

Tesis Doctoral

# La proteína ASR1 de tomate. Aspectos estructurales y funcionales. Búsqueda de sus genes blanco

Ricardi, Martiniano María

2012

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Ricardi, Martiniano María. (2012). La proteína ASR1 de tomate. Aspectos estructurales y funcionales. Búsqueda de sus genes blanco. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Ricardi, Martiniano María. "La proteína ASR1 de tomate. Aspectos estructurales y funcionales. Búsqueda de sus genes blanco". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular

***La proteína ASR1 de tomate.  
Aspectos estructurales y funcionales.  
Búsqueda de sus genes blanco***

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos  
Aires en el área Ciencias Biológicas

**Lic. Martiniano María Ricardi**

**Director de tesis:** Dr. Norberto Daniel Iusem

**Consejero de Estudios:** Dr. Norberto Daniel Iusem

**Lugar de trabajo:** Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular (LFBM) - Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIByNE - CONICET)

Buenos Aires, Diciembre 2012

# RESUMEN

---

## **La proteína ASR1 de tomate. Aspectos estructurales y funcionales. Búsqueda de sus genes blanco.**

Las proteínas ASR, exclusivas del reino vegetal, se encuentran relacionadas con la respuesta al estrés por falta de agua y otros estreses. ASR1 tiene funciones de chaperona y factor de transcripción. Esta función dual de ASR1 se condice con su presencia en extractos citosólicos y nucleares. Hemos corroborado *in planta* esta localización dual y demostrando que la misma ocurre por difusión y no mediante transporte activo. Además demostramos que dicha proteína puede homodimerizar en el citosol y se encuentra como dímero en el núcleo. Por otra parte, hemos adaptado exitosamente una metodología de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) para tomate. Este protocolo fue utilizado para realizar un ChIP “semi-nativo” y detectar marcas de histonas relacionadas a represión y activación de genes en todo el genoma de tomate a lo largo de diferentes estadios de maduración del fruto. Además, experimentos de ChIP sobre hojas de plantas de tomate estresadas, usando un anticuerpo anti-ASR1, mostraron que la mayoría de las regiones genómicas se ubicaron cerca de genes. Los grupos de genes hallados, y por lo tanto posiblemente regulados por ASR1, están relacionados a la síntesis y remodelación de la pared celular, y al transporte de agua y solutos. Finalmente, encontramos una robusta secuencia de ADN consenso de "*binding*" para ASR1.

## Palabras clave

---

ASR1 - estrés - ChIP - genes regulados - tomate

# ABSTRACT

---

**Tomato ASR1 protein. Functional and structural aspects. Search for its target genes.**

ASR proteins, exclusive to the plant kingdom, are related to water stress and other abiotic stresses. ASR1 has chaperone and transcription factor functions. This dual function is correlated with a dual nuclear/cytosolic subcellular localization, demonstrated to be due to diffusion rather than active transport. Additionally, we observed homodimerization in cytosol and homodimers in the nucleus. We have also successfully adapted a chromatin immunoprecipitation protocol (ChIP) for tomato. This protocol was used to perform semi-native ChIP for detection of repressive and activating histone modifications genome wide at different fruit maturation stages. In addition, ChIP assays on leaves from stressed tomato plants, performed with an anti-ASR1 antibody, showed that most of the enriched genomic regions were located near genes. The gene groups found, and hence probably regulated by ASR1, were related to cell wall synthesis and remodeling, and water and solute transport. Finally, we were able to find a robust consensus ASR1-binding DNA sequence.

## Keywords

---

ASR1 - stress - ChIP - regulated genes - tomato

Parte de los resultados obtenidos en esta tesis se encuentran publicados en los siguientes artículos de revistas internacionales con referato.

Ricardi MM, Guaimas FF, Gonzalez RM, Burrieza HP, Lopez-Fernandez MP, Jares-Erijman EA, Estevez JM, Iusem ND: Nuclear import and dimerization of tomato ASR1, a water stress-inducible protein exclusive to plants. *PLoS One* 2012, 7(8):e41008.

Ricardi M, Gonzalez R, Iusem N: Protocol: fine-tuning of a Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) protocol in tomato. *Plant methods* 2010, 6(1):11.

# AGRADECIMIENTOS

---

-A todos los miembros del IFIByNE y en especial a los del LFBM que hacen de este un excelente lugar de trabajo.

-A la gente del grupo de Alberto que me enseñaron los primeros pasos en los clonados que tantos tuve que hacer y también los chicos de los demás grupos que fueron víctimas de mis mangueos.

-A mi jefe Norberto por ser dejarme innovar y ser una excelente persona

-A Jose mi futuro jefe por traer al labo muchas herramientas y sobre todo muchas ganas.

-A los chicos del grupo NDI-JE, Rodri que estuvo desde el principio cuando luchábamos contra las contaminaciones, a Meli que vino no mucho después y a Juan y Javier que completaron un excelente clima de trabajo.

-A mis suegros, mi familia adoptiva, que siempre estuvieron alentándonos a Paula y a mi para cumplir con todas nuestras metas.

-A mis hermanos que siempre estuvieron conmigo

-A mis viejos que me bancaron desde siempre, aunque no siempre entendieran para que sirve lo que estoy haciendo y no estuviesen siempre de acuerdo con mis decisiones.

-A Paula, mi amor, mi sostén y mi vida, con quien compartimos tantos proyectos y con quien queremos llegar tan lejos como podamos.

# ÍNDICE

---

## **INTRODUCCIÓN**

Impacto de la falta de agua en el mundo y en Argentina	1
La familia ASR	5
Antecedentes sobre ASR1	5
Funciones de ASR1	7
ASR1 como chaperona	7
ASR1 como factor de transcripción	7
Resistencia al estrés mediado por proteínas del tipo ASR en otras plantas ASR1	9
Transporte nuclear	10
La estructura de la cromatina	11
Metodología de Inmunoprecipitación de la Cromatina. Su utilidad en Biología	11

## **OBJETIVOS**

Objetivos	14
-----------	----

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Plantas	15
-Tomates	15
- <i>Nicotiana benthamiana</i>	15
-Estrés	15
Extracción y electroforesis de proteínas	15
-Extracción	15
-Cuantificación de proteínas (método de Bradford)	16
-SDS-PAGE y Western blot	16
Clonados	16
-Generación de los fragmentos a clonar	16
-Restricción y ligación	17

-Subclonado	17
-Anillado y fosforilación	17
-Anillado y restricción	17
-Clonados en sistema Gateway	17
-PCR	18
-Ligaciones	18
-Trasformación de Bacterias	19
Transformación transiente de <i>Nicotiana benthamiana</i>	19
Cortes histológicos e inmunofluorescencia	19
Microscopía	20
Protocolo de ChIP base para <i>Arabidopsis thaliana</i>	20
-“Crosslinking” (entrecruzamiento covlente)	20
-Extracción de cromatina	20
-Fragmentación del ADN	21
-Pre-bloqueo de las bolitas de Agarosa	21
-Inmuno-precipitación de la cromatina	21
-Reversión del “crosslinking”	22
-Purificación del ADN	22
Pruebas de sonicado	22
Protocolo de ChIP adaptado para tomate	23
-“Crosslinking”	23
-Extracción de cromatina	23
Real time PCR	24
Digestión con nucleasa micrococcal	24
Protocolo de ChIP semi-nativo para tomate	25
Producción de ASR1 “recombinante”	25
-Expresión en <i>Escherichia coli</i> BL21	25
-Purificación de ASR1 recombinante	26
Obtención de anticuerpo anti-ASR1	27
-Purificación de inmunoglobulinas totales	27
-Cromatografía de afinidad para purificar anticuerpos anti-ASR1	27



Construcción de la biblioteca de los fragmentos a secuenciar	28
Secuenciación profunda	29
Análisis bioinformáticos	30
-Interpretación de las lecturas de secuencias de ADN	30
-Búsqueda de sitios de “ <i>binding</i> ” para ASR1	30

## **RESULTADOS**

### **CAPÍTULO 1 Localización subcelular y oligomerización de ASR1** 32

Localización subcelular de ASR1	32
Funcionalidad <i>in-vivo</i> de Sitio de localización Nuclear	37
Estructura cuaternaria	41
-Formación de homodímeros de ASR1 <i>in vivo</i>	41
-Compartimiento de la formación de homodímeros	43

### **CAPÍTULO 2 Genes target del pool de ASR1 nuclear** 46

#### **Puesta a punto de la metodología CHIP en tomate** 46

Purificación de Núcleos	49
“ <i>Crosslinking</i> ”	51
Puesta a punto inicial con anticuerpos anti-histona	53
Primer ensayo de CHIP contra ASR1	55
Ensayos de CHIP semi-nativos seguidos de secuenciación profunda	55

#### **CHIP contra ASR1** 59

Producción de Anticuerpo contra ASR1	59
-Expresión de ASR1 recombinante en <i>Escherichia coli</i> BL21	59
-Purificación por cromatografía de afinidad de la proteína sobre-expresada	60
Expresada	
-Inmunización de conejos con la proteína recombinante pura	61
-Titulación de los sueros	62
-Purificación de inmunoglobulinas a partir de suero de conejo	63
-Purificación de anticuerpos anti-ASR1 por cromatografía de afinidad	64

-Confirmación de la capacidad de inmunoprecipitación del anticuerpo anti-ASR1	65
Ensayos de CHIP con el nuevo anticuerpo anti-ASR1	67
Interpretación de los resultados de CHIP anti-ASR1 en hojas estresadas	68
Validación mediante CHIP-qPCR de las secuencias enriquecidas	71
Análisis bioinformático global	72
Clasificación de genes target de ASR1	74
Determinación de un motivo consenso de "binding" para ASR1	76

## **DISCUSIÓN**

Localización subcelular y oligomerización de ASR1	78
- Localización de ASR1 in vivo y relevancia de su NLS	78
-Dimerización y localización de los dímeros	79
-Modelo propuesto	80
Evaluación Del protocolo de CHIP para tomate	81
Ensayos de CHIP semi-nativo	83
Determinación de probables blancos para ASR1	83
Localización de los sitios genómicos de unión para ASR1	85
Clasificación de genes target de ASR1. Genes sobre-representados	86
-Genes relacionados con la pared celular	86
-Genes de proteínas intrínsecas de membrana. Las acuaporinas	87
-Genes con funciones "varias"	87
Secuencia consenso de " <i>binding</i> " para ASR1	89
Conclusiones integradoras y perspectivas futuras	90
En cuanto a bioquímica y biología celular	90
En cuanto a genómica	91

## **BIBLIOGRAFÍA**

Bibliografía	92
--------------	----

## **APÉNDICE**

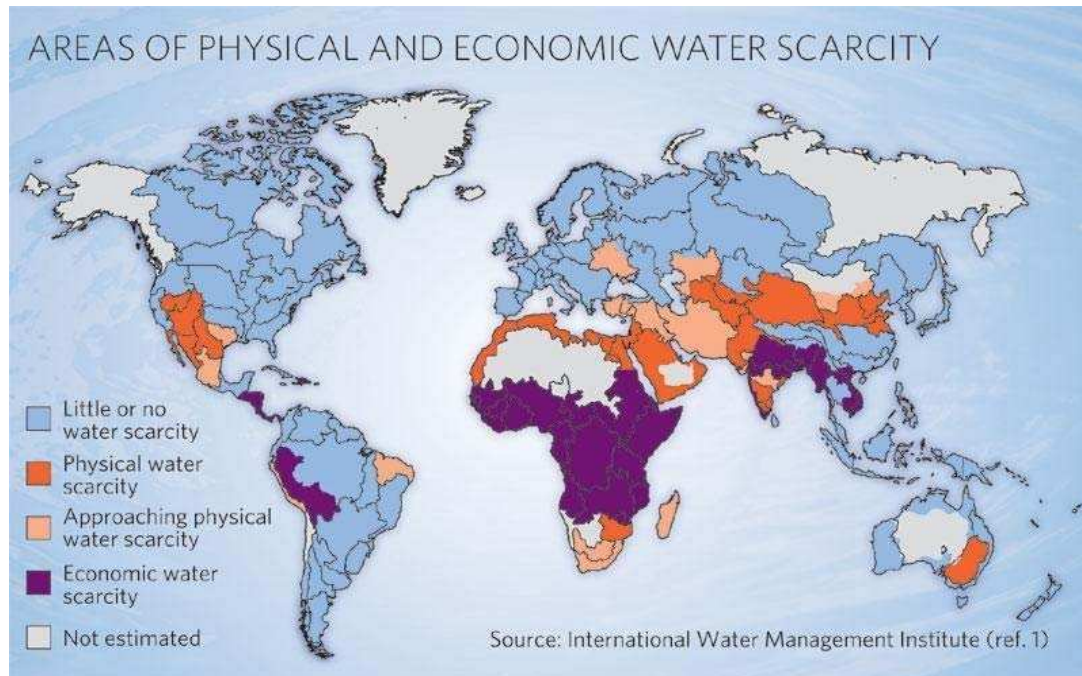
Soluciones Buffer y Reactivos	97
Mezcla Tierra	102
"Primers" para Real Time	103
Clonados	104
-Vectores	104
-"Primers"	105
-Detalle clonados	106
Parámetros Macs	107
Parámetros Gimmemotif	108

# INTRODUCCIÓN

---

## Impacto de la falta de agua en el mundo y en Argentina

El acceso al agua representa una problemática general en varias zonas geográficas del mundo agrónomicamente relevantes (**Figura 1**).



**Figura 1. Áreas de escasez de agua en el mundo:** En este mapa observamos que la mayor escasez de agua se observa mayoritariamente en África. Sin embargo este mapa no contempla las sequías estacionales.

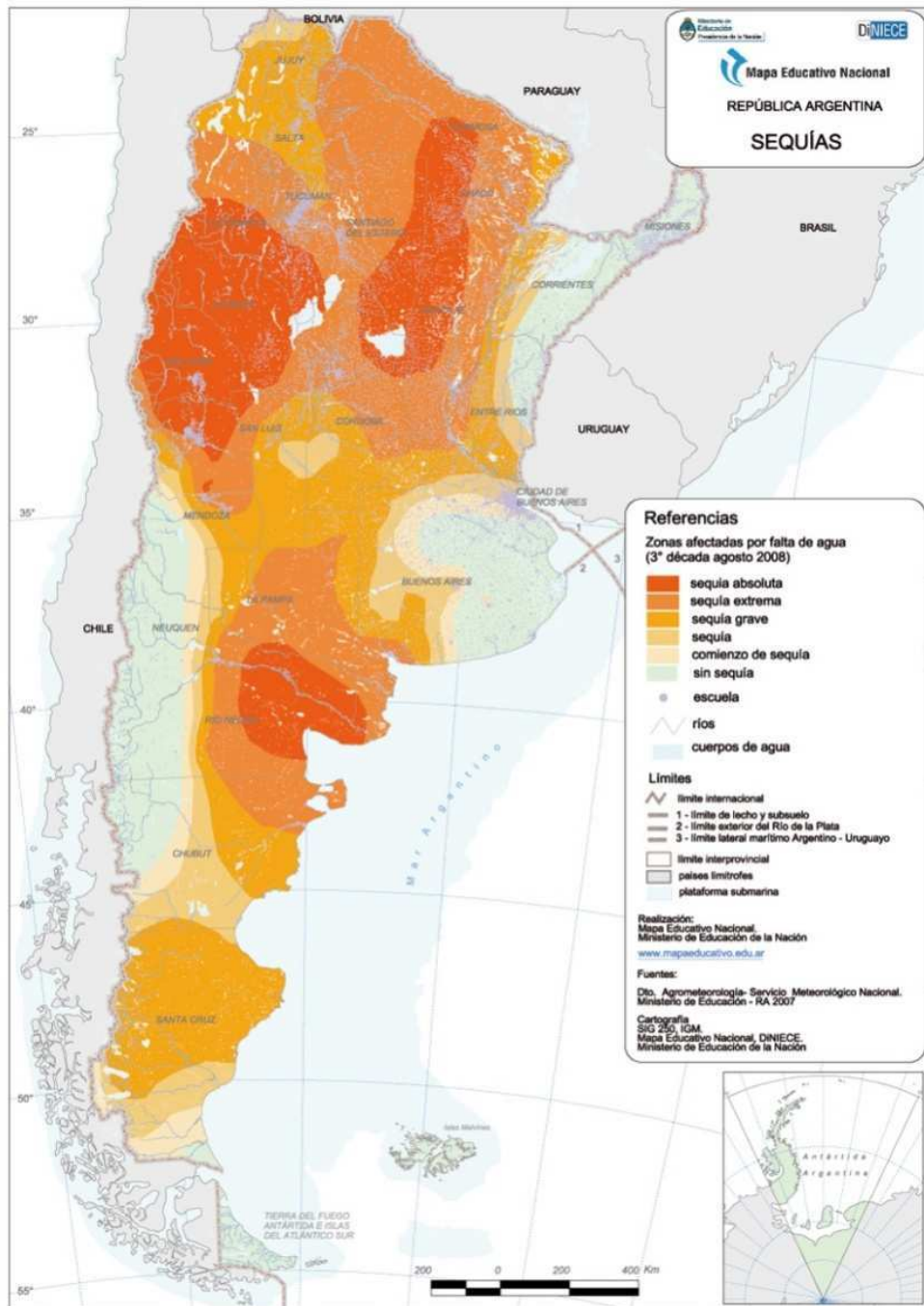
Debido a que el agua (tanto de lluvia como por irrigación artificial) es un factor determinante en el rendimiento de los cultivos [1], la optimización de los recursos hídricos en general es medular en el marco de uno de los más grandes desafíos de este siglo: la alimentación sustentable de 9 mil millones de personas en un mundo de clima cambiante donde la lluvia y la temperatura son cada vez más erráticas.

La urgencia en resolver estas cuestiones a nivel mundial obliga a generar debates periódicos en foros internacionales. Como ejemplo, cito la Fourth World

Conference on The Future of Science, septiembre de 2008 organizada en Venecia, Italia. El tema del congreso en dicha oportunidad fue “Alimento y Agua para la vida” [2]. Los participantes fueron científicos de varias disciplinas, así como también políticos y economistas. Debido a la relación entre el conocimiento básico de la fisiología vegetal con con la alimentación y la agricultura, los científicos que trabajan con plantas expusieron sobre cómo su propia investigación puede ayudar a asegurar alimento adecuado y mejorar la nutrición en el mundo del siglo XXI.

En este contexto general y con la motivación de solucionar el problema a largo plazo, la adaptabilidad de cultivos comestibles en zonas áridas (estimada midiendo la “eficiencia de uso de agua”) ha sido de interés, tanto a nivel básico como aplicado. En este marco, las respuestas celulares al estrés provocado por pérdida de agua han sido estudiadas mediante diferentes estrategias experimentales, no solamente en plantas sino a varios niveles de organización biológica, dada la conservación evolutiva de las moléculas involucradas [3]. En efecto, bacterias, levaduras, insectos, plantas y árboles viviendo en desiertos y organismos llamados anhidro bióticos, que pueden tolerar pérdida casi completa de agua [4], han sido acertadamente elegidos y usados como modelos para explorar las bases moleculares de las respuestas a la pérdida celular de agua [5-9]. La falta de agua impacta frecuentemente en la economía de nuestro país, muy dependiente de la producción agropecuaria. El Ministerio de Educación publicó en 2008 un mapa de falta de agua en Argentina (**Figura 2**), en el cual vemos que la sequía no solo se encuentra presente en zonas desérticas como el noroeste argentino sino también en las provincias de Córdoba y Santa Fe que forman parte del núcleo agro-productor.

Si bien políticas de cuidado del agua, forman parte de la solución a esta problemática, también resulta imperativo el estudio de los mecanismos por los cuales las diferentes especies vegetales logran sobrevivir a condiciones adversas.



**Figura 2. Zonas afectadas por sequía en la República Argentina (agosto 2008):** En este mapa se puede apreciar la gravedad de la sequía sufrida en nuestro país en el 2008, siendo afectada gran parte de la zona agrícola "núcleo"

Los mecanismos de adaptación a la escasez de agua en las plantas son extremadamente variados y se pueden observar a nivel morfológico, fisiológico y molecular.

En el caso de los cactus (familia Cactaceae), los miembros de la subfamilia Pereskioideae, que no se encuentra adaptada al clima seco, cuentan con arbustos y árboles grandes con hojas de aspecto ordinario y tallos no suculentos y leñosos. En contraste, la subfamilia Cactoideae, que está adaptada a ambientes secos, posee las hojas reducidas a un tamaño microscópico y toda la fotosíntesis se lleva a cabo en la corteza del tallo que es suculento y verde. Lo más llamativo de estas especies es que siguen manteniendo la identidad de todos los tejidos presentes en las plantas dicotiledóneas, si bien hay drásticos cambios morfológicos [10]. A nivel fisiológico, las plantas regulan la apertura y cierre de estomas [11] en respuesta al potencial hídrico que sensan en las hojas. Finalmente, a nivel molecular, las plantas poseen muy numerosos mecanismos para preservar las moléculas de agua, siendo uno de estos mecanismos la síntesis de osmolitos compatibles como la prolina [12].

En el caso particular de la planta de tomate (*Solanum lycopersicon*), autóctona del continente americano, podemos encontrar diferentes variedades adaptadas a las duras condiciones del desierto de Atacama (Chile), así como también otras que requieren grandes cantidades de agua como por ejemplo el tomate comercial.

## La familia ASR

La familia de genes ASR (“**A**bsisic **S**tress **R**ippening”) debe su nombre a que la primera proteína de la familia descrita, ASR1 de tomate [13], muestra un marcado aumento de expresión frente a estímulos con ácido abscísico (ABA), en condiciones de estrés por falta de agua y se encuentra muy altamente expresada en frutos en maduración y frutos maduros [9].

Las proteínas ASR están ampliamente distribuidas en el reino vegetal incluyendo a muchos cultivares de relevancia agronómica; sin embargo se encuentra ausente en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* [14]. Esta familia proteica fue recientemente clasificada como un nuevo grupo dentro de la superfamilia LEA por “**L**ate **E**mbryogenesis **A**bundant” [15] dado que también se encuentra muy altamente expresada en semillas [16]. La familia de proteínas ASR posee varias características llamativas que describiremos tomando como ejemplo a ASR1 de tomate, que fue el objeto de estudio en este trabajo.

## Antecedentes sobre ASR1

La proteína ASR1 de tomate es una secuencia polipeptídica de tan solo 110 aminoácidos (**Figura 3**). Es muy rica en aminoácidos cargados y se predice como nativamente desplegada, es decir que carece de una estructura terciaria preponderante [17] (**Tabla 1**), (**Figura4**). Posee además un “tag” natural de histidinas en su extremo amino terminal, lo cual permite su purificación cromatografía de afinidad por Ni<sup>2+</sup> sin la necesidad de modificar o agregar ninguna secuencia extra.

**M**EEEK**HHHHH**LF**HH**KDKAEEGPVDYEKEIKHHKHLEQIGKLGTVAAAGAYALHEKH  
EAKKDPEHAHKHKIEEEIAAAAAVGAGGFAPFHEHHEKDKAKKEEKKAEGGHHHLF

### Figura 3: Secuencia aminoacídica de ASR1 de tomate.

En negrita y subrayado se encuentra marcado un "tag" natural de histidinas. En color Rojo se encuentran resaltados los aminoácidos que promueven el “desorden” conformacional [17].

