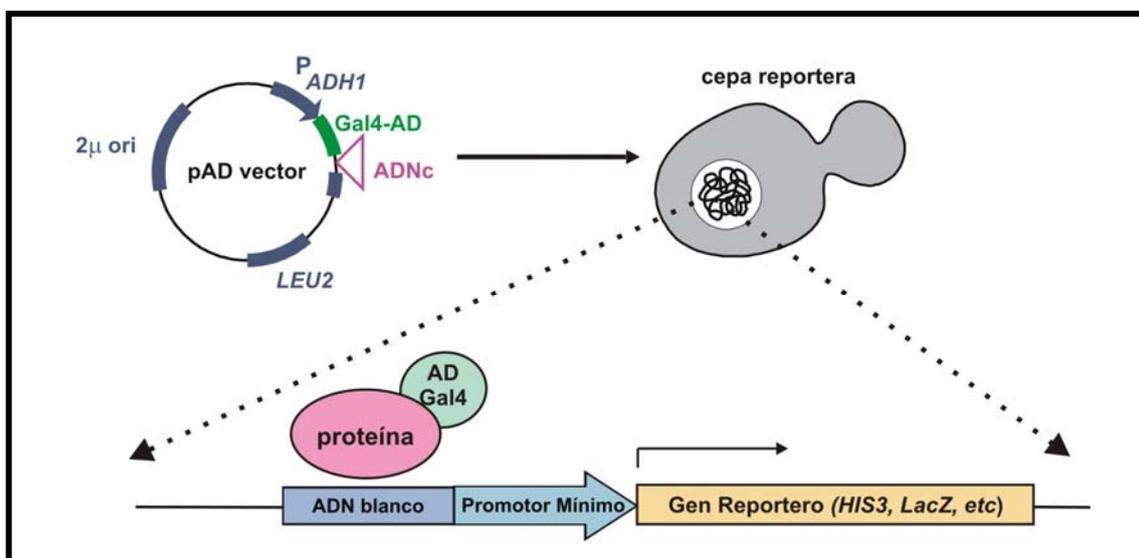


Figura 8. Esquema de la estrategia de simple híbrido en levadura. (Adaptado de Ausubel y col., 2001).

Cuando se emplea como gen reportero *HIS3*, su activación transcripcional permite a la cepa de levadura que posee auxotrofia para histidina sobrevivir en un medio carente de este aminoácido. Si se utiliza como reportero el gen *LacZ*, su expresión puede detectarse mediante

medición de la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa de manera cualitativa (aplicando el sustrato cromogénico X-Gal al medio de cultivo) o en forma cuantitativa (utilizando como sustrato por ejemplo ONPG).

### 3.28.1 Obtención de la cepa con el gen reportero para el sistema de simple híbrido

Para obtener las cepas de levadura con la secuencia de unión de ATH1<sub>HD</sub> se realizó en primer lugar una construcción formada por tres copias en tandem de un oligonucleótido que contenía la secuencia consenso. Para esto se recurrió a una estrategia de PCR empleando los cebadores R1-B y R2'-b (tabla 3), que poseen los sitios de restricción *Bam*HI y *Bgl*II, respectivamente. Como ADN molde se usó el clon E2-8 (capítulo 1 de Resultados y Discusión). El fragmento amplificado, luego de ser purificado a partir de un gel de poliacrilamida al 12%, fue digerido con las enzimas *Bam*HI y *Bgl*II y luego se lo utilizó en una reacción de ligación con el fin de lograr la unión en tandem de los oligonucleótidos. Un décimo de volumen de esta reacción se utilizó como molde en una nueva PCR con los mismos cebadores y los productos amplificados se resolvieron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%. La banda correspondiente a un fragmento que contenía tres copias del oligonucleótido fue escindida del gel y purificada como se ha descrito anteriormente. A continuación, se procedió al clonado del ADN obtenido mediante ligación en el vector pCR 2.1-TOPO (Invitrogen).

Para determinar el tamaño de los insertos clonados se realizó una digestión de los clones resultantes con la enzima *Eco*RI y los fragmentos se resolvieron en un gel de poliacrilamida usando como marcadores de peso molecular el oligonucleótido simple obtenido en la primera amplificación y ADN del bacteriófago  $\lambda$  digerido con la enzima *Hind*III. La orientación de los oligonucleótidos dentro de los insertos se analizó mediante dos digestiones con enzimas de restricción: la primera con *Bam*HI y la segunda con *Bam*HI - *Bgl*II. Además, esta estrategia permitió establecer la orientación del fragmento clonado dentro del plásmido pCR 2.1-TOPO y, en consecuencia, determinar la estrategia a seguir para el clonado en los vectores correspondientes. El clon obtenido se denominó BS1<sub>X3</sub>-TOPO.

Para obtener la cepa de levadura con la secuencia de unión de HAT3.1<sub>HD</sub> se realizó una construcción formada por tres copias en tandem de un oligonucleótido BS (obtenido en el experimento de selección de sitio de unión específico, Capítulo 3 de Resultados y Discusión),

BS<sub>x3</sub>-TOPO, mediante la estrategia de PCR descrita aquí para ATH1<sub>HD</sub>. En este caso se empleó como molde ADN del clon C4 (Capítulo 3).

La obtención de la cepa de levadura con cuatro copias de la secuencia de unión presente en el oligonucleótido BS2 se llevó a cabo mediante una estrategia combinada de PCR y ligaciones. En primer lugar, se realizó una reacción de amplificación empleando como molde ADN del clon BS2-pBluescript (sección 3.19) y como cebadores los oligonucleótidos PRLAR y P-40. El fragmento obtenido fue purificado a partir de un gel de poliacrilamida (como se describe en la sección 3.7.2) y se empleó en dos reacciones de digestión diferentes, una con la enzima *Bam*HI y la otra con la enzima *Bg*III. Los oligonucleótidos del tamaño deseado fueron purificados desde un gel de poliacrilamida. A continuación se realizó una reacción de ligación entre estos dos fragmentos de ADN, que fue utilizada posteriormente como molde en una reacción de amplificación con los cebadores mencionados arriba. El producto del tamaño deseado fue purificado y empleado en reacciones de digestión con las enzimas *Bam*HI y *Bg*III como se describió previamente. Los fragmentos que contenían los oligonucleótidos BS2 en tandem, una vez purificados, se emplearon en una nueva ligación. Posteriormente, se realizó una reacción de amplificación con los cebadores universales PRLAR y P-40 y un décimo de esta ligación. Finalmente, el fragmento obtenido se purificó a partir de un gel de agarosa y fue digerido con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI para ser ligado en los mismos sitios del vector pUC119 (construcción BX2<sub>x4</sub>-pUC119).

### ***Gen HIS3 como reportero***

La determinación de la interacción entre las proteínas estudiadas y su secuencia de ADN blanco se realizó mediante la activación transcripcional del marcador de selección de crecimiento positivo, *HIS3*.

La cepa que contiene la construcción reportera se obtuvo mediante la utilización del sistema de vectores pHIS3/pINT1 (desarrollados por Meijer y col., 1998). Para ello, fragmentos de ADN de los clones BS1<sub>x3</sub>-TOPO o BS<sub>x3</sub>-TOPO digeridos con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI se ligaron en los mismos sitios del vector pHIS3NX. En la Figura 9 se muestra un esquema de las construcciones obtenidas.

A continuación, los fragmentos que contenían el inserto y el gen reportero *HIS3* fusionado a su propio promotor mínimo fueron transferidos a los sitios *NotI-XbaI* del plásmido pINT1 (Meijer y col., 1998).

El vector pINT1 confiere resistencia al antibiótico G418 en levaduras y contiene las secuencias necesarias para su integración en el locus *PDC6* del genoma mediante recombinación homóloga. De esta manera, fragmentos de ADN resultantes de la digestión de los clones obtenidos en los sitios *NcoI* y *SacI*, presentes en el gen *PDC6*, que incluye además la construcción reportera y el gen *APT1* (resistencia a G418), se emplearon para transformar la cepa de *S. cerevisiae* Y187 según se describe en la sección 3.12.

La presencia del fragmento de interés en el genoma de las células resistentes al antibiótico se determinó por PCR con cebadores específicos y las cepas obtenidas se denominaron BS1<sub>x3</sub>:HIS3-Y187 y BS<sub>x3</sub>:HIS3-Y187.

#### **Gen *LacZ* como reportero**

La unión de las proteínas en estudio al ADN se estudió *in vivo* utilizando además la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa para medir en forma cuantitativa la interacción proteína-ADN. Para esto la secuencia de ADN blanco se fusionó al gen *LacZ* de *E. coli* en el vector de integración pLacZi (Clontech).

La construcción de cada cepa reportera se realizó a partir de los clones BS1<sub>x3</sub>-TOPO o BS<sub>x3</sub>-TOPO, los que fueron digeridos en los sitios de restricción *HindIII* y *XhoI* del sitio múltiple de clonado. Estos fragmentos se ligaron en los mismos sitios del vector pLacZi. Del mismo modo, el fragmento obtenido de la digestión con las enzimas *EcoRI* y *Sall* del clon BS2<sub>x4</sub>-pUC119 se ligó en el vector pLacZi.

Los clones resultantes, que se esquematizan en la Figura 9, se denominaron BS1<sub>x3</sub>:LacZ, BS<sub>x3</sub>:LacZ y BS2<sub>x4</sub>:LacZ. Estos plásmidos fueron oportunamente digeridos en el sitio *NcoI* (dentro del gen *URA3*) para ser introducidos en el locus *ura* no funcional de la cepa aW303 de levadura.

Las transformaciones se realizaron siguiendo la técnica descrita en la sección 3.12 y los clones fueron seleccionados creciendo las células en medio sin uracilo. La presencia de las

construcciones deseadas en el genoma de las levaduras se confirmó por PCR con oligonucleótidos específicos de manera similar a la descrita más arriba.

En la siguiente tabla se resumen las características de los vectores empleados en los ensayos de interacción proteína-ADN en levadura.

**Tabla 5.** Características de los vectores usados en la construcción de las cepas de levadura reporteras

Vector	Marcador de Selección		Gen reportero	Referencia
	en <i>E. coli</i>	en levadura		
pHIS3	Amp <sup>r</sup>	-	-	Meijer y col., 1998
pINT1 (HIS3)	Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> *	G418 <sup>r</sup> *	HIS3	Meijer y col., 1998
pLacZi	Amp <sup>r</sup>	URA3	LacZ	CLONTECH; Luo y col., 1996

\* El gen *APT1* confiere resistencia a bajas concentraciones (25 mg/l) de kanamicina en *E. coli* y a G418 (150 mg/l) en levadura

### 3.28.2 Expresión de las proteínas de fusión en *Saccharomyces cerevisiae*

Se realizaron construcciones a partir de los ADNc de los genes *STM*, *BLH3*, *ATH1* y *BEL1*, los que fueron fusionados a la región codificante del dominio de unión al ADN (BD) del activador transcripcional GAL4 de levadura, en los vectores binarios pGBKT7 y pGBT9 (Clontech) y a la región codificante del dominio de activación (AD) de GAL4, en los vectores binarios pGADT7 y pGAD424 (Clontech). Las características de estos plásmidos para expresión en levadura están descritas en la sección 3.2 (tabla 2).

En primer lugar, la región codificante para la proteína **STM** completa fue clonada en los sitios *Bam*HI y *Eco*RI del vector pBluescript SK<sup>-</sup> a partir del clon en pGEX-3X (sección 3.15.1). A continuación, el plásmido resultante fue digerido con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sal*I para realizar el clonado del inserto obtenido en fase con el dominio AD de los vectores pGADT7 (digerido en los sitios *Bam*HI y *Xho*I) y pGAD424 (en los mismos sitios). Este fragmento también fue ligado en los vectores pGBKT7 y pGBT9, ambos digeridos en los sitios *Bam*HI y *Sal*I a fin de lograr la expresión de STM como fusión al dominio de unión a ADN (BD) de GAL4.

