

## **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. .

## 4.2. 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.

### 4.2.1 Introducción

La heterodimerización entre factores de transcripción es un evento común que constituye una manera de optimizar el potencial de un factor en particular para regular en forma diferencial múltiples genes. Desde hace varios años se vienen describiendo numerosas interacciones entre proteínas con homeodominio responsables del control de procesos de desarrollo en hongos y animales. En este sentido, diversos estudios realizados con proteínas de animales pertenecientes a las familias HOX y PBC han demostrado que la formación de complejos entre ellas modula su afinidad por sitios específicos en el ADN (Chang y col., 1997) y también determina la especificidad de la unión (Mann y Chan, 1996). Además, los 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 (Saleh y col., 2000).

En distintas especies de plantas, en los últimos años se han comenzado a realizar estudios de interacción entre proteínas de las familias KNOX y BEL (Müller y col. 2001; Bellaoui y col. 2001; Smith y col. 2002; Byrne y col. 2003; Chen y col. 2003; Smith y Hake. 2003; Bhatt y col. 2004; Hackbusch y col. 2005; Kanrar y col., 2006). En cebada y en *Arabidopsis*, por ejemplo, mediante ensayos de doble híbrido en levaduras se demostró que proteínas de estas familias son capaces de interaccionar entre sí de manera específica y que, además, poseen patrones de expresión coincidentes en las plantas correspondientes (Bellaoui y col., 2001; Müller y col., 2001). Por otro lado, estudios realizados *in vitro* han demostrado que la proteína de maíz KNOTTED-1 (KN-1) interacciona con KIP (por KNOTTED-1 Interacting Protein), una proteína de la familia BEL de esta especie (Smith y col., 2002).

A partir de todos estos trabajos pudo establecerse que las proteínas KNOX y BEL interaccionan entre sí a través de motivos proteicos presentes en porciones N-terminales de las mismas. Se encontró que el motivo KNOX2, ubicado dentro del dominio MEINOX, contiene una larga hélice  $\alpha$  anfipática conservada necesaria para la formación de estos complejos proteína-

proteína (Sakamoto y col., 1999; Müller y col., 2001; Chen y col., 2003). Por otro lado, la región responsable de la dimerización en las proteínas BEL está constituida por el dominio MID, llamado así por MEINOX Interaction Domain por Bellaoui y col. (2001). Este dominio está formado por una región de tres hélices  $\alpha$ , denominada BEL (Figura 5 de la Introducción general), que participa en la determinación de la especificidad de las interacciones BEL-KNOX, y por el dominio SKY, el cual estaría involucrado en modular la afinidad de estas interacciones (Chen y col., 2003). Además, regiones C-terminales de las proteínas BEL, incluyendo el homeodominio, parecen ser importantes en la discriminación entre las distintas proteínas KNOX y en la determinación de la afinidad de unión (Bellaoui y col., 2001).

Estudios llevados a cabo por Chen y col. (2003) mostraron que la proteína KNOX de clase 1 de papa POTH1 es capaz de interactuar *in vitro* con siete proteínas de la familia BEL de esta misma especie. Estos autores observaron que el patrón de expresión del gen *Poth1* coincide en diversos órganos con los de distintos genes BEL y esto los llevó a especular que la interacción con estos diferentes factores modularía la actividad de POTH1 en cada tipo celular (Rosin y col., 2003).

Ensayos realizados con las proteínas PENNYWISE (PNY/BLH9) y POUND-FOOLISH (PNF/BLH8) de la familia BEL de *Arabidopsis* mostraron que estas proteínas interactúan con STM y KNAT1 (KNOX de clase I) (Smith y Hake, 2003; Kanrar y col., 2006). A través del análisis de las mutantes en cada uno de los genes, y de las dobles mutantes, se encontró que estos heterodímeros KNOX-BEL cumplen un papel importante en el establecimiento de la arquitectura de la inflorescencia de *Arabidopsis*. PNY-STM y PNF-STM regulan la especificación floral y el mantenimiento de los límites entre los primordios florales y el meristema de inflorescencia, mientras que los cuatro heterodímeros están involucrados en modular la elongación del entrenudo en la inflorescencia (Kanrar y col., 2006).

Si bien diversos complejos BEL-KNOX han sido reportados en distintas especies y se ha demostrado la participación de algunos de ellos en la regulación de diferentes aspectos del desarrollo vegetal, son escasos los estudios realizados en relación a la interacción de estos complejos con el ADN. Como se comentó en el capítulo anterior, se ha encontrado que el complejo formado por las proteínas de papa POTH1 (KNOX) y StBEL5 (de la familia BEL) interactúa con la secuencia TGA $\overline{C}$ TTGAC, que contiene dos sitios TGAC en tandem,

presente en el promotor del gen *ga20ox1* y reprime la transcripción (Chen y col., 2004). Por otra parte, se ha reportado que la formación del complejo KN1-KIP produce un aumento en la afinidad de unión a un fragmento de ADN con la secuencia TGACAGGT en ensayos *in vitro* (Smith y col., 2002). En función de estos resultados puede pensarse que diferentes complejos KNOX-BEL presentarían distintas propiedades de unión al ADN.

Si se considera el alto grado de conservación que existe entre los homeodominios de estas familias y su participación en la regulación de numerosas funciones biológicas uniéndose a secuencias de ADN muy similares, resulta particularmente interesante estudiar los mecanismos por medio de los cuales estos factores de transcripción logran su especificidad funcional.

Teniendo en cuenta lo expuesto más arriba y los resultados obtenidos durante el desarrollo de la presente Tesis sobre las características de la interacción de ATH1 y STM con la secuencia TGACAGGT, se decidió estudiar en más detalle la unión al ADN de los complejos BEL-KNOX. En este capítulo se presentan los resultados del análisis de la interacción del complejo formado por las proteínas **STM** y **BLH3** de *Arabidopsis* (pertenecientes a las familias KNOX y BEL, respectivamente) con secuencias de ADN con uno o dos sitios TGAC, mediante estudios *in vitro* e *in vivo* (en levadura). Por último, a través de una exploración del genoma de *Arabidopsis* se identifican los genes funcionalmente relacionados con las proteínas KNOX y BEL que contienen estas secuencias en sus regiones promotoras.

## 4.2.2 Resultados

### 4.2.2.1 Análisis de la unión al ADN del complejo BLH3-STM

Para estudiar la interacción de las proteínas BLH3 y STM con el ADN se decidió expresarlas en forma recombinante en *E. coli* como productos de fusión a la proteína de unión a maltosa (MBP) y a la glutatión *S*-transferasa (GST), respectivamente. En primer lugar, la región codificante para STM fue amplificada por PCR a partir del clon RAFL09-36-A03 (Seki y col., 2002) y clonada en los sitios *Bam*HI y *Eco*RI del vector pGEX-3X (Amersham Pharmacia Biotech). Como cebadores se utilizaron los oligonucleótidos STM-N y STM2, detallados en la tabla 3 de Materiales y Métodos.

En el caso de BLH3, se decidió clonar el fragmento que codifica desde el dominio MID hasta el extremo C-terminal de la proteína (aminoácidos 169 a 524) en fase con la MBP en el vector pMAL-c2. Esto porque, como se ha mencionado, el dominio MID es el responsable de la interacción con el dominio MEINOX de las proteínas KNOX. Además, estudios previos llevados a cabo por Müller y col. (2001) han demostrado que la eliminación de la región amino terminal previa al dominio MID de las proteínas BEL no afecta la formación de los heterodímeros. En efecto, estos autores utilizan versiones reducidas de estas proteínas, semejantes a la empleada en este trabajo, para realizar ensayos de interacción proteína-proteína *in vitro*.

Por otro lado, para evitar posibles interferencias en la formación de los complejos BLH3-STM por la presencia de la proteína MBP fusionada directamente a la caja SKY, se agregó una secuencia de siete aminoácidos para que actúe a modo de bisagra flexible. La metodología empleada se describe en la sección 3.15.2.

Finalmente, las proteínas de fusión STM-GST y BLH3-MBP fueron purificadas por cromatografía de afinidad a partir de columnas de glutatión-agarosa (sección 3.16.1) y agarosa unida a amilosa (sección 3.16.2), respectivamente.

Teniendo en cuenta el consenso obtenido para ATH1, decidimos analizar la capacidad del homeodominio de BLH3 de reconocer esta secuencia. Como se muestra en el gel de retardo de la Figura 24A, BLH3-MBP fue capaz de unir el oligonucleótido BSC (denominado en adelante como BS1) que contiene la secuencia TGACAGGT, dando lugar a la formación de dos bandas de retardo de diferente movilidad.

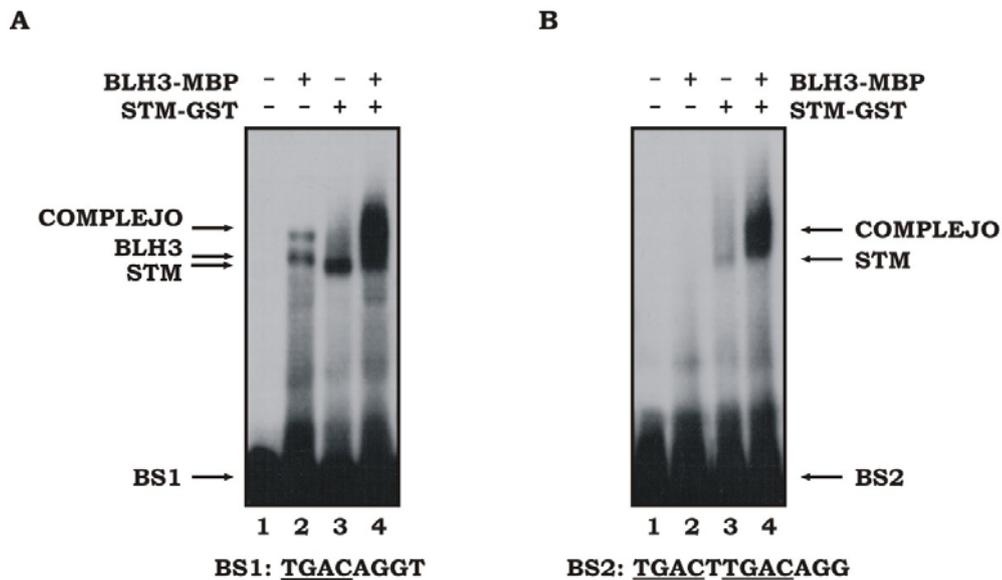
En concordancia con los resultados descriptos en el capítulo anterior para la unión al ADN del homeodominio de STM, la proteína completa también fue capaz de interactuar con la secuencia TGACAGGT (Figura 24A), pero la intensidad de unión observada fue sensiblemente menor a la obtenida con cantidades equimolares de STM<sub>HD</sub> (no mostrado). Por otra parte, para lograr una proporción de ADN unido similar a la obtenida con BLH3 fue necesario emplear cantidades tres a cuatro veces mayores de STM-GST en las reacciones de unión.