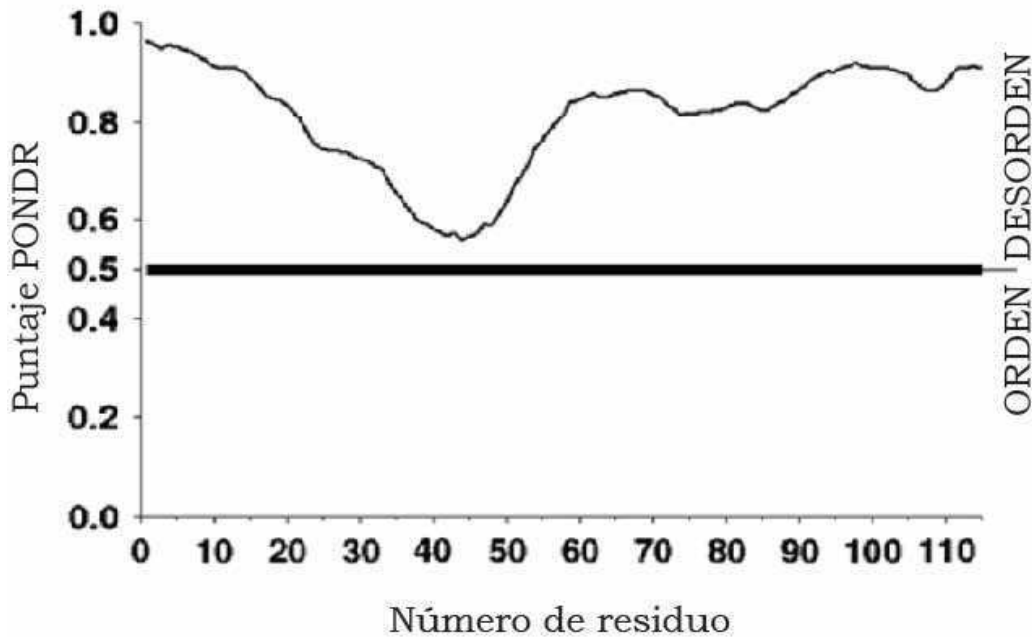


Aa	%	Carga	% grupos
Ala	14,55	NP	40,02
Cys	0,00		
Phe	3,64		
Gly	8,18		
Ile	3,64		
Leu	4,55		
Met	0,91		
Pro	1,82		
Val	2,73		
Trp	0,00		

Aa	%	Carga	% grupos
Asn	0,00	NC	3,64
Gln	0,91		
Ser	0,00		
Thr	0,91		
Tyr	1,82		
His	19,09	+	35,45
Lys	16,36		
Arg	0,00		
Asp	3,64	-	20,91
Glu	17,27		

**Tabla 1: Contenido de aminoácidos de la proteína:**

Se muestra el contenido de aminoácidos de ASR1, ordenados según sus características (no polar ,NP; no cargado, NC; carga positiva, +; carga negativa, -)



**Figura 4: Residuos que promueven el "desorden" en ASR1 de tomate:**

Se muestra la probabilidad de "desorden" (calculada mediante el puntaje PONDR) a lo largo de las diferentes posiciones aminoacídicas de ASR1. Adaptado de [17]

## Funciones de ASR1

Hasta ahora la proteína ASR1 no ha sido estudiada profundamente, quedando todavía muchos aspectos de la misma por dilucidarse. Los ensayos realizados por los grupos que trabajan en los diferentes ortólogos de ASR1 apuntan a que ASR1 podría tener funciones de chaperona y factor de transcripción y su sobre-expresión induce tolerancia a estrés. De acuerdo con esta doble funcionalidad, la proteína ASR1 de tomate fue encontrada tanto en el núcleo como en el citoplasma celular mediante ensayos de fraccionamiento subcelular y corridas en SDS-PAGE [18] y también es predicha como nuclear por programas desarrollados para ese fin [19-21].

### **ASR1 como chaperona**

Estudios biofísicos refuerzan las predicciones bioinformáticas sobre la naturaleza no plegada de la proteína ASR1 de tomate y varios de sus genes ortólogos [17, 22, 23]. En el caso de ASR1 de tomate también se sugiere que ésta puede adquirir un plegamiento estable frente a la desecación y a la presencia de  $Zinc^{2+}$  [17]. Estudios *in vitro* mostraron que ASR1 puede actuar como chaperona, impidiendo el desplegamiento de otras proteínas, manteniendo la actividad de enzimas de restricción sometidas a calentamiento y también a repetidos ciclos de congelado y descongelado [24]. Además se teoriza que la gran abundancia de ASR1 en semillas [9] puede estar relacionada con protección del plegamiento de las proteínas frente a la desecación natural que sufre la semilla en sus últimos estadios de desarrollo [25].

### **ASR1 como factor de transcripción**

Se ha demostrado que ASR1 producida en forma recombinante puede unir ADN *in vitro*. Por ejemplo, ensayos de microscopia de fuerza atómica [9] mostraron a la proteína recombinante unida a ADN plasmídico en forma de dímeros. Por otro lado, ensayos *in vitro* con la técnica SELEX determinaron que ASR1 de tomate muestra una preferencia de unión por la secuencia C<sub>2-3</sub>(C/G)A [18]. La proteína

VvMSA, ortóloga de ASR1 en *Vitis vinífera* (uva), se describió como factor de transcripción que regula la expresión de un transportador de hexosas en uva (VvHT1) [26]. Es de destacar que en este trabajo, VvMSA fue identificado con un ensayo de simple híbrido en levaduras y que se demostró el pegado *in vitro* a una secuencia específica por medio de ensayos de cambio en la movilidad electroforética (conocidos como “Gel Shift”). En cuanto a la secuencia de pegado de VvHT1, los ensayos realizados sugieren que se une a un promotor que contiene un sitio Sucrose BOX 3 completo (**TTTTCC**) y un box SURE1 incompleto (**AATAGAAA**) [27] la cual difiere mucho de la obtenida por SELEX ya que mientras la secuencia obtenida para VvMSA es rica en AT, la obtenida por SELEX lo es en CG. La regulación de VvMSA sobre el transportador de hexosas tuvo un efecto sobre la composición de azúcares de las plantas de uva [27]. Sugerentemente, la expresión heteróloga de ASR1 de tomate y el silenciamiento de ci21A (la proteína ASR1 de papa) en papas transgénicas, también modificó su contenido de azúcares [28]. Por otro lado se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que expresaban ASR1 de tomate y se observó que ASR1 se une a la secuencia CE1 [29], la cual se encuentra presente en promotores de genes regulados por el factor de transcripción ABI4. El fenotipo resultante es similar al de plantas mutantes para el gen ABI4 y la conclusión de ese trabajo es que ASR1 compite con este factor de transcripción disminuyendo la expresión de todos los genes regulados por éste. Todos estos antecedentes sugerían fuertemente que ASR1 puede regular la expresión génica. Sin embargo, hasta este trabajo, aún faltaba determinar si alguna proteína ASR une ADN *in vivo* cuando se encuentra en el contexto de su planta originaria y la identidad de sus genes blanco.

Mas allá de las consideraciones anteriores, dada la complejidad de la respuesta molecular y fisiológica al estrés hídrico en plantas, sospechábamos la existencia de un repertorio mucho más amplio de genes blanco.

### **Resistencia al estrés mediada por proteínas del tipo ASR de otras plantas**

Si bien *Arabidopsis thaliana* no posee genes homólogos a ASR1, la sobre-expresión de MpASR (proveniente de *Musa paradisiaca*) induce resistencia al estrés salino en plántulas de *Arabidopsis* [30]. Esta misma proteína también aumenta la resistencia al estrés osmótico [22]. SbASR-1 (proveniente de *Salicornia brachiata*) aumenta la tolerancia al estrés salino en plantas de tabaco transgénicas [23]. Incluso en sistemas completamente diferentes como en el de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* la presencia de ASR1 de tomate resultó osmoprotectora [31]. En todos estos casos se apunta principalmente a la función de chaperona como responsable de la tolerancia a estos estreses. La hipótesis es que ASR, debido a su carácter hidrofílico podría estar uniéndose a las proteínas impidiendo que las mismas se desplieguen cuando disminuye el contenido celular de agua [3]. Sin embargo el efecto de resistencia al estrés podría darse también por la modulación génica, más relacionada con el papel de factor de transcripción. Un trabajo realizado con la proteína ZmASR1 (proveniente de *Zea mays*) mostró que el ASR endógeno de esta planta tiene influencia en la biosíntesis de aminoácidos ramificados y que aumenta el rinde de la misma en condiciones de agua limitantes [32]. Así mismo plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que expresan LLA3 (ASR de *Lilium longiflorum*), resultaron resistentes al estrés salino y la falta de agua [33] y también al estrés por frío y congelamiento [34]. Además, estas transgénicas mostraron también alteraciones en los niveles de ARN mensajero de genes relacionados con el estrés abiótico y también de otros genes. Otro antecedente que apunta en esta dirección es la interacción que mostró VvMSA (proveniente de *Vitis vinifera*) con la proteína DREB, que es un factor de transcripción de respuesta al estrés por falta de agua [35].

Todas estas observaciones realizadas en diferentes plantas sugieren que la resistencia al estrés por falta de agua mediada por ASRs podría provenir tanto de su capacidad de regular la expresión génica como de su capacidad de actuar directamente como proteína chaperona. Además, en el caso de tomate, esta

función dual de ASR1 se condice con su presencia en extractos citosólicos y nucleares [18].

### **Transporte nuclear**

El transporte de proteínas hacia el núcleo celular se lleva a cabo generalmente a través de unos grandes complejos proteicos integrados a la membrana llamados (NPC) por “*nuclear pore complexes*” [36]. Su estructura ha sido ampliamente estudiada y se cree que a través de ellos pueden ocurrir procesos de transporte pasivo (por difusión) como de transporte activo [37]. Estos procesos no pueden diferenciarse mediante el uso de inhibidores, ya que hasta el momento los utilizados muestran efectos sobre ambos tipo de transporte en simultáneo. En el caso de la traslocación activa, se requiere que la proteína posea una señal de localización nuclear o NLS la cual es blanco de reconocimiento de proteínas de tipo importinas para atravesar el poro nuclear [38]. Otra forma de diferenciar transporte activo de pasivo es que el transporte activo la velocidad de traslocación no es dependiente del tamaño de la proteína, mientras que lo contrario ocurre en el transporte pasivo, siendo más lento para proteínas de mayor peso molecular [37].

Además, en el caso del transporte pasivo, no se requiere ninguna señal especial de traslocación, sino que el limitante es el tamaño del polipéptido que debe ingresar. Estudios realizados con proteínas de fusión a GFP en *Nicotiana benthamiana* sugieren que las proteínas menores a 50-60 kDa pueden entrar el núcleo tan sólo difundiendo a través de los poros [39]. Este tamaño límite no depende únicamente de peso molecular de la proteína sino también de su carga eléctrica y su estructura cuaternaria. Por otro lado, algunos autores encontraron que proteínas de fusión a GFP más grandes también logran ingresar al núcleo por difusión [40]. En el caso de ASR1, ésta posee una posible señal de localización nuclear [41] ubicada cerca de en su extremo carboxi-terminal. Esto sugiere que el transporte de ASR1 puede ser activo, si bien su pequeño tamaño (12.5 kDa) también le permitiría ingresar el núcleo en forma pasiva.

## **La estructura de la cromatina**

La cromatina es una compleja estructura compuesta por el ADN genómico eucariota enrollado junto a octámeros de histonas y otras proteínas. La unidad estructural formada por un solo octámero de histonas y el ADN que se encuentra enrollado en él se define como nucleosoma [42]. Existen varios grados u órdenes o jerarquías de empaquetamiento de la cromatina (a nivel de los nucleosomas individuales pero también super-enrollamientos globales) que definen en parte el nivel de expresión génica de las diferentes regiones genómicas. El grado de compactación o laxitud de la cromatina está sujeta a estímulos ambientales [42].

Por otra parte, las histonas que componen la cromatina pueden sufrir numerosas modificaciones químicas post-traduccionales como acetilación, ubiquitinación, metilación y fosforilación, entre otras [43]. Las diferentes combinaciones de estas modificaciones o marcas epigenéticas, que ocurren en regiones accesibles de las histonas, conforman un código que es capaz de regular la expresión génica [44]. Las marcas de histonas en plantas regulan la expresión en respuesta a diversos estímulos exógenos incluyendo estrés abiótico, ataques por patógenos y también cumplen un rol fundamental en la regulación del desarrollo [42]. Si bien las histonas y sus modificaciones se encuentran altamente conservadas a lo largo de todos los eucariotas, el código no es el mismo al comparar las plantas con los mamíferos [45].

## **Metodología de Inmunoprecipitación de la Cromatina. Su utilidad en Biología**

Identificar genes blanco de factores de transcripción es relevante para descubrir redes regulatorias en todos los organismos. Si bien los ensayos *in vitro* y expresiones heterólogas pueden dar indicios de la función y especificidad de ASR1 como factor de transcripción, estos resultados deben ser comprobados *in planta* y en el organismo del cual proviene la proteína. Muchos efectos observados a nivel transcripcional pueden deberse tanto a una regulación directa (es decir unión a zonas promotoras y regulación de la transcripción)

como indirecta a través del cambio en la expresión de otros factores de transcripción, proteínas relacionadas a rutas de señalización o incluso enzimas. Por lo tanto se debe tener precaución a la hora de extraer conclusiones de experimentos de genómica funcional mediante *microarrays* realizados con plantas sobre-expresantes o silenciadas, ya que muchos de los cambios de expresión observados pueden no deberse a una regulación directa. Un método muy útil para detectar interacciones directas es el ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina también conocido como ChIP, por "*Chromatin Immuno-Precipitacion*". En líneas generales, en los ensayos de ChIP se fija el tejido con formaldehído, de modo de que las proteínas que forman parte de la cromatina, o cercanas físicamente, queden unidas covalentemente al ADN; luego se purifica la cromatina así modificada y se fragmenta el ADN mediante métodos mecánicos o enzimáticos. La cromatina fragmentada entonces se precipita con anticuerpos específicos contra la proteína de interés y finalmente se purifica y analiza el ADN que co-precipitó.

Esta metodología es ampliamente utilizada en sistemas de células animales y en levaduras pero no en el reino vegetal. Las plantas y en particular el tomate contienen compuestos polifenólicos que dificultan la realización de este protocolo debido a estos compuestos se oxidan y se unen al ADN [46], provocando inconvenientes para el posterior análisis del mismo. En los últimos años han comenzado a publicarse protocolos para ChIP específicos para plantas [47, 48] incluyendo *Arabidopsis thaliana*. El éxito del protocolo, que debe ser puesto a punto para cada especie y tejido a utilizar, depende en gran medida de la calidad del anticuerpo utilizado para la precipitación. Los diferentes fabricantes de anticuerpos califican estos anticuerpos como "ChIP grade" o aptos para ChIP. Debido a que no hay anticuerpos comerciales disponibles contra ASR1 (de tomate ni de ninguna otra planta), uno de los primeros pasos para garantizar el éxito del ChIP fue la obtención de un anticuerpo de alto título y afinidad capaz de utilizarse en inmunoprecipitaciones. Como alternativa, también es posible transformar la planta para que exprese la proteína de interés fusionada a un péptido corto o "tag" para el cual hayan disponibles anticuerpos comerciales de alta calidad, incluso conjugados a un soporte sólido.

Los protocolos de ChIP no sólo son útiles para detectar la unión (“binding”) de factores de transcripción a regiones genómicas particulares, sino también para estudiar las marcas epigenéticas en histonas que presenta la cromatina en las distintas regiones; o para identificar loci siendo transcritos por la RNA Pol II. Con la aparición de los *microarrays* y más tarde de los métodos de secuenciación profunda (también llamada masiva en paralelo) a continuación de experimentos de ChIP (ChIP-chip o ChIP-seq, respectivamente), se lograron completar mapas de modificaciones de histonas a lo largo de todo el genoma de numerosas especies [49-52]. Son estos estudios de epigenómica los que permitieron desentrañar el código de las histonas y su relevancia en la expresión génica [43].



# OBJETIVOS

---

En este trabajo nos propusimos dos objetivos principales, desglosados en objetivos particulares que serán desarrollados en dos capítulos separados: el primero relacionado con **Bioquímica** y **Biología Celular**; el segundo, con **Genómica**.

## **Capítulo 1 Determinación de la localización subcelular y dimerización de ASR1 de tomate**

- I.1 Observar la localización subcelular de ASR1 *in planta*.
- I.2 Probar la funcionalidad de la señal de localización nuclear putativa de ASR1.
- I.3 Evaluar la formación de homodímeros *in vivo*.
- I.4 Determinar la localización del evento de dimerización.

## **Capítulo 2 Determinación de los genes regulados por ASR1 y de un motivo consenso de "binding"**

- II.1 Poner a punto un protocolo general de ChIP para tomate seguido de un método de detección y análisis del ADN precipitado.
- II.2 Producir un anticuerpo anti-ASR1 de alta calidad capaz de lograr inmunoprecipitación en un ChIP específico.
- II.3 Identificar, mediante el ChIP específico y secuenciación profunda, a los genes regulados por ASR1 y a un eventual motivo consenso de "binding".

# MATERIALES Y MÉTODOS

---

## **Plantas**

### **-Tomates**

Semillas comerciales de tomate (*Solanum lycopersicum*) fueron germinadas en papel secante durante 7 días y luego transferidas a macetas con mezcla de tierra donde fueron mantenidas en una cámara con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad a 26°C. Las plantas se utilizaron para experimentos a las 4 semanas.

### **-*Nicotiana benthamiana***

Se espolvorearon semillas de *Nicotiana benthamiana* en una maceta con mezcla de tierra. Cuando las plántulas comenzaron a desarrollar las primeras hojas verdaderas, fueron trasplantadas en forma individual a otra maceta y mantenidas en iguales condiciones a las utilizadas para las plantas de tomate. Las plantas estuvieron listas para usarse entre las 3 y 4 semanas.

### **-Estrés**

Se retiró cuidadosamente la tierra de las raíces de las plantas a estresar, con la ayuda de agua para minimizar el daño mecánico, y las plantas se colocaron sobre un papel secante durante las 3 horas que duró el tratamiento de estrés. Algunas plantas fueron luego colocadas en agua para corroborar su recuperación y la reversibilidad del estrés.

## **Extracción y electroforesis de proteínas**

### **-Extracción**

Se tomaron unos 100 mg de tejido y se colocaron en un Eppendorf. Luego de congelarlas en N<sub>2</sub> se las molió con ayuda de un embolo cónico. El polvo se resuspendió en 100 µl de buffer de extracción de proteínas frío (suplementado con inhibidores de proteasas). Se continuó girando el embolo y luego se

centrifugó 1 minuto a 21.500 g, 4°C. Se volvió a moler con el embolo (siempre en hielo) y se centrifugó durante 5 minutos a 21.500 g, 4°C. Se tomó el sobrenadante y se cuantificaron las muestras por el método de Bradford. Las muestras se mantuvieron en hielo hasta utilizarse y en caso de no usarse ese mismo día se congelaron y guardaron a -80 °C.

#### **-Cuantificación de proteínas (método de Bradford)**

Se utilizó como estándar la proteína BSA y se siguieron las indicaciones del fabricante (Sigma).

#### **-SDS-PAGE y Western blot**

Las corridas electroforéticas, tinción con azul de Coomasie y transferencia a membrana de nitrocelulosa se realizaron de acuerdo a los protocolos descritos previamente [53]. Las proteínas se transfirieron durante 1 hora a 100 V. Para el revelado se bloquearon las membranas con PBS 5% leche durante 1 hora y se incubaron toda la noche con los anticuerpos primarios a 4 °C en agitación a en una dilución 1:1000 o a las diluciones indicadas. Luego se realizaron 4 lavados de 15 minutos en PBS con 0,05% Tween-20 (PBST) y se incubó con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron 4 lavados de 5 minutos con en PBST, 1 lavado con PBS y se procedió al revelado. Para el revelado se utilizó una solución de luminol preparada en el momento mediante la mezcla en partes iguales de un stock de solución A y de solución B recién preparada.

### **Clonados**

#### **-Generación de los fragmentos a clonar**

Se utilizaron diferentes estrategias para la obtención de las construcciones necesarias para realizar los distintos experimentos. A continuación se detallan las estrategias generales utilizadas. Los "*primers*" y las estrategias utilizadas en cada constructo (construcción de ADN) se resumen en las tablas del apéndice (vectores; "*primers*"; detalle clonados).

### **-Restricción y ligación**

Se realizó una PCR y utilizando "*primers*" para amplificar la región de interés agregando en ambos extremos sitios de restricción para las enzimas necesarias y 3 bases adicionales (hacia el extremo 5') para mejorar la eficiencia de corte de la enzima de restricción. Los productos se digirieron con las enzimas correspondientes a los "*primers*" utilizados.

### **-Subclonado**

Se utilizaron "*primers*" con sitios de restricción y 3 bases adicionales hacia el extremo 5', para amplificar mediante PCR la región de interés utilizando como molde los productos de un clonado anterior. Los productos se digirieron con las enzimas correspondientes a los "*primers*" utilizados.

### **-Anillado y fosforilación**

Se encargaron "*primers*" complementarios entre sí conteniendo la región de interés y flanqueados por la secuencia que quedaría luego de cortar con la enzima de restricción a utilizar. Ambos "*primers*" se mezclaron, se desnaturalizaron a 95 °C por 5 minutos y se dejaron enfriar lentamente para su renaturalización obteniendo ADN doble cadena. La renaturalización se verificó corriendo la muestra en un gel de agarosa con bromuro de etidio el cual no tiñe ADN simple cadena. Este producto fue luego fosforilado con la enzima T4 kinasa según las indicaciones del fabricante. El producto final fue un fragmento con extremos protruyentes compatibles con la enzima de restricción a usar.

### **-Anillado y restricción**

Se diseñaron "*primers*" conteniendo la región de interés y flanqueados por el sitio de restricción a utilizar seguido de 3 bases adicionales para mejorar la eficiencia de corte de la enzima. Los productos fueron anillados y cortados con la enzima de restricción indicada.

### **-Clonados en sistema Gateway**

Para ingresar al sistema Gateway se diseñaron "*primers*" que anillan con el producto a clonar en su región 3' (18 bases complementarias al molde) y que

poseen las secuencias AttB1 y AttB2 en su región 5'. Se removieron los "primers" utilizando un *kit* para tal fin. Se realizó una recombinación entre el producto de PCR purificado y el vector de entrada ("Entry Vector") utilizando la mezcla de enzimas BP de Invitrogen generando el vector donante ("Donor Vector"). Para el clonado final se utilizaron los vectores donantes y los vectores de destino ("Destination Vector") los cuales se recombinan utilizando la mezcla de enzimas LR y obteniendo los vectores listos para utilizar.

### **-PCR**

Las reacciones de PCR para los clonados se realizaron utilizando la enzima con actividad "proof-reading" Pfx (Invitrogen). Siguiendo las indicaciones del fabricante se utilizaron las siguientes condiciones de ciclado. Se utilizó un bajo número de ciclos y una cantidad del orden de los 10 ng de los plásmidos utilizados como molde a fin de minimizar el número de ciclos a utilizar y así los errores de la enzima. Dependiendo del largo del amplicón se utilizó 1 minuto por cada 1000 bases a elongar partiendo de un tiempo mínimo de 30 segundos.

```

---desnaturalización inicial--
1      5 min          94 °C
-----20 / 25 ciclos-----
2      40 seg.        94°C
3      40seg.         56°C
4      1min/1000pb    68°C
-----elongación final-----
6      10 min         68°C

```

### **-Ligaciones**

Tanto los vectores a utilizar como los diferentes insertos descritos previamente fueron digeridos con las enzimas de restricción especificadas en el apéndice durante 4 horas. Los plásmidos fueron corridos en un gel de Agarosa 0,6% con bromuro de etidio. Las bandas correspondientes al plásmido linealizado fueron recortadas con un bisturí y purificadas utilizando un *kit* de purificación de ADN en gel. Los insertos fueron purificados utilizando el mismo *kit* pero sin pasar por

gel de agarosa (previa corrida de una alícuota para corroborar que el producto de PCR muestra una sola banda y del peso esperado). Las reacciones de ligación se realizaron con la enzima T4 ligasa siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando entre 50 y 100 ngr de vector y relaciones molares inserto:vector de 10:1, 3:1 y 1:1. La reacción de ligación se dejó 1 hora a temperatura ambiente y a continuación, se procedió a transformar bacterias competentes (*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ ) con los productos de las ligaciones.

### **-Transformación de Bacterias**

Para las transformaciones se utilizaron bacterias competentes químicas o bacterias electrocompetentes ambas de la cepa DH5 $\alpha$ . En el caso de *Agrobacterium tumefaciens* se utilizaron bacterias electrocompetentes de la cepa GV 31.01.

### **Transformación transiente de *Nicotiana benthamiana***

Cultivos de *Agrobacterium tumefaciens* crecidos toda la noche a 28°C fueron llevados a una Densidad Óptica de 0,1 en un buffer con 10mM MgCl<sub>2</sub> + 150  $\mu$ g/ml acetosiringona y se incubaron 3 hs a 4°C. Transcurrido ese tiempo se infiltraron hojas de *Nicotiana benthamiana* completamente desarrolladas por la cara abaxial, ejerciendo presión en la misma con una jeringa de 3ml sin punta. El líquido se infiltró hasta que la hoja quedó translúcida. Las hojas se utilizaron 3 días después de la infiltración.