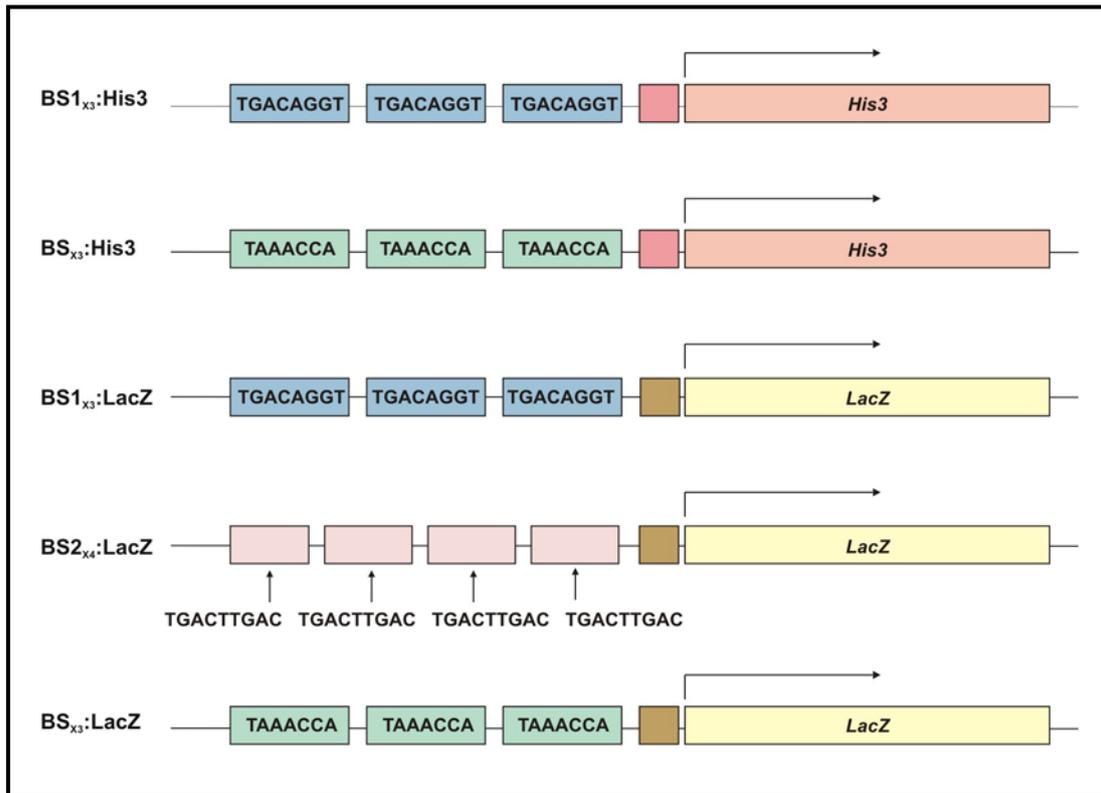


Figura 9. Esquema de las construcciones empleadas en los ensayos de simple híbrido en levadura (Y1H). Se insertaron 3 copias de los oligonucleótidos BS1 y BS (recuadros azules y verdes, respectivamente) y cuatro copias del oligonucleótido BS2 (recuadros en rosa), corriente arriba del gen reportero fusionado a un promotor mínimo. El gen reportero *HIS3* aparece en naranja y en amarillo la región codificante para la  $\beta$ -galactosidasa (*LacZ*). Los recuadros rojos y marrones señalan los promotores mínimos  $P_{his3}$  y  $P_{CYC1}$ , respectivamente.

Las regiones codificantes completas de **ATH1** y **BEL1** fueron amplificadas empleando como molde ADN de los clones RAFL09-24-O21 (ATH1) y RAFL07-11-J17 (BEL1) (Seki y col., 2002) y los pares de cebadores ATH1N-ATH12 y BELL1-BELL2, que incorporan los sitios de restricción *EcoRI* y *PstI* (tabla 3). Los productos de amplificación fueron purificados a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión y luego de ser digeridos en los sitios mencionados se ligaron en esos mismos sitios de los vectores pGAD424, pGBT9 y pGBKT7.

Para lograr la expresión en altos niveles de ATH1 como fusión al AD, el inserto resultante de la digestión del clon ATH1-pGAD424 con las enzimas *EcoRI* y *BglII* fue ligado a los sitios *EcoRI* y *BamHI* del vector pGADT7. Por otra parte, la región codificante para BEL1 fue clonada también en este vector. Para esto, se realizó una digestión del clon en pGAD424 con las enzimas *EcoRI* y *SacI* (este último sitio presente en el ADNc) y el inserto obtenido se ligó en estos sitios del plásmido pGADT7.

Un fragmento de 1257 pb obtenido de la digestión del clon de **BLH3** en pUC119 con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI* se utilizó en distintas reacciones de ligación para permitir el clonado de esta proteína en los vectores pGADT7, pGAD424, pGBKT7 y pGBT9.

Para fusionar la región que codifica el homeodominio de **HAT3.1** al dominio de activación de GAL4, un fragmento *EcoRI-SalI* de 1379 pb proveniente del clon RAFL16-64-G01 (Seki y col., 2002) se clonó en los sitios *EcoRI* y *XhoI* del vector pGADT7.

Para expresar la proteína **HAT3.1-K50A** como fusión al AD de GAL4 se clonó el fragmento obtenido por PCR y digerido con las enzimas *BamHI* y *EcoRI*, descrito en la sección 3.15.1, en el vector pBluescript SK<sup>-</sup> en estos mismos sitios. Este clon fue digerido con las enzimas de restricción *BamHI* y *SalI* con el objetivo de clonar la proteína codificada por el inserto en el vector pGADT7 (digerido con *BamHI* y *SalI*).

En todos los casos, los insertos liberados se purificaron a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión siguiendo la técnica descrita en la sección 3.8. Las reacciones de ligación se realizaron según se detalla en la sección 3.10 y la presencia de los insertos en las transformantes se determinó por cortes con distintas enzimas de restricción. Posteriormente se comprobó la secuencia de los fragmentos clonados por secuenciación de ADN.

### 3.28.3 Ensayo de la expresión del gen reportero *HIS3*

Se ha reportado que para algunas construcciones el gen reportero *HIS3* presenta niveles de expresión basales que varían con las distintas cepas de levadura y permiten su crecimiento en ausencia de histidina (Meijer y col., 1998). Sin embargo, esta actividad enzimática resultante puede reducirse si se suplementa el medio de cultivo con 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT), un inhibidor competitivo de la enzima *HIS3* de levadura (*His3p*).

Para establecer la concentración óptima de 3-AT necesaria y suficiente para controlar el crecimiento de las cepas reporteras empleadas en esta tesis en un medio sin histidina, las células transformadas con las construcciones en estudio se sembraron en placas de Petri con medio SD/-His conteniendo 0; 0,2; 0,5; 1 y 2 mM 3-AT. A continuación se evaluó el efecto de estas construcciones en el crecimiento de la cepa y se determinó la concentración más baja de 3-AT que impedía el crecimiento de colonias.

Una vez establecidas estas condiciones de crecimiento, las cepas reporteras fueron transformadas con los plásmidos construidos para expresar las proteínas estudiadas fusionadas al dominio AD (o BD) de GAL4 (sección 3.28.2) de acuerdo a la metodología descrita en la sección 3.12. Para determinar la presencia de los plásmidos en las transformantes, las células fueron crecidas en medios de cultivo carentes de leucina y/o triptofano (marcadores de selección de pAD y pBD, respectivamente). Posteriormente, el ADN plasmídico de los clones obtenidos (sección 3.14.2) se utilizó como molde en reacciones de amplificación con cebadores específicos, a fin de comprobar la identidad de los mismos.

Para determinar la capacidad de las proteínas estudiadas de interactuar con el ADN en las cepas BSS<sub>X3</sub>:HIS3-Y187 y BS<sub>X3</sub>:HIS3-Y187, se plaquearon diluciones seriales de los distintos clones en placas de Petri conteniendo medio selectivo en presencia y ausencia de histidina, y se crecieron a 30°C. Para realizar este ensayo, los clones se crecieron en 2 ml del medio selectivo adecuado a 30°C, con agitación, hasta una DO<sub>600</sub> de 0,5-1. A continuación, a fin de igualar el número de células de cada clon a ser plaqueado, se determinó la DO<sub>600</sub> de los cultivos y se estableció el volumen de los mismos correspondiente a una DO<sub>600</sub> de 0,8. Este volumen de células se cosechó por centrifugación en un tubo estéril y el sedimento se lavó con 200 µl de solución TE. Luego de una nueva centrifugación, las células se resuspendieron en 20 µl de solución TE y se realizaron las distintas diluciones en esta misma solución en un volumen final de 20 µl. A continuación se depositaron 10µl de cada una en las placas correspondientes.

#### **3.28.4 Ensayo de la actividad β-galactosidasa**

La actividad de la enzima β-galactosidasa en las cepas reporteras se determinó mediante ensayos en medio líquido debido a que, por su naturaleza cuantitativa, permiten comparar en forma relativa la fuerza de las interacciones proteína-ADN en los estudios de Y1H. Se empleó el sustrato ONPG (*o*-nitrofenil-β-D-galactopiranosido), que si bien es menos sensible que el CPRG (clorofenol-β-D-galactopiranosido) y no permite detectar las interacciones débiles, presenta ensayos muy reproducibles.

Los experimentos se llevaron a cabo empleando la metodología descrita por Ausubel y col. (1987) con algunas modificaciones. Para cada ensayo se inocularon 3 ml de medio selectivo SD/-Ura-Leu-Trp, SD/-Ura-Leu o SD/-Ura-Trp, según el caso, con 3 colonias de

levadura (2-3 mm), y se incubaron a 30°C, con agitación de 200 rpm, hasta una DO<sub>600</sub> de 0,5 a 1. A continuación, 1 ml de cultivo se utilizó para determinar la DO<sub>600</sub> y un volumen similar se centrifugó a 12000 rpm durante 15 segundos. Luego de eliminar el sobrenadante, el precipitado celular fue congelado en N<sub>2</sub> líquido y resuspendido en 665 µl de solución Z (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 16,1 g/l; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 5,5 g/l; KCl 0,75 g/l; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,25 g/l; β-mercaptoetanol 50 mM). Después, se adicionaron 55 µl de cloroformo y 55 µl de SDS al 0,1 % y la suspensión se sometió a agitación en vortex durante 60 segundos. Posteriormente se adicionaron 160 µl de ONPG 4 mg/ml (disuelto en solución Z) y se incubó a 30°C hasta aparición de color amarillo. La reacción se detuvo por agregado de 400 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M y se centrifugó a 12000 rpm, durante 5 min. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se midió la DO<sub>420</sub>.

Las unidades de β-galactosidasa se definen como la cantidad de enzima que hidroliza 1 µmol de ONPG a o-nitrofenol y D-galactosa por minuto y se calcularon utilizando la siguiente fórmula (Miller, 1972):

$$\text{Unidades } \beta\text{-galactosidasa} = 1000 \times \text{DO}_{420} / (t \times V \times \text{DO}_{600})$$

t: tiempo de incubación (en min)

V: volumen (ml)

Los ensayos se realizaron en condiciones en que la DO<sub>420</sub> obtenida fue de 0,02-1 para permanecer dentro del rango de linealidad. Finalmente, en todos los casos, se calculó el valor promedio de 3 ensayos realizados con colonias co-transformantes independientes.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## CAPÍTULO 1

Caracterización de la interacción con el ADN de ATH1, un factor de transcripción de la familia BEL. Estudio de la función del aminoácido 54 del homeodominio en las propiedades de unión de proteínas de las familias BEL y KNOX.

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 CAPÍTULO 1: Caracterización de la interacción con el ADN de ATH1, un factor de transcripción de la familia BEL. Estudio de la función del aminoácido 54 del homeodominio en las propiedades de unión de proteínas de las familias BEL y KNOX.

#### 4.1.1 Introducción

Las proteínas que contienen homeodominios comprenden una gran superfamilia de factores de transcripción eucariotas que gobiernan la expresión de numerosos genes reguladores del desarrollo. Como se comentó en la Introducción General, para cumplir su función, estas proteínas establecen contactos específicos con el ADN a través del homeodominio.

Un paso esencial en el estudio de las proteínas que contienen homeodominio consiste en determinar la secuencia de nucleótidos a la cual pueden unirse. En general, estos estudios son llevados a cabo mediante experimentos *in vitro*, enfrentando la proteína de interés a mezclas de oligonucleótidos de secuencia al azar. Una vez establecida la secuencia de ADN blanco se pueden realizar estudios más detallados del mecanismo de interacción con el ADN, como por ejemplo la identificación de los residuos de aminoácidos o regiones importantes para la unión. Posteriormente es necesario completar el análisis determinando la especificidad de la interacción proteína-ADN *in vivo*. Al comparar los estudios *in vivo* e *in vitro* se ha encontrado que, en general, la selectividad de una dada proteína es mayor en el contexto celular (Beachy y col., 1988; Winslow y col., 1989 y Müller y col., 1988).

En su mayoría, los homeodominios reconocen la secuencia TAATNN, donde los dos primeros nucleótidos son reconocidos por residuos del extremo N-terminal y la tercera posición es contactada por la Asn51 que es casi totalmente invariable. La cuarta posición de la secuencia blanco es unida por el residuo 47 altamente conservado (Ile o Val) y las dos siguientes, que son variables, son contactadas por los residuos 50 y 54 del homeodominio.