Al realizar la reacción de unión con BS1 en presencia de las proteínas BLH3 y STM se observó un aumento considerable en la cantidad de ADN unido (Figura 24A, calle 4). Esto sugiere la existencia de un efecto cooperativo. Dado que estas proteínas son capaces de

interaccionar entre sí en ensayos de doble híbrido en levaduras (Hackbusch y col., 2005; Cole y col., 2006), el aumento observado en la afinidad de unión sería consecuencia de la formación de un complejo entre STM y BLH3. En este sentido, en los experimentos de unión llevados a cabo se observó la presencia de una banda de retardo de menor movilidad respecto de las producidas por las proteínas individuales (Figura 24A).

Para estudiar si esta mayor eficiencia de unión era consecuencia de la formación de un complejo proteína-proteína se realizaron una serie de experimentos de retardo en gel.

En primer lugar se decidió incubar BLH3-MBP en presencia de la proteína recombinante GST, o agregar la proteína MBP a la reacción de unión de STM-GST. En estos ensayos no se observaron modificaciones en la intensidad de las bandas de retardo (no mostrado). Esto sugiere que el aumento en la unión al ADN observado es consecuencia de la interacción entre STM y BLH3.



**Figura 24.** La formación del complejo BLH3-STM aumenta la eficiencia de unión a moléculas de ADN que contienen tanto uno como dos sitios TGAC. **A.** Ensayo de retardo en gel donde se analiza la unión de las proteínas BLH3 (60 ng) y STM (200 ng) individuales (calles 2 y 3, respectivamente) o combinadas (calle 4), a un oligonucleótido con el núcleo TGAC (BS1). **B.** Ensayo de retardo en gel realizado en las mismas condiciones que en (A), pero con el oligonucleótido BS2 que contiene dos sitios TGAC. La secuencia de unión alrededor del motivo TGAC de los oligonucleótidos BS1 y BS2 se indica en la parte inferior de cada Figura.

Además, cuando se realizaron reacciones de unión con BLH3-MBP en presencia de STM<sub>HD</sub>, en lugar de la proteína completa, se vio que el homeodominio de STM no era suficiente para producir un aumento en la unión al ADN (no mostrado). En estos ensayos, solamente se

observaron las bandas de retardo correspondientes a los complejos de cada proteína con el ADN sin modificaciones en la eficiencia de unión.

A continuación, se efectuaron experimentos similares a los anteriores con la proteína recombinante MID-BLH3 (sección 3.15.2 de Materiales y Métodos). Esta proteína posee el dominio MID pero carece del homeodominio y por lo tanto es incapaz de interactuar con el ADN. Sin embargo, cuando se la incubó en presencia de STM fue capaz de producir un aumento en la intensidad de la banda de retardo y una disminución de su movilidad (no mostrado).

En conjunto, estos resultados indican que las regiones responsables de la heterodimerización entre las proteínas BEL y KNOX son necesarias, y suficientes, para producir el aumento en la afinidad de unión al ADN que presenta el complejo BLH3-STM.

Como se comentó en la introducción de este capítulo, el complejo formado por las proteínas de papa POTH1 y StBEL5 requiere la presencia de dos copias en tandem de la secuencia TGAC, separadas por una T, para su unión al ADN (TGACTTGAC) (Chen y col., 2004). En consecuencia se decidió analizar la unión de BLH3 y STM a un fragmento de ADN que contenía la secuencia de unión de BS1 precedida por un núcleo TGAC, TGACTTGACAGGT.

Con el fin de emplear en los experimentos de retardo un oligonucleótido de tamaño similar a BS1, el oligonucleótido sintético doble hebra BS2 (tabla 4, Materiales y Métodos) fue clonado en los sitios *Bam*HI y *Eco*RI del plásmido pBluescript SK<sup>-</sup>. A partir de este clon se amplificó un fragmento de ADN que luego fue digerido con las enzimas *Hind*III y *Xba*I. El oligonucleótido, una vez purificado, se marcó radioactivamente como se describe en la sección 3.19 de Materiales y Métodos.

Al realizar los ensayos de unión con el fragmento BS2 se obtuvieron resultados similares a los observados con BS1, pero con una reducción general de la eficiencia de unión (Figura 24B).

A partir de los experimentos descritos puede decirse que la presencia de un segundo sitio de unión no sería necesaria para la interacción eficiente del complejo STM-BLH3 con el ADN *in vitro*.

#### 4.2.2.2 Efecto de la concentración de BLH3 y STM sobre la afinidad de unión al ADN

Para investigar en más detalle las características de la interacción con el ADN de BLH3, STM, y del complejo que estas proteínas forman, se decidió analizar la unión a BS1 y BS2 de distintas cantidades de proteína en presencia, o ausencia, de una concentración constante de la otra.

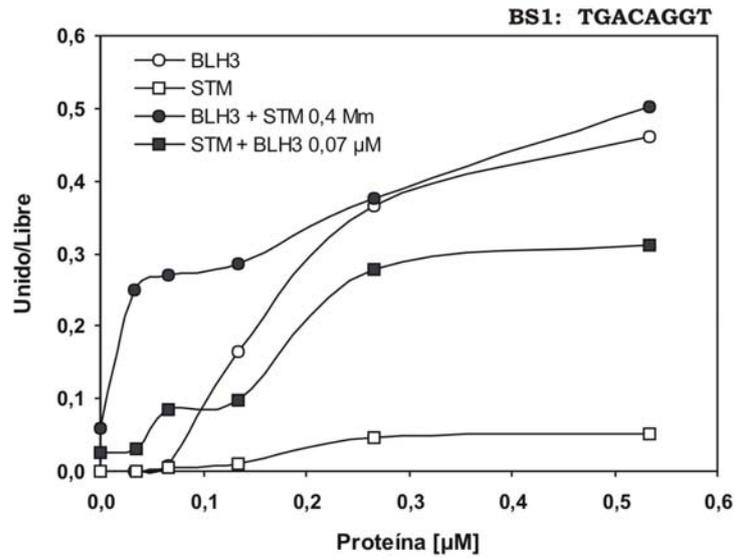
Con esto en mente se realizaron ensayos de retardo en gel con los oligonucleótidos BS1 y BS2. A continuación, se determinaron las cantidades de ADN unido y libre mediante medición en contador de centelleo de las bandas obtenidas en cada calle. En la Figura 25 se grafican los resultados de estos experimentos.

Cuando se analizó la unión con el ADN de concentraciones bajas de proteína se vio que BLH3 y STM unen de manera similar, y con muy poca eficiencia, tanto el oligonucleótido BS1 como el que contiene dos sitios TGAC en tandem (BS2) (Figura 25, curvas con símbolos blancos). Al emplear mayores cantidades de proteína en las reacciones de unión se observó un aumento pronunciado de la proporción de ADN unido por BLH3, mientras que la unión de STM mostró un leve incremento (Figura 25).

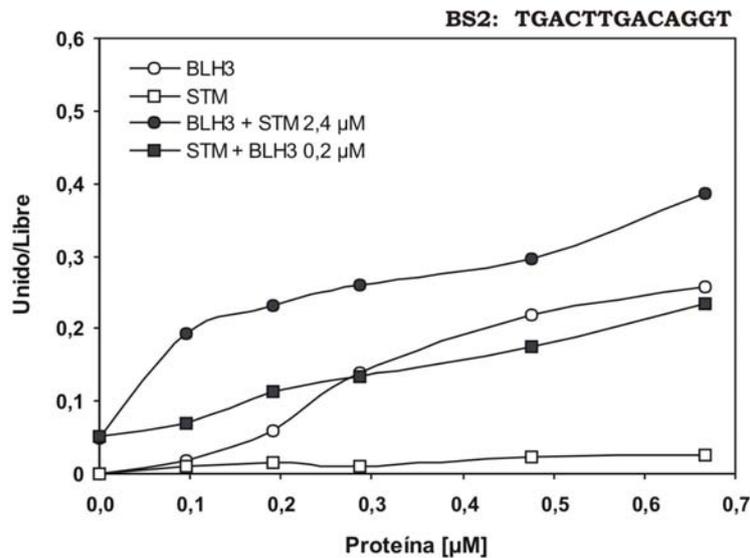
Como se ha mencionado, Hackbusch y col. (2005) han realizado ensayos de doble híbrido en levaduras con el fin de investigar la capacidad de las proteínas BEL y KNOX de *Arabidopsis* para formar homo y heterodímeros. Estos autores encontraron que BLH3, además de heterodimerizar con STM, es capaz de interaccionar consigo misma. A partir de estas observaciones podría pensarse que la mayor afinidad de unión al ADN mostrada por BLH3 correspondería a la formación de un complejo entre dos moléculas de esta proteína. Esta suposición explicaría también la presencia de dos bandas de diferente movilidad en los geles de retardo (Figura 24A).

De acuerdo a los resultados mostrados en la Figura 25, la inclusión de la otra proteína en las reacciones de unión produce un claro aumento en la proporción de ADN unido (símbolos negros, Figura 25). Este efecto es más pronunciado cuando las concentraciones de BLH3 son bajas (menores a 0,2-0,3  $\mu\text{M}$ ; Figura 25), mientras que al aumentarlas el efecto de la presencia STM sobre la unión a BS1 desaparece, o disminuye en el caso de BS2. Este comportamiento puede explicarse si se considera que la elevada afinidad de unión de BLH3 respondería a la formación de complejos consigo misma.

A



B



**Figura 25. Efecto de la concentración de proteína sobre la afinidad de unión al ADN. A.** Unión de cantidades crecientes (0,03-0,53  $\mu\text{M}$ ) de BLH3 (círculos) o STM (cuadrados) al oligonucleótido BS1 que contiene un único núcleo TGAC. Los experimentos de retardo en gel se llevaron a cabo en ausencia (símbolos blancos) o en presencia (símbolos negros) de la otra proteína (STM: 0,40  $\mu\text{M}$ ; BLH3: 0,07  $\mu\text{M}$ ). **B.** Ensayos similares realizados empleando en las reacciones de unión el oligonucleótido BS2 (que contiene dos sitios TGAC) y de 0,10 a 0,67  $\mu\text{M}$  BLH3 o STM, en ausencia o en presencia STM 2,4  $\mu\text{M}$  o BLH3 0,20  $\mu\text{M}$ , según el caso.

Por otro lado, cuando se agregó una cantidad constante de BLH3 a concentraciones crecientes de STM, el efecto en la unión al ADN por la formación del complejo BLH3-STM fue más pronunciado con concentraciones de STM por encima de 0,2-0,3  $\mu\text{M}$  (Figura 25). En estos

ensayos se utilizaron pequeñas cantidades de BLH3 (0,07-0,2  $\mu$ M) a fin de minimizar el efecto de la formación de complejos BLH3-BLH3.

Por último, debe destacarse que se obtuvieron mayores niveles de ADN unido en los experimentos realizados con el oligonucleótido BS1 tanto cuando se lo incubó con las proteínas individuales como combinadas, y en todas las concentraciones ensayadas. Esto concuerda con los resultados descritos anteriormente (Figura 24).