### **Cortes histológicos e inmunofluorescencia**

Los cortes histológicos y la inmunofluorescencia fueron realizados en el laboratorio de la Dra. Sara Maldonado de acuerdo a lo descrito previamente [54]. Brevemente las hojas fueron cortadas en tiras de entre 1 y 2 mm de ancho, las cuales fueron fijadas y deshidratadas gradualmente. Las tiras fueron luego incluidas en resina, cortadas con un micrótopo y montadas en un portaobjetos. Las muestras se revelaron con anticuerpo anti-ASR1 o anti-Myc como control

negativo. Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo conjugado a Alexa Fluor-488 (Invitrogen).

### **Microscopía**

Las hojas fueron infiltradas con una solución de DAPI 10 µg/ml y luego de 15 minutos fueron montadas para su observación. Secciones de hoja de un tamaño aproximado de 5 mm sin nervaduras fueron colocadas sobre un portaobjetos. Se observaron en un microscopio confocal Olympus FV-1000. Para la señal de Alexa488/GFP/Venus/EYFP, se utilizó un láser de excitación de 488 nm y un filtro de emisión de 505 a 525 nm. Para observar DAPI se utilizó un láser de 405 nm como excitación y un filtro de emisión de 430 a 470nm. Las imágenes se adquirieron en forma secuencial utilizando un objetivo 60X de inmersión en agua con una apertura numérica de 1,2.

### **Protocolo de CHIP para *Arabidopsis thaliana***

Las soluciones y *buffers* empleados en los distintos pasos se encuentran detallados en la sección “Apéndice” que se encuentra al final de este trabajo.

#### **-“Crosslinking” (entrecruzamiento covalente)**

Se tomaron 3-4 gramos de hojas jóvenes. Se cortaron en trozos no mayores de 1 cm<sup>2</sup> y se separaron en cuatro tubos Falcon. Para comenzar el “*crosslinking*”, se agregaron 37 ml de buffer extracción #1 y 1 ml de formaldehído a cada tubo y se realizó vacío con una bomba durante 10 minutos. Para detener el “*crosslinking*”, se agregaron 2,5 ml de glicina 2M y se aplicó vacío por unos 5 minutos adicionales.

#### **-Extracción de cromatina**

Las hojas, que mostraron una apariencia translúcida, se enjuagaron con agua destilada y se secaron con papeles absorbentes. A continuación se molieron con ayuda de un mortero y nitrógeno líquido hasta obtener un polvo muy fino. A partir de este punto y todos los pasos fueron llevados a cabo en hielo o a 4°C. El

polvo fue resuspendido en 30 ml de buffer de extracción #1 frío y a continuación fue filtrado por 4 capas de tela de nylon de 80  $\mu\text{m}$  y centrifugado a 2.880 g durante 20 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 10 ml de buffer de extracción #2 y se transfirió a varios Eppendorf de 1.5 ml. La muestra se centrifugó durante 10 minutos a 12.000 g en frío y se descartó el sobrenadante. El *pellet* fue resuspendido en 300  $\mu\text{l}$  de buffer de extracción #3 y luego colocado sobre un colchón de otros 300  $\mu\text{l}$  de buffer de extracción #3 en un tubo nuevo. Se centrifugó durante 1 hora a 16.000 g en frío. Se quitó con cuidado el sobrenadante y resuspendió el *pellet* en 500  $\mu\text{l}$  de buffer de lisis.

#### **-Fragmentación del ADN**

La muestra fue sometida a ultrasonido (“sonicada”) 5 veces de 10 segundos a un 15% de potencia. Luego se centrifugó la muestra a 21.500 g durante 10 minutos en frío y se guardó el sobrenadante.

#### **-Pre-bloqueo de las bolitas de agarosa que unen anticuerpo**

Se incubaron, por cada muestra a realizar, 40  $\mu\text{l}$  de suspensión de bolitas “agarose protein A-G plus” (Santa Cruz SC-2003) durante 1 hora en agitación suave a 4°C con 10  $\mu\text{g}$  de ADN de esperma de salmón y 10  $\mu\text{g}$  BSA en 1ml de buffer de dilución. Luego las bolitas fueron lavadas 3 veces con buffer de dilución. Para todos los lavados, las bolitas se incubaron con 1ml del buffer a utilizar durante 10 minutos a 4°C con agitación suave y se descartó el sobrenadante previa centrifugación de 5 minutos a 1.000 g 4°C.

#### **-Inmunoprecipitación propiamente dicha**

La cromatina obtenida previamente se cuantificó utilizando el *kit* “Quan-it dsDNA HS” de Invitrogen y se dividió de modo de tener 8  $\mu\text{g}$  de ADN total por tubo. A continuación se diluyó la cromatina agregando 9 volúmenes de buffer de dilución, se colocaron 2-3  $\mu\text{l}$  del anticuerpo o suero no inmune o nada (material “INPUT”) y se dejó incubando toda la noche en la heladera con agitación suave. Al día siguiente se agregaron 40  $\mu\text{l}$  de bolitas con proteína A-G pre-lavadas y se incubaron 1 hora a 4°C en agitación suave. Se centrifugaron las bolitas de 5 minutos a 1.000 g 4°C y luego de descartar el sobrenadante se realizaron



lavados con: buffer de baja sal, buffer de alta sal, buffer con LiCl y dos con TE. Después del último lavado se retiró la mayor cantidad de líquido posible. El inmunoprecipitado fue eluido agregando 250  $\mu$ l de buffer de elución recién preparado, "*vortexeando*" brevemente e incubando durante 15 minutos a 65°C. Se recuperó el sobrenadante luego de precipitar las bolitas y se repitió la elusión combinando ambos sobrenadantes en un único tubo.

#### **-Reversión del “*crosslinking*”**

Para revertir el “*crosslinking*” se agregaron 20  $\mu$ l de NaCl y se incubaron las muestras a 65°C durante 6 horas o toda la noche según convenga. Para impedir evaporación, los tubos se incubaron completamente sumergidos en un baño de agua.

#### **-Purificación del ADN**

Finalizada esta incubación, se agregaron 10  $\mu$ l de EDTA 0,5 M, 20  $\mu$ l Tris-HCl 1M pH 6.5 y 1,5  $\mu$ l de proteinasa K 14mg/ml y se incubó durante 1 h a 45°C. El ADN se purificó por medio de una extracción orgánica con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) seguida de precipitación con acetato de sodio e isopropanol utilizando ARN de transferencia para mejorar la precipitación de acuerdo a lo descrito en [53]. El ADN se resuspendió en 30  $\mu$ l de agua miliQ con 10 $\mu$ g/ml de RNAsa y se incubó a 45°C 20 por minutos para degradar el ARN.

#### **Pruebas de sonicatedo**

Para el sonicatedo se utilizó el equipo “Branson Sonic Dismembrator 102C”. Se colocó la punta del sonicador en hielo durante 1 minuto antes de cada ronda de sonicatedo para prevenir el sobrecalentamiento de la muestra. Todo el proceso se realizó en hielo a fin de evitar el calentamiento excesivo.

## **Protocolo de ChIP adaptado para tomate**

### **-“Crosslinking”**

Se realizó de igual manera que el protocolo original para *Arabidopsis*.

### **-Extracción de cromatina**

Las hojas, que mostraron una apariencia translúcida, se enjuagaron con agua destilada y se secaron con papeles absorbentes. A continuación se molieron con ayuda de un mortero y Nitrógeno líquido hasta obtener un polvo muy fino. El polvo fue resuspendido en 30 ml de buffer de extracción #1 frío y a continuación fue filtrado de manera secuencial por telas de nylon de un tramado de 80  $\mu\text{m}$  y 11  $\mu\text{m}$  y centrifugado a 2.880 g durante 20 minutos en frío. El precipitado fue resuspendido en 20 ml de buffer de extracción #2 e incubado durante 10 minutos con agitación lenta en frío para producir la lisis de los cloroplastos. La muestra se centrifugó durante 30 minutos a 2.100 g y luego de descartar el sobrenadante, se volvió a resuspender en 4 ml de buffer de extracción #2 y se separó en 4 tubos eppendorf. Se centrifugó durante 10 minutos a 10.000 g, se descartó el sobrenadante y resuspendió la muestra en 1 ml de buffer 95% Percoll. Al finalizar la centrifugación, los restos de pared celular y organelas de alta densidad quedan en el fondo del tubo, mientras que organelas de menos densidad como núcleos y los cloroplastos remanentes quedan flotando en la superficie. De este modo tomó cuidadosamente la capa superior, sin tomar el precipitado del fondo, se diluyó el Percoll con buffer de resuspensión nuclear en al menos 5 veces (para que la densidad ahora permita que los núcleos queden en el *pellet*) y centrifugó durante 10 minutos a 12.000 g a 4°C. Se descartaron los sobrenadantes de los 4 tubos y resuspendieron combinándolos en 1 ml de buffer de resuspensión nuclear. Se volvió a centrifugar 10 minutos a 12.000 g y se resuspendió el *pellet* en 500  $\mu\text{l}$  de buffer de lisis. A partir de este paso, se continuó con el sonicado. Los demás pasos se realizaron como se describió para el protocolo de *Arabidopsis thaliana*.

## Real time PCR

Las reacciones de Real time PCR se realizaron en un termociclador Opticon, en un volumen final de 25  $\mu$ l. Para las reacciones se utilizó la enzima Taq Polimerasa recombinante de Invitrogen y SYBR-green (roche) para la detección del ADN. Las condiciones de ciclado (ver esquema abajo) para todos los amplicones oscilaron entre 59°C y 64°C y fueron puestas a punto para obtener una eficiencia de más del 90% en la reacción [55]. Se realizó una curva de desnaturalización y se corrieron los productos de la PCR para corroborar que hubiese un único producto.

---desnaturalización inicial--

1      5 min                      94 °C

-----35 ciclos-----

2      30 seg                      94°C

3      30 seg                      59/64°C

4      30 seg                      72°C

5      2 seg                      lectura

--curva de desnaturalización-

## Digestión con nucleasa micrococcal

Para esta prueba, se procedió a la purificación de la cromatina de acuerdo con el protocolo ajustado sin llegar a colocar el buffer de lisis nuclear y salteando el paso de “*crosslinking*”. Una vez obtenida la cromatina esta se centrifugó y se resuspendió en 300  $\mu$ l de buffer de digestión. Se agregaron diferentes cantidades de nucleasa micrococcal y se incubó a 37°C durante 20 minutos. Para finalizar la digestión se retomó el protocolo de ChIP desde la purificación del ADN.

## **Protocolo de ChIP semi-nativo para tomate**

Para este protocolo se utilizaron frutos de tomate en lugar de hojas. Las muestras fueron primero molidas en nitrógeno líquido, resuspendidas en buffer de extracción 1 y luego fijadas por 1 minuto con formaldehído al 1%. Se detuvo el "crosslinking" y se continuó con la extracción de cromatina como en el protocolo de ChIP de tomate hasta el paso previo a la lisis nuclear. En lugar de resuspender en buffer de lisis nuclear, se los resuspendió en buffer de digestión de nucleasa micrococcal suplementado con 10 µg/µl de RNasa A. Se tomó el 10% del volumen y se realizaron digestiones con 2 unidades de nucleasa micrococcal a distintos tiempos para determinar para cada muestra de núcleos el tiempo de digestión necesario para obtener mononucleosomas. La digestión se detuvo procediendo con la reversión del "crosslinking" y purificación del ADN. El ADN se cuantificó y las muestras se corrieron en un gel de agarosa para determinar el tiempo óptimo para obtener mononucleosomas. Mientras se realizaron estas corroboraciones, el resto de la muestra fue guardada a -80 °C. Una vez obtenido el tiempo de digestión se procedió a digerir el resto de la muestra. La digestión se detuvo agregando EDTA a una concentración final de 10 mM. Las muestras fueron posteriormente sonicadas (5% de potencia durante 10 segundos) para romper la membrana nuclear y liberar la cromatina. Se ajustó la muestra a 300mM de NaCl, 0,1% de SDS y 1% de tritón X-100 y se prosiguió el ChIP a partir del paso "inmunoprecipitación propiamente dicha" usando anticuerpos anti-marcas de histonas.

## **Producción de ASR1 "recombinante"**

### **-Expresión en *Escherichia coli* BL21**

Esta cepa bacteriana contiene la parte codificante del gen de la ARN polimerasa del fago T7 bajo las órdenes del promotor lac (lac-T7) y por lo tanto es inducible por IPTG. Para producir la proteína utilizamos un plásmido disponible en el laboratorio conteniendo el cDNA de ASR1 de tomate bajo el control de un promotor reconocido específicamente por la ARN polimerasa del fago T7 (T7:ASR1).

Siguiendo esta estrategia general, se inocularon cultivos iniciadores crecidos toda la noche a 37 °C con y sin el plásmido T7:ASR1 en 25 ml de LB con ampicilina y en 5ml de LB sin antibiótico, respectivamente. Al día siguiente se inoculó, a partir del pre-cultivo que contenía el plásmido, un Erlenmeyer conteniendo 100 ml de medio LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina, llevando a una DO = 0,5. Se lo incubó 1 hora a 37°C y luego se suplementó el medio con 1 mM de IPTG para inducir la expresión de ASR1. Pasados diferentes tiempos de inducción se cosecharon las bacterias por centrifugación, se congelaron los *pellet* en nitrógeno líquido y se los guardó a -80°C hasta su utilización. Al día siguiente, fueron resuspendidos en 1 ml de buffer de extracción proteínas con inhibidores de proteasas y sonicados (3 ciclos de 10 segundos al 10% de potencia) para producir la lisis de las bacterias. Las muestras se centrifugaron a máxima velocidad por 10 minutos, y se analizaron mediante un SDS-PAGE, transferencia y tinción de Rojo Ponceau. Determinado el tiempo de inducción adecuado se realizó un escalado del cultivo a 500ml. Luego de cosechar y congelar el *pellet*, el mismo fue resuspendido en 10 ml buffer fosfato 20mM pH = 7,4 con 20 mM de Imidazol y suplementado con inhibidores de proteasas, sonificado y centrifugado para su subsiguiente purificación por cromatografía.

#### **-Purificación de ASR1 recombinante**

Aprovechando una seguidilla de 5 histidinas presentes naturalmente en la secuencia de ASR1 de tomate, realizamos una cromatografía de afinidad con una columna comercial pre-empaquetada y cargada con cationes de Niquel (His-trap de GE). Utilizando una bomba peristáltica se siguió el protocolo estándar indicado por el fabricante para purificar proteínas en estado nativo. La segunda purificación se realizó eluyendo las proteínas con un gradiente de imidazol. El proceso de lavado y elución se siguió colocando gotas de 1 µl en membrana de nitrocelulosa y revelando proteínas con Rojo Ponceau de acuerdo a protocolos estándar.

## **Obtención de anticuerpo anti-ASR1**

### **-Purificación de inmunoglobulinas totales**

Las inmunoglobulinas del suero de un conejo, previamente inoculado con la proteína ASR1 recombinante, fueron precipitadas con sulfato de amonio de acuerdo a protocolos estándar [53]. A continuación fueron dializadas durante 1 día en PBS y purificadas con el *kit "Hi-trap proteing G"* de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las fracciones eluidas con alta absorbancia a 280nm fueron equilibradas en PBS mediante 3 ciclos de concentración y dilución con una columna Vivaspin con un "cutoff" de 30 kDa.

### **-Cromatografía de Afinidad para purificar anticuerpo anti-ASR1**

Tanto para el armado como para el uso de la columna de agarosa, se utilizó una bomba peristáltica. La columna de afinidad con ASR1 pura pegada, se generó utilizando las bolitas de agarosa activadas por cianógeno marca Sigma (C9210) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se pesaron 0,25 gr de bolitas que rinden aproximadamente 0,875 ul de gel. Se colocaron en una columna con un filtro de retención (con capacidad de 800 µl), se lavaron 30 minutos a 1,5 ml/min con HCl 1 mM y luego con Agua mQ durante 10 minutos. A continuación se pasaron 5 ml de buffer de acoplamiento e inmediatamente se comenzó a pasar la muestra con la proteína ASR1 recombinante equilibrada en buffer de acoplamiento. Resultó fundamental trabajar rápido para que no se consuman los sitios reactivos de la resina. La muestra se corrió en un "loop" cerrado durante 1 hora a temperatura ambiente a una velocidad de 1,5 ml/min. La columna fue luego lavada durante 10 minutos con buffer de acoplamiento. Para bloquear los sitios que no reaccionaron se pasó buffer de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente se realizaron 5 lavados secuenciales de 20 ml de buffer de acoplamiento y 20 ml de buffer ácido. La columna ya lista se guardó equilibrada en NaCl 1M a 4°C.

Se retiraron de la columna las bolitas de sefarosa-ASR1 y se incubaron junto a las inmunoglobulinas previamente purificadas en 30 ml de PBS a 4°C con agitación lenta durante toda la noche. Se volvió a cargar la columnita pasando los 30 ml por la misma utilizando una jeringa. Se conectó la columna cargada al

sistema de la bomba peristáltica y se pasaron 100 ml de PBS con 0,5M de NaCl para lavar los anticuerpos inespecíficos y se continuó pasando la solución hasta que no eluyeron más proteínas detectables. A continuación se pasaron 10 ml de buffer de elución y se recolectaron en fracciones de 0,5 ml. Los tubos para recolectar las fracciones contenían Tris-base 1M para neutralizar el pH de la elución inmediatamente. Las fracciones conteniendo anticuerpo (identificadas por *dot-blot* y Rojo Ponceau) se combinaron y se equilibraron en PBS mediante repetidas concentraciones y diluciones en una columna Vivaspin con un “cutoff” de 30 kDa. El anticuerpo se llevó a un volumen aproximado de 100  $\mu$ l y se agregó Glicerol a una concentración final del 50% para finalmente guardarlo a  $-20^{\circ}\text{C}$

### **Construcción de la biblioteca de fragmentos de ADN a secuenciar**

El ADN inmunoprecipitado fue repurificado utilizando “AMPXP Beads” según indica el manual (Ambion) y eluido en 10  $\mu$ l de agua miliQ. A continuación se completaron los extremos de los fragmentos del ADN para obtener extremos romos, utilizando el fragmento Klenow de la ADN polimeraza según indicaciones del fabricante. El ADN fue a continuación repurificado con “AMPXP Beads”, eluido nuevamente en 10  $\mu$ l de agua miliQ y se procedió a la fosforilación de los fragmentos romos utilizando una T4 kinasa según especificaciones del fabricante. El producto fue nuevamente purificado con las bolitas “AMPXP Beads”, resuspendido en 10  $\mu$ l de agua miliQ y ligado con diferentes adaptadores doble cadena utilizando una T4 ligasa ultraconcentrada. Los diferentes oligonucleótidos dúplex adaptadores (se utilizó uno por muestra) son esencialmente iguales, con la salvedad de unas 5 bases en su extremo 3´ que conforman un código de barras, y permiten la posterior identificación de la muestra cuando se realiza una mezcla de varias (esta metodología, muy utilizada en este tipo de ensayos se conoce como multiplexado). Luego de la ligación, se realizó una purificación con las bolitas “AMPXP Beads” modificada. La cantidad de bolitas utilizada fue de 1,2 Volúmenes en lugar de los 1,7 que indica el manual y los tiempos de incubación fueron reducidos a 8 minutos. De esta manera se logra que los fragmentos de dímeros de adaptadores más

pequeños que 100-200 pb, generados en la ligación, se pierdan durante la purificación. Es fundamental que la muestra quede libre de dímeros ya que éstos, al ser más pequeños, resultan amplificados más eficientemente que los fragmentos provenientes de la muestra. Con 0,5  $\mu$ l de las muestras libres de dímeros se realizaron reacciones de PCR de prueba a bajo número de ciclos para amplificar el producto hasta obtener una concentración del orden de los 5 ng/ $\mu$ l. En estas primeras reacciones, se corroboró la ausencia de dímeros y se determinó para cada una de las muestras el número de ciclos adecuado para la obtención de 5 ng/ $\mu$ l de producto. Las condiciones de ciclado variaron entre 12 y 18 ciclos según cada muestra y se realizaron utilizando una enzima con alta actividad y baja tasa de errores (Phusion II) con las siguientes condiciones de ciclado:

---desnaturalización inicial---

1      30 seg.                  98 °C

-----12 / 18 ciclos-----

2      10 seg.                  98°C

3      30 seg.                  65°C

4      30 seg.                  72°C

-----elongación final-----

6      5 min                      72°C

Una vez realizadas las reacciones de PCR con el remanente de la muestra, se mezclaron 20 ng de las muestras que poseían los diferentes códigos de barra. Esta mezcla fue re-purificada con “AMPXP Beads” y resuspendida en 10  $\mu$ l, de forma que cada muestra esté en una concentración de 2 ng/ $\mu$ l.

### **Secuenciación profunda**

Las muestras de ADN inmunoprecipitado, purificado y amplificado fueron enviadas a un secuenciador Hiseq Illumina (Cornell University) con capacidad para obtener 100 millones de lecturas de 50 bases cada una por cada “línea” sembrada.



## **Análisis bioinformáticos**

### **-Interpretación de las lecturas de secuencias de ADN**

Las lecturas obtenidas fueron procesadas para separar las muestras de acuerdo a su código de barras. Para esto se utilizó un set de herramientas para linux llamado "fastx toolbox" [56]. Una vez separadas, se removieron las bases correspondientes al código de barras con el mismo *software*, lo que se conoce como "trimming" ("afeitado suave"). A continuación, las muestras fueron alineadas con el genoma de tomate (versión SL2.40) disponible en la página del proyecto genoma tomate [57, 58] utilizando el *software* Bowtie [59]. Las lecturas que alinearon con más de dos errores o "miss-match" fueron descartadas así como también lo fueron aquellas que alineaban en más de una posición del genoma. A continuación las lecturas fueron ordenadas e indexadas utilizando el *software* provisto por IGV [60]. Finalmente se realizó un conteo del número de secuencias que caen dentro de una ventana de 150 pb. Los resultados de este conteo se visualizaron a lo largo del genoma utilizando el navegador provisto por IGV.

### **-Búsqueda de sitios de "binding" para ASR1**

Los datos fueron procesados de igual manera que para el ChIP-seq semi-nativo. Las secuencias alineadas fueron posteriormente analizadas con el *software* Macs [61] (Parámetros utilizados en el apéndice). Dicho *software* busca mediante métodos estadísticos, picos o regiones con una mayor cantidad de lecturas en comparación con las áreas circundantes (picos locales). Esta búsqueda es realizada tanto para la muestra de interés como para la muestra control, en nuestro caso fue el "INPUT". Finalmente el programa determina por comparación los picos que se encuentran solamente en la muestra de interés y no en la muestra control. El formato de los resultados fue ajustado para poder utilizar el paquete CSAR [62] que utiliza el lenguaje de programación estadístico R [63]. Con este paquete se determinaron los picos que se encuentran en regiones cercanas a genes y se identificaron dichos genes. También con este mismo *software* se determinó la ubicación relativa al gen para los picos que cayeron en regiones génicas, separando aquellos que se ubicaron en la región

promotora (las 3 kb río arriba del inicio de la transcripción), dentro del gen (toda la región transcripta) o río abajo del mismo (1 kb río abajo del fin de la transcripción). Finalmente se obtuvieron, en colaboración con el Dr. Tomas Duffy, los sitios consenso de pegado de ASR1 utilizando el *software* Gimmemotif [64] (Parámetros utilizados en el apéndice) y las categorías de genes sobre-representados con el programa Mapman [65].

