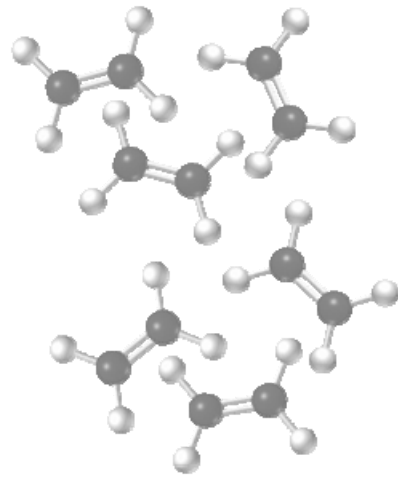


I – INTRODUCCIÓN GENERAL



Todos somos muy ignorantes. Lo que ocurre es que no todos ignoramos las mismas cosas.

Albert Einstein

I. - INTRODUCCIÓN GENERAL

I.1 – Los factores de transcripción que intervienen en la respuesta de las plantas a las condiciones medioambientales desfavorables.

Las condiciones ambientales constituyen los factores más importantes que afectan el desarrollo vegetal. Dado que las plantas son organismos sésiles y no pueden utilizar el movimiento como mecanismo de escape frente a condiciones desfavorables, han evolucionado desarrollando mecanismos que les permiten afrontar condiciones inhóspitas. Los procesos de adaptación se disparan a través de diferentes vías de traducción de señales que amplifican el estímulo inicial para que finalmente se activen o repriman genes de respuesta. La regulación de la expresión de este tipo de genes se da generalmente y mayoritariamente a nivel transcripcional, siendo los factores de transcripción los eslabones primarios de las vías (Chen y Zhu, 2004). Los factores de transcripción son proteínas que tienen la capacidad de reconocer y unirse a secuencias específicas que se encuentran en las regiones promotoras de los genes que actúan como sus blancos regulando de esta forma la actividad de la maquinaria transcripcional. Si bien la transcripción es el punto más importante en la regulación de la expresión de un gen y por ende, en la abundancia de la proteína codificada por el mismo, existen otros puntos de regulación post-transcripcionales, como el silenciamiento génico, que también juegan un papel crucial (Baulcombe, 2004).

En *Arabidopsis* y arroz, plantas cuyos genomas han sido secuenciados en su totalidad, hay estimativamente entre 1300 y 1500 genes que codifican factores de transcripción (Riechmann y col., 2000; Goff y col., 2002). Esta estimación se hizo en base a la presencia de regiones con homología de secuencia con dominios de unión a ADN, típicos de este tipo de proteínas en genes de función desconocida. Un número importante de estos factores de transcripción presenta respuestas a variados factores ambientales según se deduce de los análisis transcriptómicos en los que se compara la expresión génica en plantas sometidas a estrés.

Los factores de transcripción vegetales han sido clasificados en familias y subfamilias de acuerdo a la homología en sus dominios de unión a ADN. Entre las familias, las que más frecuentemente han sido relacionadas con la respuesta a estrés se encuentran las que poseen dominios de unión del tipo NAC, ERF/AP2, Zn-finger, DOF,

Myb, WRKY, b-Zip y HD. La conexión entre estos factores de transcripción y las condiciones de estrés se estableció principalmente teniendo en cuenta que la expresión de los genes que los codifican está regulada activamente por estas condiciones (Shinozaki *et al.*, 2003).

I.2 – Proteínas que contienen homeodominios.

Los homeodominios (HD) son motivos de 60 amino ácidos codificados por secuencias nucleotídicas llamadas cajas homeóticas, del inglés *homeobox* (HB). Están presentes en factores de transcripción y han sido encontrados en todos los organismos eucariotas en los que se estudiaron. La secuencia de 60 amino ácidos se pliega en una estructura terciaria característica de tres hélices separadas por una vuelta y un rulo, además de un brazo amino terminal flexible. La hélice III, que se ubica en forma perpendicular a las hélices I y II (antiparalelas entre sí) es la que hace contacto con el surco mayor del ADN estableciendo uniones específicas (Kissinger y col., 1990; Gehring y col., 1994). Esta estructura está muy conservada entre especies indicando su importancia al haberse mantenido durante la evolución. (Moens y Selleri, 2006).