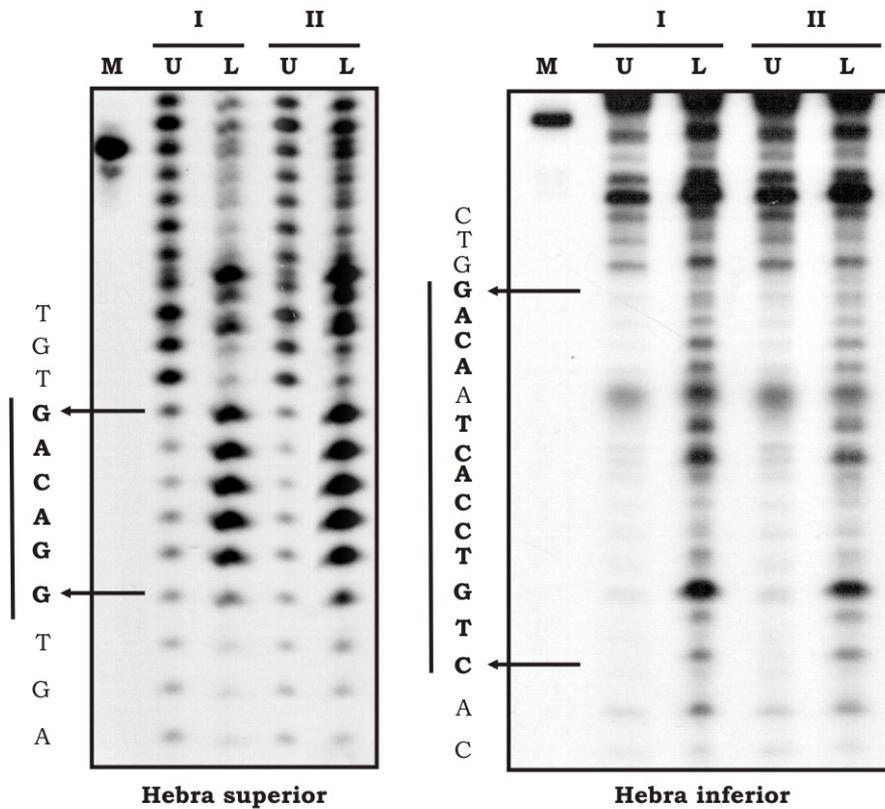
#### **4.2.2.3 Estudio de la interacción con BS1 y BS2 mediante ensayos de interferencia en la unión por tratamiento con radical hidroxilo**

Para obtener información acerca de los nucleótidos dentro de la secuencia de BS1 y BS2 que efectúan contactos energéticamente importantes con BLH3, sola o en presencia de STM, se llevaron a cabo experimentos de interferencia por ataque con radical hidroxilo. Como se ha mencionado, en estos ensayos el oligonucleótido en estudio es sometido a una reacción controlada con radical hidroxilo. A continuación, la población de moléculas de ADN modificadas que retienen su capacidad de interaccionar con la proteína es resuelta en un gel de retardo, purificada, y analizada en un gel de secuencia (sección 3.25 de Materiales y Métodos).

Como se verá a continuación, los patrones de interferencia obtenidos con BLH3 sola o incubada con STM fueron similares. Esto sugiere que la formación del complejo no produce interacciones con nucleótidos adicionales de las secuencias de unión.

En la Figura 26 se muestran experimentos realizados con el oligonucleótido BS1 marcado radioactivamente en uno de sus extremos 3'. Como puede verse, en el caso de la hebra que contiene la secuencia TGAC, las posiciones contactadas fueron GACAGG (TGACAGGT) (Figura 26, panel izquierdo). Con respecto a la hebra inferior, se observó interferencia a lo largo de los nucleótidos TCACCTGTC, complementarios a la secuencia GACAGGTGA (Figura 26). Aunque estos resultados son similares a los obtenidos con otras proteínas KNOX y BEL (capítulo 1 de esta tesis; Tioni y col., 2005), se observan sutiles pero reproducibles diferencias. En el caso de la hebra superior, el patrón de interferencia fue de uno y dos nucleótidos menos comparado con el producido por ATH1<sub>HD</sub> (Figura 15) y STM<sub>HD</sub> (Figura 17), respectivamente. Para la hebra inferior los nucleótidos importantes para la unión al ADN de BLH3, y del complejo con STM, abarcan una región que se desplaza hacia el extremo 5' de

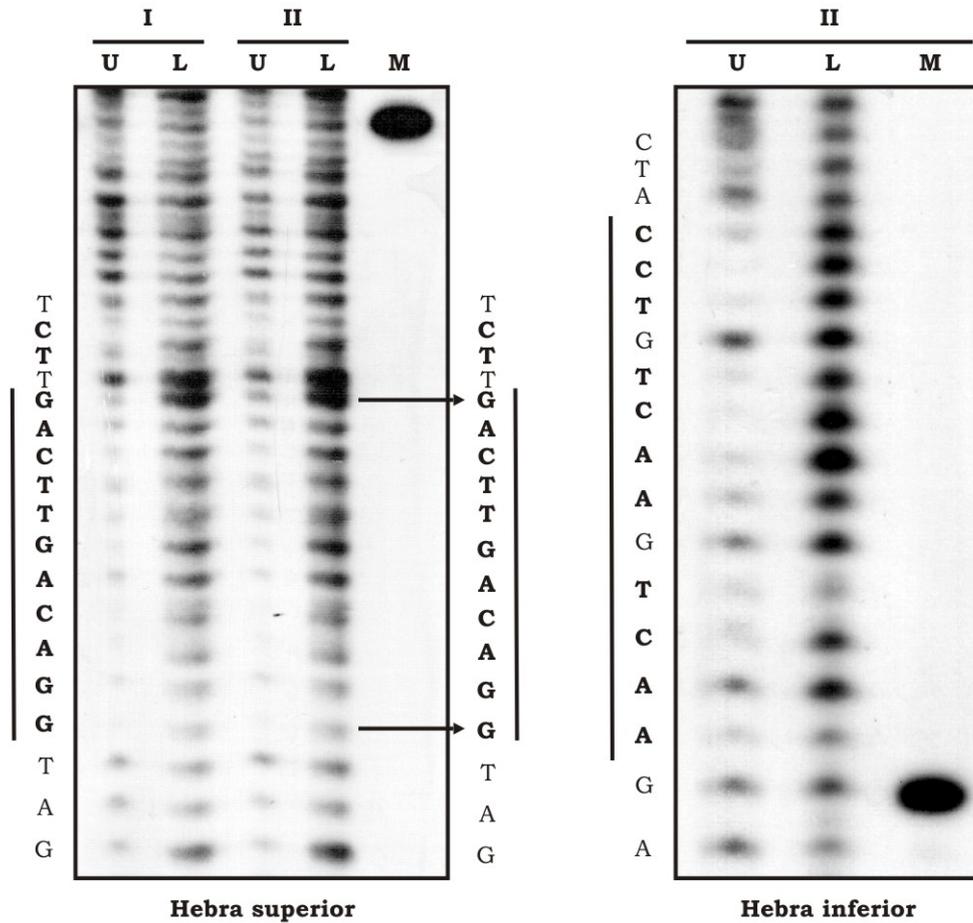
esa cadena, extendiéndose tres posiciones más hacia dicho extremo respecto de lo observado para ATH1<sub>HD</sub> y STM<sub>HD</sub> (Figuras 16 y 17).



**Figura 26. Ensayo de interferencia en la unión por ataque con radical hidroxilo del oligonucleótido BS1.** El oligonucleótido BS1 marcado en uno de sus extremos 3' (sitio *EcoRI* o *HindIII*), luego de ser expuesto al ataque con radical hidroxilo, se incubó con BLH3 (indicado como I) o con BLH3 y STM (indicado como II). Las letras a la izquierda de cada panel señalan la secuencia de ADN de la hebra marcada (5' en la parte superior). U: ADN unido, L: ADN libre. Una parte del ADN marcado digerido con la otra enzima se utilizó para indicar la posición de cada nucleótido (calle M). En la parte inferior se muestra la secuencia del sitio de unión de BS1 y la región de interferencia aparece en negrita y subrayada.

Cuando se realizaron ensayos de interferencia con el oligonucleótido BS2 se vio que la región de interferencia comprendía los dos núcleos TGAC. Como se muestra en la Figura 27, las posiciones que son importantes para la unión corresponden a la secuencia GACTTGACAGG en la hebra superior y a TaCCTgTCAAgTCAA en la hebra inferior, donde las letras en minúscula señalan nucleótidos cuya eliminación afectó débilmente la unión de las proteínas.

En función del patrón repetitivo que se obtuvo con BS2 puede decirse que ambos sitios de unión son contactados con la misma eficiencia y mediante interacciones similares. Además los resultados obtenidos indican que el aumento en la afinidad de unión del complejo no estaría relacionado con el establecimiento de nuevos contactos con el ADN, detectables por este tipo de experimentos.



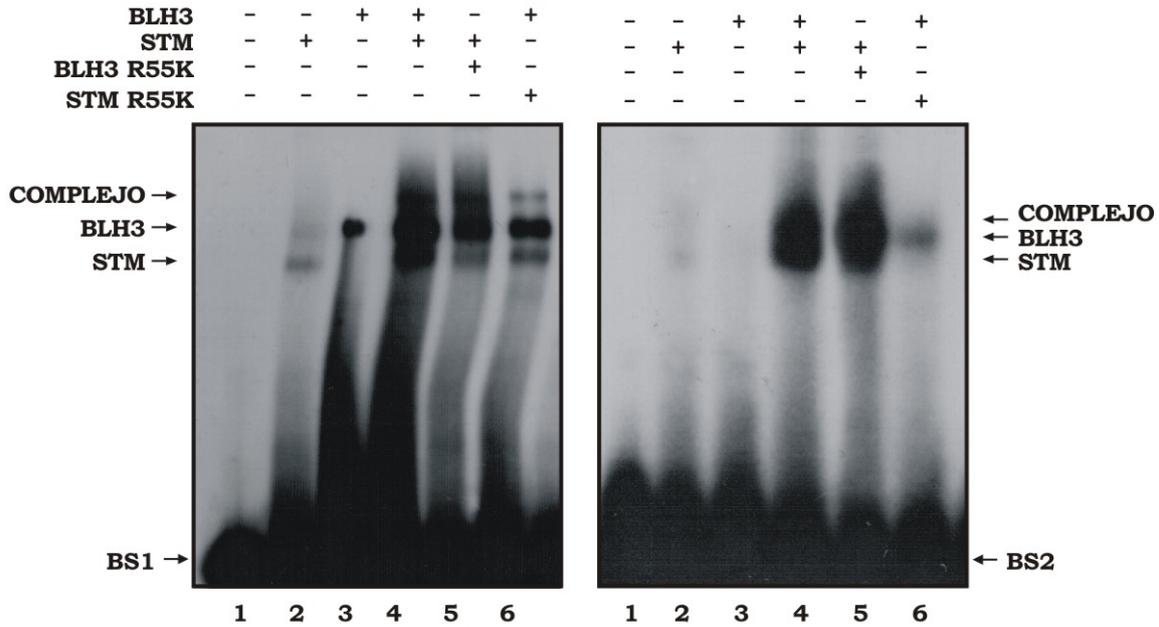
**Figura 27. Ensayo de interferencia en la unión por ataque con radical hidroxilo del oligonucleótido BS2.** El oligonucleótido BS2 marcado en uno de sus extremos 3' (sitio *Xba*I o *Hind*III) fue expuesto al ataque con radical hidroxilo. Luego se incubó con BLH3 (I) o con BLH3 y STM (II). Una parte del ADN marcado digerido con la otra enzima se utilizó para indicar la posición de cada nucleótido (calle M). Las letras al costado de cada panel señalan la secuencia de ADN de la hebra marcada (5' en la parte superior). En la parte inferior se muestra la secuencia del sitio de unión de BS2 y la región de interferencia aparece en negrita y subrayada.