# RESULTADOS

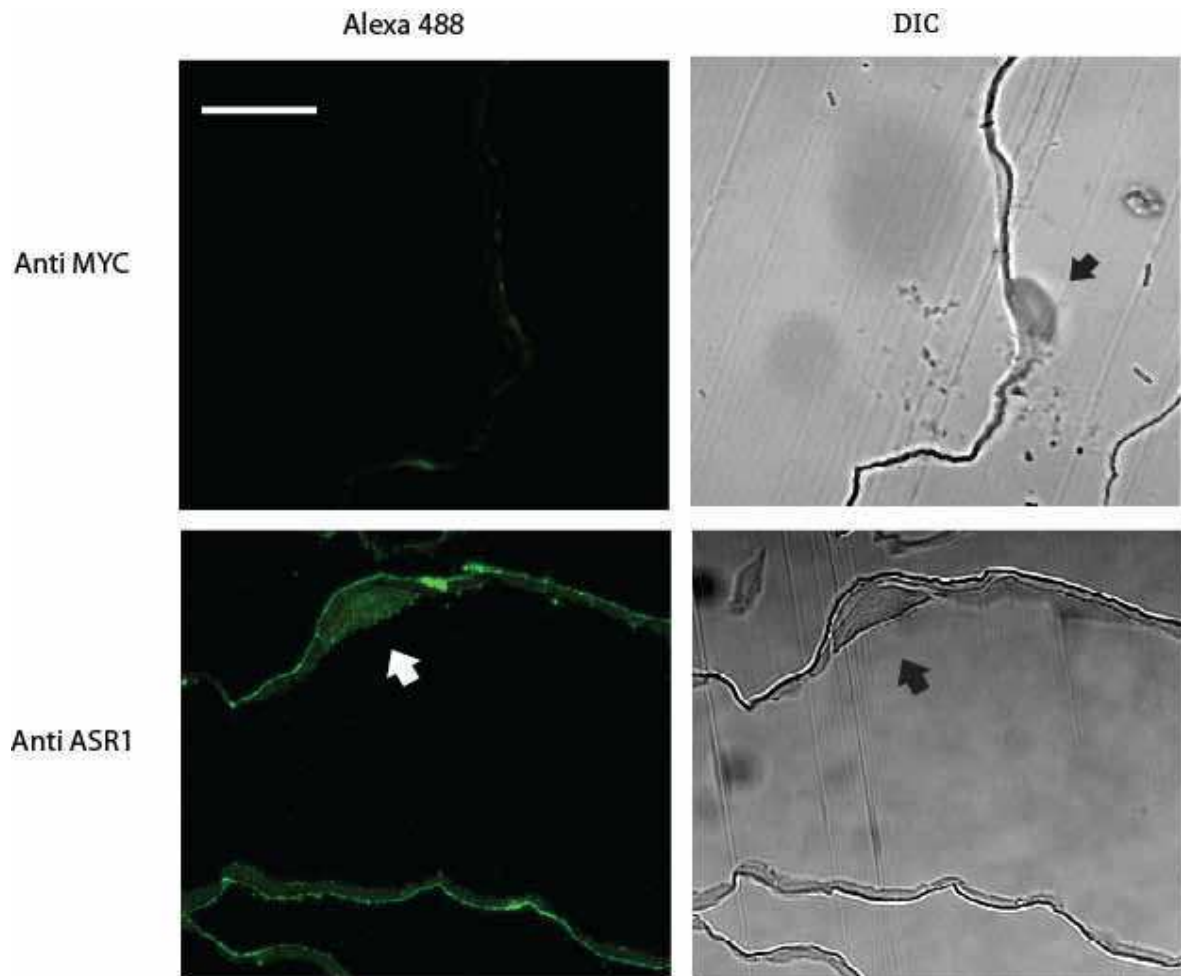
---

## **CAPÍTULO 1 Localización subcelular y oligomerización de ASR1**

Utilizando la planta *Nicotiana benthamiana*, caracterizamos la localización subcelular *in vivo* de ASR1 de tomate y la funcionalidad de su secuencia de localización nuclear putativa. También estudiamos la formación de homodímeros de ASR1 *in vivo* en este mismo sistema y describimos la localización subcelular de los mismos.

### **Localización subcelular de ASR1**

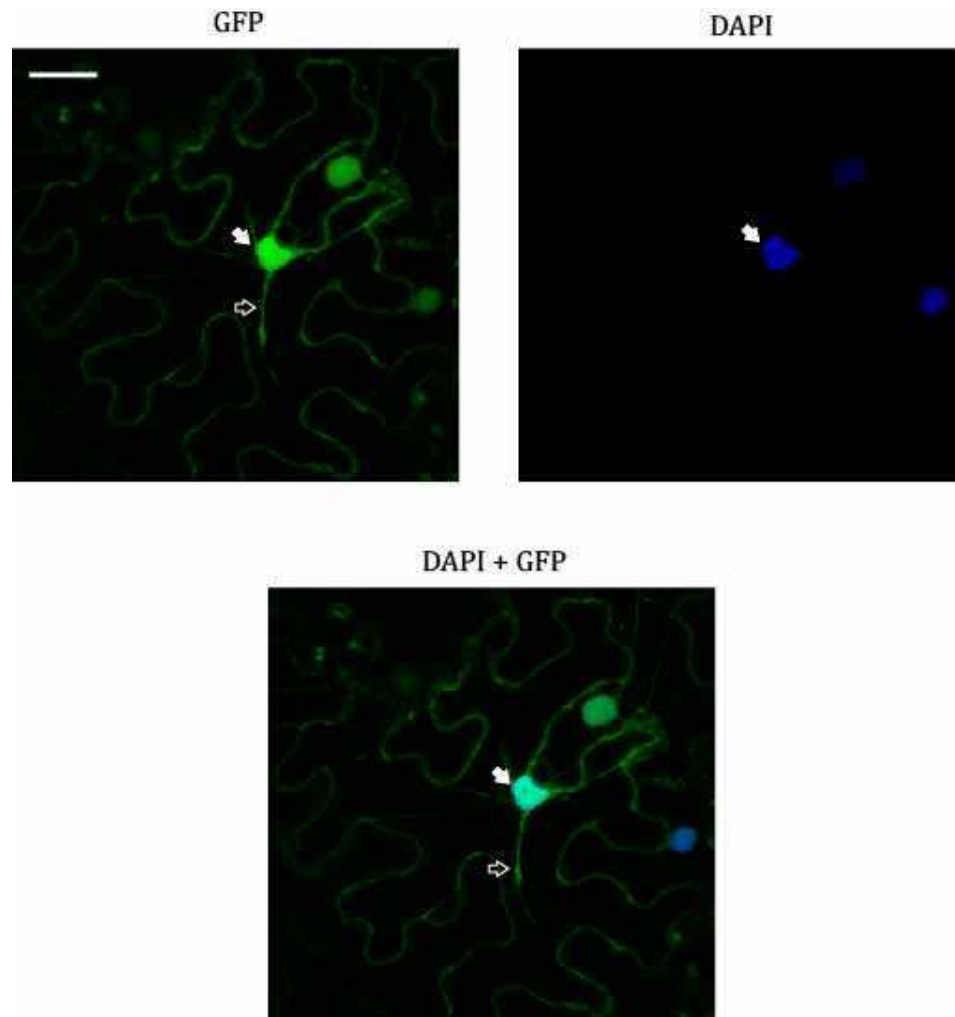
Como un primer acercamiento para determinar la localización subcelular de ASR1 de tomate, realizamos cortes histológicos de hojas de *Nicotiana benthamiana* transformadas en forma transitoria con la proteína ASR1 de tomate y luego reveladas con anticuerpos anti-ASR1 y anti-MYC como control negativo. La proteína mostró localización nuclear y citosólica (**Figura 5**). Cabe destacar que las células epidérmicas tienen su citoplasma reducido a las zonas cercanas al núcleo y a la pared celular debido al espacio que ocupan las vacuolas.



**Figura 5. Inmunolocalización de ASR1 de tomate en *Nicotiana benthamiana*.**

Los cortes transversales de hojas provenientes de plantas expresando ASR1 de tomate mostraron una localización nuclear (núcleos señalados con flechas) y una señal citosólica (en las regiones que bordean la pared celular). A la izquierda las imágenes adquiridas en el canal de Alexa 488 y a la derecha imágenes de transmisión (DIC). Barra de escala = 10  $\mu$ m

A continuación decidimos hacer una fusión de ASR1 a la proteína fluorescente verde (GFP) de manera de poder observar la localización en tejido vivo sin fijar. Con esta finalidad, la proteína quimérica se expresó en forma transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana*. Este primer ensayo nos mostró (en concordancia con lo observado en la inmunolocalización) que ASR1-GFP se observa tanto en núcleo, el cual teñimos con DAPI, como en citoplasma (**Figura 6**).



**Figura 6. Localización *in vivo* de ASR1-GFP.**

Imágenes de células epidérmicas de hojas obtenidas con un microscopio confocal. Arriba la izquierda se observa el canal de GFP (verde) y a la derecha el canal de DAPI (azul). Abajo ambas imágenes superpuestas. Se observó que ASR1 tiene una fuerte presencia en el núcleo teñido con DAPI (flecha rellena) y también podemos observarlo en el citosol, el cual se encuentra reducido a los bordes de las células. Se observan hilos de citoplasma que unen la región peri-nuclear con los bordes de la célula (flecha sin relleno). Barra de escala = 10  $\mu$ m

Adicionalmente utilizamos varios programas informáticos que predicen, basándose en la secuencia peptídica y en bases de datos, la localización nuclear de proteínas de plantas. Estudiamos los ortólogos más relevantes de ASR1 y observamos que todos los *softwares* utilizados predicen a estos como proteínas nucleares (**tabla 2**). Estos programas además en muchos casos identificaron una señal de localización nuclear en su carboxi-terminal. Finalmente realizamos un alineamiento de los carboxi-terminales de los diferentes ortólogos de ASR1 en donde se encuentran varias histidinas que en el caso de *Lilium longifolium* (azucena) resultaron indispensables para la traslocación al núcleo [66]. Llamativamente para el caso de *Solanum lycopersicon* (tomate) y *Solanum tuberosum* (papa), hay dos histidinas que se encuentran en otra posición. La localización de LLA2 [66] y VvMSA[27] está comprobada experimentalmente.

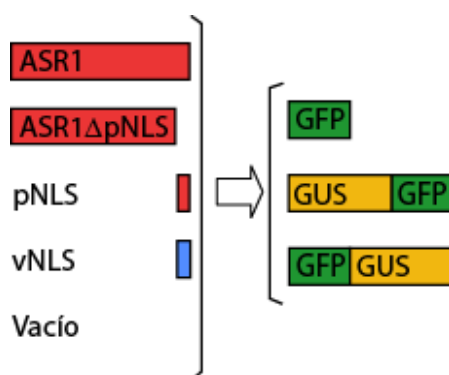
Especie	Yloc		NLS	Observado	Alineamiento de NLS	PM (kDa)
	Prob	Conf				
Tomate	99,72	0,87	0,88	Nuc/Cyto	GGF <b>F</b> HEHHE <b>KK</b> DA <b>KK</b> EE <b>KK</b> AEGG~~HHHL <b>F</b>	12,5
Papa	99,72	0,87	0,86	----	GGF <b>F</b> ALHEHHE <b>KK</b> DA <b>KK</b> E <b>Q</b> KAEGG~~HHHL <b>F</b>	12,5
<i>N. Benthamiana</i>	97,39	0,69	0,67	----	GGF <b>F</b> HEHHD <b>KK</b> DA <b>KK</b> E <b>Q</b> EAEGG <b>K</b> ~HHHL <b>F</b>	11,1
Uva	73,43	0,62	0,86	Nuc	GGF <b>F</b> HEHHE <b>KK</b> E <b>A</b> KEE <b>D</b> EEAHG~ <b>KK</b> HHHL <b>F</b>	16,7
Azucena	97,15	0,90	0,66	Nuc	GGY <b>T</b> FHEHHE <b>KK</b> TL <b>KK</b> E <b>N</b> EEVEG~ <b>KK</b> HH <b>FF</b> GG	16,1
Maíz	92,09	0,74	0,61	----	GGF <b>F</b> HEHHE <b>KKK</b> DH <b>K</b> DA <b>E</b> EAGGE <b>KK</b> HH <b>FF</b> GG	15,7
Arroz	87,07	0,67	0,54	----	GGY <b>F</b> HEHHE <b>KKK</b> DH <b>K</b> SA <b>E</b> ESTGE <b>KK</b> HH <b>LF</b> GG	15,4
Citrus	87,18	0,14	0,40	----	GGF <b>F</b> HEHHE <b>KK</b> E <b>A</b> KE <b>E</b> D <b>Q</b> EAHG~ <b>KK</b> STTIS <b>FN</b>	10,8

**Tabla 2. Características de varios ortólogos de ASR1.**

Se compararon varios ortólogos de ASR1 de tomate. El programa NUCLEO [21] muestra alta probabilidad de localización nuclear (columna NLS) para la mayoría de las proteínas; YLOC [20] predice una alta probabilidad (Prob) con alta confianza (Conf) de localización nuclear para todos los ortólogos excepto citrus. Se indican las especies corroboradas empíricamente (observados). El alineamiento de los carboxi-terminales muestra que hay dos lisinas (K) en diferente posición (marcadas en gris). Las demás lisinas, relevantes para el sitio de NLS, se encuentran resaltadas en negrita y subrayadas. Se indica el peso molecular de cada proteína (PM)

## Funcionalidad *in vivo* de la Señal de Localización Nuclear (NLS)

Como se menciona en la introducción las proteínas menores a 50-60 kDa ingresan al núcleo de células epiteliales de *Nicotiana benthamiana* por simple difusión. Para determinar el mecanismo (transporte activo o difusión) de ingreso de ASR1 al núcleo realizamos más proteínas de fusión con pesos superiores a los 90 kDa (ASR1-GFP-GUS), de manera que estas proteínas únicamente pudieran ingresar el núcleo en forma activa (**Figura 7**).

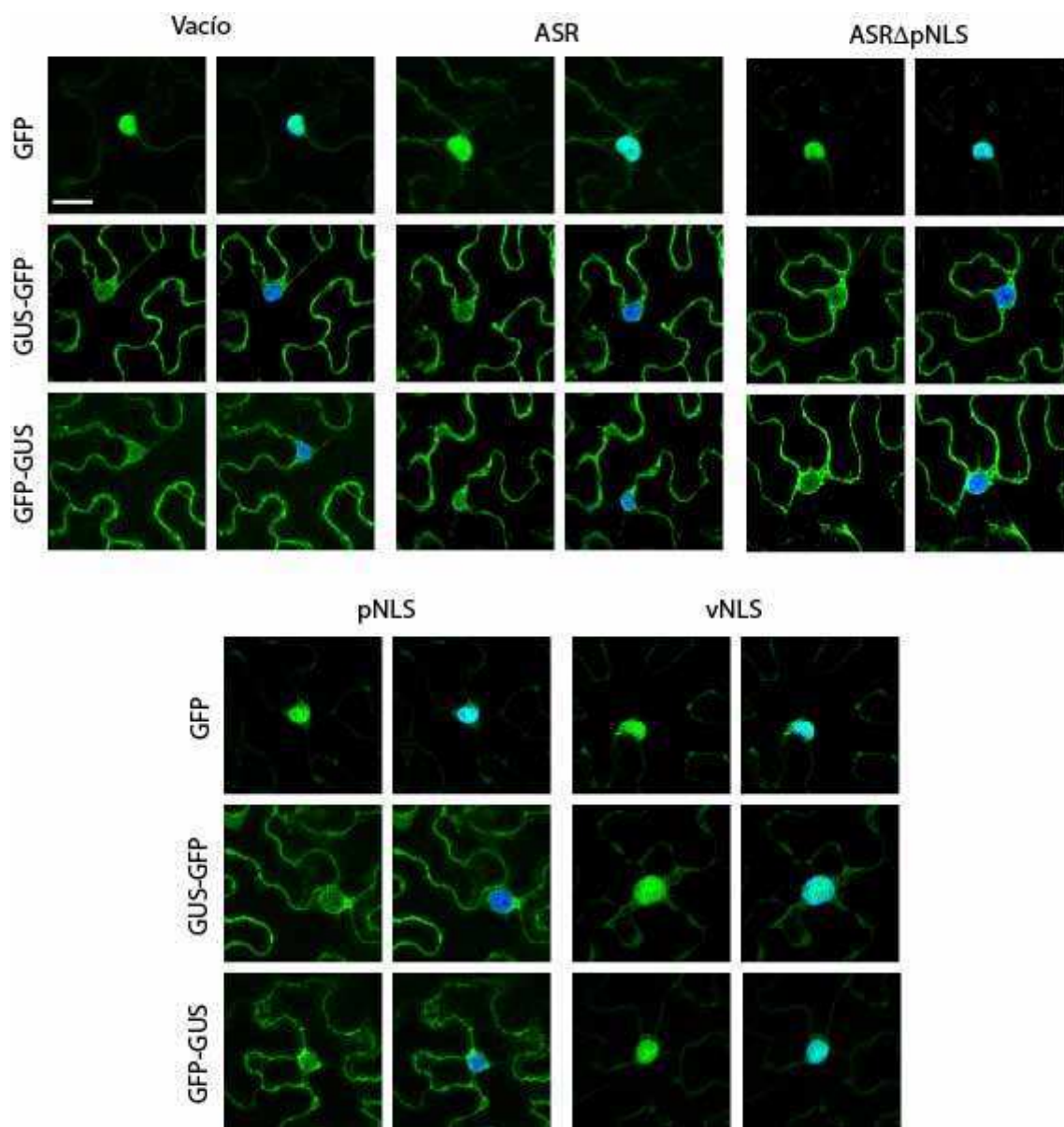


**Figura 7: Construcciones generadas para probar la NLS de ASR1.**

Se realizaron construcciones de ASR1 intacta, ASR1 sin su señal de localización nuclear (ASR1ΔpNLS), la señal de localización nuclear sola (pNLS), una señal de localización nuclear viral (vNLS), todas ellas fusionadas a la proteína fluorescente verde (GFP) o a una versión de GFP a su vez fusionada a glucuronidasa (GUS) de manera de aumentar el peso molecular de la proteína de fusión resultante.

Utilizando como referencia los patrones de localización nuclear observados por las proteínas GFP y GFP-GUS y un control positivo utilizando un NLS de origen viral con actividad comprobada (vNLS) [39], observamos que ASR1 no parece ser transportado activamente al núcleo y que su señal de localización nuclear por sí sola tampoco logra este objetivo. Finalmente, de acuerdo a lo esperado, la proteína ASR1 sin su señal de localización nuclear putativa tampoco logró cambiar el patrón de localización observado en los controles con vector de referencia “vacío”, es decir, el original sin inserto adicional (**Figura 8**).

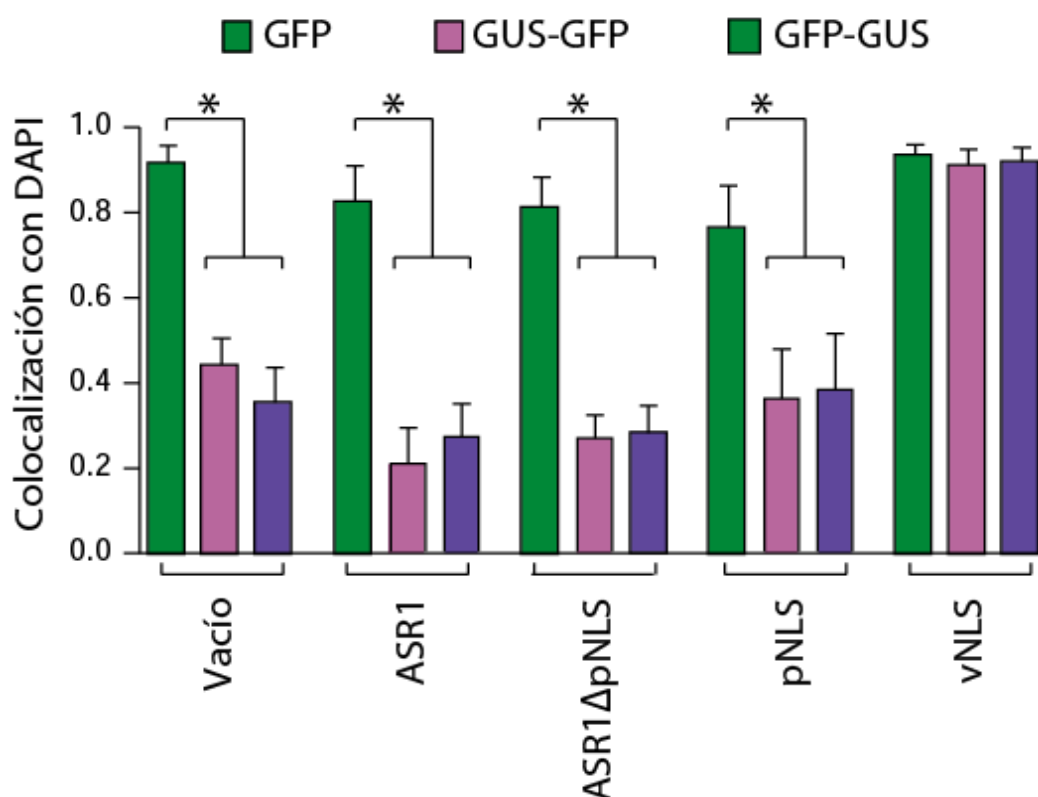




**Figura 8: Imágenes representativas observadas a partir de todas las construcciones utilizadas.**

Se observó en el microscopio confocal la localización subcelular de las proteínas generadas por los diferentes constructos. En verde a la izquierda de cada panel se observa el canal para GFP. A la derecha de cada panel se observa la superposición de la señal de GFP con la de DAPI (azul). Las imágenes representativas muestran dos patrones bien diferenciados. Barra de escala = 10  $\mu$ m.

A continuación calculamos los coeficientes de colocación de Pearson comparando la señal de GFP con la de DAPI. Estos coeficientes de colocación con DAPI (o localización nuclear) mostraron una gran diferencia al comprar GFP con las fusiones GFP-GUS o GUS-GFP, diferencia que únicamente fue modificada en el control positivo con el vNLS (**Figura 9**). El coeficiente de Pearson en nuestro caso puede variar entre 1 en caso de localización exclusivamente nuclear y 0 en caso de completa exclusión del núcleo.



**Figura 9: Cuantificación de la localización nuclear.**

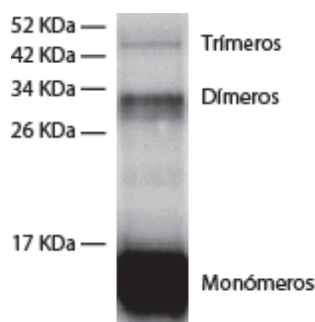
Coefficientes de Pearson para determinar la co-localización de GFP con DAPI de todas las proteínas codificadas por los constructos indicados en la **figura 7**. Se observó que la señal de localización viral (vNLS) fue capaz de hacer ingresar las proteínas de alto peso molecular hacia el núcleo, mientras que el resto de las proteínas expresadas se comportaron igual que el control con las proteínas fluorescentes solas (Vacío). Los coeficientes se calcularon tomando una sección cuadrada de 128x128 píxeles que abarcara el núcleo en su totalidad. \*  $P < 0.0001$ ,  $n = 15$ . Se graficó media y desvió estándar.