Un grupo particular de genes homeóticos constituye la superclase TALE, cuyo rasgo más característico es la presencia de tres aminoácidos extra altamente conservados en el rulo

que conecta las hélices I y II del homeodominio. En plantas existen dos familias de genes que codifican proteínas TALE: KNOX y BEL (Bürglin, 1997).

En relación con la especificidad de unión al ADN de las proteínas TALE de plantas, en los últimos años se han realizado estudios de selección del sitio de unión y mutagénesis que indican que las proteínas de la familia KNOX unen secuencias de ADN que contienen el núcleo TGAC (Krusell y col., 1997; Smith y col., 2002; Tioni y col., 2005). Sin embargo, no se han llevado a cabo estudios similares con las proteínas de la familia BEL. Hasta el momento sólo se ha reportado que la proteína StBel5 de papa interacciona con una secuencia que contiene el núcleo TGAC presente en el promotor del gen *ga20ox1* de papa (Chen y col., 2004).

En este capítulo describimos el estudio de la interacción con el ADN del homeodominio de **ATH1**, un factor de transcripción de *Arabidopsis thaliana* perteneciente a la familia BEL. Como se ha comentado, éste se expresa en el meristema apical del tallo y en los primordios de hojas durante las primeras etapas del desarrollo y está involucrado en procesos regulados por luz como la de-etiolación, la transición floral y respuestas de tipo *shade avoidance* (Quaedvlieg y col., 1995). Mediante ensayos de selección del sitio de unión específico de esta proteína determinamos que reconoce una secuencia similar a la unida por KN1, una proteína KNOX de clase I de maíz (Long y col., 1996). Realizamos entonces, en segundo lugar, un estudio comparativo de las propiedades de unión al ADN de ATH1 y **STM**, una proteína de *Arabidopsis* que pertenece a la clase I de la familia KNOX y cuya función principal es el mantenimiento de los meristemas. Finalmente, analizamos la importancia en la interacción del residuo 54 del homeodominio de estas proteínas y de cada uno de los nucleótidos que forman parte de la secuencia de ADN reconocida.

## 4.1.2 Resultados

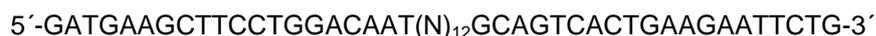
### 4.1.2.1 Determinación de la secuencia de ADN consenso para la unión al ADN del homeodominio de ATH1

Un requisito esencial para llevar a cabo estudios estructurales o funcionales de las proteínas que contienen homeodominio es disponer de las mismas en estado puro y en cantidades suficientes para los ensayos que quieran realizarse. De este modo, el primer paso

necesario es lograr un sistema de expresión de proteínas recombinantes adecuado que permita obtenerlas en forma soluble y como productos de fusión a péptidos o polipéptidos a fin de purificarlas según las características de los mismos. Para estudiar la interacción de ATH1 con el ADN, se decidió expresar el homeodominio de esta proteína en *Escherichia coli* como producto de fusión con la glutatión S-transferasa (GST) de *S. japonicum*, siguiendo la estrategia que se describe a continuación.

La región que codifica desde el homeodominio hasta el extremo carboxilo terminal (aminoácidos 364-474) de ATH1 fue amplificada por PCR a partir del clon de ADNc RAFL09-24-O21 (Seki y col., 2002). Los cebadores empleados (ATH11 y ATH12, descritos en Materiales y Métodos) introdujeron los sitios de reconocimiento de *Bam*HI y *Eco*RI para permitir el clonado del inserto en el vector de expresión pGEX-3X (Amersham Pharmacia Biotech; Smith y Jonson, 1988). El homeodominio recombinante fue expresado y purificado por cromatografía de afinidad como se describe en la sección 3.16 de esta Tesis y la proteína obtenida se denominó ATH1<sub>HD</sub>-GST.

Para determinar las secuencias de ADN que son reconocidas específicamente por el homeodominio de ATH1 aplicamos el método de selección y amplificación de oligonucleótidos de secuencia al azar descrito por Oliphant y col. (1989). Se empleó un oligonucleótido degenerado de 52 pb que contiene una región central de 12 pb de secuencia al azar y dos brazos conservados:

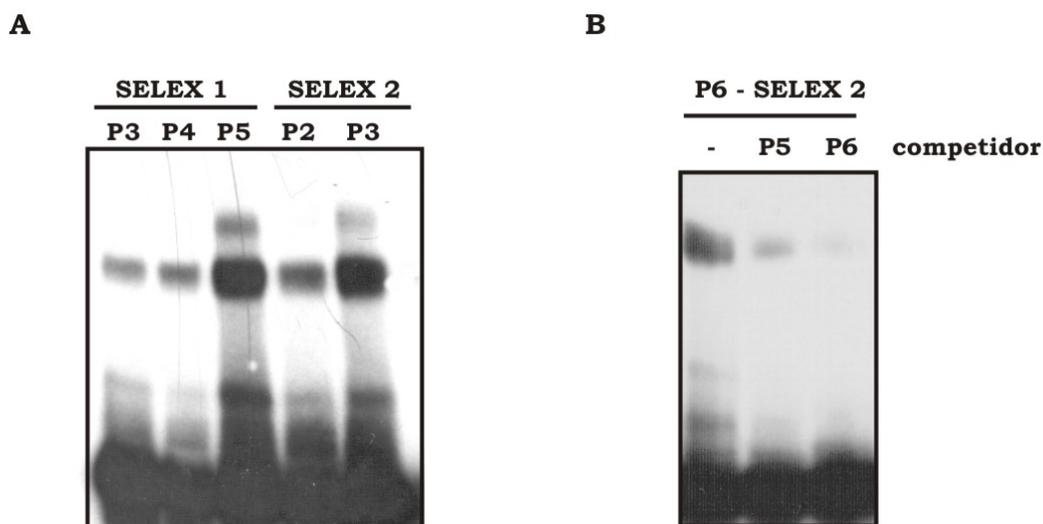


Con este oligonucleótido marcado radioactivamente se realizaron ensayos de unión ADN-proteína en solución y las fracciones unidas se separaron de las libres mediante ensayos de retardo en gel (sección 3.20 de Materiales y Métodos). Las moléculas de ADN seleccionadas fueron eluidas y amplificadas por PCR empleando la metodología descrita en el punto 3.21 (Selección de sitios de unión específicos). Los oligonucleótidos obtenidos fueron digeridos con *Eco*RI y *Hind*III para ser marcados radioactivamente por rellenado con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa y [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP (sección 3.19 de Materiales y Métodos).

Se llevaron a cabo dos experimentos diferentes de selección denominados SELEX1 y SELEX2. El primero de ellos se realizó con una mezcla de oligonucleótidos que contenía la secuencia TGA CTGC en uno de sus brazos conservados que, como se verá más adelante, es

similar al consenso que se obtuvo para ATH1. En consecuencia, para eliminar el efecto sobre la selección de la unión de la proteína a esta secuencia, se planificó un segundo experimento de selex modificando la secuencia existente a TGGCTGC. En este ensayo las reacciones de amplificación se efectuaron con el cebador R2': 5'- CAG AAT TCT ACA GTG GCT GC- 3' en lugar de R2: 5'- CAG AAT TCT TCA GTG ACT GC- 3' (en negrita se resalta la posición modificada).

En la Figura 10A se muestra un ensayo de retardo en gel realizado con la proteína recombinante ATH1<sub>HD</sub>-GST y diferentes mezclas de oligonucleótidos obtenidas luego de dos a cinco rondas de selección en cada experimento de SELEX. Como puede observarse, la proporción de ADN unido fue mayor después de cada paso de selección, indicando que ATH1 fue capaz de seleccionar secuencias específicas a partir de la mezcla en cada nuevo ciclo. Además, al comparar los dos experimentos se observa que en el segundo se produjo un incremento notorio en la unión en etapas más tempranas de selección.

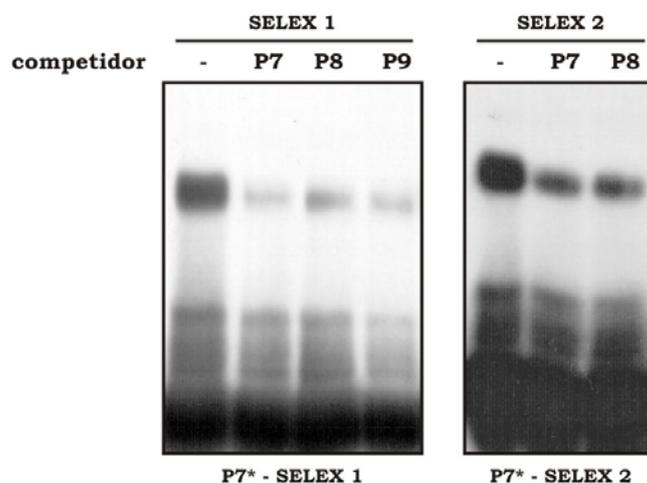


**Figura 10. Unión de ATH1<sub>HD</sub> a diferentes poblaciones de oligonucleótidos.** A. Ensayo de retardo en gel realizado con 100 ng de ATH1<sub>HD</sub>-GST y diferentes mezclas de oligonucleótidos obtenidas luego de dos a cinco ciclos de selección, amplificación y purificación. SELEX 1 y 2 señalan el primer y segundo experimento, respectivamente. B. Determinación del aumento en la especificidad de unión con el avance de los experimentos de selección. Ensayo de competencia realizado con un exceso molar de 50 veces de los oligonucleótidos de los pasos 5 y 6 enfrentados a la ronda 6, marcada radioactivamente con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP, y 15 ng de ATH1<sub>HD</sub>-GST.

A fin de verificar el enriquecimiento de los oligonucleótidos seleccionados en secuencias de ADN reconocidas específicamente por ATH1<sub>HD</sub>-GST se realizaron, en cada una de las rondas, ensayos de competencia con mezclas de oligonucleótidos sin marcar

correspondientes a otros pasos del SELEX. A modo de ejemplo, en la Figura 10B se muestra un ensayo de competencia realizado en la sexta ronda del SELEX2 en el que se emplearon como competidores oligonucleótidos de los ciclos cinco y seis. Como puede observarse, la unión de ATH1<sub>HD</sub> disminuyó con el aumento del número de rondas de selección de los oligonucleótidos competidores. Esta incapacidad de las moléculas de la quinta ronda para competir con la misma eficiencia que las del sexto ciclo confirma el incremento en la mezcla de oligonucleótidos en moléculas unidas específicamente por ATH1<sub>HD</sub> observado en los ensayos de unión directa.

En total, se llevaron a cabo siete pasos de selección y amplificación, luego de los cuales no se observó un aumento de la unión ni tampoco una mayor capacidad de las nuevas poblaciones de oligonucleótidos para competir por la unión al homeodominio de ATH1 (Figura 11). Por lo tanto, se decidió clonar la mezcla de oligonucleótidos de la séptima ronda en el vector pCR 2.1-TOPO. De los clones obtenidos se seleccionaron al azar 30 de ellos para ser secuenciados, 13 correspondientes al primer experimento y 17 resultantes del segundo ensayo de SELEX.



**Figura 11. Ensayos de competencia con las mezclas de oligonucleótidos obtenidas en los pasos 7 a 9.** A la izquierda se muestra un ensayo de competencia realizado con los oligonucleótidos de los ciclos 7 a 9 del primer experimento (SELEX1). La imagen de la derecha corresponde a un ensayo de competencia efectuado con las mezclas 7 y 8 del segundo experimento (SELEX2). En ambos casos un exceso molar de 50 veces de cada competidor se enfrentó a la mezcla de la ronda 7 (marcada radioactivamente) del experimento de SELEX correspondiente y a 15 ng de ATH1<sub>HD</sub>-GST.

En la Figura 12 se presentan las secuencias de los clones obtenidos en ambos experimentos. Como puede observarse, ocho de los clones derivados del segundo experimento contienen la secuencia TGAC repetida dos veces en tandem. Esto sugiere que este motivo es

importante para la unión de ATH1<sub>HD</sub> al ADN. Más aún, esta secuencia está presente en todos los clones analizados, excepto en uno que contiene TGAT (E1 1).

A partir de esta observación, los clones que presentaron un único TGAC fueron alineados para evaluar la presencia de otros nucleótidos conservados por fuera de este núcleo. De este alineamiento se dedujo que la secuencia consenso de ADN reconocida por ATH1<sub>HD</sub> es TGACAGGT y que, dentro de esta secuencia, el núcleo TGACA está altamente conservado, seguido de posiciones con nucleótidos definidos con una frecuencia del 50 al 60% (mostrado en la parte inferior de la Figura 12).