#### **4.2.2.4 Estudio de la afinidad de unión al ADN de complejos proteína-proteína con un homeodominio no funcional**

El hecho de que el oligonucleótido BS1 contiene un único sitio TGAC sugiere que solamente una de las proteínas que forman el complejo puede interactuar de manera específica con este fragmento de ADN. A partir de esta reflexión nos preguntamos si un homeodominio es suficiente para que se produzca el aumento en la unión al ADN que ocurre por la formación del complejo proteína-proteína.

Para intentar responder a esta pregunta decidimos construir mutantes de las proteínas BLH3 y STM incapaces de unir ADN. Dado que se ha postulado que el residuo de arginina 55 del homeodominio posee un rol esencial en el reconocimiento de la G del núcleo TGAC (Tioni y col., 2005), decidimos modificar a lisina esta posición. Como se detalla en Materiales y Métodos (secciones 3.15.1 y 3.15.2), las secuencias codificantes de las proteínas mutantes fueron clonadas en los mismos vectores que las proteínas nativas correspondientes. A las proteínas recombinantes obtenidas se las denominó BLH3-R55K y STM-R55K.

De acuerdo a lo esperado, estas mutantes fueron incapaces de unir ADN (no mostrado). Sin embargo, cuando se incluyó la mutante BLH3-R55K en la reacción de unión de STM nativa se produjo un incremento en la unión de esta última a los oligonucleótidos BS1 y BS2 (Figura 28). Dado que BLH3-R55K no interactúa con el ADN, puede asumirse que el homeodominio de STM establecería los contactos específicos en este caso. Resulta interesante el hecho de que en los ensayos realizados con el oligonucleótido BS2 la unión del complejo BLH3-R55K/STM fue similar a la del complejo BLH3-STM. Sin embargo, esto no se observó con el oligonucleótido BS1, con el cual se produjo un aumento más significativo de la unión con el complejo nativo. Cuando se emplearon BLH3 nativa y STM-R55K en la misma reacción de unión se incrementó la intensidad de las bandas de retardo. Pero en este caso el efecto fue considerablemente menor que el generado por el complejo BLH3-STM con ambos oligonucleótidos. Estos resultados indican que dentro del complejo cualquiera de los homeodominios puede participar del reconocimiento del ADN, pero que existiría una clara preferencia del homeodominio de STM para contactar el oligonucleótido BS2.

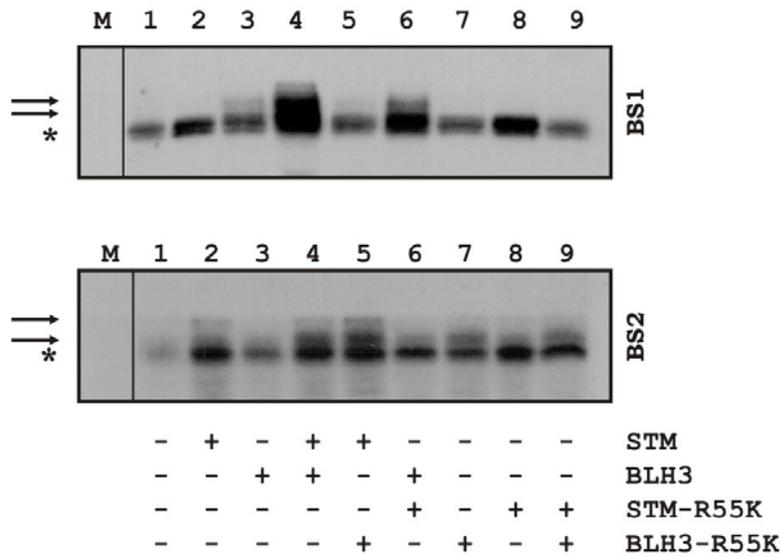


**Figura 28. Proteínas que contienen un homeodominio incapaz de unir ADN producen un aumento en la eficiencia de unión al ADN de la otra proteína (nativa).** Ensayos de retardo en gel realizados con 100 ng de las proteínas STM, BLH3, STM-R55K y BLH3-R55K, solas o en distintas combinaciones. Las reacciones de unión se efectuaron con el oligonucleótido BS1 (a la izquierda) y con el oligonucleótido BS2 que contiene dos sitios TGAC (panel derecho).

Para continuar con el estudio de la interacción con el ADN de las proteínas nativas y mutantes se llevaron a cabo ensayos de entrecruzamiento por luz UV siguiendo la metodología descrita en Materiales y Métodos (sección 3.26). En estos experimentos se realiza una reacción de unión en solución y a continuación la mezcla se irradia con luz UV. Debido a las características que posee esta última como agente de entrecruzamiento (llamado de distancia cero), aquellas moléculas de proteína y ADN que se encuentren en íntimo contacto quedarán unidas entre sí de forma covalente (Kneale, 1994). Una vez terminada la irradiación, las muestras son analizadas en un gel de poliacrilamida desnaturizante, seguido de exposición del mismo a una placa radiográfica.

En la Figura 29 se muestra el resultado de experimentos en los que las reacciones de unión se realizaron en las mismas condiciones que para los ensayos de retardo en gel. Como puede observarse, la cantidad del oligonucleótido BS1 unido covalentemente a las distintas combinaciones de proteínas mostró un patrón similar al del ADN presente en las bandas de retardo de la Figura 28 (parte izquierda). De nuevo, la mayor unión se observó cuando se emplearon en la reacción de unión las proteínas BLH3 y STM nativas. Sin embargo, existieron

algunas diferencias. La unión de STM nativa fue mayor que la de BLH3 y se detectó interacción con el ADN de la mutante STM-R55K (Figura 29, panel superior). Estas observaciones reflejan la formación de contactos inestables con el ADN que si bien desaparecen durante la electroforesis en los gels de retardo, son detectados en los ensayos de entrecruzamiento por luz UV.



**Figura 29.** Experimentos de entrecruzamiento con luz UV de las proteínas en estudio con moléculas de ADN que contienen la secuencia TGAC una sola vez (BS1, parte superior) o dos (BS2, parte inferior). Se realizaron reacciones de unión con las combinaciones de proteínas nativas (BLH3 y STM) y mutantes (BLH3-R55K y STM-R55K) indicadas en la parte inferior de la Figura. Luego se las expuso a luz UV y fueron analizadas mediante electroforesis en gels de poliacrilamida en presencia de SDS. La calle 1 de cada gel corresponde al ADN incubado en ausencia de proteína (control). El tratamiento con luz UV de esta reacción genera un producto que migra junto con el ADN unido covalentemente a STM (indicado con un asterisco). Las flechas señalan bandas de 86 kDa y 73 kDa que representan el ADN entrecruzado a BLH3 y STM, respectivamente. La región correspondiente al ADN libre no se muestra. En la calle M se sembró una mezcla comercial de proteínas (Amersham Biosciences) como marcador de masa molecular.

La formación del complejo BLH3-STM generó un aumento en la unión de STM y BLH3 (nativas) al oligonucleótido BS1 (Figura 29, calle 4). Esto sugiere que ambas proteínas establecerían contactos con el ADN. Sin embargo, a partir de los experimentos efectuados no puede determinarse si esta interacción ocurre entre proteínas de un mismo complejo o de complejos diferentes. Es más, en estos ensayos no se observó la presencia de ADN unido a dos moléculas de proteína. Aunque debe considerarse que esto podría corresponder a una baja eficiencia de entrecruzamiento en las condiciones empleadas.

También se llevaron a cabo experimentos de entrecruzamiento por irradiación con luz UV con el oligonucleótido BS2 y se obtuvieron resultados similares a los descritos más arriba

para BS1. La diferencia más significativa radicó en que el complejo formado por STM y BLH3-R55K mostró el mismo comportamiento que el constituido por las proteínas nativas (Figura 29, gel en la parte inferior). Este resultado está de acuerdo con lo observado en los ensayos de retardo en gel y sugiere también que, dentro del complejo, STM estaría encargada de establecer los contactos específicos con BS2. Por otro lado, con este oligonucleótido se detectó entrecruzamiento entre la mutante BLH3-R55K y el ADN (Figura 29, calle 7).

#### 4.2.2.5 Estudio de la unión al ADN de STM, BLH3 y del complejo BLH3-STM *in vivo* en levaduras

Como se ha explicado en detalle en Materiales y Métodos (sección 3.28) la utilización del sistema de simple híbrido en levaduras permite determinar, o comprobar, la interacción entre una proteína y la secuencia de ADN en estudio, a través de la detección de la activación transcripcional de un gen reportero (Figura 8).

Para estudiar la unión *in vivo* en levaduras de STM y BLH3 con los oligonucleótidos BS1 y BS2, se realizaron construcciones en las que tres copias del oligonucleótido BS1, y cuatro de BS2, fueron clonadas corriente arriba del promotor mínimo del gen *CYC1* de levadura fusionado al gen *LacZ* de *E. coli*. A continuación, estos fragmentos de ADN fueron integrados al genoma de *S. cerevisiae* aW303 mediante recombinación homóloga en el locus *ura*, y las cepas reporteras obtenidas se denominaron BS1<sub>x3</sub>:LacZ y BS2<sub>x4</sub>:LacZ (Figura 9 de Materiales y Métodos).

Por otro lado, se obtuvo la cepa de *S. cerevisiae* BS1<sub>x3</sub>:HIS3-Y187 mediante la utilización del sistema de vectores pHIS/pINT1 (Meijer y col., 1998). Esta cepa contiene integradas en el genoma tres copias en tandem del oligonucleótido BS1 fusionadas al gen reportero *HIS3* (Figura 9).

Las distintas estrategias y metodologías empleadas para obtener todas estas cepas de levadura se encuentran descritas en detalle en la sección 3.28.1 de Materiales y Métodos.