## Estructura cuaternaria

### -Formación de homodímeros de ASR1 *in vivo*

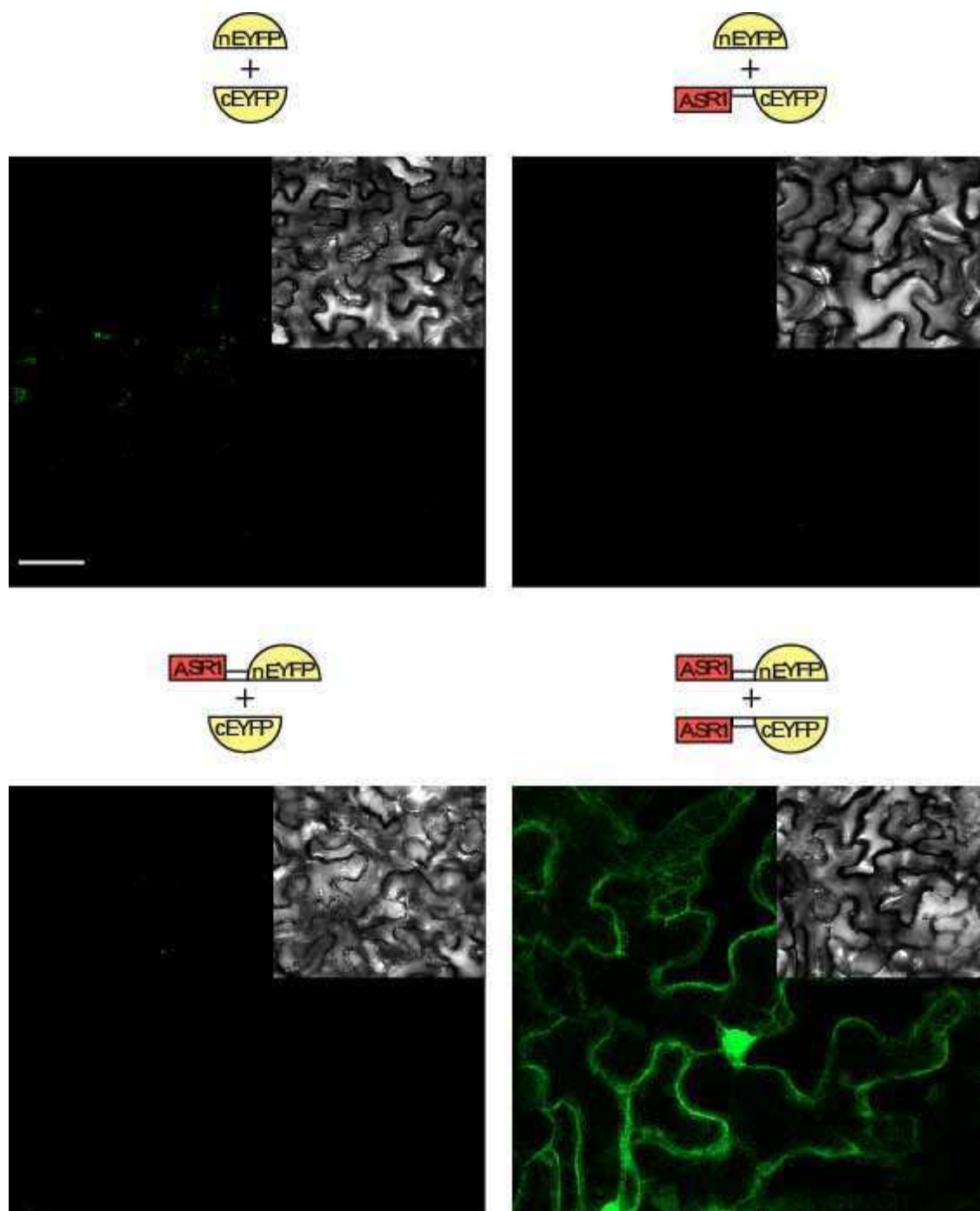
Como un primer acercamiento a la formación de homodímeros *in vivo* de ASR1, realizamos experimentos de “*crosslinking*”, posterior extracción de proteínas y corrida en un gel de poliacrilamida desnaturalizante. Para estos ensayos se trataron frutos de tomate con formaldehído y realizamos una purificación de núcleos seguida de una purificación por afinidad con columna con cationes de Ni<sup>2+</sup>. En esta corrida pudimos observar los dímeros de ASR1 e incluso trímeros. **(Figura 11)**



**Figura 11: Presencia de dímeros y trímeros en fruto de tomate.**

Se realizó una purificación de núcleos de fruto de tomate, previo "*crosslinking*" con formaldehído. La muestra fue posteriormente purificada basándose en el "tag" natural de histidinas de la proteína ASR1 y finalmente se realizó una corrida electroforética en condiciones desnaturalizante. Se observó la presencia de dímeros y trímeros además de una gran mayoría de monómeros.

Para corroborar la homodimerización de ASR1 utilizamos el sistema de reconstitución de proteínas fluorescentes BiFC ("*Bimolecular Fluorescence Complementation*"). Para este experimento fusionamos ASR1 a ambas mitades del gen de la proteína fluorescente EYFP (cEYFP y nEYFP). Al producirse la dimerización de ASR1 pudimos observar la reconstitución de la fluorescencia de la proteína EYFP, mientras en los controles no se observó señal alguna **(Figura 12)**.



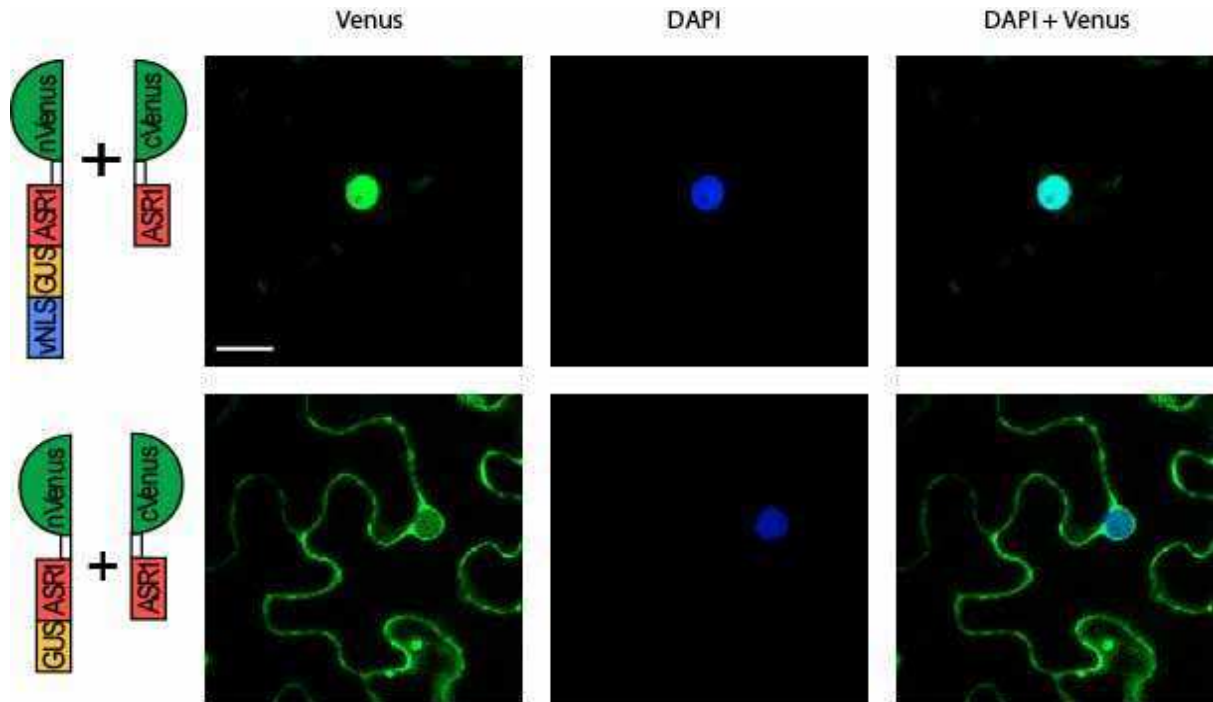
**Figura 12: ASR1 forma dímeros en plantas de *Nicotiana benthamiana*.**

La proteína fluorescente EYFP se reconstituyó sólo cuando ASR1 se encontró fusionado a ambas mitades. Arriba de cada imagen se muestran las combinaciones de proteínas quiméricas expresadas. En verde se observa la señal de EYFP y en el cuadro interno se ven imágenes de transmisión reducidas al 50%. Barra de escala = 10  $\mu$ m.

### **-Compartimento de la formación de homodímeros**

Resultó llamativo que los dímeros de ASR1 observados por BiFC mostraron una localización mayoritariamente nuclear, si bien se puede observar también señal en el citoplasma (**Figura 12**).

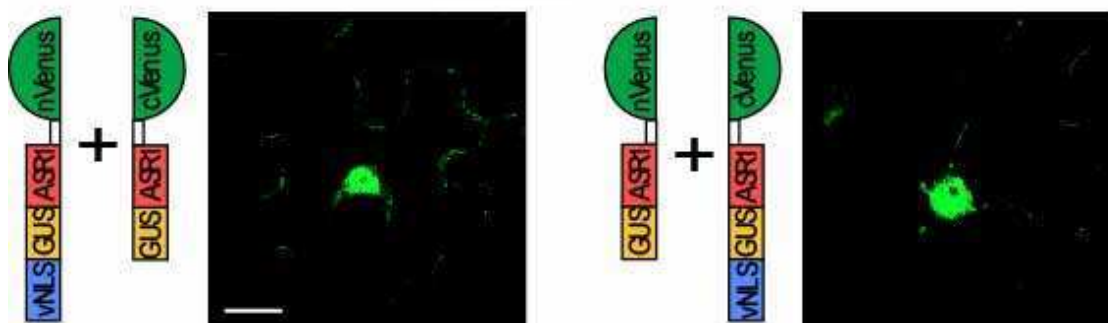
Para entender si los dímeros se forman en el citosol, en el núcleo o en ambos compartimentos, diseñamos nuevas construcciones de BiFC utilizando una variante de EYFP llamada Venus. Mediante el uso de la señal de localización viral y fusiones a la proteína de alto peso molecular GUS, diseñamos constructos de ASR1 con una mitad de Venus que fuesen dirigidas al núcleo o que no pudiesen ingresar al mismo. Como compañero para estos constructos utilizamos una fusión de ASR1 a la otra mitad de Venus el cual por su bajo peso puede ingresar y salir del núcleo por difusión (**Figura 13**).



**Figura 13: Presencia de dímeros en núcleo y citosol.**

Los dímeros de ASR1 pudieron verse mayoritariamente en el núcleo (arriba), o en el citosol (abajo) según se restringió una de las mitades de Venus a dichos compartimientos celulares (constructos a la izquierda). A la izquierda en verde se observa la señal de Venus, en el centro en azul el marcador nuclear DAPI y a la derecha la superposición de ambas. Barra de escala = 10  $\mu\text{m}$ .

Si bien los resultados obtenidos sugieren que la interacción podría estar dándose en ambos compartimientos, realizamos un control para corroborar que las proteínas de fusión se encuentran recluidas a los compartimientos celulares correspondientes. Dicho control consistió en otro experimento de BiFC donde se expresó una proteína de fusión que se dirija al núcleo y otra que por su tamaño se mantuviese en el citosol. Para nuestra sorpresa este control dio positivo, mostrando una clara señal nuclear (**Figura 14**).



**Figura 14: Dimerización de ASR1 en construcciones restringidas a diferentes compartimientos celulares.**

Los dímeros de ASR1 se formaron aún en los constructos restringidos a diferentes compartimientos celulares. A la izquierda de cada imagen se muestran las proteínas expresadas. En verde se observa la señal de Venus. Barra de escala = 10  $\mu\text{m}$ .

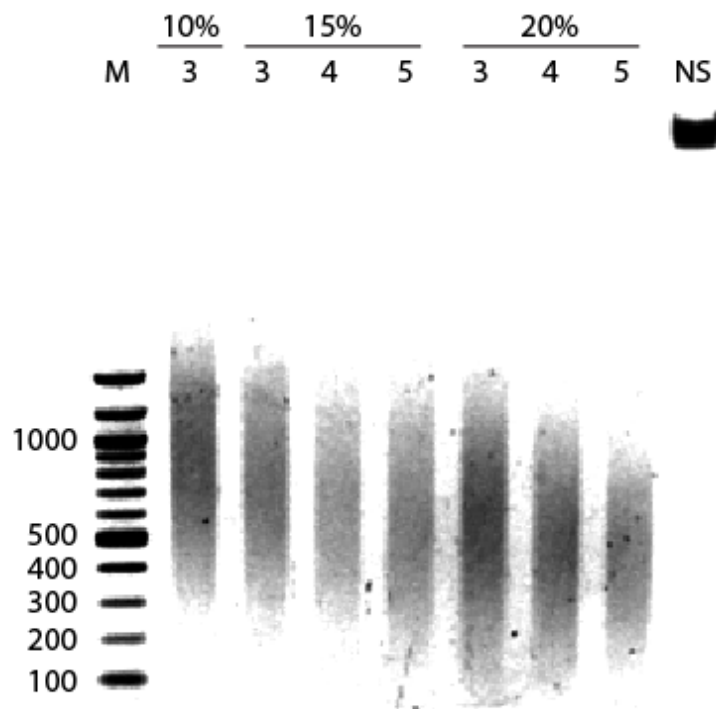


## **CAPÍTULO 2 Genes target del pool de ASR1 nuclear**

### **Puesta a punto de la metodología ChIP en tomate**

Para realizar las primeras pruebas de ChIP, recurrimos a un *kit* comercial (marca Epigentek) que requiere una puesta a punto para la fragmentación adecuada del ADN. Siguiendo las indicaciones del *kit* y la literatura, realizamos extracciones de cromatina y diferentes tratamientos de sonicado para ajustar el tamaño de los fragmentos de ADN generados, a precipitar posteriormente. De acuerdo a nuestro objetivo, dichos fragmentos resultaron de aproximadamente 500 pb y se consiguieron con 5 rondas de sonicación al 15% de potencia y 10 segundos de duración cada una (**Figura 15**).

Una vez ajustado este parámetro procedimos a realizar los primeros ensayos utilizando el control positivo del *kit* (anticuerpo contra histona H3 dimetilada en su lisina 9 (H3K9me2) y *primers* para detectar varias secuencias pertenecientes a transposones de tomate (Amplicones To1, To3 y T135), los cuales estarían presuntamente silenciados y asociados a dicha modificación de la histona. Las reacciones de PCR en tiempo real no fueron capaces de detectar nivel alguno de estas secuencias en los precipitados, mientras que funcionaron con las muestras previas al inmunoprecipitado (INPUT). Luego de varias pruebas concluimos que el *kit*, al menos en nuestras manos, no funcionaba.



**Figura 15. Fragmentación del ADN.**

Corrida electroforética en gel de agarosa 1,5% con bromuro de etidio de muestras de cromatina frescas sonicadas al 10%, 15% o 20% de potencia durante 3, 4 o 5 pulsos de 10 segundos cada uno. NS, muestra no sonicada; M, marcador de peso molecular “Quick load” 100-bp ladder (New England Biolabs).

A continuación decidimos probar aplicando el protocolo de CHIP descrito para *Arabidopsis thaliana* [47], sin utilizar el *kit*. Este protocolo de CHIP para *Arabidopsis* consta de varias etapas muy parecidas a las del protocolo del *kit*:

- "*crosslinking*"

- purificación de cromatina

- sonicado

- inmuno-precipitación propiamente dicha y purificación del ADN precipitado.

Durante este protocolo, observamos que la calidad de la cromatina obtenida no era buena ya que según las instrucciones del *kit*, el *pellet* de la cromatina debía tener un color blancuzco y en nuestro caso era prominentemente verde, indicando la presencia de contaminantes. Particularmente, luego del paso que utiliza un colchón de sacarosa 1,7 M para separar los núcleos, no se vio una clara separación entre el *pellet* y los contaminantes del sobrenadante. Además, datos bibliográficos indicaron que otros autores descartaron el uso de colchones de sacarosa para purificar núcleos de tomate [67]. Dados estos precedentes, nos enfocamos en la obtención de *pellets* de núcleos con menor grado de contaminantes.

## Purificación de núcleos

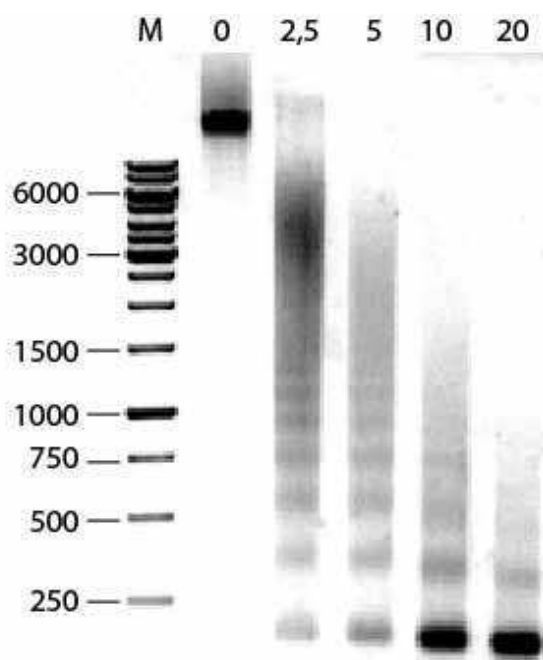
Para obtener núcleos de tomate aceptablemente puros, realizamos una mezcla del protocolo descrito por Bowler para ChIP [47] y de dos protocolos de purificación de núcleos de tomate [67, 68]. Básicamente se reemplazó el buffer con colchón de sacarosa 1,7 M por un buffer con Percoll y se agregaron lavados a los núcleos purificados utilizando buffer de resuspensión nuclear. El resultado de este “híbrido” entre los protocolos fue la obtención de núcleos intactos apreciables al agregar SYBR-green a los mismos y mirarlos al microscopio confocal (**Figura 16**).



**Figura 16: Observación microscópica de núcleos teñidos con SYBR-Green.**

Los núcleos intactos se observaron como partículas de entre 5 y 10  $\mu\text{m}$  que mostraron fluorescencia verde. Barra de escala: 100  $\mu\text{m}$ .

Mediante una digestión con nucleasa micrococcal, probamos que la calidad de la cromatina obtenida de nuestra purificación de núcleos era lo suficientemente buena para obtener patrones en escalera o "*ladder*" bien definidos [69] (**Figura 17**).



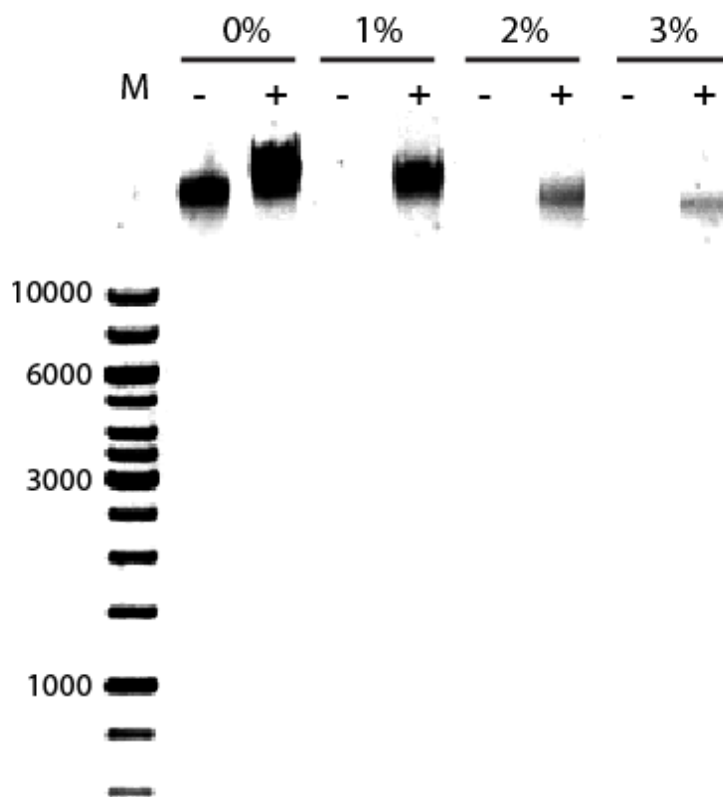
**Figura 17: Digestión de la cromatina aislada.**

Gel de agarosa 1,5% revelado con bromuro de etidio. Las muestras de cromatina fueron previamente digeridas sin (0) y con 2,5, 5, 10 y 20 unidades de nucleasa micrococcal. Al correr las muestras en un gel de agarosa, se puede observar el patrón en escalera desde mononucleosomas hasta di-, tri- y poli-nucleosomas y el incremento de la proporción de mononucleosomas a medida que aumenta la cantidad de enzima agregada. M marcador de peso molecular (Gene Ruler 1 kb, Fermentas).

### **“Crosslinking”**

“*Crosslinking*” se llama al entrecruzamiento covalente y reversible entre macromoléculas, a través de sus grupos  $-NH_2$  conseguido gracias al único átomo de C del formaldehído que hace de “puente”. Este paso se realiza para capturar en el inmunoprecipitado al ADN asociado (no covalentemente *in vivo*) a la proteína de interés. Si el *crosslinking* es ineficiente, es probable que los complejos ADN-proteína se disocien durante el desarrollo del protocolo, mientras que un exceso de formaldehído complica el paso de purificación del ADN debido a la dificultad de revertir el mismo posteriormente.

Se ha reportado que al realizar una extracción con fenol/cloroformo, el ADN “*crosslinkeado*” no se ubica en la fase acuosa como lo hace cuando se encuentra sin “*crosslinkear*”, sino que debido a las proteínas unidas covalentemente a él, éste pasa a la interfase o incluso a la fase orgánica. Aprovechando este hecho, se puede deducir fácilmente si el *crosslinking* funcionó correctamente y si la reversión con NaCl es la suficiente [70]. Para probar ambos pasos se combinaron distintos tratamientos de *crosslinking* y se trató o no con calor y NaCl para revertirlo. Los resultados mostraron que un tiempo de 10 minutos con formaldehído al 1% basta para un *crosslinking*, el cual puede revertirse eficientemente (**Figura 18**).



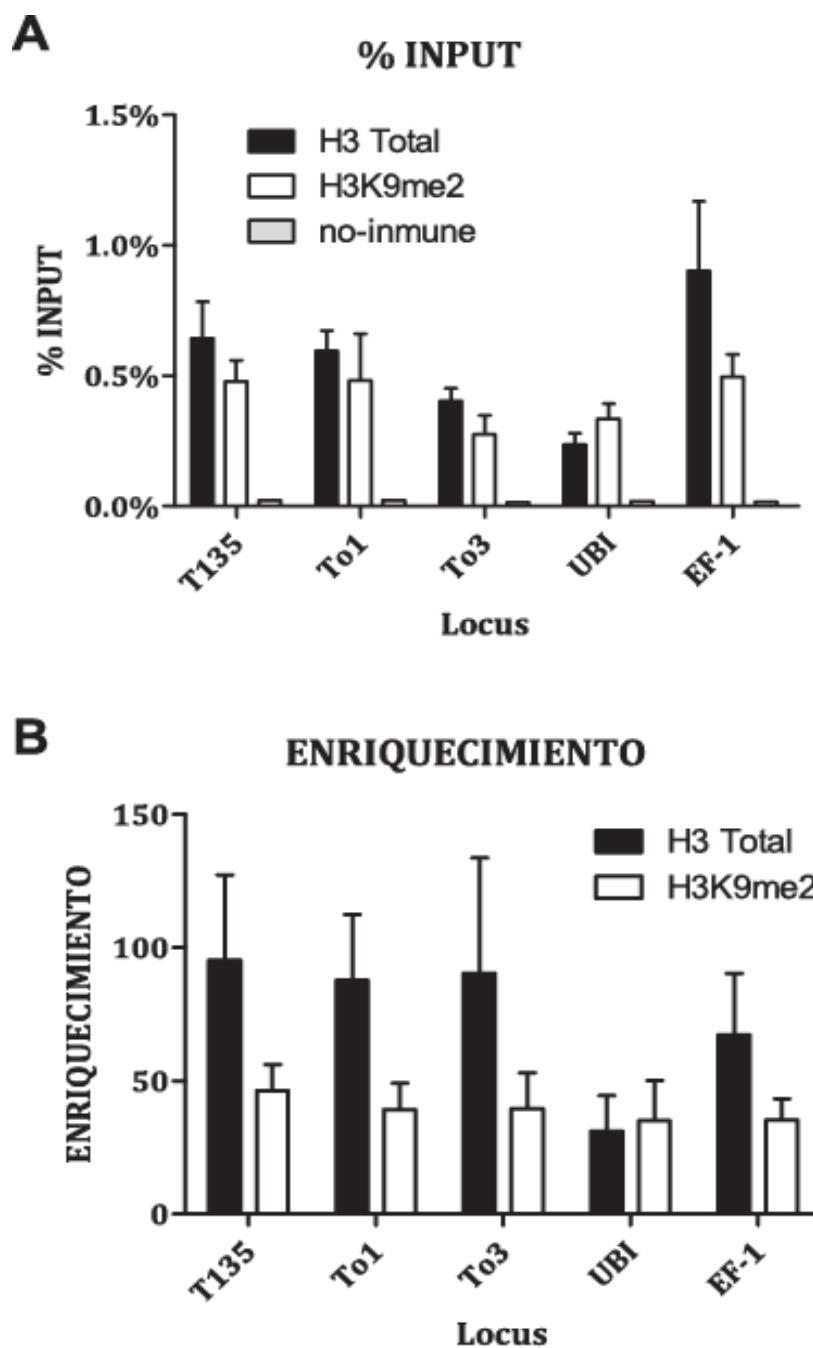
**Figura 18. Eficiencia del *crosslinking*.**

Gel de agarosa 0,8 % revelado con bromuro de etidio. Se corrieron muestras previamente sometidas a tratamientos de *crosslinking* con diferentes concentraciones de formaldehído (0%, 1%, 2% y 3%). Las muestras sembradas fueron las fases acuosas luego de una extracción con fenol/cloroformo antes (-) o después (+) de revertir el *crosslinking* con NaCl y calor. M = marcador de peso molecular "O`gene ruler".