Los genes que codifican HD fueron identificados por primera vez en *Drosophila* y recibieron el nombre de homeóticos ya que una mutación puntual o su expresión ectópica generaba el fenómeno de homeosis (Garber y col., 1983). Este fenómeno consiste en el cambio de un segmento corporal por otro como en el caso de las mutantes de *Drosophila*, *antennapedia* y *bithorax*. En 1991, Eric Volbrecht y colaboradores, trabajando con mutantes de maíz, identificaron por primera vez un gen que codifica un HD en plantas; lo llamaron *KNOTTED1* (del inglés, anudado) ya que la mutante en la cual fue identificado tenía las hojas anudadas. Desde entonces han sido identificados muchos genes con HB en una amplia variedad de plantas, incluyendo plantas C3, C4, mono y dicotiledóneas, conformando una gran familia.

Los miembros de esta familia de proteínas con HD difieren entre sí en varios parámetros, la secuencia del HD presenta algunas particularidades, el tamaño de la proteína, la localización del HD, la asociación con otros dominios conservados y también en la estructura de los genes incluyendo la cantidad y ubicación de exones/intrones. También se distinguen por sus funciones. De acuerdo a algunos de estos criterios las proteínas de plantas que contienen un HD se clasificaron en 6 familias: HD-Zip, PHD finger, Bell, ZF-HD, WOX y KNOX (Ariel y col., 2007). En la figura 1.1 y en la tabla 1.1 se representa un esquema con las principales características

estructurales y algunas funciones de los miembros de las 6 familias que constituyen la súper-familia de proteínas con HD de plantas.

Proteínas con Homeodominios

Familia

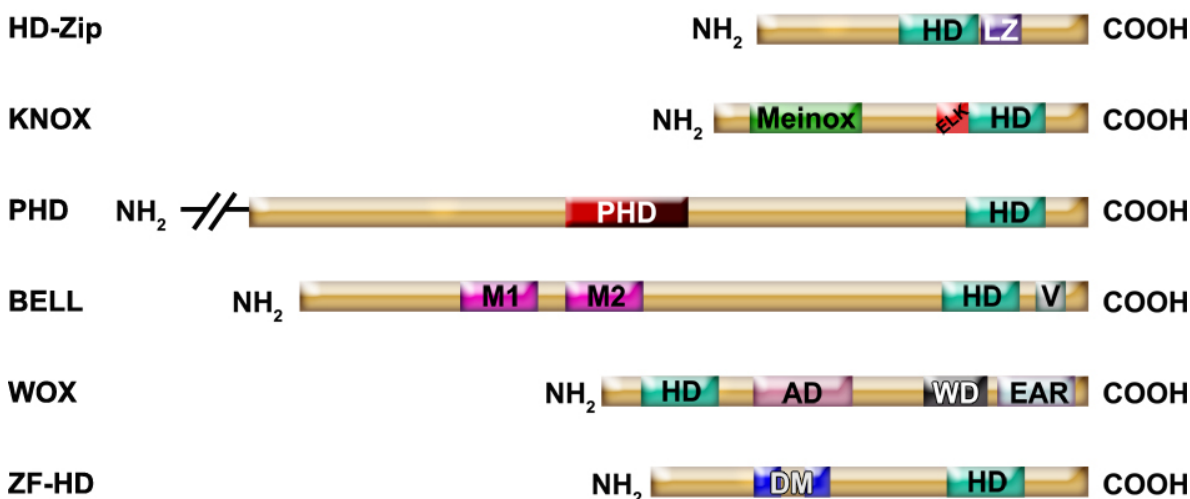


Figura 1.1: Representación esquemática de las estructuras y dominios distintivos de cada familia de proteínas con HD. Abreviaturas: AD, dominio ácido; DM, motivo de dimerización; EAR, motivo de represión amfilíco; ELK dominio nombrado por esta secuencia de amino ácidos conservada, glu, leu y lys; HD, homeodominio; LZ, cierre de leucinas; M1y M2 conforman el dominio Meinox (asociación entre dominios MEIS y KNOX); PHD, homeodominio de planta; V, caja ‘VSLTLGL’; WD, dominio WUS.