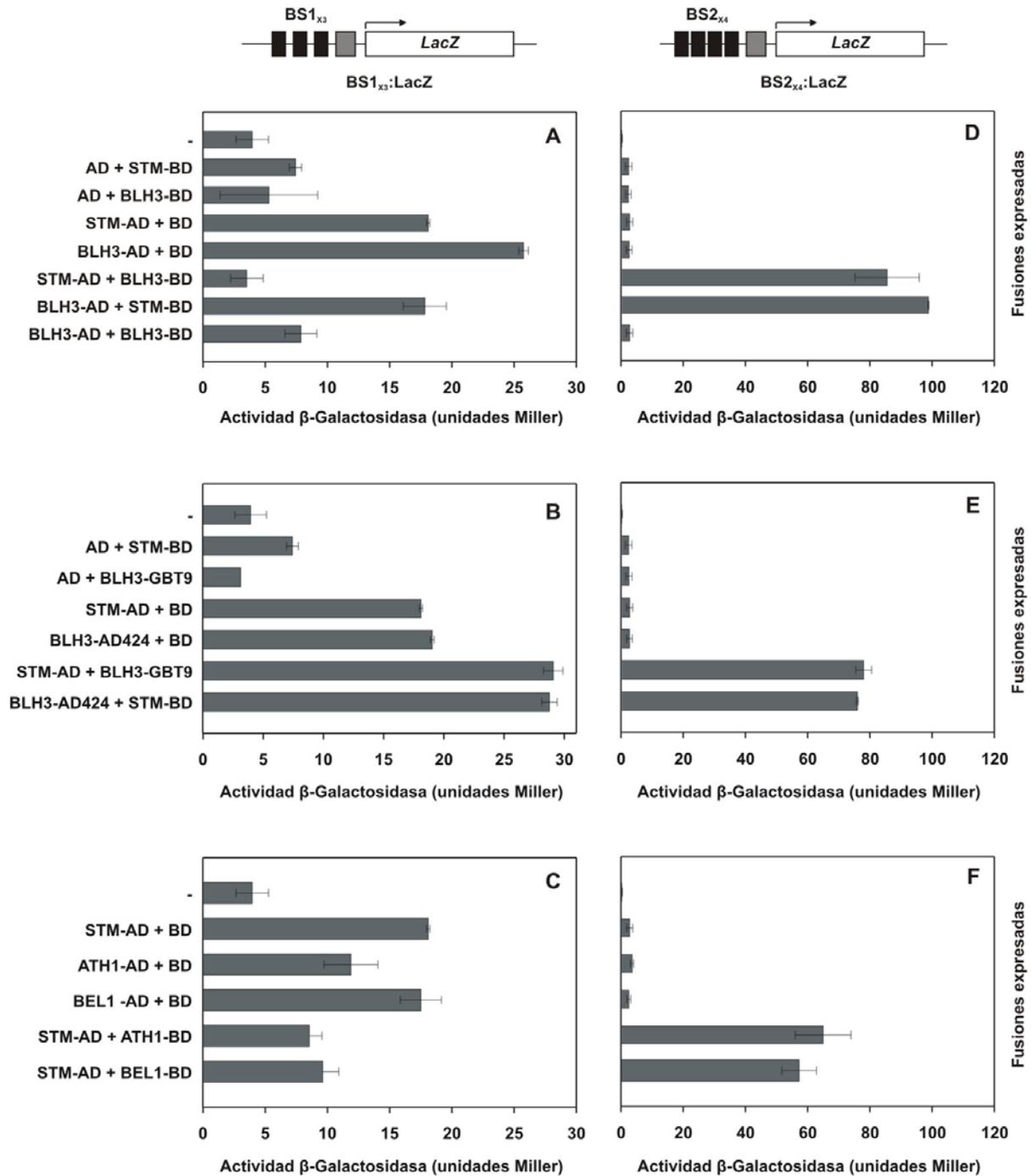
A continuación, las levaduras fueron transformadas con ADN de los clones STM-pGADT7 y BLH3-pGADT7 (generados como se describe en la sección 3.28.2). Estos vectores permiten expresar en altos niveles la proteína de interés fusionada al dominio de activación (AD) de GAL4 (tabla 2).

Cuando se analizó la expresión del gen reportero *HIS3* en la cepa BS1<sub>x3</sub>:*HIS3*-Y187 se observó que la presencia de STM, o BLH3, fusionada al AD permitía a la levadura sobrevivir en medios carentes de histidina (no mostrado). Esto indica que estas proteínas son capaces de reconocer *in vivo* la secuencia de unión presente en BS1. Este resultado se confirmó en ensayos realizados empleando el gen *LacZ* como reportero (cepa BS1<sub>x3</sub>:*LacZ*) (Figura 30A). Las metodologías empleadas para la medición de la expresión del gen reportero *HIS3* y de la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa se detallan en Materiales y Métodos (secciones 3.28.3 y 3.28.4, respectivamente).

A fin de estudiar la unión al ADN del complejo BLH3-STM *in vivo*, se decidió co-expresar las proteínas BLH3 y STM fusionando una de ellas al AD y la otra al dominio de unión (BD) de GAL4. Esto último dado que ninguna de las proteínas es capaz de activar significativamente la transcripción del reportero *LacZ* cuando se la expresa fusionada al BD (Figura 30A).

Como se observa en la Figura 30A, la co-expresión de STM y BLH3 produjo niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa menores que los obtenidos con la expresión de las proteínas individuales fusionadas al AD. Este resultado indica que existe una competencia en la unión a BS1 por parte de las proteínas que, luego de interaccionar con el ADN, son incapaces de activar la transcripción del gen reportero (es decir, aquellas fusionadas al BD). Además, señala que la unión al ADN de las proteínas individuales superaría a la del complejo en las condiciones ensayadas. Justamente, el efecto observado es mayor cuando BLH3 está fusionada al BD, en concordancia con la mayor afinidad de unión que presentó esta proteína en los ensayos de retardo en gel, y a los niveles mayores de actividad  $\beta$ -galactosidasa obtenidos con la fusión BLH3-AD en los ensayos de simple híbrido.

A fin de reducir este efecto de competencia se decidió utilizar fusiones de BLH3 procedentes de los plásmidos pGAD424 y pGBT9 (CLONTECH; descritos en la tabla 2 de Materiales y Métodos) que producen bajos niveles de expresión. Como puede observarse en la Figura 30B, los niveles de activación obtenidos con la fusión de BLH3 al AD del vector pGAD424 (BLH3-AD424), y al BD en pGBT9 (BLH3-GBT9), demuestran que se lograron reducir los niveles de expresión de estas proteínas.



**Figura 30. Ensayos de unión *in vivo* en levadura de BLH3 y STM a diferentes secuencias de unión.** Se grafica la actividad  $\beta$ -galactosidasa específica de células de levadura que contienen, integrados en el locus *ura3*, los oligonucleótidos BS1 (A, B, C) o BS2 (D, E, F) fusionados al gen reportero *LacZ* y a un promotor mínimo. En la parte superior de la Figura se muestra un esquema de estas construcciones. **A, D.** Las cepas fueron transformadas con diferentes construcciones para expresar BLH3, o STM, fusionadas al dominio de activación (AD) o de unión al ADN (BD) de GAL4 a partir de los plásmidos pGADT7 o pGBKT7, respectivamente (indicado en la parte izquierda de la Figura). **B, E.** Las cepas de levadura se transformaron con construcciones similares realizadas en los plásmidos pGAD424 o pGBT9. **C, F.** Ensayos realizados con las cepas transformadas previamente con construcciones que permiten la expresión de ATH1 o BEL1 fusionadas a los dominios de activación o de unión al ADN, presentes en los plásmidos pGADT7 o pGBKT7. Los valores de actividad enzimática graficados corresponden al promedio obtenido de tres ensayos independientes. Las barras de error representan la desviación estándar.

Cuando se expresó BLH3-GBT9 junto con STM-AD los valores de actividad  $\beta$ -galactosidasa fueron más altos que los obtenidos con la fusión STM-AD (Figura 30B). Esto sugiere la existencia de complejos proteína-proteína con una eficiencia de unión a BS1 mayor que las proteínas individuales. Cuando se co-expresaron BLH3-AD424 y STM fusionada al BD en pGBKT7 los valores de actividad del reportero fueron similares a los producidos por la co-expresión de BLH3-GBT9 y STM-AD (Figura 30B). Este resultado reafirma entonces la idea de que la activación de la transcripción detectada en estos ensayos se debe a la unión del complejo STM-BLH3 al ADN.

Cuando se realizaron los ensayos con la cepa BS2<sub>x4</sub>:LacZ se obtuvieron niveles de activación bastante bajos con las proteínas individuales (Figura 30D, E). Sin embargo, al co-expresar STM y BLH3 en las diferentes combinaciones se produjo un aumento muy considerable de la actividad  $\beta$ -galactosidasa (Figura 30D, E). En función de estos resultados puede decirse que la formación del heterodímero BLH3-STM genera un aumento significativo en la unión a BS2 *in vivo*. Esto sugiere que el complejo establecería interacciones adicionales con los sitios TGAC presentes en BS2, no observadas en los ensayos *in vitro*. Por otro lado, las diferencias obtenidas *in vivo* entre BS1 y BS2 podrían corresponder a diferencias en la eficiencia de activación de la transcripción por parte del complejo al unirse a los respectivos sitios de unión.

A continuación, se analizó el efecto de la expresión de las proteínas de la familia BEL ATH1 y BEL1 sobre la actividad  $\beta$ -galactosidasa de las células de levadura con las construcciones reporteras BS1 y BS2:LacZ (Figura 30C,F). Los resultados obtenidos fueron esencialmente similares a los observados con BLH3. ATH1 y BEL1 fueron capaces de interactuar con BS1 *in vivo* y de formar heterodímeros con STM con propiedades de unión a BS2 análogas a las mostradas por el complejo BLH3-STM. Además, con estas proteínas también se observó el efecto de competencia por la unión a BS1 cuando se las co-expresó junto con STM.

El hecho de que se haya observado una competencia entre BLH3 y STM por la unión a BS1, pero no a BS2, sugiere que *in vivo* las proteínas individuales son capaces de unir eficientemente la secuencia TGACAGGT, pero no, o muy pobremente, los sitios en tandem presentes en BS2. Además, la unión del complejo a BS1 no presentó diferencias significativas

con la mostrada por las proteínas individuales. Por el contrario, en el caso de BS2 se obtuvo un incremento muy notorio en la eficiencia de unión cuando se co-expresaron las dos proteínas. Estos resultados parecen contradecirse con los obtenidos en los ensayos *in vitro*, en los que se observó un aumento en la unión por la formación del complejo con los dos oligonucleótidos. Sin embargo, a partir de las curvas de la Figura 25 puede deducirse que este efecto depende del rango de concentración de proteína que se considere. Por ejemplo, en el caso de BS1 la unión del complejo y de BLH3 sola es muy similar por encima de 0,2  $\mu\text{M}$ , mientras que existe una diferencia muy significativa en la unión a BS2 con esta concentración de BLH3. A partir de estas observaciones puede pensarse entonces que los resultados obtenidos en los experimentos *in vivo* reflejan el efecto de estos rangos de concentración sobre la eficiencia de unión al ADN de las proteínas individuales y del complejo.