### **Puesta a punto inicial con anticuerpos anti-histona**

Ajustados todos los parámetros procedimos a realizar el ChIP en hojas de plantas de tomate. Esta vez utilizamos anticuerpos comerciales contra Histona H3 total e Histona H3 dimetilada en lisina 9 (H3K9me2). Para detectar el ADN inmunoprecipitado utilizamos "*primers*" específicos para amplificar regiones de genes activamente transcritos (ubiquitina y EF-1) y los mismos "*primers*" de transposones diseñados anteriormente (To1, To3 y T135) detallados en el apéndice. Según la bibliografía esperábamos que los genes con activa transcripción no estuviesen asociados a la marca H3K9me2, que en Arabidopsis se relaciona con regiones silenciadas. El protocolo de ChIP modificado para tomate arrojó resultados positivos dado que las muestras precipitadas utilizando anticuerpos contra H3 y H3K9me2 resultaron enriquecidas en ADN en comparación con las muestras precipitadas con suero no inmune. Dicho enriquecimiento superó las 50 veces. Cuando se expresó respecto del ADN presente antes de la precipitación (%INPUT) los valores se hallaron entre el 1% y 0,2 %. En líneas generales, con el anticuerpo contra H3 total obtuvimos mayores niveles de enriquecimiento (**Figura 19**). Cuando calculamos la relación H3k9me2/H3 total para cada amplicón no se observaron grandes diferencias, lo cual podría estar apuntando a que la marca H3K9me2 en tomate podría estar presente tanto en regiones silenciadas como en aquellas expresadas activamente.





**Figura 19. ChIP contra Histona 3 total y Histona 3 dimetilada en lisina 9.**

El ADN precipitado fue cuantificado por PCR en tiempo Real. A) Se relativizaron los valores obtenidos para cada amplicón respecto de una curva de calibración realizada con el INPUT. En todos los casos, el %INPUT fue significativamente mayor para las muestras precipitadas con anticuerpos específicos en comparación con las precipitadas con suero pre-inmune. B) Se calculó el enriquecimiento relativizando cada valor de %INPUT al valor del suero pre-inmune. Se graficó media y desvío estándar.

## **Primer ensayo de ChIP contra ASR1**

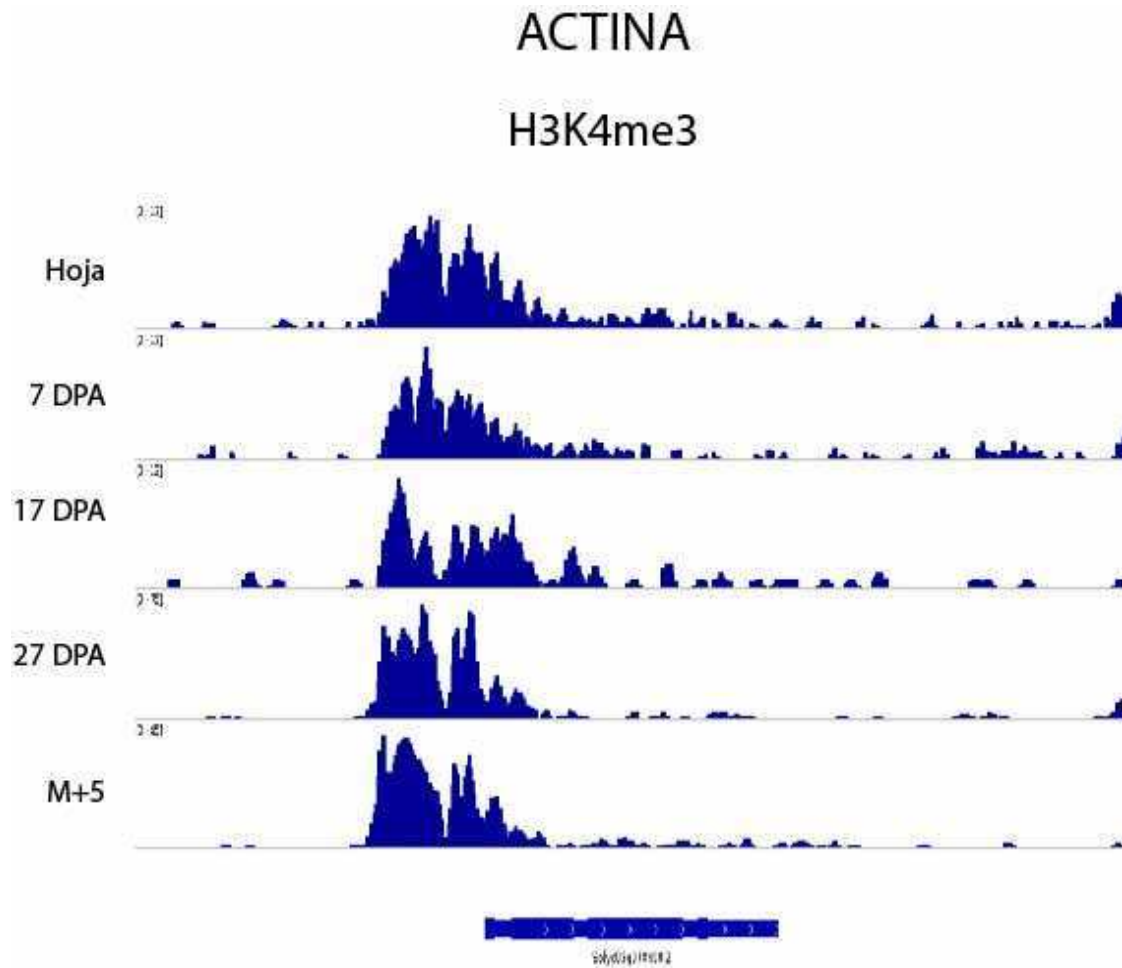
Una vez ajustado el protocolo, realizamos un primer intento de ChIP en hojas de tomate estresadas usando un anticuerpo anti-ASR1 disponible en el laboratorio. Para detectar las secuencias de ADN precipitadas, recurrimos, sin éxito, al clonado directo. Como alternativa, una colaboración con el Boyce Thompson Institute (Universidad de Cornell) nos permitió acceso a técnicas de secuenciación profunda o “*deep sequencing*” para la identificación del ADN precipitado.

## **Experimentos de ChIP “semi-nativos” seguidos de secuenciación profunda**

Realizamos ensayos de ChIP seguidos de “*deep sequencing*” (aparato Illumina HiSeq 2000). Para dichos ensayos utilizamos frutos de tomate en diferentes estadios de maduración y anticuerpos contra Histona H3 trimetilada en lisina (H3K4me3) presente en genes activos en *Arabidopsis thaliana* y histona H3 trimetilada en lisina 27 (H3K27me3) presente en regiones silenciadas. Los ensayos de ChIP fueron realizados en forma semi-nativa, es decir con un corto período de fijación en formaldehído y la fragmentación de la cromatina se realizó por digestión con nucleasa micrococcal. Para este método, es necesario además realizar bibliotecas de ADN ligados a adaptadores especiales y pre-amplificación por PCR, previo a la secuenciación (Ver Materiales y Métodos).

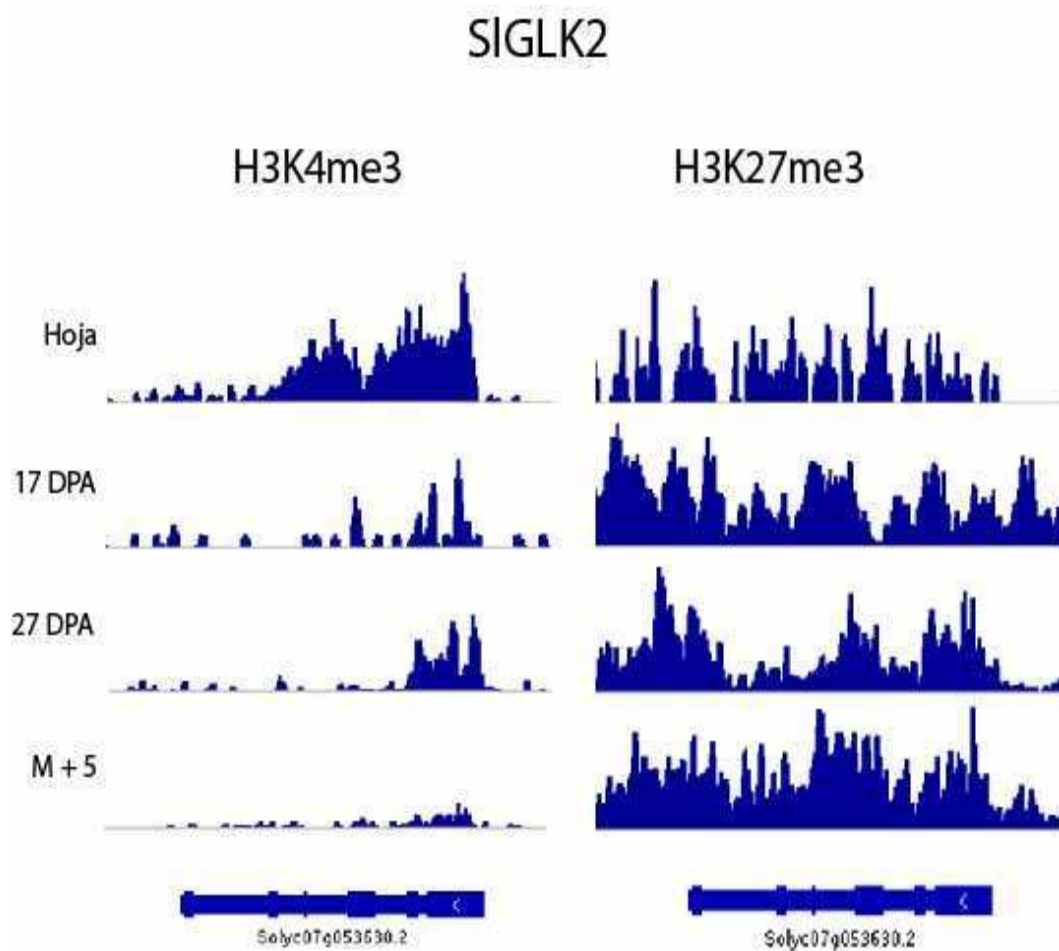
De manera de evaluar la calidad de los datos generados se tomaron varios genes de conocida expresión como puntos de referencia. El análisis bioinformático de los datos se realizó como se describe en materiales y métodos. Los datos procesados se graficaron con el *software* “Integrative genomics viewer” (IGV) [60] con el que se puede navegar el genoma y observar las lecturas asociadas a cada posición del mismo.

Los resultados mostraron una fuerte presencia de H3K4me3 en la zona cercana al inicio de la transcripción del gen de actina (**Figura 20**) tanto en muestras de hoja como a lo largo de varios estadios de desarrollo y maduración del fruto. En el caso de actina, no observamos prácticamente ninguna marca de H3K27me3 (no mostrado). Un caso interesante es el del gen *SlGLK2* que codifica para un factor de transcripción del tipo “*Golden-2 like*” y determina la acumulación y distribución de clorofila en frutos en desarrollo [71]. Este gen muestra una disminución de la marca H3K4me3 y un concomitante aumento en H3K27me3 (**Figura 21**) cuando se compara hoja y distintos estadios de maduración del fruto.



**Figura 20. Trimetilación en lisina 4 de histona H3 en la región del gen de actina.**

En la figura se muestra la abundancia de secuencias inmunoprecipitadas contra histona H3 tri-metilada en lisina 4. Se contaron las lecturas que cayeron en ventanas de 150 pb y se graficó un histograma que muestra el número de lecturas a lo largo de la región circundante al gen de actina. Se utilizaron muestras de hojas verdes (Hoja) de frutos 7, 17 y 27 días post-antesis (7 DPA, 17 DPA , 27 DPA) y de frutos 5 días post-maduración (M + 5). Se observó una gran concentración de lecturas en la región promotora del gen. La ubicación y orientación del gen de actina (Soylc03g078400.2) están indicadas abajo.



**Figura 21: Tri-metilación en lisina 4 y en lisina 27 de la histona H3 en la región del gen de SIGLK2.**

La figura muestra la abundancia de secuencias inmunoprecipitadas contra histona H3 tri-metilada en lisina 4 (H3K4me3) y contra histona H3 tri-metilada en lisina 27 (H3K27me3). Se contaron las secuencias que cayeron en ventanas de 150 pb y se graficó un histograma que muestra el número de lecturas a lo largo de la región circundante al gen AHRD. Se utilizaron muestras de hojas verdes (Hoja) de frutos 17 y 27 días post - antesis (17 DPA , 27 DPA) y de frutos 5 días post maduración (M + 5). La ubicación y orientación del gen de SIGLK2 (Solyc07g053630.2) están indicadas abajo.

## **ChIP contra ASR1**

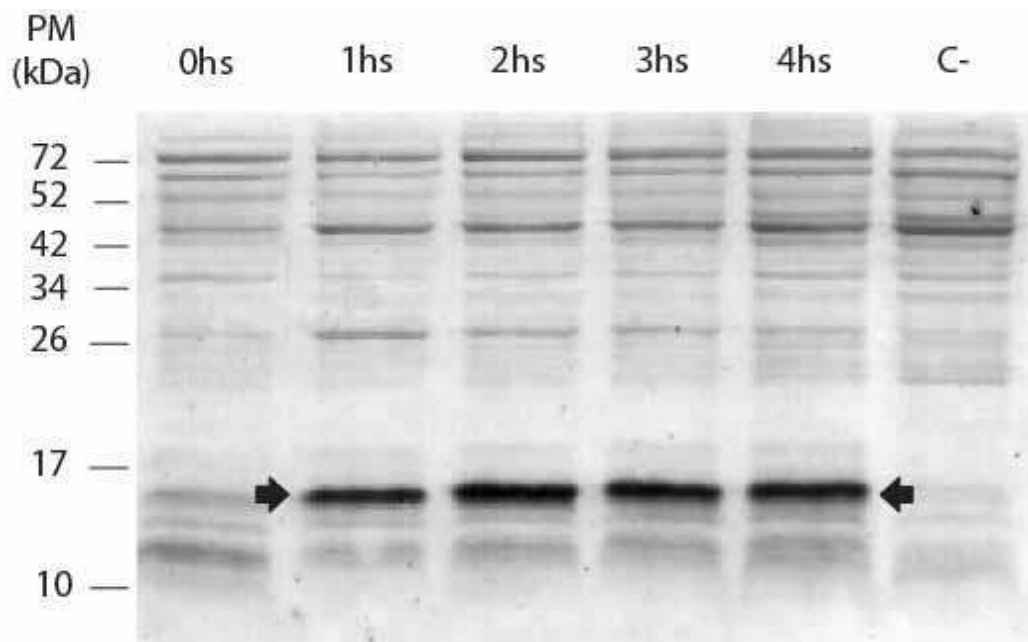
### **Producción de Anticuerpo contra ASR1**

Debido a que el primer ChIP contra ASR1 no resultó exitoso, decidimos producir un nuevo anticuerpo de alta *performance*, siguiendo los siguientes pasos:

- Expresión de ASR1 recombinante en *Escherichia coli* BL21.
- Purificación por cromatografía de afinidad de la proteína sobre-expresada.
- Inmunización de conejos con la proteína recombinante pura.
- Ensayos de "Immuno Blot" con los sueros para chequear el título obtenido,
- Purificación de inmunoglobulinas a partir de suero de conejo.
- Purificación de anticuerpos anti-ASR1 por cromatografía de afinidad.
- Ensayos de Inmunoprecipitación para probar la capacidad de precipitación del anticuerpo.

#### **-Expresión de ASR1 recombinante en *Escherichia coli* BL21**

En nuestro laboratorio disponemos de un plásmido de expresión (T7-ASR1) que posee el clonado cDNA de ASR1 bajo el control del promotor de la RNA polimerasa del bacteriófago T7. Se realizaron cultivos en pequeña escala y se indujeron con IPTG a diferentes tiempos. Como control negativo se realizó también un cultivo de la cepa *E. coli* BL21 sin plásmido. Las proteínas de los cultivos se extrajeron, se corrieron en un gel de poliacrilamida 15% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, donde se visualizaron por tinción con Rojo Ponceau. Pudimos observar una alta expresión en todos los tratamientos de inducción e incluso un nivel basal (a las 0 hs) apreciable entre los pesos de 10 y 17KDa (**figura 22**).

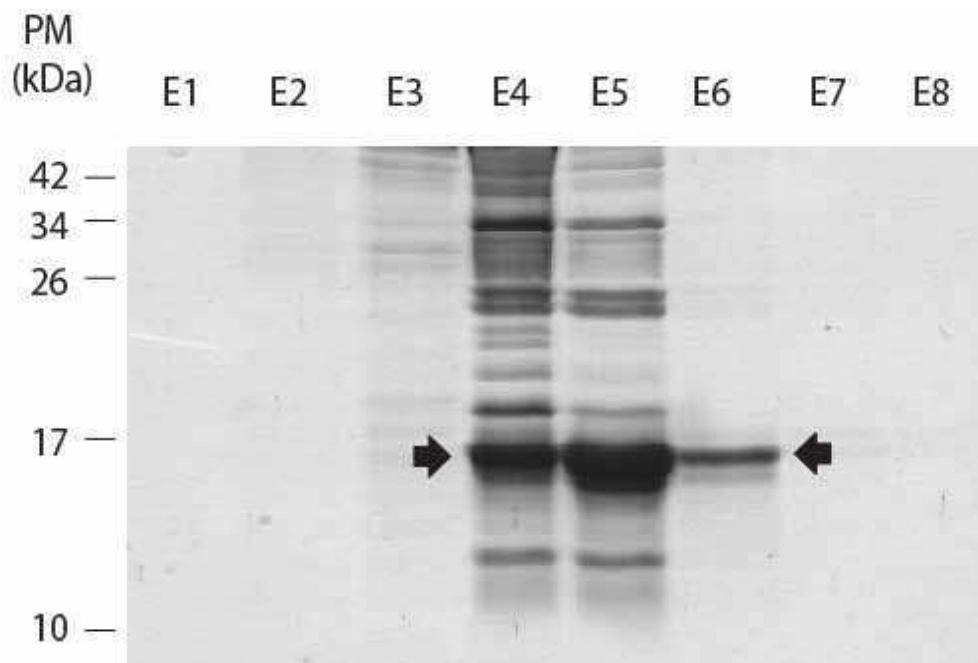


**Figura 22: Verificación de la expresión de ASR1 recombinante.**

Membrana teñida con Rojo Ponceau luego de correr y transferir, en un SDS-PAGE 15%, las proteínas de los cultivos inducidos con IPTG durante diferentes tiempos (0, 1, 2, 3 y 4 hs). La flecha negra marca la presencia de ASR1 recombinante en el sobrenadante del lisado de bacterias.

### **-Purificación por cromatografía de afinidad de la proteína sobre-expresada**

Los cultivos inducidos durante 2 horas con IPTG fueron lisados mediante sonicado y purificados con la columna pre-empaquetada con  $\text{Ni}^{2+}$ . Luego de una primera ronda de purificación la proteína seguía mostrando una cantidad considerable de contaminantes al analizarla por SDS-PAGE seguido de tinción de proteínas con Azul de Coomasie (**Figura 23**).



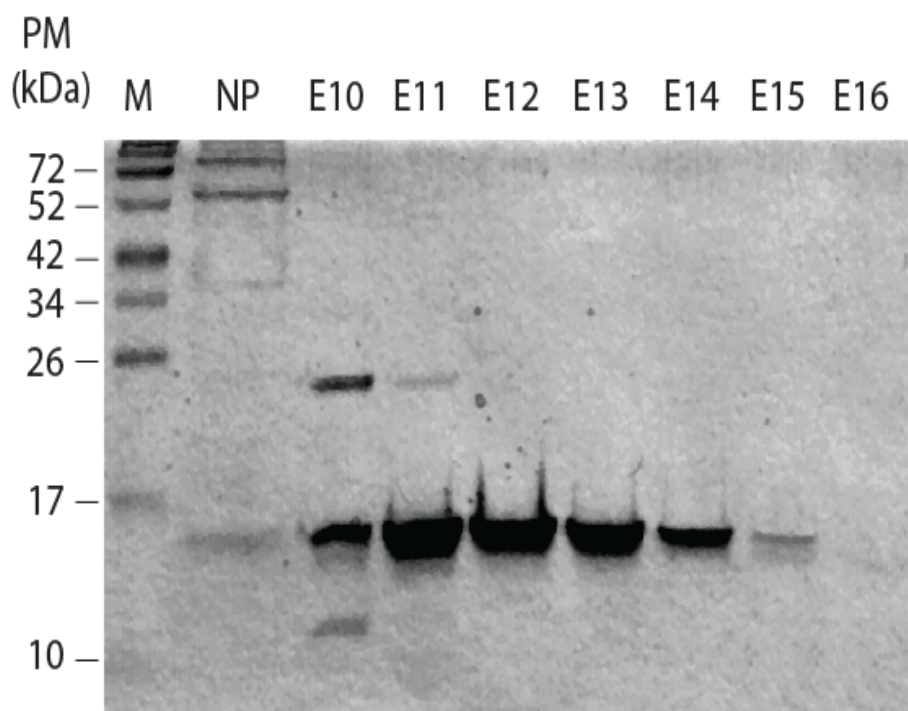
**Figura 23: SDS-PAGE y posterior tinción con Azul de Coomassie en las distintas fracciones eluidas de la cromatografía de afinidad.** Se sembraron las fracciones 1 a 8 del eluido de la cromatografía (E1-E8). Las fracciones E4, E5 y E6 muestran la proteína recombinante junto con contaminantes. Las flechas negras señalan el peso correspondiente a ASR1 recombinante.

Para continuar juntamos las fracciones desde la E4 hasta la E6 y repetimos la purificación, esta vez utilizando un gradiente continuo no lineal de imidazol para la elución, y obtuvimos la proteína más pura (**Figura 24**).

#### **-Inmunización de conejos con la proteína recombinante pura**

La proteína recombinante purificada se concentró por medio de columnas diseñadas para tal fin (marca Vivaspin) y fueron entregadas a la Dra. Hebe Goldman para su inoculación en conejo.



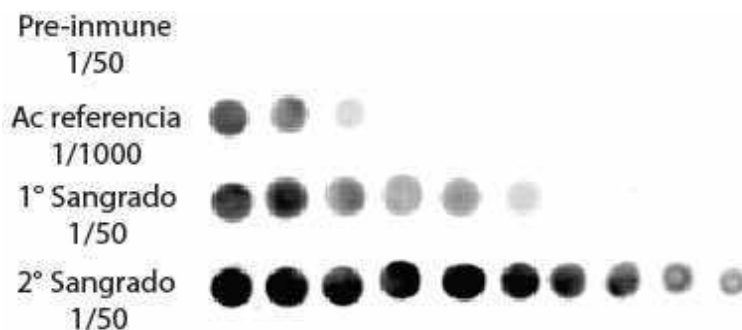


**Figura 24. Segunda purificación de ASR1 recombinante.**

Se sembraron en un SDS-PAGE las fracciones 10 a 16 del eluido de la cromatografía realizada con gradiente de Imidazol (E10-E16), junto con la fracción que de proteína no pegada a la columna (NP). Luego de transferir y revelar con Rojo Ponceau, las fracciones E12-E15 muestran la proteína recombinante sin contaminantes detectables.