Familia	Función	Gen miembro modelo	Referencias
HD-Zip	Respuesta a factores ambientales. Respuesta a las condiciones de iluminación. Desarrollo vascular y de órganos. Desarrollo de tricomas y epidermis.	<i>ATHB1</i> (At1g20280) <i>ATHB2</i> (At4g16780) <i>ATHB8</i> (At1g52150) <i>ATHB10</i> (At1g79840)	Henriksson y col., 2005 Sessa y col., 2005 Prigge y Clark 2006 Nakamura y col., 2006
PHD-finger	Maduración de polen.	<i>MMD1</i> (At1g66170)	Yang y col., 2003
BEL	Mantenimiento del meristema apical del tallo.	<i>BEL1</i> (At5g41410)	Bellaoui y col., 2001 Cole y col., 2006
ZF-HD	Regulación de desarrollo floral.	<i>ATHB25</i> (At5g65410)	Tan y Irish 2006
WOX	Embriogénesis.	<i>WUSCHEL</i>	Kieffer y col., 2006

	Mantenimiento de meristema apical. Identidad de órganos durante el desarrollo floral.	(At2g17950)	Leibfried y col., 2005
KNOX	Iniciación y mantenimiento del meristema apical. Determinación de la arquitectura de la inflorescencia.	<i>KNAT1</i> (At4g08150) <i>KNAT6</i> (At1g23380)	Mele y col., 2003 Belles-Boix y col., 2006

Tabla 1.1: Eventos fisiológicos y moleculares en los cuales intervienen proteínas con HD y ejemplos de genes modelos pertenecientes a cada una de las familias con su correspondiente código de identificación y referencia bibliográfica.

1.2 – La familia HD-Zip.

Los miembros de la subfamilia HD-Zip presentan en su estructura proteica un cierre de leucinas (LZ, del inglés *leucine zipper*) corriente abajo del HD. Ambos dominios forman parte de factores de transcripción pertenecientes a otros reinos eucariotas pero la asociación de ambos en una sola proteína es exclusiva de plantas (Schena y Davis, 1992). La proteína se une al ADN a través del HD mientras que el LZ actúa como un dominio de dimerización. Esta dimerización es condición *sine qua non* para la unión específica de ADN mientras que los miembros de otras familias de plantas, y también de otros reinos, tienen la capacidad de unir ADN como monómeros. La figura 1.2 muestra la estructura tridimensional de una proteína de tipo HD-Zip unida a un segmento de ADN.

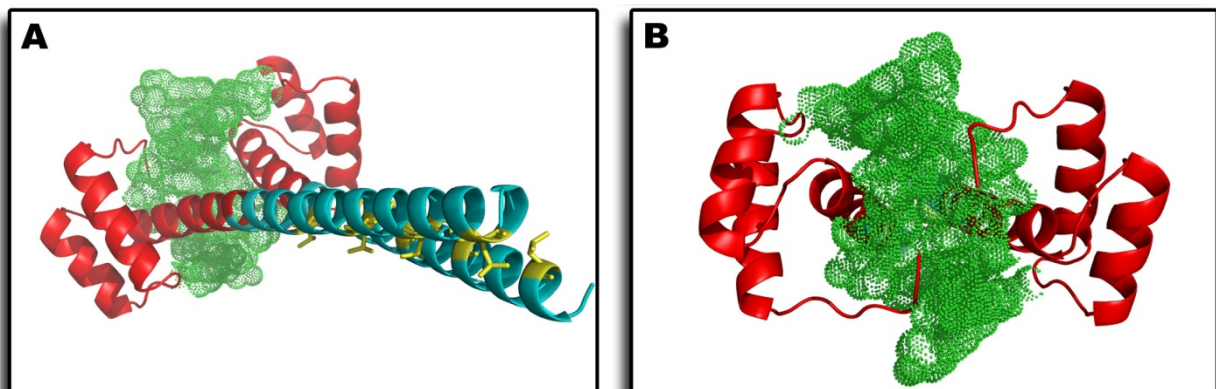


Figura 1.2: Estructura tridimensional de una proteína HD-Zip y su interacción con el ADN. EL ADN es representado con puntos verdes que indican el radio de las fuerzas de van der Waals, el HD está esquematizado en rojo y el LZ en celeste. Las leucinas pertenecientes al cierre están destacadas en amarillo.