Finalmente, en función de los resultados obtenidos puede decirse que la formación de un complejo entre la proteína BEL BLH3 y la proteína KNOX STM produce un aumento en la afinidad de unión al ADN cuya magnitud depende de la secuencia del sitio de unión. Este comportamiento podría señalar la existencia de diferencias en el modo de regulación ejercido por las proteínas KNOX y BEL, solas o combinadas, dependiendo de las secuencias de unión presentes en los genes blanco y, además, de las concentraciones relativas de cada una de estas proteínas dentro la célula.

#### **4.2.2.6 Presencia de los sitios de unión simple y doble en las regiones promotoras de genes de *Arabidopsis***

Para completar el estudio de la unión al ADN de proteínas de las familias BEL y KNOX llevado a cabo en la presente tesis, se decidió analizar la presencia de secuencias relacionadas a los sitios de unión simple y doble en fragmentos de 1000 pb localizados corriente arriba de las regiones transcritas del genoma de *Arabidopsis*. Como representante de la secuencia simple se empleó TGACAG, debido a que estos nucleótidos fueron reconocidos eficientemente por las proteínas KNOX y BEL *in vitro*, y porque contiene la secuencia seleccionada por proteínas KNOX a partir de poblaciones de oligonucleótidos diferentes (Krusell y col., 1997; Smith y col., 2002; este estudio). Se encontraron 6925 genes que contienen la secuencia TGACAG en las regiones buscadas. Entre estos se eligieron

aquellos genes que codifican proteínas involucradas en la formación de meristemas, en el desarrollo del tallo y de la inflorescencia, o en la biosíntesis y transducción de señal de las hormonas giberelinas, citoquininas y auxinas (tabla 6). Es decir que se seleccionaron los que estarían relacionados con las funciones reportadas para las proteínas KNOX y BEL, y que por lo tanto podrían ser blanco de estas proteínas.

En los últimos años se ha acumulado gran cantidad de evidencia que coloca a las proteínas KNOX como reguladoras centrales de los niveles de hormonas en los meristemas de plantas (Hay y col., 2004). Como se muestra en la tabla 6, la búsqueda efectuada en las regiones promotoras del genoma de *Arabidopsis* arrojó dos genes que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de giberelinas, una ent-kaureno sintasa y una GA3 oxidasa. También se encontraron varios genes relacionados con la transducción de señales en respuesta a esta hormona. Como se comentó en la Introducción general, la represión transcripcional de genes que codifican la enzima de biosíntesis de giberelinas GA20 oxidasa por las proteínas KNOX (y oportunamente BEL) ha sido estudiada en tabaco, *Arabidopsis* y papa (Sakamoto y col., 2001; Hay y col., 2002; Rosin y col., 2003). Además, se ha descubierto recientemente que los genes *KNOX* ejercen un efecto positivo en las vías de señalización de citoquininas (Yanai y col., 2005). En relación a esto, encontramos que numerosos genes involucrados en las respuestas a citoquininas (*AHP1*, *AHP6*, *ARR10*, *ARR16*, *ARR17* y *ARR19*), y *ATIPT5*, implicado en la biosíntesis de esta hormona, contienen la secuencia TGACAG.

Por otra parte, en el análisis llevado a cabo aparecieron varios factores de respuesta a auxinas (*ARF6*, *ARF13*, *ARF18*, *ARF22*, *IAA15*, *IAA16*), y genes que son requeridos para su transporte y distribución como *PIN4*, *ATPGP1* y *PLDP2*. Esto tiene sentido si se tiene en cuenta que se producen alteraciones en el transporte polar de auxinas cuando los genes *KNOX* no son regulados negativamente en hojas (Schneeberger y col., 1998; Tsiantis y col., 1999; Zgurski y col., 2005).

Diversos estudios han demostrado que la arquitectura de la inflorescencia es controlada por la actividad de distintos heterodímeros KNOX-BEL. Como se ha comentado anteriormente, estos factores son esenciales para la determinación de los primordios florales, el establecimiento de los patrones del entrenudo de la inflorescencia y el mantenimiento de los límites entre los primordios florales y el meristema de inflorescencia (Smith y col., 2003; Bhatt y

col., 2004; Smith y col., 2004; Kanrar y col., 2006). Además, se ha propuesto que los genes *KNOX* participan del desarrollo de los carpelos (Pautot y col., 2001; Scofield y col., 2007). En este sentido, en la búsqueda efectuada se encontró la secuencia TGACAG en los promotores de genes que codifican factores involucrados en el desarrollo floral. Éstos incluyen *LFY* y *CLV1*, genes de identidad de meristemas florales, y *SEP4*, *PI* y *NUB*, los cuales son necesarios para el desarrollo de órganos florales, entre otros (tabla 6).

Por otra parte, se encontraron varios genes que codifican factores de transcripción involucrados en el funcionamiento de los meristemas y que incluyen *ESR1*, *LAS*, *SE*, *CUC1*, *PHV* y *CUC2*. Particularmente, *CUC1* y *CUC2* participan en la formación de los meristemas apicales y actúan induciendo la expresión de *STM* (Aida y col., 1999). La presencia de una secuencia similar a *BS1* en los promotores de estos genes indicaría que las proteínas *KNOX* y/o *BEL* podrían regular la expresión de los genes *CUC*. En efecto, otros genes relacionados con las funciones de *CUC* también contienen la secuencia TGACAG en sus promotores, como *ATBRM/CHR2*, que codifica una ATPasa involucrada en la remodelación de la cromatina que activa la transcripción de los genes *CUC*, y un miRNA que influye sobre la acumulación de transcritos de los genes *CUC1* y *CUC2*.

También se encontraron los genes *ASL1* y *AS1*, que codifican proteínas involucradas en la represión de *KNAT1*. Como se muestra en la tabla 6, los genes *KNOX* de clase II *KNAT2* y *KNAT4*, además de *BLH2* y *BLH5*, de la familia *BEL*, contienen la secuencia buscada en sus promotores. Recientemente, Kumar y col. (2007) han demostrado que *BLH2* y *BLH4* determinan la arquitectura de las hojas mediante la inhibición del crecimiento en dominios específicos de la misma, en parte a través de la represión de genes *KNOX*. En conjunto, todas estas observaciones podrían indicar la existencia de una compleja red de interacciones involucradas en la regulación de la expresión de los genes *KNOX* y *BEL*. Esto no incluiría sólo las interacciones proteína-proteína entre las diferentes proteínas *TALE*, sino también las interacciones con secuencias específicas en los promotores de los genes *KNOX* y *BEL*.

Como sitio de unión doble se eligió la secuencia TGACNTGAC, que contiene los dos núcleos TGAC separados por un nucleótido, como en *BS2*. Al realizar la búsqueda se encontró que 732 genes contienen esta secuencia en sus promotores. Este número resultó menor al

obtenido para la secuencia simple, lógicamente a causa de la mayor longitud que posee la secuencia doble respecto de TGACAG. Notablemente, el gen *BLH3* contiene la secuencia TGACTTGAC en su promotor. Por otra parte, se encontraron tres genes que codifican proteínas que participan en el transporte y la respuesta a auxinas (por ejemplo PIN6), y *FPF1*, que modula las respuestas a giberelinas en los meristemas apicales durante la transición floral. Entre los demás genes, ningún otro pudo relacionarse de manera sencilla con las funciones de las proteínas KNOX y/o BEL reportadas hasta el momento. Quizás esta secuencia esté involucrada en la regulación de otro tipo de genes. También puede pensarse que variaciones de esta secuencia, como separaciones diferentes entre los sitios TGAC o cambios en una de las posiciones conservadas, serían las reconocidas por las proteínas TALE *in planta*. Por ejemplo, entre los genes que contienen la secuencia doble en sus promotores se encontraron algunos involucrados en las respuestas a la luz o en la señalización de ABA (ácido abscísico) como *PHYB*, *SHB1*, *ABA3* y *SNRK2.3* (tabla 6). Además, se vio que el gen *BLH6* contiene la secuencia GACTTGAC, que es similar a la presente en BS2 pero que carece de la T de la primera posición.

Se debe tener en cuenta que la presencia de una determinada secuencia en la región promotora de un gen no implica necesariamente que dicho gen será regulado por una proteína capaz de reconocer esa secuencia. Esto es especialmente válido en el caso de secuencias de baja complejidad, como por ejemplo TGACAG. En este sentido, los genes mencionados más arriba se constituyen en posibles genes blanco dado que participan en procesos relacionados con los regulados por proteínas KNOX y/o BEL. La regulación efectiva de los mismos por parte de estas proteínas deberá ser, sin embargo, demostrada experimentalmente.

**Tabla 6.** Análisis de la presencia de secuencias relacionadas al sitio de unión simple (TGACAG) y doble (TGACNTGAC) en fragmentos de 1000 pb localizados corriente arriba de las regiones transcritas del genoma de *Arabidopsis*. Se muestran los genes relacionados funcionalmente con las proteínas de las familias KNOX y BEL.