#### **-Titulación de los sueros**

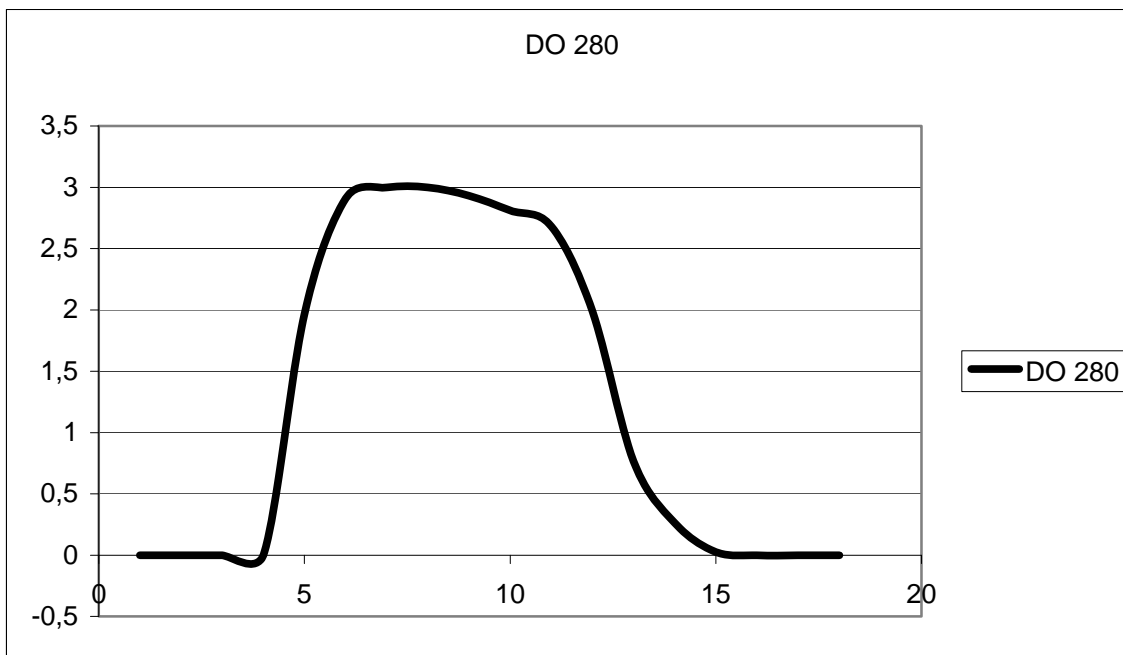
Se realizó un sangrado exploratorio para determinar si el conejo respondía satisfactoriamente a la inmunización. Se tituló el nuevo anticuerpo realizando un "*dot-blot*" con diluciones seriadas al medio de la proteína ASR1 recombinante. Se lo comparó con un anticuerpo previamente existente en nuestro laboratorio. Al no ser suficiente el título obtenido, se realizó una nueva inoculación y un nuevo sangrado exploratorio (**Figura 25**). Resultando satisfactorio este último título, se procedió al sangrado completo del animal.



**Figura 25: Titulación de los sangrados.** Los sangrados exploratorios se utilizaron para revelar una membrana de nitrocelulosa sembrada con gotas de 1  $\mu$ l de diluciones seriadas al medio de la proteína ASR1 recombinante. Se observó un título aceptable en el segundo sangrado. Como anticuerpo de referencia se utilizó el suero anti-ASR1 previamente disponible en el laboratorio. El revelado se realizó con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa.

#### **-Purificación de inmunoglobulinas a partir de suero de conejo**

Las inmunoglobulinas del suero fueron precipitadas con sulfato de amonio y posteriormente dializadas. A continuación se purificaron las inmunoglobulinas totales mediante una columna comercial “Hi-trap protein G”. Se juntaron las fracciones ricas en inmunoglobulinas medidas mediante la absorbancia a 280 nm (**Figura 26**). Las fracciones desde la 5 hasta la 14 fueron concentradas (columna vivaspin) y diluidas en PBS para realizar una cromatografía de afinidad con la proteína ASR1 recombinante unida covalentemente a un soporte sólido, que en nuestro caso fue una resina de agarosa activada con cianógeno (Sigma).



**Figura 26. Purificación de inmunoglobulinas con columna Hi-trap:**

Se midió la densidad óptica a 280 nm de las fracciones eluidas de la columna Hi-trap. Los valores mayores a 3 saturaron el límite de detección del aparato.

#### **-Purificación de anticuerpos Anti-ASR1 por cromatografía de afinidad**

La cromatografía de afinidad se realizó de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. Se realizó un "dot-blot" y tinción de Rojo Ponceau para visualizar las fracciones de la elución que contenían el anticuerpo (**Figura 27**). Finalmente se concentraron y equilibraron en PBS las fracciones 1 a 9.

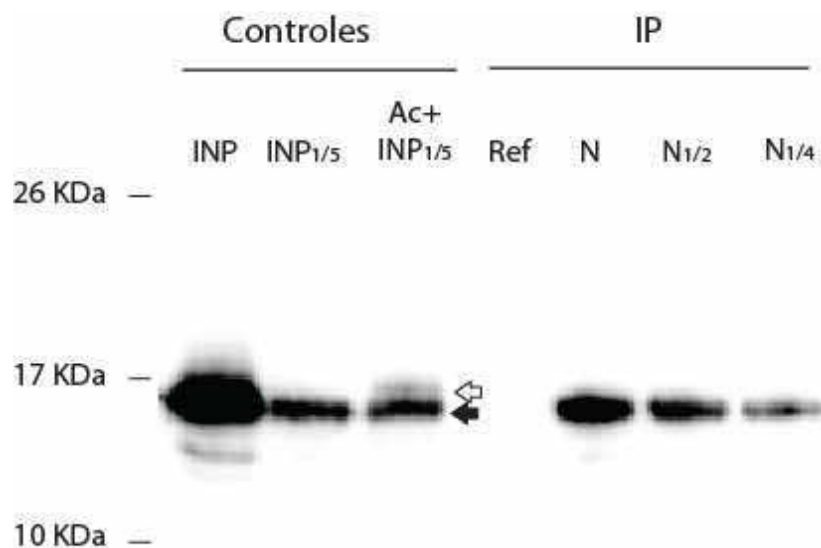


**Figura 27. Purificación de anticuerpos Anti-ASR1 por cromatografía de afinidad.**

Se colocó 1  $\mu$ l de las fracciones eluidas de la columna de afinidad y se observó la presencia de proteínas mediante tinción con rojo Ponceau. Las fracciones 1-9 resultaron positivas para la presencia de proteína.

### **-Confirmación de la capacidad de inmunoprecipitación del anticuerpo anti-ASR1**

Para esta finalidad, realizamos un protocolo incompleto de CHIP (sin "crosslinking" de manera de no co-precipitar ADN). Se utilizaron núcleos de fruto como material de partida ya que éste expresa grandes cantidades de ASR1. El inmunoprecipitado fue eluido de las esferas de agarosa mediante un tratamiento con glicina ácida, para no degradar las proteínas. La muestra fue posteriormente corrida en SDS-PAGE para la detección de ASR1 mediante *Western Blot*. Como se requiere un segundo anticuerpo para revelar el *Western*, es común en estos casos observar bandas muy fuertes correspondientes a las cadenas pesadas y livianas del primer anticuerpo utilizado en la inmunoprecipitación, los cuales se desnaturalizan y corren junto con la muestra de interés, pudiendo confundir en el revelado posterior. Con la intención de impedir justamente el revelado de estas bandas, se utilizó un anticuerpo secundario que reconoce solamente inmunoglobulinas en estado nativo (p. ej. el anti-ASR1 usado para revelar el *Western*), y que por lo tanto no reconoce al primer anticuerpo anti-ASR1 usado en la inmunoprecipitación, cuya calidad se desea testear en este ensayo mediante detección positiva de ASR1 en el gel. La inmunoprecipitación fue exitosa, a juzgar por la clara banda correspondiente a ASR1 observada sólo cuando se utilizó el nuevo anticuerpo anti-ASR1 en la precipitación, mientras que el anticuerpo anterior, no logró precipitar una cantidad detectable (**Figura 28**).



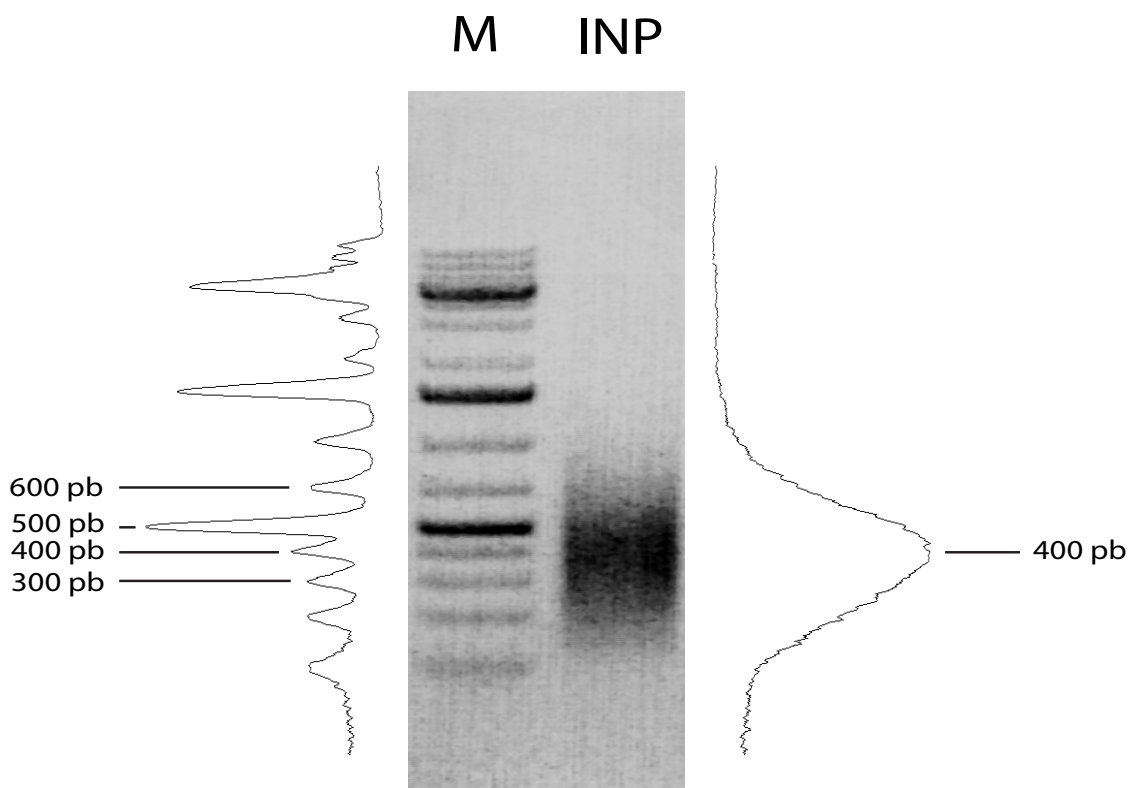
**Figura 28. Capacidad de inmunoprecipitación del anticuerpo anti-ASR1 nuevo.**

SDS-PAGE/Western revelado con anticuerpo anti-ASR1. En las primeras tres calles se corrieron muestras controles: extracto nuclear con cromatina previa a inmunoprecipitación (INP = input); el mismo extracto diluido al quinto (INP<sub>1/5</sub>); y extracto diluido al quinto mezclado con 1  $\mu$ l de anticuerpo anti-ASR1 para observar si el anticuerpo desnaturalizado muestra bandas que interfieran con la visualización (tercera calle). En las últimas calles se corrieron las muestras inmunoprecipitadas (IP): muestra incubada con el anticuerpo pre-existente en el laboratorio y que sirve como control negativo (Ref) y muestras incubadas con el anticuerpo nuevo utilizando distintas cantidades de extracto nuclear inicial (N; N<sub>1/2</sub> y N<sub>1/4</sub>). El revelado se hizo como se indicó en materiales y Métodos. Marcado con flecha rellena se ve la banda de ASR1, mientras la flecha sin relleno indica la señal inespecífica en la tercera calle generada por la presencia de un exceso del primer anticuerpo agregado en la corrida, pese a la especificidad mencionada del segundo anticuerpo usado para revelar el Western.

## **Ensayos de ChIP con el nuevo anticuerpo anti-ASR1**

Debido a la alta expresión de ASR1 que se observa en frutos de tomate maduros [9], originalmente decidimos utilizar este tejido para el protocolo de ChIP y posterior “*deep sequencing*” como medio para la detección y análisis del ADN precipitado. Si bien con esta estrategia obtuvimos secuencias, éstas se alinearon uniformemente a lo largo del genoma conocido de tomate sin mostrar enriquecimiento claro de ninguna región en especial y sobre todo no se distinguieron del control precipitado con un anticuerpo no específico. Finalmente, realizamos un último ChIP en hojas de plantas de tomate estresadas y analizamos el precipitado mediante “*deep sequencing*”. Este último intento arrojó resultados más claros, como veremos a continuación.

Para poder interpretar mejor el posterior análisis bioinformático, antes fue conveniente determinar el tamaño promedio de los fragmentos del ADN de partida (INPUT) ofrecido para el ChIP con núcleos de hojas estresadas (que es el mismo tamaño que el de los fragmentos inmunoprecipitados y posteriormente secuenciados). Tal tamaño promedio fue determinado por electroforesis en gel de agarosa y resultó ser de 400 pb con el programa ImageJ [72] (**Figura 29**).



**Figura 29. Determinación del peso promedio de los fragmentos de ADN a inmunoprecipitar (INPUT).**

Se corrió en gel de agarosa el ADN fragmentado Input de hojas estresadas (INP) y un marcador de peso molecular (M: 100 pb *ladder*). Se cuantificó la intensidad de las bandas observadas en el marcador (izquierda) y en la muestra (derecha), observándose un valor promedio aproximado de 400 pb. Gel de agarosa 2 % revelado con bromuro de etidio y cuantificado con el *software* ImageJ [72].

### **Interpretación de los resultados de ChiP anti-ASR1 en hojas estresadas**

Para identificar las regiones enriquecidas experimentalmente, se utilizó el *software* Macs [61]. Este programa modela empíricamente el tamaño de los fragmentos secuenciados y usa una distribución dinámica de Poisson para encontrar picos locales en ambas muestras (material post-ChIP y el INPUT), es decir, busca zonas del genoma que contengan una mayor abundancia de lecturas en comparación con sus regiones circundantes.

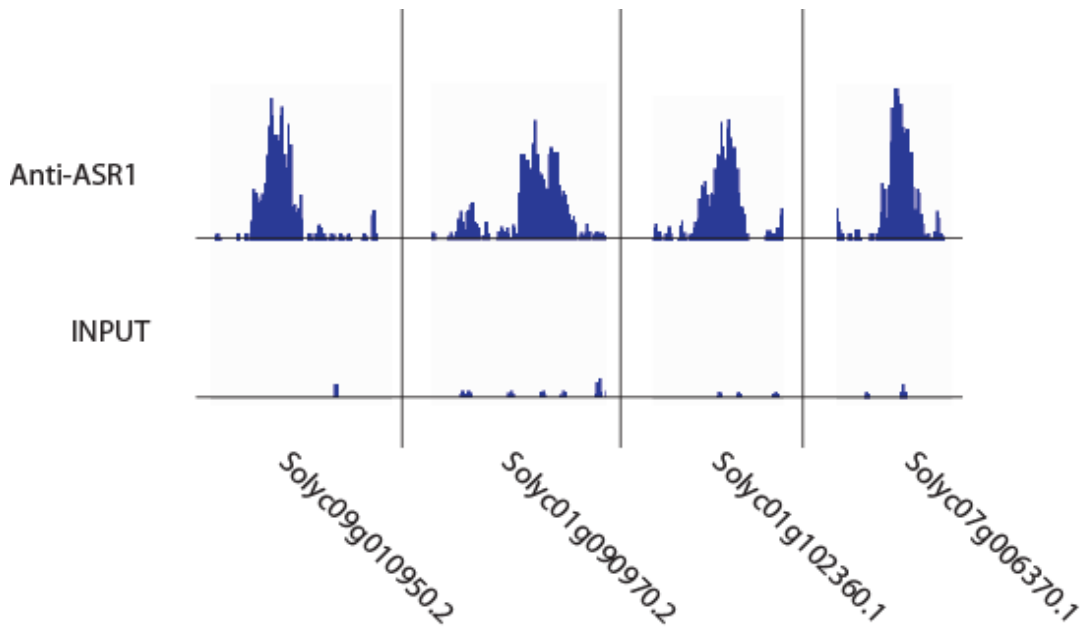
El análisis con el *software* Macs generó una lista de 225 regiones enriquecidas en la muestra precipitada (**algunos se muestran en Tabla 3**), en comparación con el INPUT. A modo de corroboración del análisis informático, se revisaron todos los picos obtenidos de los cuales se muestran 4 a modo ilustrativo (**Figura 30**). El análisis se realizó también con los programas cis-genome [73] y el paquete CSAR [62], pero éstos arrojaron falsos positivos y no se utilizaron para el posterior análisis.

Cromosoma	Inicio	Fin	Largo	Puntaje
Chr1	82955709	82956371	663	306
Chr7	1194442	1195252	811	286,97
Chr1	76438827	76439515	689	251,83
Chr5	4911834	4912728	895	236,06
Chr5	4907997	4908831	835	235,12
Chr9	4315702	4316286	585	230,55
Chr1	89187456	89187990	535	214,65
Chr8	61869092	61869619	528	201,54
Chr3	59054967	59055546	580	188,78
Chr9	58915814	58916418	605	184,69
Chr6	41195995	41196596	602	173,86
Chr2	46987902	46988604	703	173,8
Chr2	48205156	48205766	611	173,8
Chr12	6609432	6610083	652	173,8
Chr12	64009107	64009667	561	173,51

**Tabla 3. Picos obtenidos con el *software* Macs.**

Se muestran los 15 picos con mayor relevancia estadística identificados con el *software* Macs [61]. Para cada uno se indica el cromosoma, la posición de inicio y fin del pico, el largo del mismo y el puntaje representativo de su relevancia estadística.





**Figura 30. Corroboración manual de algunos de los picos observados, como ejemplos.**

En la figura se muestra la abundancia de algunas de las secuencias inmunoprecipitadas con anti-ASR1 o en el INPUT. Se contaron las lecturas que cayeron en ventanas de 150 pb y se graficó un histograma que muestra el número de lecturas a lo largo de 4 regiones diferentes donde se observaron picos con alta significancia estadística. Abajo se indican los códigos de los genes cercanos a los picos observados.

### Validación mediante qPCR de las secuencias inmuno-enriquecidas

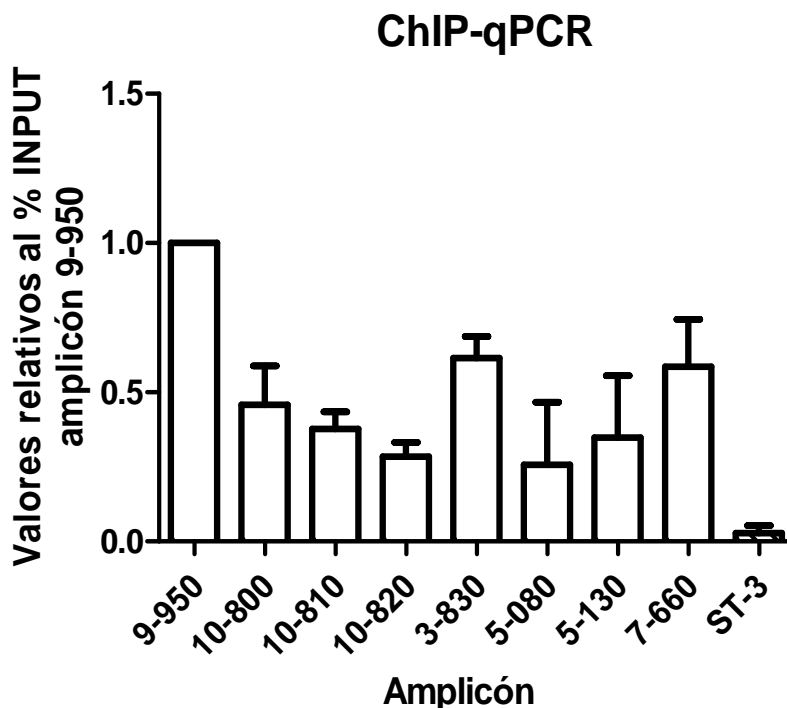
Para validar la autenticidad de los picos (regiones de ADN enriquecidas) observados como resultado del enfoque *genome-wide* elegido, se diseñaron *primers* para amplificar por PCR individualmente 8 loci, elegidos de acuerdo a su función bioquímica conocida (que *a priori* sonara lógica su relación con el estrés hídrico) o por un valor estadístico particularmente alto; y además *primers* para una novena región donde no hubo ningún pico, que se eligió como control negativo (**Tabla 4**).

Estas validaciones se realizaron usando como fuentes de ADN molde para la PCR Real Time: un duplicado de la muestra sometida a *deep sequencing* y también dos nuevos inmunoprecipitados obtenidos en las mismas condiciones. En las tres muestras se observó que los 8 loci elegidos se encontraron enriquecidos en comparación con el control negativo, ST-3 (**Figura 31**), confirmando la validez de los resultados a nivel global generados por ChiP-seq (estrategia *genome-wide*).

Amplificación	Gen	Función predicha
3-830	Solyc03g097830.2	Poly(A) polimerasa
5-080	Solyc05g008080.1	Acuaporina
5-130	Solyc05g056130.2	Subunidad de glicosil transferasa
7-660	Solyc07g062660.2	Proteína con bromodominio
9-950	Solyc09g010950.2	Proteasa de división celular
10-800	Solyc10g054800.1	Acuaporina
10-810	Solyc10g054810.1	Acuaporina
10-820	Solyc10g054820.1	Acuaporina
ST-3	Solyc09g074230.2	Transporte de azúcares

**Tabla 4. Loci elegidos para la validación de la estrategia *genome-wide***

En la tabla se detallan los 8 loci elegidos para la validación de los datos de ChIP-seq, indicando nombre completo del gen y su función predicha. El gen Solyc09g074230.2 (ST-3) se utilizó como control negativo (locus que no resultó inmuno-enriquecido). Las secuencias de todos los *primers* figuran en *Apéndice*.



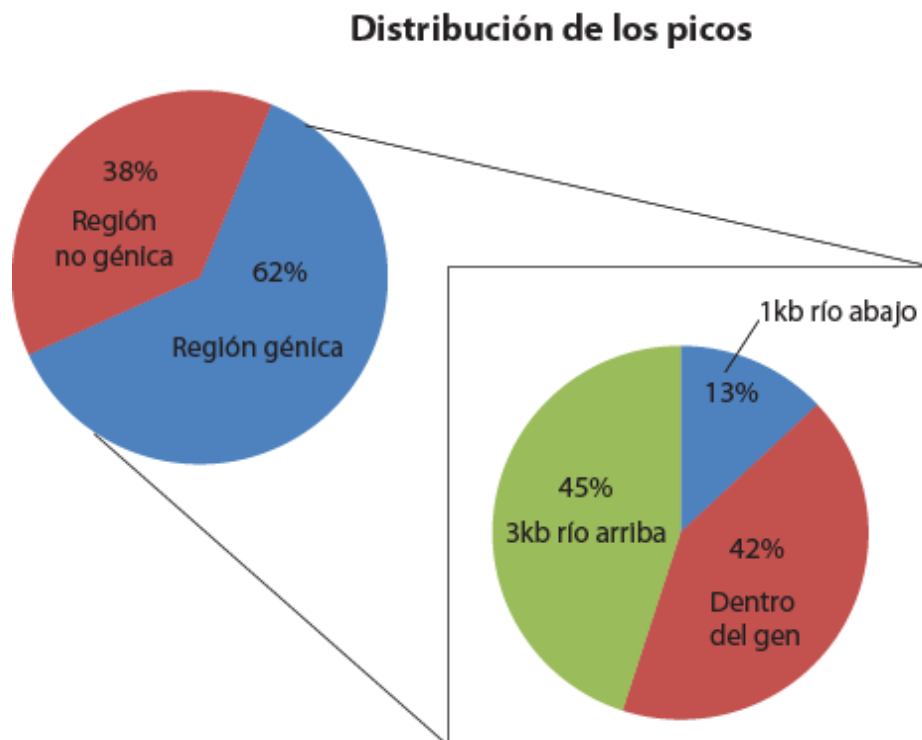
**Figura 31. Validación de las regiones genómicas enriquecidas detectadas por ChIP-seq.**

Se realizaron nuevos experimentos de ChIP y se cuantificó la abundancia de las distintas regiones indicadas en la **Tabla 4** mediante PCR en tiempo real (qPCR). Como control negativo se utilizó el amplicón ST-3. Para cada muestra se calculó el %INPUT y estos valores se graficaron relativos al %INPUT del amplicón 9-950, que fue el de mayor valor numérico. Los nombres de los amplicones son abreviaturas de los códigos de los genes (**Tabla 4**).