Una característica interesante es que los clones con dos motivos TGAC aparecieron sólo en el segundo experimento de SELEX. Esto pudo deberse a que el oligonucleótido usado en el ensayo SELEX1 contenía la secuencia TGAC en uno de los brazos. Además, al analizar en más detalle los clones obtenidos en el primer experimento, se observa que la secuencia TGAC está presente en la misma hebra en todos los casos, localizada en tandem con el TGAC conservado en el brazo del oligonucleótido. A partir de esto podría especularse que ATH1<sub>HD</sub> es capaz de interactuar eficientemente con moléculas de ADN que presentan dos copias de la secuencia TGAC en tandem, si bien no contienen la secuencia consenso completa, probablemente debido a que son unidas por dos moléculas de proteína. En favor de esto último debe destacarse que en los últimos pasos de selección se observó la formación de un complejo ADN-proteína de menor movilidad cuando se emplearon 100 ng de proteína en las reacciones de unión (Figura 10A). Esta banda de retardo adicional podría corresponder al complejo formado por la interacción de dos proteínas con dos secuencias de ADN presentes en los oligonucleótidos.

Resulta interesante también el hecho de que las dos copias del motivo TGAC seleccionadas en el segundo experimento de SELEX están separadas por tres nucleótidos en siete de los ocho clones que presentan este arreglo. Podría pensarse que este es el espaciamiento óptimo necesario para la unión de dos homeodominios de ATH1. Sin embargo, la distancia entre la secuencia TGAC en el brazo y la seleccionada en el primer experimento es mayor (de tres a siete nucleótidos, principalmente de seis). Dado que la secuencia variable empleada contiene 12 nucleótidos, puede decirse que 3 nucleótidos sería la distancia mínima requerida para la unión al ADN de dos moléculas de ATH1<sub>HD</sub> en tandem.

E1 1	tacagtggctgcCCT <b>ATAGG</b> ATattgtccaggaa
<u>E1 2</u>	tacagtggctgcACG <b>ATGAC</b> ATAATattgtccaggaa
E1 3	tacagtggctgcCG <b>ATGACA</b> AGGAattgtccaggaa
E1 6	tacagtggctgcCG <b>TTGACAGG</b> Aattgtccaggaa
<u>E1 9</u>	tacagtggctgcAT <b>GTGACAGG</b> AAattgtccaggaa
E1 10	tacagtggctgcGT <b>GTGACGTG</b> GAattgtccaggaa
E1 11	tacagtggctgcA <b>AGTGAC</b> ATTTGattgtccaggaa
E1 13	tacagtggctgcGT <b>GTGACAGC</b> Tattgtccaggaa
E1 15	tacagtggctgc <b>TTGACAGATC</b> TGattgtccaggaa
<u>E1 19</u>	tacagtggctgcCC <b>CTGACAAG</b> TGattgtccaggaa
E1 45	tacagtggctgc <b>TGACAGGTG</b> TCAattgtccaggaa
<u>E1 72</u>	tacagtggctgc <b>TGACAGATTG</b> TAattgtccaggaa
E1 73	tacagtggctgcCG <b>CTGACATG</b> ATattgtccaggaa
E2 1	ttcctggacaat <b>TGACTTTTGAC</b> Agcagccactgta
E2 2	ttcctggacaat <b>TGACAGCTGAC</b> Tgcagccactgta
<u>E2 3</u>	ttcctggacaat <b>TGACACGTGACAG</b> gcagccactgta
E2 5	ttcctggacaat <b>TGACGTTTTGAC</b> Cgcagccactgta
E2 7	ttcctggacaat <b>TGACCCTGACG</b> Ggcagccactgta
<u>E2 8</u>	tacagtggctgc <b>TGACAGGT</b> Gattgtccaggaa
E2 9	tacagtggctgcG <b>TTGACGTTT</b> Gattgtccaggaa
E2 10	ttcctggacaat <b>TGACATTTGACA</b> Cgcagccactgta
E2 11	tacagtggctgcC <b>AGTGACAGG</b> TGattgtccaggaa
<u>E2 16</u>	tacagtggctgcCA <b>ATGACTTGT</b> Gattgtccaggaa
E2 18	tacagtggctgcAC <b>ATGACAGAA</b> Tattgtccaggaa
E2 19	ttcctggacaat <b>TGACTATTGAC</b> Agcagccactgta
E2 22	ttcctggacaat <b>AGACATATGAC</b> Agcagccactgta
E2 23	ttcctggacaat <b>TGACGTATCGAC</b> Agcagccactgta
E2 24	tacagtggctgcC <b>GACAGGTGACAG</b> attgtccaggaa
E2 27	tacagtggctgcCG <b>TGACAGGAG</b> attgtccaggaa
E2 32	ttcctggacaat <b>TGACGCGTGACAG</b> gcagccactgta

Consenso	C	G	G	T	G	A	C	A	G	G	T	G
<b>T</b>	2	4	3	<b>19</b>	-	-	1	1	6	2	<b>10</b>	4
<b>G</b>	3	7	7	-	<b>19</b>	-	-	2	<b>11</b>	<b>12</b>	3	8
<b>A</b>	5	3	4	-	-	<b>19</b>	-	<b>16</b>	2	4	6	5
<b>C</b>	9	5	5	-	-	-	<b>18</b>	-	-	1	-	1
<b>%</b>	50	37	37	100	100	100	95	84	56	63	53	44
<b>Posición</b>	-3	-2	-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9

Figura 12. Alineamiento de las secuencias de 30 clones, elegidos al azar, obtenidos del clonado de la mezcla de oligonucleótidos seleccionada por ATH1<sub>HD</sub> luego de siete ciclos de selección. La secuencia de la parte central de 12 pb de cada oligonucleótido se muestra en letra mayúscula y la correspondiente a los brazos en letra minúscula. Los números de los clones, asignados en forma arbitraria, aparecen a la izquierda. E1 o E2 indican clones pertenecientes al primer o segundo experimento, respectivamente. Aquellos oligonucleótidos empleados en los ensayos de retardo en gel están subrayados. Las secuencias se han dispuesto de manera de maximizar el alineamiento y se muestran en todos los casos las hebras que contienen el núcleo TGAC. Las bases que corresponden al consenso obtenido se encuentran en negrita. La tabla en la parte inferior indica la frecuencia de cada nucleótido en cada posición y muestra la secuencia consenso resultante. Esta tabla ha sido construida con los clones que contienen una única secuencia TGAC a fin de mostrar el consenso por fuera de este núcleo.

La secuencia de ADN consenso reconocida por ATH1<sub>HD</sub> resultó ser similar a la seleccionada por las proteínas de la familia KNOX hooded y knotted1 (de cebada y maíz, respectivamente) (Krusell y col., 1997; Smith y col., 2002). Esto indica que estas proteínas podrían interactuar con el ADN mediante mecanismos similares. En consecuencia, a fin de realizar un análisis comparativo de las propiedades de unión de los homeodominios de las familias KNOX y BEL, se decidió estudiar la unión del homeodominio de STM (una proteína de *Arabidopsis* que, como ya se ha mencionado, pertenece a la clase I de la familia KNOX) con las distintas poblaciones de oligonucleótidos obtenidas en los sucesivos pasos de selección.

Con esto en mente, la secuencia codificante para el homeodominio y el extremo C-terminal de STM fue amplificada por PCR a partir del clon de ADNc RAFL09-36-A03 (Seki y col., 2002). Se utilizaron los cebadores STM1 y STM2 (descritos en Materiales y Métodos) y el fragmento obtenido se clonó en los sitios *Bam*HI y *Eco*RI del vector pGEX-3X, en fase con la secuencia codificante para la proteína GST. La proteína de fusión resultante (STM<sub>HD</sub>-GST) fue expresada y purificada siguiendo la metodología empleada para ATH1<sub>HD</sub>-GST (sección 3.16 de Materiales y Métodos).

Cuando se realizaron ensayos de retardo en gel empleando la proteína recombinante STM<sub>HD</sub>-GST se observó un incremento en la unión al ADN a medida que progresaba la selección (no mostrado). Esto sugiere que, en efecto, ATH1<sub>HD</sub> y el homeodominio de STM (STM<sub>HD</sub>) interactúan específicamente con secuencias de ADN similares.

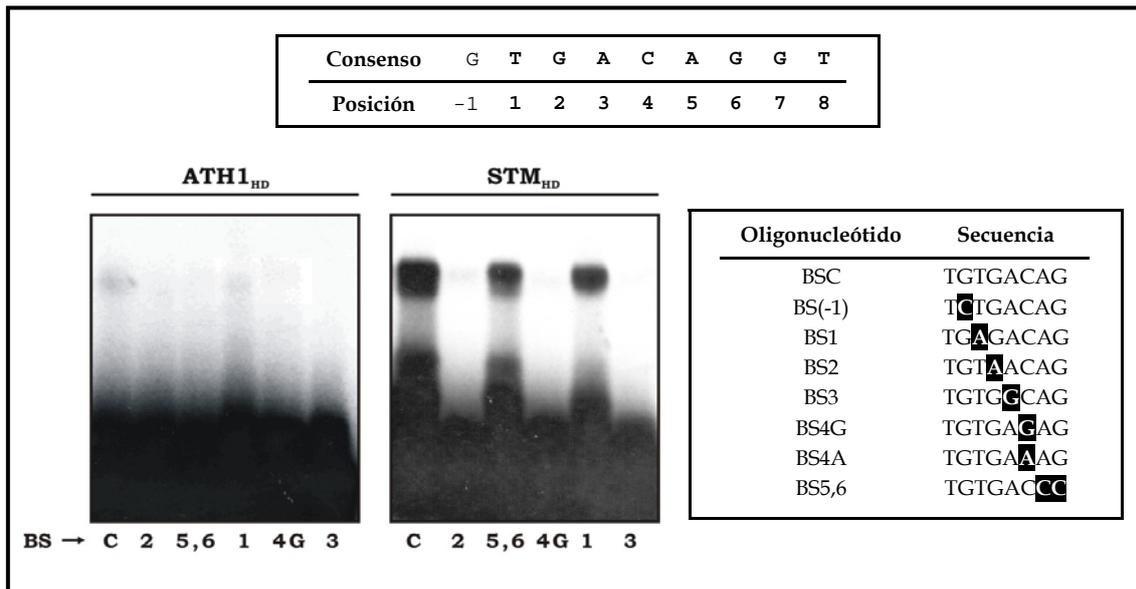
#### 4.1.2.2 Análisis de la especificidad en la unión al ADN de ATH1<sub>HD</sub> y STM<sub>HD</sub>.

A fin de validar los experimentos de SELEX llevados a cabo, se estudió la importancia de las diferentes posiciones dentro de la secuencia consenso obtenida. Para ello se realizaron ensayos de retardo en gel empleando oligonucleótidos sintéticos con sustituciones puntuales dentro del núcleo TGAC. En la tabla que aparece en la Figura 13 se muestra la secuencia del sitio putativo de unión de cada uno de ellos y las secuencias completas se detallan en la sección 3.5 de Materiales y Métodos.

Como se observa en la Figura 13, ni ATH1<sub>HD</sub> ni STM<sub>HD</sub> fueron capaces de unir oligonucleótidos con modificaciones en las posiciones 2 y 3 del núcleo TGAC (BS2 y BS3). Sin embargo, el cambio en la primera posición (T) no produjo un efecto apreciable sobre la unión al

ADN de estas proteínas (Figura 13, BS1). Modificaciones en las posiciones localizadas en sentido 5' del núcleo TGAC tampoco influyeron en la unión (oligonucleótido BS(-1), mostrado más adelante en la Figura 21). Estos resultados concuerdan con lo obtenido en los experimentos de selección dado que en éstos no se recuperaron clones con nucleótidos específicos (o conservados) en estas posiciones.

Como se verá más adelante, la unión de ATH1<sub>HD</sub> a los oligonucleótidos sintéticos fue menor que la observada con los obtenidos de los clones seleccionados. En principio, esta disminución podría corresponder a dos factores. Primero, a que estos oligonucleótidos no contienen la secuencia consenso completa, ya que poseen A en las posiciones 7 y 8 (ver Tabla 4 de Materiales y Métodos). Segundo, a que la unión de ATH1<sub>HD</sub> a oligonucleótidos sintéticos es menos eficiente, independientemente de la secuencia, quizás debido a que poseen una longitud menor. Esto último sugiere que ATH1 preferiría fragmentos de ADN más grandes para la unión.



**Figura 13. Unión de ATH1<sub>HD</sub> y STM<sub>HD</sub> a oligonucleótidos con modificaciones dentro de la secuencia consenso.** Ensayos de retardo en gel realizados con oligonucleótidos con cambios dentro y fuera del núcleo TGAC. En la tabla se describen las secuencias de los diferentes oligonucleótidos empleados en cada caso (BSC a BS5,6).