SECUENCIA: TGACAG						
LOCUS	HITS	INICIO	FIN	SECUENCIA	GEN	DESCRIPCIÓN
<b>Vías de Gibberelinas</b>						
AT1G15550	1	45	40	CTGTCA	ATGASD1_GA4	Participa en los pasos finales de biosíntesis de gibberelinas.
AT1G74660	1	762	757	CTGTCA	ARMYB31/AY13	Miembro de la familia R2R3 Myb.
AT1G74870	1	636	640	TGACAG	AT1G74870.1	Codifica una proteína probablemente involucrada en la respuesta a gibberelinas.
AT1G78480	1	231	226	CTGTCA	GA2	Codifica una enzima que cataliza la síntesis de ent-kaurano en la biosíntesis de gibberelinas.
AT3G11440	1	521	516	CTGTCA	ATMYB65	Miembro de la familia R2R3 Myb. Sería inducido durante la germinación en respuesta a gibberelinas.
AT4G24210	1	400	405	TGACAG	SLY1	Codifica una proteína F-box involucrada en la señalización de gibberelinas. Regula la germinación.
AT4G26430	1	160	185	TGACAG	GAMT1	Codifica una metiltransferasa que genera metil-ésteres de gibberelina. Se expresa principalmente en vainas durante el desarrollo de las semillas.
AT5G17480	1	881	886	TGACAG	RGL3	Miembro de la familia DELLA. Involucrado en transducción de señales de gibberelinas.
<b>Vías de Citoquininas</b>						
AT1G49190	2	148	151	TGACAG	ARR19	Regulador de respuesta a citoquininas de tipo-B.
AT1G49190	2	551	546	CTGTCA	ARR19	
AT1G80100	2	402	407	TGACAG	AHP6	Regulador negativo de la señalización de citoquininas.
AT1G80100	2	563	568	TGACAG	AHP6	
AT2G40670	2	293	228	CTGTCA	ARR16	Regulador de respuesta a citoquininas de tipo-A.
AT2G40670	2	633	628	CTGTCA	ARR16	
AT2G41310	1	664	659	CTGTCA	ATRR3/ARR8	Regulador de respuesta a citoquininas tipo-A. Se expresa principalmente en raíces.
AT2G41610	1	500	505	TGACAG	ATCKX1/CKX1	Codifica una proteína similar a una citoquinina-oxidasas que cataliza la degradación de citoquininas.
AT2G46910	1	560	555	TGACAG	CRF5	Codifica un factor de respuesta a citoquininas.
AT3G21510	1	822	827	TGACAG	AHP1	Codifica una de las seis proteínas AHP (Arabidopsis thaliana histidine phosphotransfer protein). Regulador positivo de las vías de citoquininas.
AT3G56360	1	597	592	CTGTCA	ARR17	Regulador de respuesta tipo A.
AT4G31620	1	32	37	TGACAG	ARR10	Regula la respuesta a citoquininas en raíces.
AT5G19040	1	648	653	TGACAG	ATIPT5	Codifica una isopentenil transferasa implicada en la biosíntesis de citoquininas.
<b>Vías de Auxinas</b>						
AT1G10210	1	119	124	TGACAG	ATMPK1	Involucrada en las vías de señalización de auxinas.
AT1G30330	1	280	275	CTGTCA	ARF8	Regula la expresión de los genes de respuesta a auxinas. Actúa de manera redundante con ARF8 en el control de la elongación de estambres y maduración de los flores.
AT1G34170	1	914	909	CTGTCA	ARF13	Factor de respuesta a auxina 13.
AT1G34360	1	268	273	TGACAG	ARF22	Factor de respuesta a auxina 22.
AT1G80360	2	602	607	TGACAG	IAA15	Codifica una proteína cuya expresión se induce por ácido indol-acético (IAA).
AT1G80360	2	688	703	TGACAG	IAA15	
AT2G01420	1	953	948	CTGTCA	PIN4	Codifica un transportador de auxinas que se localiza en meristemas apicales de raíz.
AT2G01640	1	416	421	TGACAG	SGR5	Involucrado en eventos iniciales de gravitropismo del tallo como la percepción de la gravedad y/o los procesos de señalización subsiguientes a la sedimentación de los amiloplastos.

AT2001420	1	953	948	CTGTCA	PINA	Codifica un transportador de auxinas que se localiza en meristemas apicales de raíz.
AT2001940	1	416	421	TGACAG	SGR5	Involucrado en eventos iniciales de gravitropismo del tallo como la percepción de la gravedad y/o los procesos de señalización subyacentes a la sedimentación de los arilloplastos.
AT2022410	1	135	140	TGACAG	AT2022410.1	Codifica una proteína similar a AUX1 (AUXIN RESISTANT 1).
AT2036910	1	391	386	CTGTCA	ARF1/AMDR1	Pertenece a la familia de transportadores ABC. Participa de la salida de IAA de la célula e interacciona con proteínas PIN.
AT2044370	1	362	367	TGACAG	JAR1	Se induce en respuesta a auxinas. Codifica un componente de señalización de fitocromo A localizado en el citosol.
AT2047730	1	469	491	CTGTCA	IAA19	Codifica una proteína inducida por IAA.
AT2056830	1	972	977	TGACAG	PLDP2	Necesario para el transporte, distribución y respuesta a las auxinas. Involucrado en el desarrollo de raíces en respuesta a la falta de nutrientes.
AT2022888	1	167	182	CTGTCA	AT2022888.1	Codifica un microARN. Secuencia: TGAAAGCTGCCAGCATGATCTA. Controla los patrones de expresión de ARF6 y ARF8. Esencial para la fertilidad de ávulas y enteras.
AT2061830	1	732	737	TGACAG	ARF18	AUXIN RESPONSE FACTOR 18
AT4012980	1	760	755	CTGTCA	AT4012980.1	Probablemente codifica una proteína de respuesta a auxinas.
AT4037680	1	631	626	CTGTCA	HL51/COIP3	Posee un rol negativo sobre la señalización de auxinas y azúcares. Involucrado en el desarrollo del gancho apical.
AT1014810	1	728	733	TGACAG	TWN2	Necesario para la proliferación correcta de células basales durante el desarrollo del embrión.
AT1030460	1	590	585	CTGTCA	PHY	Codifica PHAVOLUTA. Regulador del patrón de desarrollo embrionario.
AT1055680	1	771	776	TGACAG	LAS/SL1.19	Miembro de la familia GRAS; involucrado en la iniciación de los meristemas axilares durante las fases de desarrollo vegetativo y reproductivo. Actúa conforme abajo de REV y AXR1 en el desarrollo de tallos.
AT1060300	2	235	230	CTGTCA	AT1060300.1	Codifica una proteína relacionada con la formación de los meristemas apicales.
AT1060300	2	730	735	TGACAG	AT1060300.1	Codifica una proteína relacionada con la formación de los meristemas apicales.
AT1060380	1	677	672	CTGTCA	AT1060380.1	Codifica una proteína relacionada con la formación de los meristemas apicales.
AT1075820	2	166	161	TGACAG	CLV1	Participa del control del tamaño de los meristemas apicales del tallo y floral. Contribuye en el establecimiento y mantenimiento de los meristemas de identidad floral.
AT1075820	2	557	552	CTGTCA	CLV1	SERRATE. Controla la actividad de los meristemas y el patrón de desarrollo axial de hojas.
AT2027100	1	670	675	TGACAG	SE	Codifica una ATPasa SWI/SNF que regula positivamente la transcripción de los tres genes CUC. Involucrada en la formación y/o mantenimiento de los límites entre células durante la embriogénesis.
AT2046020	1	962	977	CTGTCA	ATBRM/CHR2	Codifica una quinasa de tipo SHAGGY—involucrada en la organización de los meristemas.
AT2005940	1	938	933	CTGTCA	AT2005940.1	Codifica un factor de transcripción involucrado en la formación del meristema apical del tallo y la formación de raíces laterales mediada por auxinas.
AT2015170	2	863	858	CTGTCA	CUC1	Codifica un factor de transcripción de la familia TCP que detiene el desarrollo de los brotes axilares.
AT2015170	2	676	671	CTGTCA	CUC1	Involucrado en la homeostasis de los meristemas floral y del tallo, en la respuesta a ABA y estrés hídrico.
AT2018650	2	67	62	CTGTCA	AT2018650.1	Codifica una oxidoreductasa necesaria para el desarrollo del meristema apical del tallo. Las mutantes presentan alteraciones en la posición de las hojas y en el mantenimiento de los meristemas.
AT2018650	2	238	233	CTGTCA	AT2018650.1	Se expresa en células en activa división, principalmente en células en fase S temprana.
AT2059380	1	293	198	CTGTCA	FTA	Necesario de manera redundante con CUC1 para la formación del meristema apical en el embrión, separación de los cotiledones y la expresión de STM.
AT4027780	1	443	438	CTGTCA	FEY	
AT2002470	1	750	745	CTGTCA	DPA	
AT2059850	2	144	139	CTGTCA	CUC2	
AT2059850	2	441	446	TGACAG	CUC2	

Desarrollo y Funcionamiento de Meristemas

AT5G82230	1	898	803	TGACAG	ERL1	ERECTA-LIKE 1. Regula la especificación de las células madre estomáticas y la diferenciación de las células de la guarda.
AT5G88870	1	854	848	CTGTCA	ASL1	Codifica una proteína con dominio LOB involucrada en la represión de los genes <i>KNOX</i> . Actúa junto con AS2 en la determinación de la simetría proximal-distal de hojas.
AT2G37630	1	884	859	CTGTCA	AS1	Codifica una proteína con dominio MYB involucrada en la especificación del eje proximal-distal de la hoja. Actúa junto con <i>AXR1</i> para impedir la expresión de <i>KNAT1</i> en hojas y con <i>PIN1</i> para reprimir <i>KNAT1</i> y promover el crecimiento de órganos laterales.
AT5G27807	1	381	358	CTGTCA	AT5G27807.1	Codifica un microRNA de la familia miR184. Secuencia: UGGAGAAGCAGGGCACGUGCG. Controla el número de pétalos de manera no redundante (con respecto a otros miembros de la familia) mediante la regulación de la acumulación de los transcritos de las proteínas <i>CUC1</i> y <i>CUC2</i> .
AT1G70610	1	528	524	CTGTCA	KNAT2	Miembro de la clase I. Se expresa principalmente en el ápice del tallo de plántulas, en flores y meristemas de inflorescencia de plantas adultas. Participa del desarrollo de carpelos.
AT5G11080	1	882	877	CTGTCA	KNAT4	Miembro de la clase II. Su expresión está regulada por la luz. Se expresa en todos los tejidos pero mayormente en hojas, venas jóvenes y raíces.
AT4G38870	1	838	841	TGACAG	BLH2	Proteína de la familia BEL.
AT2G27220	1	714	719	TGACAG	BLH5	Proteína de la familia BEL.
AT1G13400	1	893	888	TGACAG	JGL/NUB	Involucrado en el desarrollo de estambres y carpelos. Expresión limitada al lado abaxial de órganos laterales.
AT1G29750	1	927	922	CTGTCA	RKF1	Se expresa en primordios florales jóvenes, estambres y polen.
AT1G53180	1	17	12	CTGTCA	SPL4	SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 4. Involucrada en la regulación del cambio de fase y la floración.
AT1G79730	1	384	389	TGACAG	ELF7	EARLY FLOWERING 7. Involucrado en el control del tiempo de floración mediante la regulación de la expresión de FLC.
AT2G03710	1	331	328	CTGTCA	SEP4/AGL3	Miembro de la familia SEP. Involucrado en desarrollo de sépalos, pétalos, estambres y carpelos. Rol central en determinación de los meristemas florales y de la identidad de órgano.
AT2G43410	2	178	183	TGACAG	FPA	Regula el tiempo de floración por la vía autónoma. Las mutantes poseen la floración extremadamente retardada.
AT2G43410	2	160	165	TGACAG	FPA	
AT2G45880	1	795	800	TGACAG	AGL20/SOC1	Controla la floración y es requerido por CO para la promoción de la misma. Actúa corriente abajo de FT.
AT5G54010	1	812	807	CTGTCA	GCN5	Histona aceditransferasa que participa en la determinación del eje tallo-raíz del embrión. Requerido para la actividad de meristemas florales modulando la expresión de <i>WUS</i> y <i>AG</i> .
AT5G59380	1	203	198	CTGTCA	FTA	Involucrado en la homeostasis de los meristemas apicales del tallo y floral. Participa en el desarrollo de hojas.
AT4G38930	2	898	803	TGACAG	SPT	SPATULA pertenece a la familia bHLH de factores de transcripción. Las mutantes poseen carpelos anormales (no fusionados) y dormancia de semillas reducida. Media la germinación en respuesta a la temperatura.
AT4G38930	2	941	948	TGACAG	SPT	
AT4G37750	1	838	833	CTGTCA	ANT	ANTEGUMENTA, factor crucial para la iniciación del integumento.
AT5G13480	1	372	387	CTGTCA	FY	Regulación del tiempo de floración. Media los cambios en el procesamiento de los transcritos de FCA.
AT5G22240	1	968	863	CTGTCA	PI	Factor de transcripción con dominio MADS. Requerido para la especificación de la identidad de pétalos y estambres.
AT5G35770	1	324	329	TGACAG	SAP	STERILE APETALA. Regula el desarrollo de la inflorescencia, de flores y óvulos.
AT5G81850	1	780	755	CTGTCA	LFY	Promueve la transición floral. Involucrado en el desarrollo de meristemas florales.
AT5G85050	1	471	478	TGACAG	AGL31/MAF2	Miembro de la familia MADS box involucrado en el control del tiempo de floración.