Teniendo en cuenta las características estructurales así como el tamaño, ubicación del HD-Zip y otros dominios conservados, las proteínas pertenecientes a esta familia se clasificaron en 4 subfamilias (figura I.3).

Homeodomain-Leucine Zipper

Subfamilia

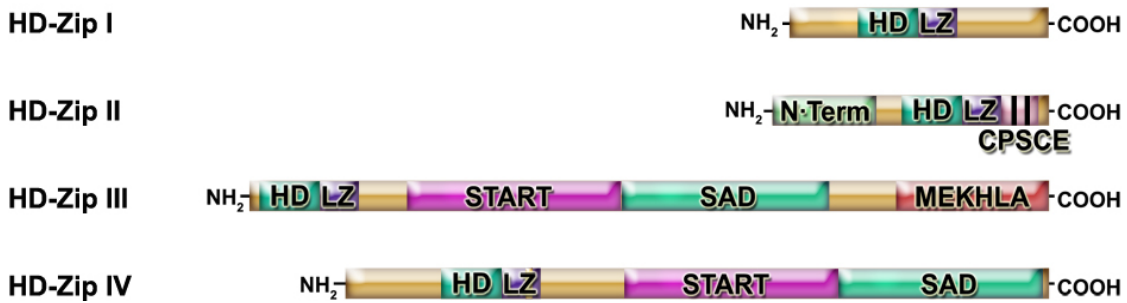


Figura I.3: Representación esquemática de las estructuras de los miembros de las cuatro subfamilias HD-Zip. Abreviaturas: dominio MEKHLA nombrado así por la alta conservación de amino ácidos met, glu, lys, his, leu, ala; N-term, dominio consenso en la región N-terminal; SAD, dominio adjunto a START; START, del inglés “steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer domain”.

La figura I.4 presenta el árbol filogenético construido con las proteínas HD-Zip de *Arabidopsis* en el que cabe destacar la proximidad evolutiva entre las subfamilias I y II con respecto a las subfamilias III y IV, más distanciadas entre sí y con respecto a las dos primeras.