Al realizar cambios en la posición cuatro del núcleo TGAC, la unión resultó ser diferente dependiendo si la modificación era realizada a A o a G. Mientras que ninguna de las dos proteínas fue capaz de reconocer un oligonucleótido con la secuencia TGAG (Figura 13, BS4G),

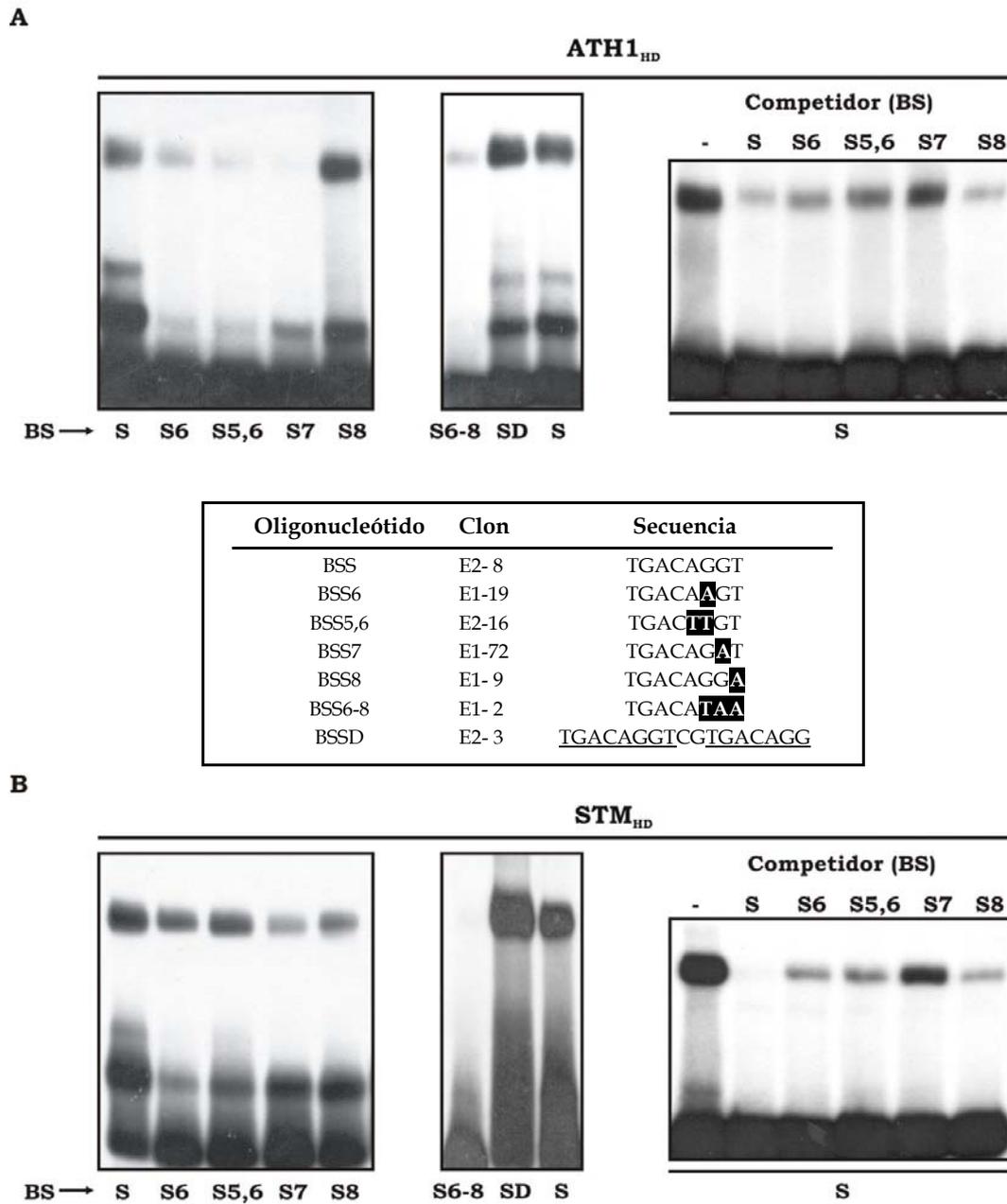
como se verá más adelante ATH1<sub>HD</sub> mostró una unión razonable a la secuencia TGAA, reconocida menos eficientemente por STM<sub>HD</sub> (Figura 21).

Para estudiar la importancia de los nucleótidos en las posiciones en sentido 3' del núcleo TGAC se realizaron ensayos de retardo en gel utilizando oligonucleótidos preparados a partir de los clones seleccionados como se describe en Materiales y Métodos (sección 3.19).

En la Figura 14A se muestra cómo modificaciones en las posiciones cinco, seis y siete de la secuencia consenso produjeron una disminución en la unión al ADN de ATH1<sub>HD</sub>, mientras que no se observó efecto sobre la misma cuando se cambió la posición ocho de T a A (oligonucleótido BSS8). En efecto, solamente este oligonucleótido fue capaz de competir tan eficientemente como el que poseía la secuencia consenso (BSS) por la unión a ATH1<sub>HD</sub>, mientras que oligonucleótidos con cambios en las otras posiciones resultaron menos efectivos (Figura 14A, panel derecho).

Estos resultados, sumados al hecho de que modificaciones simultáneas en las posiciones seis, siete y ocho del consenso afectaron significativamente la unión de ATH1<sub>HD</sub> (Figura 14A, BSS6-8), indican que el consenso obtenido corresponde a la secuencia blanco de esta proteína. Por otro lado, un oligonucleótido con dos copias en tandem de la secuencia TGAC separadas por tres nucleótidos fue reconocido con una eficiencia similar a la secuencia consenso (Figura 14A, BSSD). Esto explica la aparición de clones de este tipo en los ensayos de SELEX realizados.

Al comparar el efecto de los cambios dentro de la secuencia de ADN sobre la unión de ATH1<sub>HD</sub> y STM<sub>HD</sub> se observaron algunas diferencias que se describen a continuación. Como se muestra en la Figura 14, modificaciones en las posiciones 5 y 6 (TGACAG) produjeron menos efecto sobre la unión de STM<sub>HD</sub> que sobre la de ATH1<sub>HD</sub>. Esto es especialmente claro para la posición 5, ya que STM<sub>HD</sub> fue capaz de unir un oligonucleótido con la secuencia TGACC o TGACT tanto como el consenso TGACA. Sin embargo, estas modificaciones afectaron severamente la unión de ATH1<sub>HD</sub> (Figura 13, BS5,6 y Figura 14, BSS5,6). Por otro lado, la presencia de una G en la posición siete de la secuencia unida (BSS7) parece ser particularmente importante para ambas proteínas, mientras que el cambio de T a A en la posición 8, aunque no afecta la unión de ATH1<sub>HD</sub>, reduce la formación del complejo ADN-proteína por parte de STM<sub>HD</sub> (BSS8).



**Figura 14. Unión de ATH1<sub>HD</sub> (A) y STM<sub>HD</sub> (B) a oligonucleótidos con modificaciones en posiciones en sentido 3' del núcleo TGAC.** Ensayos de retardo en gel realizados con oligonucleótidos doble cadena (44 nt) obtenidos luego de la digestión de los clones correspondientes con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*. En la tabla se describen las secuencias relevantes de los distintos oligonucleótidos (BSS a BSSD) y los clones de los cuales provienen. A la derecha se muestran ensayos de retardo en gel en los que se realizaron experimentos de competencia por la unión a BSS. En ambos casos se empleó un exceso molar de 50 veces de los diferentes oligonucleótidos sin marcar, indicados en la parte superior de cada gel.

A través de los ensayos de competencia con oligonucleótidos sin marcar también se comprobó la existencia de diferencias en las preferencias de unión de ATH1 y STM. Por ejemplo, BSS5,6 compitió tan eficientemente como BSS6 y BSS por la unión a STM<sub>HD</sub>, pero

muy pobremente por la unión a ATH1<sub>HD</sub> (Figura 14, panel derecho inferior y superior, respectivamente).

En función de todo lo descrito puede decirse que aunque ATH1<sub>HD</sub> y STM<sub>HD</sub> reconocen secuencias de ADN similares, existen diferencias en el modo en el que estas proteínas interaccionan con el ADN.

#### **4.1.2.3 Estudio de la unión de ATH1<sub>HD</sub> al ADN mediante ensayos de protección y pérdida de nucleósido por ataque con radical hidroxilo**

Con el objetivo de analizar en más detalle la unión de ATH1 con el ADN se llevaron a cabo experimentos de protección al ataque con radical hidroxilo y de interferencia en la unión por pretratamiento del ADN con el mismo reactivo. Estos ensayos permiten estudiar dos aspectos de la interacción de una proteína con el ADN. Por un lado, los experimentos de protección indican las regiones del esqueleto azúcar-fosfato del ADN que son contactadas por la proteína al unirse a su sitio de reconocimiento. Por el otro, los ensayos de interferencia permiten distinguir las contribuciones individuales de cada nucleótido a la estabilidad del complejo ADN-proteína (Dixon y col., 1991; Draganescu y col., 1995).

##### **Ensayos de protección al ataque con radical hidroxilo**

En primer lugar, se estudió la interacción de ATH1<sub>HD</sub> con la secuencia consenso obtenida mediante experimentos de protección contra radicales hidroxilo. Para ello se utilizó un oligonucleótido con la secuencia TGACAGGT (que se denominó I) marcado específicamente en sólo uno de sus extremos 3', de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Luego de realizar la reacción de unión a ATH1<sub>HD</sub>, el ADN fue sometido al ataque con radicales hidroxilo. Las moléculas de oligonucleótido unidas a la proteína se separaron de las no unidas mediante un ensayo de retardo en gel y a continuación se resolvieron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (sección 3.24, Materiales y Métodos). De esta manera, como los enlaces que se encuentran ocluidos por la unión de la proteína son atacados con menos eficiencia por el radical hidroxilo, las bandas correspondientes aparecen con intensidad reducida en el gel de secuencia. Dado que el radical hidroxilo cliva el esqueleto

azúcar fosfato del ADN sin especificidad de secuencia, estas bandas corresponden a los puntos o regiones de contacto de la proteína con el ADN.

Como se observa en la Figura 15A, al comparar los patrones de bandas obtenidos en el ensayo de protección se pudo deducir que ATH1<sub>HD</sub> protege siete nucleótidos en la hebra que contiene la secuencia TGAC (hebra superior en la figura). Esta región incluye los nucleótidos GAC y los cuatro que le siguen en sentido 3'. Sin embargo, debe destacarse que la protección es mayor en la región GACA y disminuye progresivamente hacia el final de la secuencia blanco. Conjuntamente, se observa una moderada, pero reproducible, protección de la posición siete (TGACAGGT).