## SECUENCIA: TGACNTGAC

LOCUS		HITS	INICIO	FIN	SECUENCIA	GEN	DESCRIPCIÓN
AUXINAS	AT1G28480	1	530	538	TGACATGAC	AT1G28480.1	Proteína putativa de respuesta a auxinas.
	AT1G77110	1	84	76	GTCATGTCA	PIN6	PINFORMED 6, alportar auidina:hidrógeno. Transportador de auidina s.
	AT5G01990	1	948	940	GTCAGGTCA	AT5G01990.1	Proteína de la familia Auxin efflux carrier.
ABA	AT1G18540	1	790	798	TGACTTGAC	ATABA3LOSS/SIR3	ABA DEFICIENT 3. Involucrado en la conversión de ABA-Aldehído en ABA, el último paso de la biosíntesis de ABA.
	AT5G08390	2	145	137	GTCACGTCA	AT5G08390.1	Proteína putativa de respuesta a ABA.
	AT5G08390	2	835	927	GTCAGGTCA	AT5G08390.1	
	AT5G98980	1	351	343	GTCACGTCA	SNRK2.3/SRK2I	Involucrado en la señalización de ABA durante la germinación, demanda de semillas y crecimiento de las plántulas.
TALE	AT1G75410	1	581	573	GTCAGGTCA	BLH3	BEL1-like homeodomain 3
Desarrollo Floral	AT5G24880	1	915	907	GTCACGTCA	FPF1	FLOWERING PROMOTING FACTOR 1. Involucrado en una vía de señalización dependiente de giberelinas. Regula la respuesta a giberelinas en los meristemas apicales durante la transición floral.
	AT5G17690	1	974	968	GTCAGGTCA	TFL2/LHP1	TERMINAL FLOWER 2. Actúa en el control del tiempo de floración y la vernalización.
Luz	AT2G18790	1	607	615	TGACTTGAC	PHYB	Fotorreceptor involucrado en regular la de-etilación. Promueve la germinación en respuesta a la luz. Involucrado en la respuesta a etilación.
	AT4G28350	1	354	362	TGACATGAC	SHB1	SHB1. Actúa en señalización del orbitocromo y posiblemente en las respuestas a la luz mediadas por fitocromos.

### 4.2.3 Discusión

El establecimiento de interacciones proteína-proteína entre diferentes factores de transcripción constituye un evento esencial para lograr la versatilidad de la regulación de la expresión génica. Entre las proteínas con homeodominio, los complejos formados por las proteínas de mamíferos Pbx1 y Hox o MEIS constituyen ejemplos muy estudiados de interacciones proteína-proteína (Chang y col. 1997; Knoepfler y col. 1997; Berthelsen y col. 1998; Jaw y col. 2000; Penkov y col. 2000). En estos heterodímeros ambos homeodominios contactan sitios de unión adyacentes, dispuestos en tandem.

El complejo formado por las proteínas Pbx1 y MEIS se ha tomado como modelo de las interacciones establecidas por los factores de transcripción KNOX y BEL debido a que pertenecen a la superclase TALE, y a que las interacciones proteína-proteína se producen a través de dominios conservados en las porciones N-terminales de las mismas (Knoepfler et al. 1997; Berthelsen et al. 1998; Bellaoui et al. 2001; Smith et al. 2002). El complejo Pbx1-MEIS interacciona específicamente con la secuencia TGATTGAC, compuesta por los sitios de unión de Pbx1 y MEIS, respectivamente. En este caso, ambos homeodominios son necesarios para la unión y se establece un arreglo espacial de los mismos dentro del complejo. Pbx1 interacciona con la primera mitad de la secuencia y las proteínas MEIS unen la segunda porción. Con respecto a las proteínas TALE de plantas, se ha observado que la formación del complejo entre las proteínas KN1 y KIP de maíz produce un aumento en la afinidad de unión a moléculas de ADN que contienen un sólo sitio TGAC (Smith y col., 2002). Estudios similares llevados a cabo con las proteínas de papa POTH1 y StBEL5 mostraron que es necesaria una secuencia con dos motivos TGAC (TGACTTGAC) para que se produzca este efecto. En este caso, mutaciones en los nucleótidos centrales de cualquiera de los dos motivos impiden la unión del complejo al ADN (Chen y col., 2004).

De acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* aquí descritos, el complejo formado por las proteínas de *Arabidopsis* STM y BLH3 no requiere la presencia de dos motivos TGAC para que se produzca una unión eficiente al ADN. Esto sugiere que sólo uno de los homeodominios del complejo sería el que establece contactos específicos con el ADN. Observación que se comprueba con el hecho de que proteínas incapaces de unir ADN (como las mutantes en el homeodominio) producen un aumento en la

afinidad de unión al ADN de la otra proteína (nativa). En consecuencia, puede pensarse que con la formación del complejo se producirían cambios conformacionales que disminuyen las restricciones de uno de los homeodominios para unirse al ADN. Además, los estudios llevados a cabo con las proteínas mutantes sugieren que STM tendría un rol importante en la interacción del complejo con el ADN. En este sentido, se ha observado que el homeodominio de STM une ADN con una eficiencia considerablemente mayor que la proteína completa.

La identificación de los diferentes complejos entre las proteínas TALE, formados por factores que se expresan en los mismos tejidos y momentos del desarrollo, así como la determinación de sus genes blanco, proporcionarán las bases para entender la manera en que estas proteínas regulan diferentes aspectos del desarrollo vegetal. En relación a esto, hemos encontrado que varios genes que controlan la formación y funcionamiento de los meristemas apicales contienen en sus promotores la secuencia TGACAG reconocida por las proteínas BEL y KNOX.

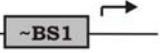
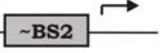
A pesar de que se conoce la existencia de una estrecha relación entre los genes *KNOX* y las funciones de algunas hormonas, se sabe muy poco sobre la manera en que la actividad de las proteínas KNOX y BEL se relaciona con la de las fitohormonas. En este estudio hemos encontrado que numerosos genes involucrados en las vías de señalización de hormonas contienen las secuencias reconocidas por estos factores de transcripción en los ensayos *in vitro* e *in vivo* aquí descritos. Puntualmente, hemos observado que los promotores de los genes *GA2*, *GA4* y *ATIPT5*, que participan en las vías de biosíntesis de giberelinas y citoquininas, contienen el motivo TGACAG. Además, encontramos que varios genes de respuesta primaria a estas hormonas podrían ser blancos de estas proteínas no reportados hasta el momento.

Aunque se ha sugerido que los genes *KNOX* modulan el transporte de las auxinas, no se conocen los genes involucrados en esta regulación. En la búsqueda efectuada se vio que varios genes necesarios para el transporte, distribución y respuesta a auxinas contienen en las regiones analizadas la secuencia reconocida por las proteínas TALE. Además, de acuerdo a nuestros resultados y teniendo en cuenta los recientes descubrimientos sobre la participación de las proteínas KNOX (y probablemente BEL) en el desarrollo de la raíz (Serikawa y col. 1996, 1997; Dean y col. 2004; Truernit y col. 2006), puede pensarse que *PIN4*, *ATPGP1* y *PLDP2*,

que participan en el transporte de auxinas en estos tejidos, podrían representar genes regulados por estas proteínas.

Los ensayos de unión al ADN *in vivo* en levaduras han mostrado que el complejo STM-BLH3 es capaz de interactuar con secuencias de ADN que contienen un único sitio TGAC (BS1). Sin embargo, el aumento en la transcripción del gen reportero originado por la co-expresión de las dos proteínas fue considerablemente mayor cuando se utilizó la construcción que contenía dos sitios TGAC en tandem (BS2). Por otra parte, la reducida capacidad de las proteínas individuales de unir BS2 *in vivo* coincide con los resultados obtenidos en los ensayos de retardo en gel. Los mayores niveles de expresión producidos por el complejo respecto de las proteínas individuales sugieren que, *in vivo*, se produce una unión más eficiente del primero a BS2 (no observada *in vitro*). O bien, que existe una activación más eficiente por parte del complejo unido a esta secuencia. En el primer caso, esto implica que la interacción de ambos homeodominios con el ADN representa una ventaja *in vivo*, quizás debido a la presencia de factores internos inexistentes en los ensayos *in vitro*. En consecuencia, la unión de las dos proteínas al ADN podría incrementar la estabilidad del complejo *in vivo*. En cualquier caso, puede decirse que existen diferencias específicas de secuencia en las propiedades de unión al ADN de las proteínas STM y BLH3 individuales y del complejo formado por las mismas. Esto sugiere que diferentes especies interactuarían con grupos distintos de genes, en función de las secuencias presentes en sus promotores. Por ejemplo, hemos encontrado que los promotores de los genes *KNAT2*, *KNAT4*, *BLH2* y *BLH5* contienen la secuencia TGACAG, mientras que el promotor de *BLH3* posee el motivo TGA~~C~~TTGAC. Esta diferencia plantea la posibilidad de que estos genes sean regulados de forma diferente por las proteínas KNOX y BEL.

Como se ha discutido, un factor adicional que explica los resultados obtenidos en los ensayos *in vivo* es el comportamiento diferente en la unión a la secuencia simple en función de las concentraciones de proteína. Por lo tanto, el efecto sobre la expresión génica de cambios en los niveles de las proteínas BEL y KNOX dentro de la célula también podría depender del tipo de secuencias blanco presentes en cada gen (Figura 31). Esto otorgaría una mayor plasticidad a las redes de regulación de las que forman parte estas familias de reguladores del desarrollo.

Niveles de expresión	↓ BLH3	↓ BLH3 + STM	↑ BLH3	↑ BLH3 + STM
Gen 1: 	++	++++	++++	++++
Gen 2: 	-	++++	+	++++

**Figura 31. Efecto de cambios en los niveles relativos de las proteínas BEL y KNOX en función del tipo de secuencia presente en los genes blanco.** Se propone un modelo para la regulación transcripcional en función de los niveles de BLH3 y STM. Los genes que contienen secuencias del tipo BS1 en sus promotores serían reconocidos por el complejo BLH3-STM cuando BLH3 está en menor concentración. Sin embargo, a mayores niveles, se produciría una competencia con las proteínas individuales. Por el contrario, genes que contienen secuencias similares a BS2 serían reconocidos de manera eficiente sólo en presencia del complejo BLH3-STM.

## 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.