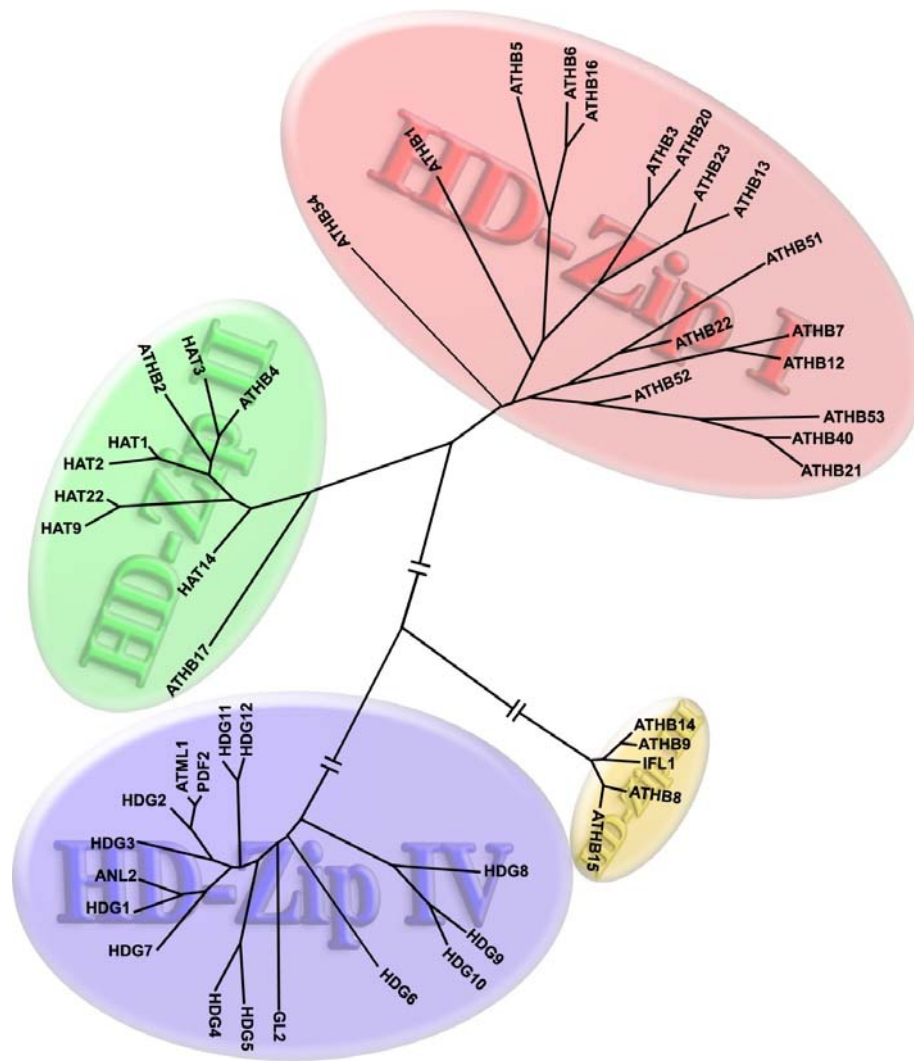


Figura 1.4: Árbol filogenético construido con las proteínas HD-Zip de Arabidopsis, tomando las proteínas completas. Para la construcción del árbol se utilizó el programa Tree-Puzzle 5.2 (Schmidt y col., 2002).

I.3 – La subfamilia HD-Zip I.

En *Arabidopsis* la subfamilia I de proteínas HD-Zip está compuesta por 17 miembros (*ATHB1, 3, 5-7, 12, 13, 16, 20-23, 40, 51-54*). Las proteínas codificadas por estos genes tienen un tamaño de alrededor de 35 kDa y presentan un alto grado de conservación dentro del HD, una conservación moderada en el LZ y ninguna similitud en el resto de la secuencia (Chan y col., 1998). Cabe destacar que si comparamos las secuencias de muchas de estas proteínas con las pertenecientes en otras plantas se logran identificar ciertos dominios conservados en la región carboxilo terminal (Federico Ariel, comunicación personal).

La figura I.5 presenta un árbol filogenético construido con las proteínas pertenecientes a la subfamilia HD-Zip I en el que se incluyeron todos los miembros conocidos de *Arabidopsis*, de arroz y de girasol.

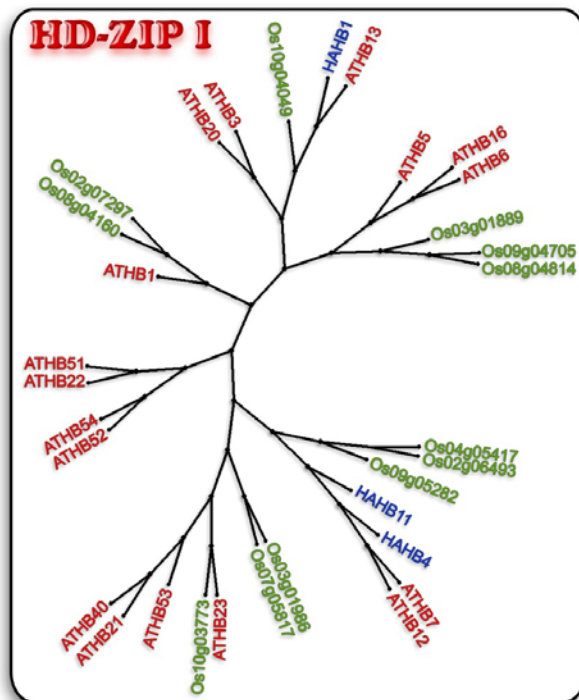


Figura I.5: Árbol filogenético de proteínas con dominio HD-Zip pertenecientes a la sub-familia I de *Arabidopsis* (rojo), arroz (verde) y girasol (azul).