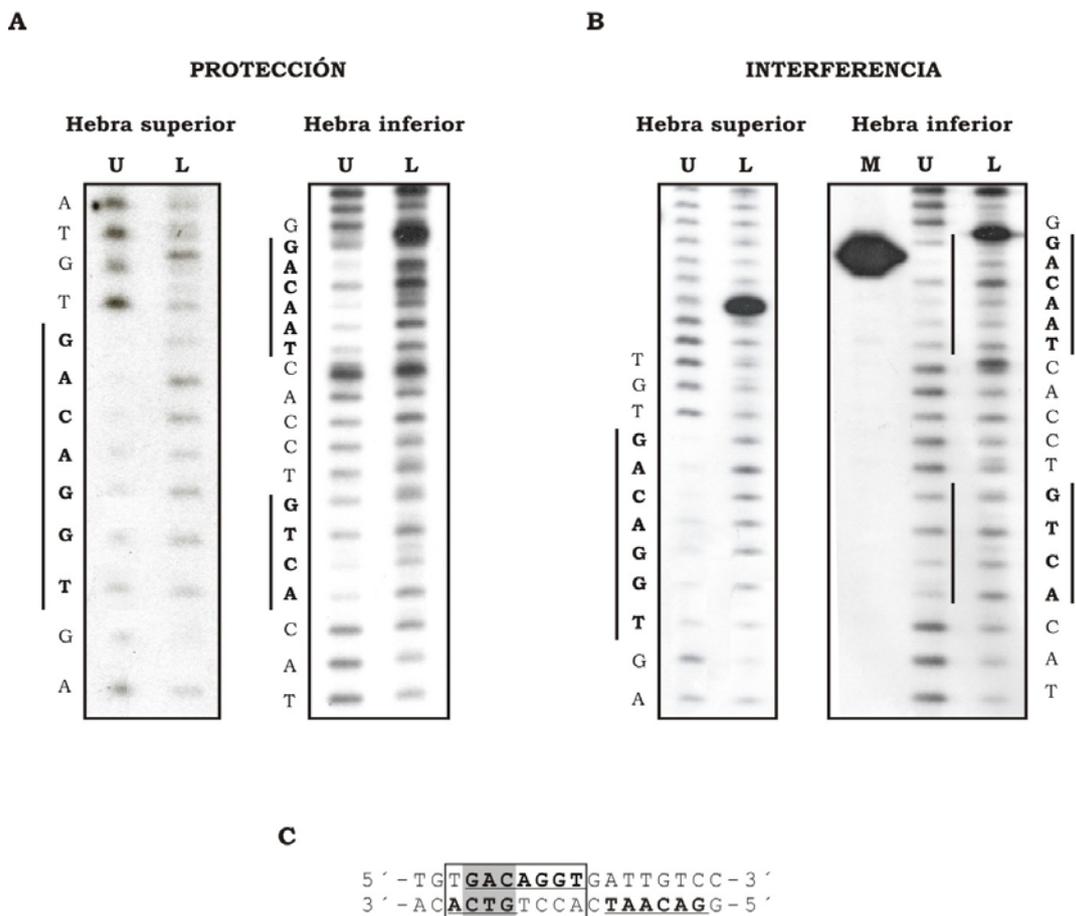
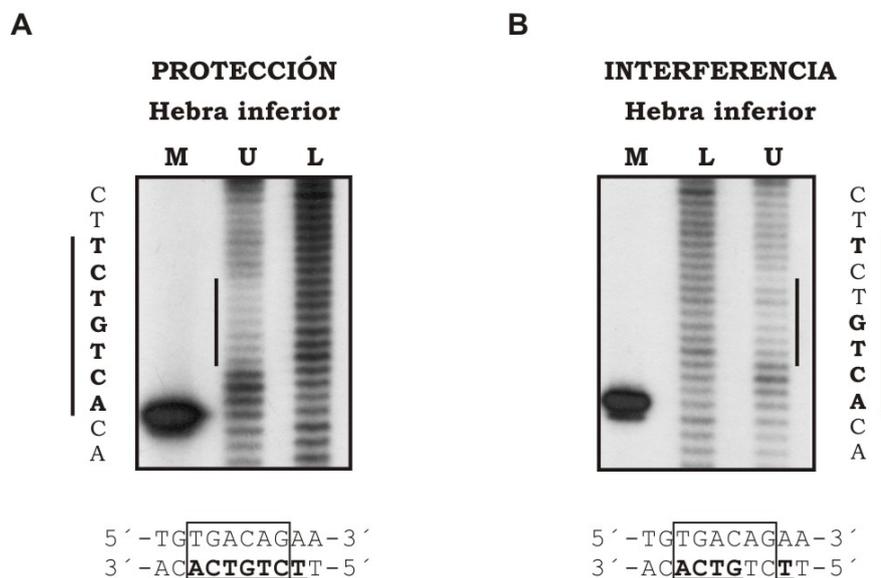


Figura 15. Experimentos de protección (A) e interferencia en la unión (B) por ataque con radical hidroxilo realizado con el oligonucleótido I, que contiene la secuencia 5'-TGACAGGT-3'. El oligonucleótido marcado en uno de los extremos 3' fue sometido al ataque con radical hidroxilo luego (A) o antes (B) de la unión con 0,8 µg de ATH1<sub>HD</sub>. A los lados de cada ensayo se indica la secuencia de ADN de la hebra marcada radioactivamente. La calle M corresponde a un fragmento de ADN de 34 nt utilizado para identificar la posición de cada nucleótido. C. Secuencia del sitio de unión donde las posiciones protegidas aparecen subrayadas y en negrita. El núcleo GAC (GTC) más protegido está sombreado. U, ADN unido; L, ADN libre

La protección obtenida al utilizar el oligonucleótido I marcado radioactivamente en la hebra inferior abarca los nucleótidos 5'-GTCA-3', complementarios a TGAC, pero las dos primeras posiciones aparecen mucho menos protegidas que el resto (Figura 15A). Se observa, además, una segunda región protegida del ataque por radicales hidroxilo, GACAAT, que contiene los nucleótidos más importantes del núcleo reconocido (GAC). A partir de esto puede pensarse que la protección observada corresponde a una segunda molécula de proteína que reconoce esta secuencia. Sin embargo, no se observa la protección correspondiente en la hebra superior. Esto se debería a que esta secuencia está localizada cerca del extremo 3' del oligonucleótido y la señal obtenida en esta región es demasiado débil para ser detectada en el ensayo.

A partir de este resultado se decidió realizar el experimento empleando un segundo oligonucleótido carente de la secuencia antes mencionada y que contiene como sitio de unión la secuencia TGACAGAA. Cuando se realizaron ensayos de protección con este oligonucleótido, denominado II, se observó una región protegida más extensa en la hebra inferior, que abarcó los nucleótidos complementarios a TGACAGA (Figura 16A).



**Figura 16.** Experimento de protección frente al ataque con radicales hidroxilo (A) y de interferencia en la unión (B) realizado con el oligonucleótido II. En las reacciones de unión se emplearon 0,8 µg de ATH1<sub>HD</sub>-GST y 200.000 cpm de ADN. Un fragmento del mismo oligonucleótido digerido con enzimas de restricción se utilizó como marcador de posición (M). En la parte inferior de cada panel se muestra recuadrada la secuencia del sitio de reconocimiento y las posiciones contactadas aparecen subrayadas y en negrita. U, ADN unido; L, ADN libre.

### **Ensayos de interferencia en la unión por radicales hidroxilo**

A partir de ensayos de interferencia al ataque con radicales hidroxilo se obtuvo información adicional sobre los nucleótidos que influyen en la unión de ATH1<sub>HD</sub> al ADN. En estos experimentos el ADN es tratado con agentes capaces de generar radicales hidroxilo en condiciones tales que se obtienen moléculas dañadas en un único sitio a lo largo del esqueleto fosfodiéster. A continuación, esta población es empleada en una reacción de unión con la proteína y las fracciones unidas se separan de las libres mediante ensayos de retardo en gel. Finalmente estas fracciones se analizan en un gel de secuencia en el que aquellos nucleósidos cuya remoción interfiere con la unión de la proteína aparecen como bandas ausentes, o menos representadas, en la fracción unida. De esta manera, pueden identificarse cada uno de los nucleótidos que efectúan contactos energéticamente importantes con la proteína.

En la Figura 15B se muestra un experimento de interferencia en la unión por tratamiento con radicales hidroxilo del oligonucleótido I, previamente marcado radioactivamente en uno de sus extremos 3', realizado como se describe en la sección 3.25 de Materiales y Métodos. Como puede observarse, existe una buena correlación entre la región protegida por ATH1<sub>HD</sub> y las posiciones que son importantes para la unión. Esto significa que todos los nucleótidos que forman parte del área protegida establecen contactos que contribuyen a una unión eficiente con la proteína. Nuevamente, se obtuvieron dos regiones de interferencia en la hebra inferior (Figura 15B, panel derecho) y cuando se empleó el oligonucleótido II, sin el motivo GACA, el patrón de interferencia obtenido se extendió en sentido 3' (Figura 16B). Sin embargo, si se compara con lo obtenido en los ensayos de protección, los nucleótidos complementarios a AG en TGACAGA mostraron una interferencia menor (Figuras 16A y 16B, respectivamente).

#### **4.1.2.4 Estudio de la unión de STM<sub>HD</sub> al ADN mediante ensayos de protección y pérdida de nucleósido causada por ataque con radical hidroxilo**

Con el objetivo de caracterizar la interacción de STM<sub>HD</sub> con el ADN se llevaron a cabo experimentos de interferencia con radicales hidroxilo. De manera similar a lo descrito anteriormente, el ADN marcado en uno de sus extremos 3' fue tratado con agentes generadores de radicales hidroxilo y luego se expuso a la unión con 200 ng de proteína

(sección 3.25 de Materiales y Métodos). En la Figura 17 se muestra el gel de secuencia obtenido al realizar este ensayo con el oligonucleótido I (secuencia consenso, TGACAGGT).

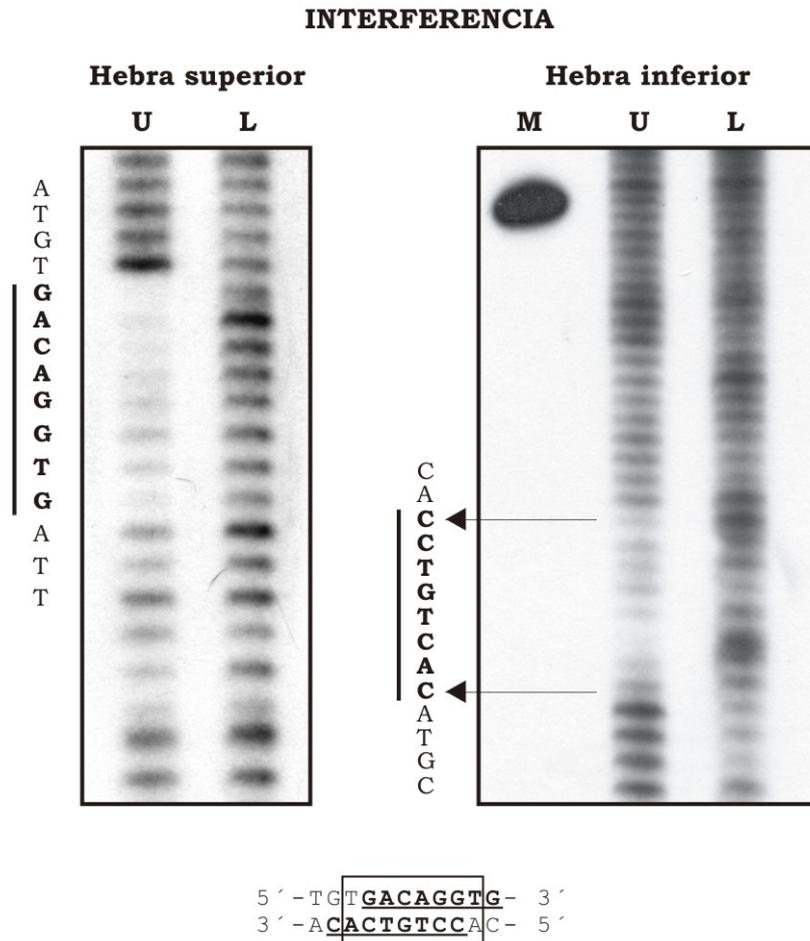
Para el caso de la hebra superior el resultado fue similar al obtenido con ATH1<sub>HD</sub>, con la diferencia de que la eliminación del nucleósido presente en el nucleótido 9 de la secuencia consenso interfirió sensiblemente con la formación del complejo ADN-proteína. En estrecha relación con esta observación, cuando se efectuaron los ensayos de protección correspondientes también se vio que la región protegida por STM era de ocho nucleótidos, extendiéndose una posición más hacia el extremo 3' de la secuencia (TGACAGGTG) respecto del patrón de protección producido por ATH1<sub>HD</sub> (no mostrado).

En cuanto a la hebra inferior, se observó interferencia en la unión a lo largo de ocho nucleótidos, complementarios a la secuencia GTGACAGG (Figura 17, panel derecho). A diferencia de lo obtenido con la proteína ATH1<sub>HD</sub>, en el caso de STM<sub>HD</sub> no se produjo protección (o interferencia) de esta hebra en la zona que contiene la secuencia similar al núcleo reconocido. Esto indica que STM fue capaz de discriminar de modo más eficiente entre las dos secuencias en las condiciones de unión usadas en los ensayos. Este distinto comportamiento podría deberse a las mayores concentraciones de proteína utilizadas en las reacciones de unión de ATH1<sub>HD</sub>, con el fin de obtener una alta proporción de moléculas de ADN unidas. Esto último se debe a que ATH1 interactúa con el ADN de manera menos eficiente que STM<sub>HD</sub>.

Los resultados obtenidos a partir de los experimentos de protección e interferencia se corresponden con los obtenidos en los estudios de las propiedades de unión a ADN de ATH1<sub>HD</sub> y STM<sub>HD</sub>. De esta manera, la especificidad más relajada que presentó ATH1<sub>HD</sub> en relación a la posición 8 (TGACAGG**I**) puede explicarse porque esta proteína protege con poca eficiencia los nucleótidos presentes en esta posición en las dos hebras del ADN. Sin embargo, a pesar de la tolerancia observada a cambios en el cuarto nucleótido (TGAC**C**), no se produjo una reducción de la protección o interferencia en esta posición. Esto indicaría que ATH1<sub>HD</sub> interactúa con el cuarto nucleótido a través de contactos con el esqueleto azúcar-fosfato o que es capaz de establecer interacciones específicas con nucleótidos diferentes. De acuerdo a esto, ATH1 une TGAC y TGAA, pero no TGAG.