Los estudios realizados *in vitro* permitieron determinar que las proteínas de tipo HD-Zip I reconocen y unen como dímeros la secuencia pseudopalindrómica CAAT(A/T)ATTG (Chan y col., 1998; Palena y col., 1999; Palena y col., 2001). Con algunas de las proteínas de *Arabidopsis* que conforman la subfamilia I se realizaron ensayos de unión a ADN. Sólo dos, ATHB7 y 12 no unieron el palíndromo ni ninguna otra secuencia (Johannesson y col., 2001). Sin embargo, en nuestro laboratorio al ser expresadas en forma recombinante y purificadas, ATHB7 fue capaz de unir el mismo pseudopalíndromo que los otros miembros mientras que ATHB12 permaneció inactiva en las condiciones ensayadas (Federico Ariel, comunicación personal). Los análisis bioquímicos realizados con proteínas HD-Zip I de girasol indicaron que el brazo flexible N-terminal juega un papel importante en la interacción con el ADN, aumentando la afinidad sin cambiar la especificidad (Palena y col., 2001). Por otra parte, se determinó que el rulo localizado entre las hélices I y II es estructuralmente importante y responsable de que los miembros de esta familia unan ADN exclusivamente como dímeros (Tron y col., 2004).

La expresión de los genes de esta subfamilia, según los estudios realizados hasta la fecha, está regulada fuertemente por factores externos como sequía, temperaturas

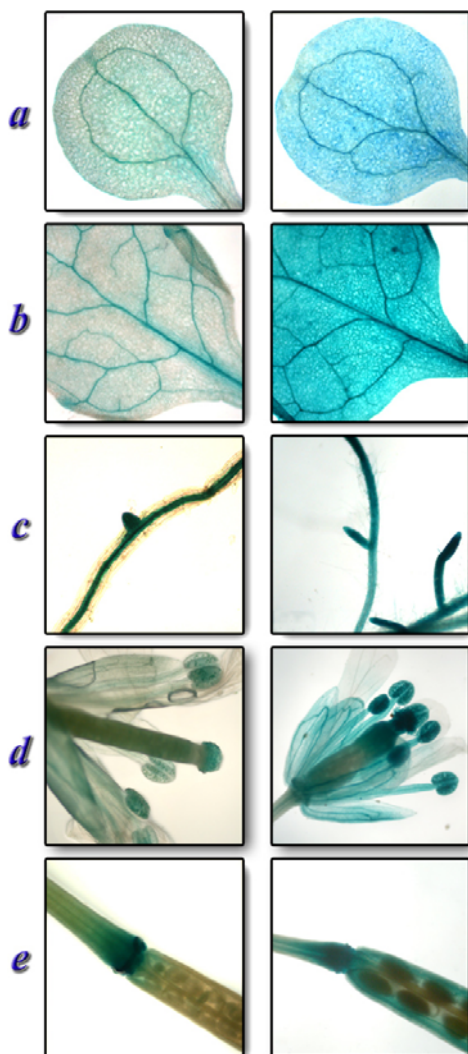
extremas, estrés osmótico y condiciones lumínicas. En forma general sus funciones como factores de transcripción están ligadas al desarrollo en respuesta a alteraciones en las condiciones ambientales, particularmente a aquellas que generan estrés abiótico (Mayda y col., 1999; Meijer y col., 2000; Gago y col., 2002; Himmelbach y col., 2002; Olsson y col., 2004). Entre las proteínas HD-Zip más caracterizadas se encuentran: *ATHB1*, el primer miembro identificado que actúa como un mediador de la determinación del destino de las células meristemáticas (Aoyama y col., 1995), *ATHB16* que participa en la percepción de señales disparadas por la luz azul (Wang y col., 2003). *ATHB7*, *12*, *5* y *6* genes cuya expresión está regulada positiva o negativamente por condiciones de déficit hídrico y la fitohormona ABA (Söderman y col., 1994; Söderman y col., 1996; Söderman y col., 1999; Lee y col., 2001). Además, los estudios de sobreexpresión con los genes *ATHB3*, *13*, *20* y *23* indicaron la participación de éstos en la regulación del desarrollo de hojas y cotiledones (Mattsson y col., 2003; Henriksson y col., 2005). En la figura 1.6 se presenta una visión gráfica y resumida de las funciones que cumplen en los vegetales las proteínas de tipo HD-Zip según el conocimiento actual.



Figura 1.6: Esquema de las funciones conocidas de las proteínas pertenecientes a las subfamilias HD-Zip.

I.4 – El factor de transcripción HAHB4.

HAHB4, por *Helianthus annuus homeobox-4*, es un factor de transcripción de girasol perteneciente a la subfamilia I de proteínas HD-Zip. Su relación filogenética con otros miembros de la familia, como *ATHB7* y *12*, no es tan estrecha como para definirlos como genes ortólogos (Figura I.5; Gago y col., 2002). La comparación de las secuencias de los homeodominios de distintos miembros de la subfamilia HD-Zip I indica que la similitud de HAHB4 con la secuencia consenso de esta subfamilia es sólo del 49%. Tomando en cuenta únicamente los miembros de *Arabidopsis* más relacionados filogenéticamente con HAHB4, la homología de secuencia aumenta al 67% para *ATHB7* y al 63% para *ATHB12*. La mayoría de los otros miembros presentan



entre el 75 y 85% de similitud en la secuencia consenso, de lo que se puede deducir que *HAHB4* codifica el miembro más divergente. Una característica distintiva de este gen de girasol es que su HD se localiza casi en el extremo N-terminal de la proteína (aminoácidos 17-76) y carece del dominio ácido N-terminal presente en la mayoría de las otras proteínas HD-Zip. Esta característica la comparte solamente con las proteínas *ATHB7* y *12* de *Arabidopsis* y *HBLZP* de damasco.

En nuestro laboratorio se ha demostrado que HAHB4, al igual que la mayoría de proteínas

Figura I.7: Ensayo histoquímico realizado a plantas transgénicas que expresan el gen reportero *GUS* bajo el control del promotor de *HAHB4*. Cada columna representa una línea de baja y alta expresión respectivamente. a: cotiledones; b: hojas; c: raíces; d: flores; e: vainas.

HD-Zip I, se une *in vitro* como un dímero a la secuencia CAAT(A/T)ATTG (Palena y col., 1999). La expresión de este gen es prácticamente indetectable en plantas crecidas en condiciones óptimas pero se induce fuertemente en presencia de ABA, déficit hídrico, elevada osmolaridad o salinidad según indicaron los estudios realizados por *northern blot* y protección a la digestión por

ARNasa (Gago y col., 2002). Más tarde se obtuvieron plantas transgénicas capaces de expresar el gen reportero *GUS* bajo el control del promotor de *HAHB4* (llamado PEL por “**promotor entero largo**”) coincidiendo con las observaciones previas. Además, estos estudios permitieron, por su sensibilidad y reproducibilidad, delimitar los tejidos y órganos en los cuales se expresa (hojas, cotiledones, raíces y mas ligeramente a tallo e hipocotilo, Dezar y col., 2005b). Se pudo observar también que el promotor es activo en sépalos, estigma, anteras y granos de polen (Figura 1.7).

Dezar y col. (2005a) demostraron que la sobreexpresión constitutiva de *HAHB4* en plantas de *Arabidopsis* confiere una marcada tolerancia a condiciones de estrés hídrico. En la figura 1.8e se puede observar la diferencia en el comportamiento de plantas transgénicas y plantas salvajes después de ser sometidas a estrés hídrico severo. Como contraparte a esta característica fenotípica beneficiosa, la sobreexpresión de este gen trae aparejada una serie de alteraciones fenotípicas indeseables. Estas plantas presentan un retraso marcado en el desarrollo, tallos e internodos más cortos, hojas redondeadas e inflorescencias compactas (figura 1.8a-d, Dezar y col., 2005a). Estas penalidades fisiológicas producidas probablemente por la expresión constitutiva condujeron a querer obtener plantas transgénicas que no las presentaran pero sí conservaran la característica de tolerancia. Con este objetivo, Cabello y col. (2007) obtuvieron plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan el gen *HAHB4* bajo el control de promotores inducibles por estrés, entre ellos, el propio promotor de *HAHB4* (*PEL*) y una variante de éste que incluye el primer intrón del gen *COX5c-2* descrito como un amplificador de las señales (Curi y col., 2005). En este trabajo se generaron plantas transgénicas con fenotipos morfológicos normales y una deseada y eficiente tolerancia a sequía. En la figura 1.8 se muestran tanto las características fenotípicas de estas plantas como también un ensayo representativo de su comportamiento frente al estrés hídrico.