Por otra parte, la incapacidad de STM<sub>HD</sub> de unir de manera eficiente oligonucleótidos con modificaciones en la posición 8 está de acuerdo con lo obtenido en los experimentos de

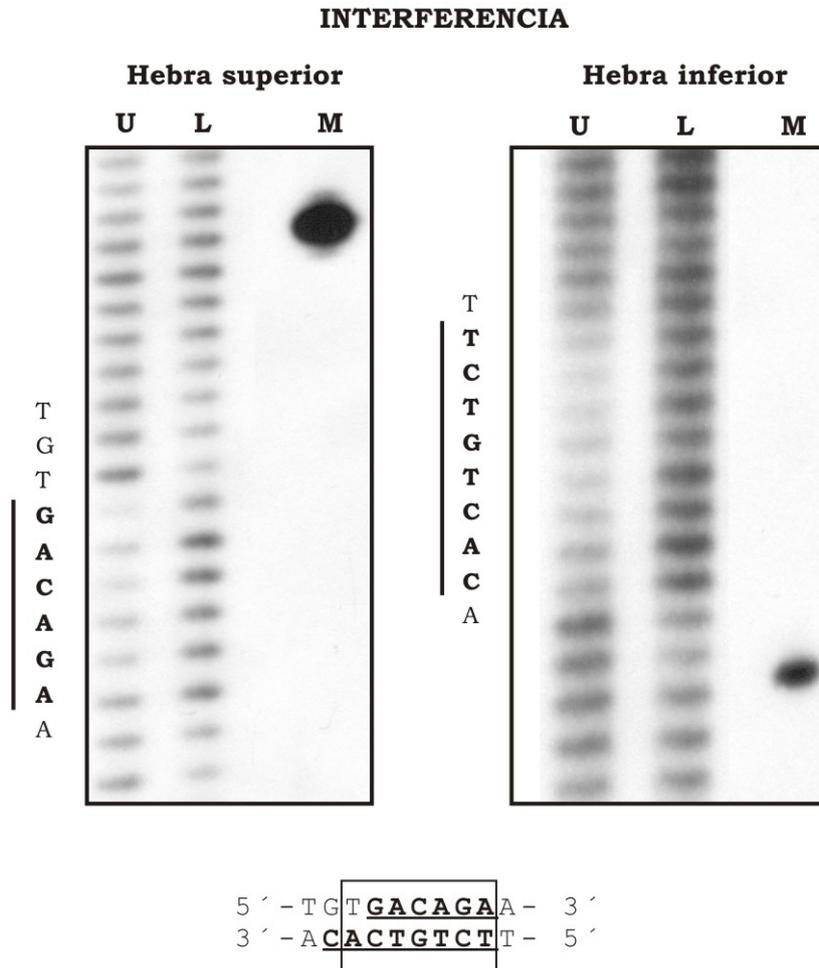
interferencia y protección, ya que en estos ensayos se observó una alta protección de esta posición en ambas hebras del ADN. Más aún, STM<sub>HD</sub> contacta 8 nucleótidos en la cadena superior, uno más hacia el extremo 3' respecto de lo obtenido para ATH1<sub>HD</sub>. En función de estas deducciones y a fin de progresar en la interpretación de estos resultados se realizaron ensayos de protección e interferencia con STM<sub>HD</sub> y el oligonucleótido II que contiene la secuencia TGACAGAA.



**Figura 17. Ensayos de interferencia en la unión de STM<sub>HD</sub> al ADN por pérdida de nucleósido.** Experimento realizado con el oligonucleótido I y 0,2 µg de STM<sub>HD</sub>. Como indicador de tamaño molecular (M) se utilizó una alícuota del ADN marcado en el extremo *Xba*I y digerido con la enzima *Hind*III. Las letras a la izquierda de cada panel señalan la secuencia de ADN (extremo 5' en la parte superior) de la hebra marcada. En la parte inferior se muestra la secuencia del sitio de unión y la región de interferencia se encuentra en negrita y subrayada.

Como se puede observar en la Figura 18, al utilizar un fragmento de ADN que contiene la secuencia de unión TGACAGAA, la región contactada por STM<sub>HD</sub> es de seis nucleótidos en la hebra superior TGACAGAA y de ocho nucleótidos en la hebra inferior, complementarios a la secuencia GTGACAGAA. Esta disminución en la extensión de la región de ADN reconocida en

comparación con la secuencia consenso explica la menor afinidad observada en los ensayos de retardo en gel con el oligonucleótido BSS8 (TGACAGGA). En conjunto, todos estos resultados demuestran la importancia de esta posición para la unión de STM al ADN.



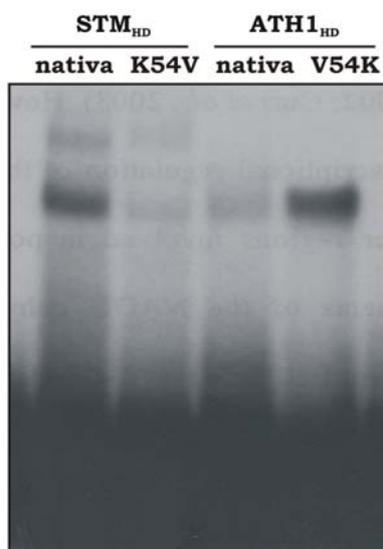
**Figura 18. Ensayo de interferencia en la unión de STM<sub>HD</sub> al oligonucleótido II (5'-TGACAGAA-3').** Experimento realizado con el oligonucleótido I y 0,2 µg de STM<sub>HD</sub>. Una alícuota del ADN digerido con la enzima de restricción *Bgl*III fue utilizada para identificar la posición de la zona de interferencia (M). Las letras a la izquierda de cada panel señalan la secuencia de ADN (extremo 5' en la parte superior) de la hebra marcada. En la parte inferior se muestra la secuencia del sitio de unión y la región de interferencia se encuentra en negrita y subrayada.

#### 4.1.2.5 Análisis de la importancia del residuo 54 de los homeodominios de ATH1 y STM en la interacción con el ADN.

Si bien no existen estudios estructurales de los complejos de unión al ADN de las proteínas de las familias KNOX y BEL, se supone que en esta interacción participan los



excepción. Mientras que el homeodominio de STM presenta lisina (K) en esta posición, ATH1 contiene un residuo de valina (V). Se decidió entonces investigar la influencia de la identidad del residuo 54 del homeodominio en las características de unión al ADN de ATH1 y STM. Con esto en mente se diseñaron oligonucleótidos para generar mutantes puntuales de estas proteínas con un intercambio del aminoácido en la posición 54. De esta manera, mediante la aplicación de la estrategia de mutagénesis sitio-dirigida descrita en la sección 3.15.1 de Materiales y Métodos, se obtuvieron las secuencias codificantes para el homeodominio de STM modificado de lisina 54 a valina 54 (STM<sub>HD</sub>-K54V) y para el motivo de unión a ADN de ATH1 modificado de valina 54 a lisina 54 (ATH1<sub>HD</sub>-V54K). Los insertos obtenidos se clonaron en los sitios *Bam*HI y *Eco*RI del vector pGEX-3X en fase con la secuencia codificante para la proteína GST. A continuación, las proteínas de fusión purificadas se emplearon en ensayos de retardo en gel a fin de analizar la unión con un oligonucleótido que contenía la secuencia consenso TGACAGGT.

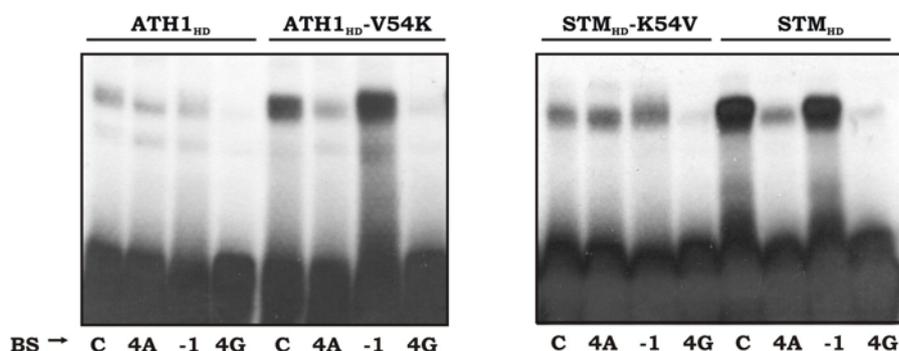


**Figura 20. Comparación de la afinidad de unión al ADN de las proteínas ATH1<sub>HD</sub> y STM<sub>HD</sub> nativas y mutadas en la posición 54 del homeodominio.** Ensayo en gel de retardo realizado con el oligonucleótido I (TGACAGGT) y 100 ng de cada proteína de fusión.

Como se observa en la Figura 20, y de acuerdo con lo obtenido anteriormente, ATH1<sub>HD</sub> nativa une ADN con una eficiencia menor que STM<sub>HD</sub>. En cambio, la mutante ATH1<sub>HD</sub>-V54K posee una eficiencia de unión comparable a la de STM<sub>HD</sub> nativa. Según estos resultados, la mayor eficiencia observada para STM<sub>HD</sub> y ATH1<sub>HD</sub>-V54K estaría determinada por la presencia

del aminoácido lisina en la posición 54. De manera similar, la menor eficiencia de unión de ATH1<sub>HD</sub> se debería a la presencia de valina, en lugar de lisina, en la posición 54.

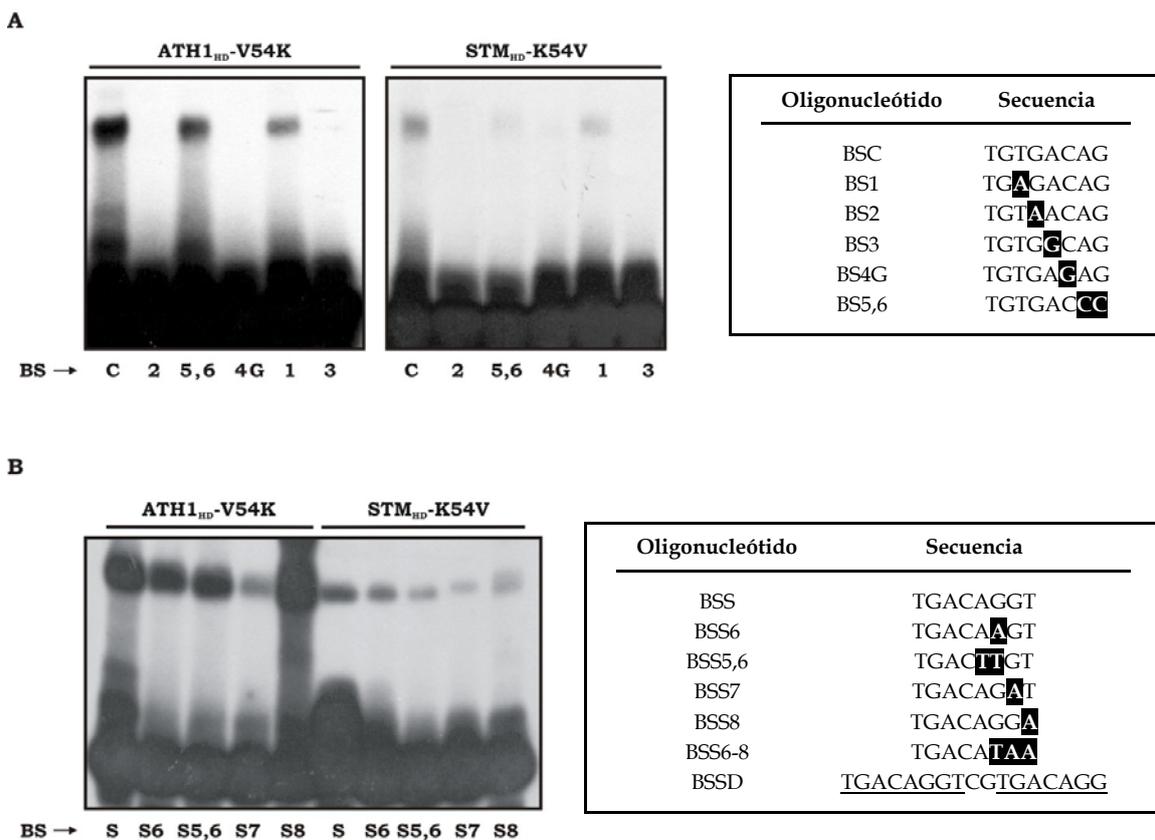
A continuación, se estudió la unión de las proteínas mutantes con oligonucleótidos que contenían variaciones puntuales en la secuencia de reconocimiento y los geles de retardo obtenidos se muestran en las Figuras 21 y 22. Como puede observarse, la introducción de V54 en el homeodominio de STM genera una proteína capaz de reconocer la secuencia TGAA con la misma eficiencia que el núcleo TGAC, mientras que ATH1<sub>HD</sub>-V54K presenta una clara preferencia por una C en la cuarta posición (TGAC) (Figura 21, BSC y BS4A). Por otra parte, cambios en el dinucleótido GA del núcleo TGAC afectan sensiblemente la unión de las dos mutantes (Figura 22A, BS2 y BS3), tal como se vio con las contrapartes nativas en los ensayos realizados con estos oligonucleótidos (Figura 13, BS2 y BS3). En cuanto a la unión con fragmentos de ADN que presentan modificaciones puntuales en las posiciones -1 y 1 (GTGAC), no se observaron diferencias respecto del comportamiento de las proteínas nativas [Figuras 13 y 21, BS(-1) y BS1]. Es decir que ATH1<sub>HD</sub>-V54K y STM<sub>HD</sub>-K54V tampoco se vieron afectadas por cambios en estos nucleótidos.