Hacia el comienzo de este trabajo de Tesis, se contaba con valiosa información bioquímica sobre *HAHB4* relacionada con su estructura, capacidad de unir ADN y afinidad de unión. Asimismo existía un buen cúmulo de datos sobre su expresión. Además, la obtención de plantas transgénicas que expresan en forma constitutiva este factor de transcripción brindó la posibilidad de comenzar a dilucidar la función de este gen de girasol, especialmente en lo que respecta a la respuesta a sequía. Esta situación llevó a plantear nuevos objetivos con el interés profundizar en el conocimiento referente a la funcionalidad de esta proteína. Nada sabíamos sobre el mecanismo por el cual este

gen confería tolerancia a sequía ni si, por sus características de factor de transcripción, participaba en otros procesos fisiológicos. Con la aspiración de contestar estas preguntas, durante la realización de esta Tesis se llevó a cabo una amplia caracterización molecular y funcional de este factor de transcripción. La estrategia inicial elegida fue la de realizar un estudio transcriptómico en plantas de *Arabidopsis* que lo expresan constitutivamente. Pensamos que este tipo de estudio nos ayudaría a determinar cuáles son las principales vías metabólicas en las que participa *HAHB4* en las plantas de girasol.

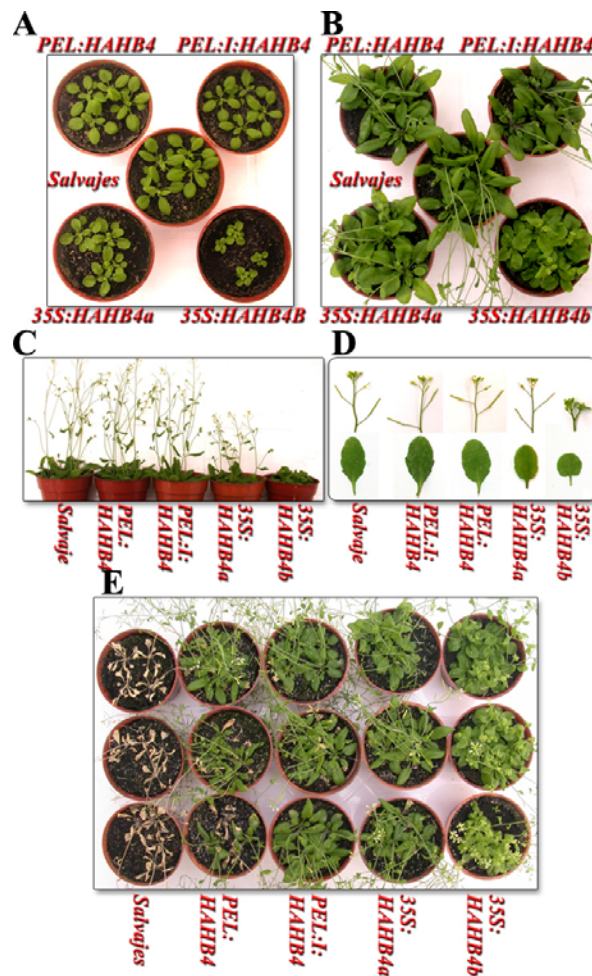


Figura 1.8: Fenotipos de plantas transgénicas que expresan el gen *HAHB4* constitutivamente o bajo el control de promotores inducibles. Comportamiento frente a estrés hídrico de los distintos genotipos. **A** y **B**: vista aérea de plantas transgénicas y salvajes de 20 y 30 días crecidas en condiciones estandarizadas; **C**: vista lateral de las mismas plantas donde se visualizan claramente las diferencias en el desarrollo; **D**: detalles de las inflorescencias y hojas. **E**: vista aérea de plantas sometidas a condiciones de estrés hídrico severo y posteriormente regadas. S: plantas salvajes; *PEL:HAHB4*: plantas que expresan el gen *HAHB4* bajo el control de su propio promotor; *PEL:I:HAHB4*: ídem al genotipo anterior pero con el intrón del gen *COX5c* fusionado al promotor de *HAHB4*; *35S:HAHB4a* y *b*: plantas que expresan constitutivamente el gen *HAHB4* en niveles bajos y altos respectivamente.