Oligonucleótido	Secuencia
BSC	TGTGACAG
BS(-1)	T <b>C</b> TGACAG
BS4G	TGTGA <b>G</b> AG
BS4A	TGTGA <b>A</b> AG

**Figura 21. Análisis del efecto de modificaciones en la cuarta posición del núcleo TGAC en la unión al ADN de ATH1<sub>HD</sub>, ATH1<sub>HD</sub>-V54K, STM<sub>HD</sub> y STM<sub>HD</sub>-K54V.** Ensayos de retardo en gel realizados con 100 ng de cada proteína en las reacciones de unión. Los oligonucleótidos empleados se indican en cada calle y la secuencia central de cada uno de ellos se muestra en la tabla. Los recuadros en negro indican las modificaciones realizadas en el sitio de reconocimiento.

Como se observa en la parte B de la Figura 22, la mutante  $ATH1_{HD}\text{-V54K}$  se ve menos afectada que la proteína  $ATH1_{HD}$  nativa por cambios en las posiciones 5 y 6 de la secuencia de unión (TGACAG) y es capaz de unir los oligonucleótidos BSS6 y BSS5,6 de manera similar que la secuencia consenso. En cambio,  $STM_{HD}\text{-K54V}$  se ve más afectada ante alteraciones en las posiciones 5 y 6 de esta secuencia (Figura 22) y muestra una especificidad más relajada en relación al nucleótido presente en la posición 4 (Figura 21, BSC y BS4A). Este comportamiento es idéntico al observado con  $ATH1_{HD}$  nativa (Figuras 14, BSS6 y BSS5,6 y Figura 21, BSC y BS4A).



**Figura 22. Ensayos de unión de las proteínas mutantes  $ATH1_{HD}\text{-V54K}$  y  $STM_{HD}\text{-K54V}$  con oligonucleótidos con diferentes secuencias putativas de unión. A.** Unión a oligonucleótidos sintéticos doble hebra de 28 pb con modificaciones dentro y fuera del núcleo TGAC de la secuencia consenso. La tabla a la derecha de cada panel detalla las secuencias de los distintos oligonucleótidos (BSC a BS5,6). **B.** Unión a oligonucleótidos doble cadena de 44 pb procedentes de los clones resultantes de los experimentos de selección. Estos fragmentos de ADN fueron obtenidos por amplificación con los cebadores R1 y R2' (para que no contengan la secuencia TGAC en el brazo conservado), seguidos de digestión con *EcoRI* y *HindIII*. Las secuencias relevantes de estos oligonucleótidos se muestran en la tabla a la derecha.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en esta sección, puede decirse que el residuo 54 de los homeodominios de  $ATH1$  y  $STM$  sería el principal responsable de las diferencias observadas en las propiedades de unión al ADN de estas proteínas.

Particularmente, este residuo ejerce influencia sobre la afinidad de unión y la especificidad en las posiciones 4, 5 y 6 de la secuencia reconocida. En cambio, dado que frente a modificaciones en T<sub>8</sub> (TGACAGGT) las mutantes ensayadas se comportan como las proteínas nativas de las que derivan, esta afirmación no es válida para las diferencias encontradas en la interacción con la posición 8. En consecuencia, otros residuos, o combinaciones de ellos, participarían en el contacto con esta posición.

#### **4.1.3 Discusión**

En el presente capítulo se ha analizado la interacción con el ADN del homeodominio de la proteína ATH1 de la familia BEL de *Arabidopsis*. Esto se realizó mediante ensayos de selección del sitio de unión, protección (e interferencia) frente al ataque con radicales hidroxilo y ensayos de retardo en gel. Los resultados obtenidos demuestran que ATH1<sub>HD</sub> reconoce la secuencia TGACAGGT, estableciendo contactos directos en ambas hebras con las posiciones 2, 3 y 5 (subrayadas), y efectuando interacciones adicionales con los nucleótidos que se encuentran hacia el extremo 3' del núcleo TGACA.

En la Introducción General se ha discutido la contribución a la unión al ADN de los distintos aminoácidos del homeodominio implicados en la formación del complejo proteína-ADN. En la mayoría de los homeodominios los residuos de las posiciones 47, 50, 51, 54 y 55 de la hélice III están involucrados en el establecimiento de interacciones específicas con el ADN. Como se muestra en la Figura 19, ATH1 presenta Asn47, Ile50, Asn51, Val54 y Arg55 en estas posiciones. Esta combinación particular de aminoácidos está presente solamente en las proteínas que conforman la familia BEL, pero algunos de ellos se encuentran en otros homeodominios de los cuales se tienen datos estructurales. En particular, las estructuras de los complejos homeodominio-ADN de Pbx1 y extradenticle (Passner y col., 1999; LaRonde-LeBlanc y Wolberger, 2003) pueden emplearse aquí para realizar comparaciones, dado que contienen Asn47, Gly50, Asn51, Ile54 y Arg55. Además, estas proteínas unen la secuencia TGAT, similar al núcleo TGAC reconocido por ATH1<sub>HD</sub>. En el complejo Pbx1-ADN, las dos primeras posiciones del núcleo son contactadas por Arg55 mediante interacciones de van der Waals y puentes de hidrógeno, respectivamente. Mientras que Asn51 establece dos puentes de hidrógeno con la posición 3 e interacciones de van der Waals con la base 4 (LaRonde-

LeBlanc y Wolberger, 2003). En función de lo expuesto proponemos que los residuos Arg55 y Asn51 de ATH1<sub>HD</sub> y STM<sub>HD</sub> establecerían interacciones similares (Figura 23). Por su parte, la isoleucina 54 de Pbx1 y extradenticle realiza contactos en la hebra complementaria, más específicamente con el nucleótido adyacente a la posición 4.

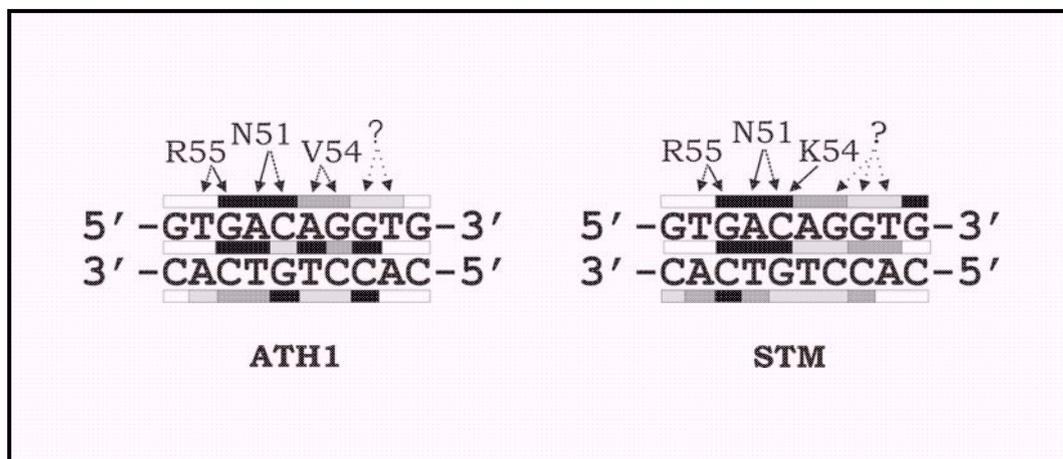
A partir de estudios recientes que realizamos en el laboratorio donde se desarrolló esta tesis hemos propuesto que los nucleótidos GAC de la secuencia TGAC interaccionan con los residuos Arg55, Asn51 y Lys54 del homeodominio de una proteína de la familia KNOX de girasol (Tioni y col., 2005). También hemos deducido que los nucleótidos presentes en la región 3' de la secuencia unida serían reconocidos por residuos de las posiciones 50 y/o 54. Es importante destacar que las proteínas BEL contienen los mismos aminoácidos en estas posiciones, a excepción del residuo valina 54.

En base al estudio que hemos realizado de las diferentes propiedades de unión que presentan ATH1<sub>HD</sub> y STM<sub>HD</sub>, así como también sus respectivas mutantes, proponemos que el residuo valina 54 de ATH1<sub>HD</sub> establecería contactos principalmente con las posiciones 5 y 6 (TGACAG), y no (o en forma menos importante) con la posición 4. Esto último conduciría a una especificidad menos estricta por el nucleótido presente en esta posición en comparación con lo que ocurre con los homeodominios que contienen lisina 54 (familia KNOX en la superclase TALE).

La Figura 23 resume el modelo planteado de interacción de ATH1 y STM con la secuencia TGACAGGT. Según este esquema, el aminoácido lisina 54 presente en STM<sub>HD</sub> nativa y ATH1<sub>HD</sub>-V54K establecería uniones puente de hidrógeno con la G complementaria a C en TGAC. La formación de estos enlaces sería la causa de la mayor afinidad de unión mostrada por las proteínas con lisina en la posición 54. De modo diferente, el aminoácido valina presente en ATH1<sub>HD</sub> y STM<sub>HD</sub>-K54V sólo establecería uniones más débiles como las de van der Waals o mediadas por moléculas de agua (Figura 23).

Los aminoácidos encargados de establecer contactos con el ADN que forman parte del homeodominio de ATH1 también se encuentran presentes en las proteínas BEL descritas hasta el momento. A partir de esto puede pensarse que estas proteínas reconocerían secuencias idénticas o muy similares de ADN.

Como se ha comentado anteriormente, la interacción entre las proteínas KNOX y BEL se produce a través de dominios proteicos localizados fuera del homeodominio (Bellaoui y col., 2001; Müller y col., 2001). Un estudio reciente sugiere que el complejo formado por una proteína KNOX y una proteína BEL de papa interacciona con una secuencia presente en el promotor de *ga20ox* que contiene dos copias en tandem del motivo TGAC, separadas por un pb (Chen et al., 2004). Esto implicaría que en este complejo las hélices de reconocimiento de los dos homeodominios están orientadas en forma antiparalela en lados opuestos de la molécula de ADN. Teniendo en cuenta las características de unión de las proteínas KNOX y BEL descritas en este capítulo, especulamos que el homeodominio que estaría interaccionando con el primer motivo TGAC necesita reacomodar algunos de los contactos con el ADN a fin de permitir la unión de la otra molécula de proteína en el motivo adyacente. De acuerdo a los resultados obtenidos por Chen y col. (2004), sólo el dinucleótido GA es esencial para que se produzca la unión al primer sitio TGAC, mientras que la unión al segundo requiere de la secuencia GAC. Estas imposiciones coinciden con lo obtenido en nuestro estudio para la unión de una proteína BEL y una proteína KNOX, respectivamente.



**Figura 23. Modelo planteado de la interacción de ATH1 y STM con el ADN.** Se muestran las dos hebras de la secuencia unida por estas proteínas. Las barras en medio ilustran la importancia de cada par de bases para la unión, deducida de los distintos sitios de unión ensayados en los geles de retardo. En las barras superior e inferior se representa la importancia de los nucleótidos de cada cadena de ADN, obtenida de los estudios de interferencia en la unión por ataque con radicales hidroxilo. La intensidad del color gris señala la importancia relativa de cada posición. En la parte superior aparecen los residuos de aminoácidos del homeodominio que, de acuerdo a lo que hemos propuesto, interaccionan con cada posición de la secuencia reconocida. Las flechas completas y punteadas indican uniones puente de hidrógeno y de van der Waals, respectivamente.

En conclusión, si bien las propiedades de unión al ADN de ATH1, y probablemente las de todas las proteínas de la familia BEL, muestran similitud con las de las proteínas KNOX, existen diferencias evidentes en cuanto a la afinidad y selectividad que presenta esta interacción. Estas diferencias pueden atribuirse principalmente al aminoácido de la posición 54 del homeodominio y, probablemente, son esenciales para la función de estas proteínas *in vivo* si se tiene en cuenta la conservación de este residuo en las proteínas de cada familia.