### **Análisis bioinformático global**

Una vez corroborado que el ChIP resultó reproducible y confiable, continuamos con un análisis más profundo de los datos. De las 225 regiones, observamos que el 62% de ellas se ubicaron dentro de “regiones génicas” definiéndolas como las comprendidas desde 3 kb río arriba del inicio de la transcripción hasta 1 kb río abajo del fin de la misma (**Figura 32**). Dentro de los picos encontrados en las regiones génicas, observamos que éstos se encuentran distribuidos entre la zona promotora (unas 3 kb

río arriba del inicio de la transcripción), la región codificante y la región río abajo al extremo 3' del gen. Un 45% de los picos observados se concentraron en la región promotora definida como aquella que abarca desde 3 kb río arriba del inicio de la transcripción hasta el inicio de la misma. Otro 42% se observó directamente dentro del gen y un reducido 13% se ubicó entre el fin de la transcripción y 1 kb río abajo a éste (**Figura 32**).



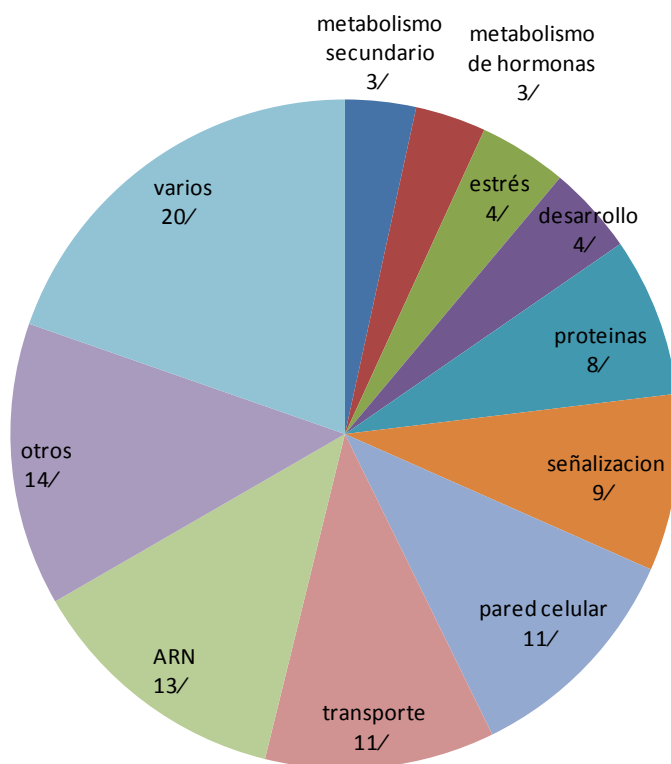
**Figura 32. Localización genómica de las regiones con “binding” a ASR1 en relación a genes.**

Se muestra el porcentaje de secuencias que se ubicaron entre 3 kb río arriba hasta 1 kb río abajo de genes y el porcentaje que se ubicó por fuera de estas regiones. Se observó que el 62% de las secuencias caen en regiones génicas. En el recuadro, dentro del 62% de los picos en regiones génicas, se muestra el porcentaje de secuencias que se ubicaron en la región promotora (desde 3 kb río arriba del inicio de la transcripción hasta el comienzo de la misma), directamente dentro del gen o ubicadas luego del fin de la transcripción (entre el fin y 1 kb río abajo del mismo).

### Clasificación de genes target de ASR1

Los genes que se encontraron asociados a ASR1 fueron clasificados utilizando el *software* Mapman [65] en colaboración con el Dr. Tomas Duffy (INTA Castelar). La categorización se realizó basada en la posible función de los genes, la cual, en la gran mayoría de los casos, se obtuvo por homología de secuencia y presencia de dominios de función conocida en otros organismos. Observamos una gran diversidad de grupos con diferentes funciones (**Figura 33**), de los cuales a simple vista resulta difícil extraer conclusiones.

#### Funciones celulares



**Figura 33. Funciones celulares representadas en nuestro set de datos.**

La clasificación se realizó basada en las funciones de los genes. Las categorías que representaban menos del 2% fueron agrupadas en “otros”. Se puede observar una gran diversidad de grupos con diversas funciones.

Para definir cuál de estos grupos de genes es significativo, se realizó el test estadístico P, que indica cuáles de estas categorías están sobre-representadas en comparación con su proporción en todo el genoma. Las categorías sobre-representadas incluyeron genes relacionados con la pared celular, con los de proteínas llamadas “intrínsecas” de membrana, por ejemplo acuaporinas, y otros genes agrupados en funciones varias (**Tabla 5**).

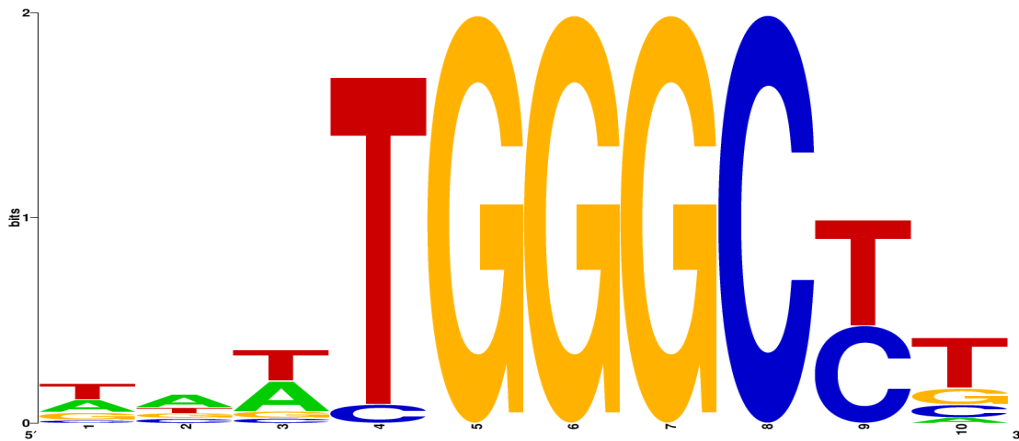
Grupo de función		Cantidad de secuencias	Estadístico P	% en muestra	% en genoma	Sobre-representación
Pared Celular	Síntesis de celulosa. Celulosa sintasa	4	1,38E-05	2,45%	0,08%	31
	Beta 1,3 glucano hidrolasas	3	5,40E-03	1,84%	0,12%	14,8
	Pectin esterasas	3	7,57E-03	1,84%	0,18%	10,5
	Degradación	4	9,84E-03	2,45%	0,12%	20,2
Transporte	Proteínas intrínsecas de membrana	5	2,78E-06	3,07%	0,02%	135,7
Varios	Varios	23	1,07E-05	14,11%	0,18%	80,5

**Tabla 5. Grupos funcionales sobre-representados.**

Se realizó una comparación entre los grupos de genes representados en nuestro set de datos y la abundancia de estos grupos en el genoma. En la tabla se muestran las categorías sobre-representadas, indicando la cantidad de secuencias encontradas en nuestro set de datos, el valor estadístico P, el porcentaje que estos representan en nuestra muestra, el porcentaje que se observa en el genoma de tomate y el cociente entre ambos porcentajes indicando cuantas veces mayor es la abundancia dentro de nuestro set de datos.

### Determinación de un motivo consenso de "binding" para ASR1

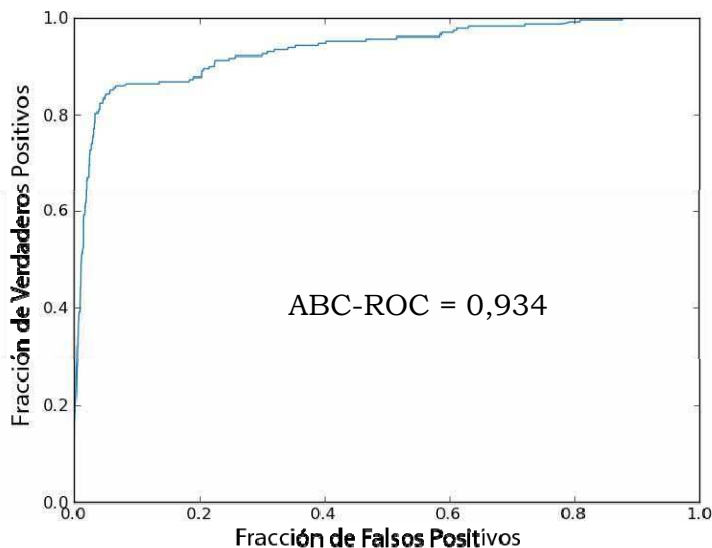
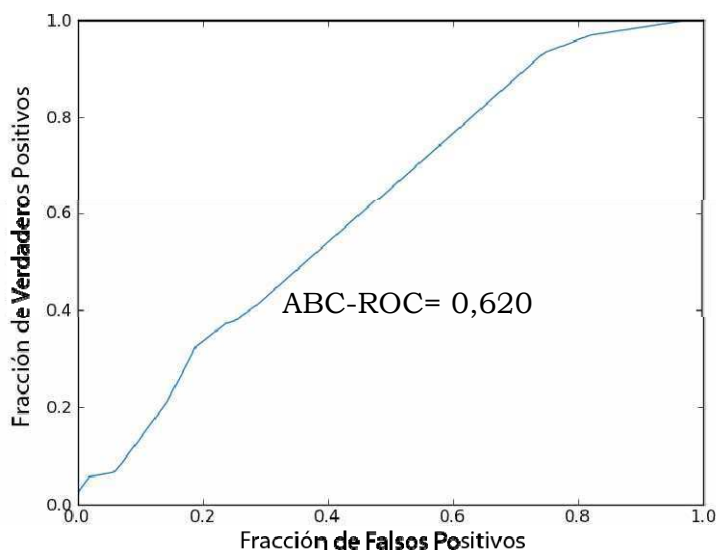
Se identificó una secuencia de ADN consenso, con 6 nucleótidos muy conservados, reconocida por ASR1 en colaboración con el Dr. Tomas Duffy. Se utilizó el *software* Gimmemotif [64]. Mediante esta herramienta bioinformática, hallamos un motivo consenso robusto para ASR1 (**Figura 35**).



**Figura 35. Motivo consenso de "binding" de ASR1.**

Se muestra la secuencia consenso de "binding" reconocida por ASR1. El tamaño de las letras es proporcional a la abundancia de cada base en cada posición. Se puede observar que el motivo consenso es TGGGC(T/C)T.

El programa arrojó 10 secuencias consenso, de las cuales la mostrada (**figura 35**) tiene una alta significancia estadística. Para calcular esta significancia, el programa grafica una curva ROC. En la curva ROC [74] se grafica la fracción de verdaderos positivos en función de la fracción de falsos positivos. A modo comparativo, se muestran las ROC de la mejor secuencia y de una secuencia con mal desempeño (**Figura 36**). El desempeño se mide por medio del área bajo la curva ROC (ABC-ROC), la cual oscila entre valores de 0,5 y 1, siendo la más cercana a 1 la que mejor desempeño tiene.

**ROC para TGGGC(T/C)T****ROC para CGTGGCGC**

**Figura 36. ROC. Valor estadístico de los motivos consenso encontrados.**

Se compara el desempeño de dos motivos consenso diferentes mediante curvas de ROC. Arriba la secuencia TGGGC(T/C)T muestra un valor de área bajo la curva (ABC-ROC) cercano a 1, indicando un buen desempeño, mientras en la curva de abajo una secuencia con mal desempeño muestra una ABC-ROC cercana a 0,5.



# DISCUSIÓN

---

## **Localización subcelular y oligomerización de ASR1**

### **-Localización de ASR1 in vivo y relevancia de su NLS**

Nuestros resultados experimentales muestran una localización predominantemente nuclear, con presencia de proteína en el citosol, que concuerda con lo reportado en otras proteínas heterólogas de ASR1. Sin embargo resulta evidente que esta concordancia no se da por la funcionalidad de la señal de localización nuclear, sino por el pequeño tamaño de ASR1, en contraste con el caso de LLA2 (homólogo de ASR1 en azucena) que desprovisto de su señal de localización nuclear no ingresa al núcleo [66]. Esto resulta particularmente llamativo ya que posee un pequeño peso molecular (16 kDa) y podría ingresar por simple difusión como lo hace en nuestro caso ASR1 de tomate. Estas diferencias se pueden explicar por el uso de distintos sistemas para la expresión de ASR1. En nuestro laboratorio utilizamos células epidérmicas de hojas de *Nicotiana benthamiana*, mientras que en cambio en el trabajo que describe a LLA2, se utilizó el modelo de *Chenopodium quinoa* (quinoa). Mientras en *Nicotiana benthamiana* la proteína GFP sola se encuentra en núcleo y citosol [39], en quinoa esta se encuentra recluida al citosol [66], de modo que aparentemente el mecanismo de difusión en quinoa no funciona para la proteína GFP. Es posible que los núcleos de las células de Quinoa sean más restrictivos en el ingreso de proteínas, tal vez por posibles diferencias a nivel de sus NPCs.

Nuestros ensayos preliminares mostraron que si reemplazamos la señal de NLS original de ASR1 por la proveniente de LLA23 y realizamos las fusiones a proteínas fluorescentes de alto peso molecular, esta nueva proteína quimérica no es capaz de ingresar al núcleo en nuestro modelo experimental. Además también se realizaron otros ensayos en los cuales se

agregaron dos lisinas al NLS de ASR1 de modo de emular el NLS de azucena (este NLS híbrido posee cuatro pares de lisinas), obteniéndose el mismo resultado. Estos dos experimentos parecen indicar que la funcionalidad de la NLS podría depender del organismo en el cual se encuentra o tal vez del contexto peptídico que la rodea. Con respecto a esta última posibilidad, cabe destacar que las fusiones artificiales a proteínas fluorescentes de alto peso no alteraron la funcionalidad de la NLS viral utilizada como control, lo cual sugiere que GFP no estaría enmascarando ni alterando la funcionalidad del péptido fusionado en su extremo carboxi-terminal.

### **-Dimerización y localización de los dímeros**

Ensayos *in vitro* sugieren que ASR1 de tomate puede adquirir estructura secundaria, dimerizar y finalmente unir ADN cuando se lo incubaba con  $Zn^{2+}$  [17]. También se ha sugerido que ASR1 estaría en su conformación de dímero en el núcleo donde actuaría como factor de transcripción y como monómero en el citosol actuando como osmoprotector y chaperona. Nuestros primeros experimentos de BiFC mostraron la presencia de dímeros en núcleo y citosol, que en principio podrían difundir libremente (dado que el dímero formado tiene un peso molecular menor a 50 kDa) y formarse en cualquiera de ambos compartimientos. Los ensayos de BiFC con proteínas de fusión de alto peso molecular, que quedan excluidas del núcleo, demuestran que ASR1 dimeriza en el citosol (**Figura 13**).

Llamativamente, se observó dimerización de dos proteínas que en principio estarían ubicadas en diferentes compartimientos sub-celulares (**figura 14**).

Esta observación se puede explicar de dos maneras:

- 1) La proteína quimérica ASR1:GUS:GFP:vNLS es traducida en el citosol, rápidamente dimeriza con ASR1:GUS:GFP y luego ingresa al núcleo.
- 2) Está descripto que, en células animales Hela, hay una muy pequeña fracción (aproximadamente el 0,33%) de los NPCs que tienen un poro de un tamaño un mayor que el resto (1,6 veces mayor radio) [37] y que

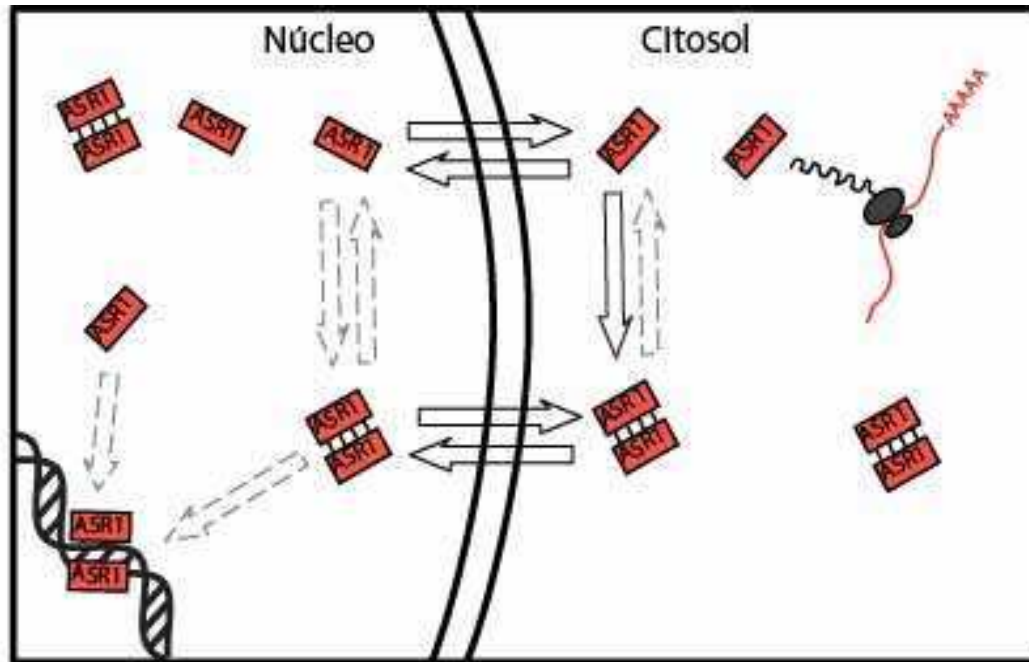
podrían permitir el paso de proteínas más grandes. Este paso estaría limitado por su poca abundancia y sería más lento. Este razonamiento, también explica que observemos una señal tenue en el núcleo en las construcciones que quedan mayormente excluidas (**figuras 8 y 13**).

Por otra parte, considerando que los dímeros formados en BiFC son estabilizados por el encuentro de ambas mitades de la proteína fluorescente [75], no resulta posible determinar si hay un equilibrio dinámico entre dímeros y monómeros, o si la mayoría de la proteína se encuentra como monómero o como dímero en los distintos compartimientos. Las proporciones de monómero/dímero podrían ser estudiadas *in vivo* mediante técnicas de microscopía avanzada como FRET [76] (Foster Resonance Energy Transfer) o por microscopia de correlación como N&B (Number and Brightness) [77].

Debido a este resultado no resulta posible distinguir si ASR1 ingresa al núcleo como dímero pre-formado, dimeriza en el mismo o si ocurren ambas cosas. No obstante nuestros resultados si concluyen por primera vez que ASR1 tiene la capacidad de formar dímeros *in vivo*, en el citosol.

### **-Modelo propuesto**

Basados en las conclusiones del trabajo y en la información disponible hasta ahora sobre ASR1, planteamos un modelo en el cual resaltamos nuestros aportes en el tema. El empleo de la técnica de BiFC nos lleva a hipotetizar que ASR1 formaría dímeros rápidamente en el citosol y que también se encuentra en forma dimérica dentro del núcleo, ya sea por dimerización en dicho compartimiento o por traslocación de dímeros preformados. Además demostramos la posibilidad de traslocación de dímeros y/o monómeros hacia el núcleo por simple difusión de manera independiente de la señal de localización nuclear. Los dímeros presentes en el citosol probablemente puedan unirse al ADN para ejercer regulación sobre la expresión génica (**Figura 37**)



**Figura 37: Modelo para la traslocación y dimerización de ASR1.**

Los monómeros y dímeros de ASR1 pueden ingresar o salir del núcleo por difusión simple, de una forma independiente de su NLS. Mientras que la formación de dímeros en el citosol quedó demostrada, los dímeros de ASR1 en el núcleo pueden derivar de dímeros preformados en el citosol o podrían formarse allí. ASR1 podría unirse al ADN como monómero o dímero para regular la expresión génica. Las flechas en línea sólida indican los eventos demostrados mientras las de línea punteada indican evento que aun no se demostraron *in vivo*.

### **Evaluación del protocolo de ChIP para tomate**

Los protocolos de ChIP para *Arabidopsis thaliana* no resultaron adecuados para tomate. El problema con la técnica es probablemente el arrastre de contaminantes junto con la cromatina que posiblemente inhiban los subsiguientes pasos. En particular algunos autores sugieren que los diferentes anticuerpos son sensibles a los contaminantes en distinto grado [47, 70] y lo demostraron utilizando distintas cantidades de cromatina para el inmunoprecipitado y obteniendo en algunos casos un mejor enriquecimiento en las muestras con menos cromatina. Durante este

trabajo modificamos el protocolo de ChIP existente para *Arabidopsis* [47] reemplazando en especial el paso del colchón de sacarosa, cuyo objetivo es la obtención de una fracción rica en núcleos, por un paso con un buffer con Percoll. Con esta modificación obtuvimos un *pellet* de núcleos con menor contaminación y lo suficientemente puro para poder ser digerido directamente con nucleasa micrococal. Este ensayo con la nucleasa micrococal abrió la posibilidad de la modificación del protocolo para hacer ChIP semi-nativo, en donde la fragmentación del ADN se realiza mediante digestión con nucleasa micrococal en vez de por sonicado. El uso de nucleasa micrococal permite la obtención de fragmentos de ADN muy uniformes del tamaño mononucleosomas, lo que permite el análisis de alta resolución de modificaciones de histonas ya que se utiliza la unidad más pequeña de la cromatina.

Con el fin de probar el ChIP para tomate utilizamos anticuerpos contra una modificación de Histona H3 (H3K9me2) asociada a transposones. La marca se encontró no solamente presente en transposones, sino también en genes activamente transcritos como el de actina (**Figura 19**). Esto nos resultó en un primer momento muy llamativo ya que esta modificación está asociada a transposones y regiones heterocromáticas en *Arabidopsis* [78, 79]. Sin embargo, existe un estudio que sugiere que las plantas con un genomas más pequeños, como por ejemplo *Arabidopsis thaliana* (170 Mb), tienden a tener las zonas de heterocromatina (ricas en transposones y secuencias repetitivas silenciadas) bien determinadas y separadas de la eucromatina (donde se encuentran la mayoría de los genes), mientras que plantas con genomas más grandes, como por ejemplo tomate (960Mb), tienden a tener heterocromatina más distribuída e incluso presente dentro de regiones eucromáticas [80]. A la luz de tales reportes nuestros datos no resultan tan sorprendentes, sin embargo cabe destacar que la relación entre el tamaño de los genomas y la heterocromatina fue determinada por

simple visualización de los cromosomas, revelados con anticuerpos contra H3K9me2 y no poseen la misma resolución que un ensayo de ChIP.

### **Ensayos de ChIP semi-nativo**

El protocolo ajustado en hojas fue utilizado exitosamente en muestras de fruto durante la estadía en la universidad de Cornell, en el laboratorio del Dr. Giovannoni. Los resultados obtenidos e ilustrados con dos genes característicos muestran que la marca de H3K4me3 está asociada a genes activamente transcritos como la actina, el cual se expresa a lo largo de todos los estadios de maduración del fruto. En el caso del gen *SlGLK2*, se observó una disminución en la marca H3K4me3, la cual es acompañada por un aumento en H3K27me3, considerada una marca represiva y antagonica de H3K4me3. Estas observaciones coinciden con las realizadas en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* [43, 49, 50]. Resultaría interesante realizar el ensayo de ChIP-seq con anticuerpos anti-H3K9me2 para corroborar si la planta de tomate se comporta diferente a *Arabidopsis thaliana* con respecto a esa marca en particular.

### **Determinación de probables blancos de ASR1**

Como se mencionó en la introducción, el anticuerpo a utilizar es un paso determinante en el éxito de esta técnica. El anticuerpo disponible originalmente en nuestro laboratorio no mostró capacidades de inmunoprecipitación (**Figura 24**). Creemos que el motivo de esta incapacidad es que tal anticuerpo había sido generado contra un péptido sintético corto ubicado en el N-terminal de la proteína ASR1. Es posible que esta región no se encuentre expuesta en los extractos donde las proteínas se encuentran en estado nativo e interactuando con otras moléculas. En general, se plantea que los anticuerpos policlonales, que reconocen muchos epítopes dentro de la proteína de interés, resultan más

efectivos a la hora de realizar ensayos de inmunoprecipitación que aquellos que reconocen un único epítotope. Nuestras pruebas demostraron que el nuevo anticuerpo generado tiene capacidades de inmunoprecipitación **(Figura 24)**. Si bien el anticuerpo fue purificado por cromatografía de afinidad por ASR1, dada la similitud entre ASR1 y ASR2 (83% de identidad) existe la posibilidad de que haya un reconocimiento cruzado. Para demostrar que esto no ocurre, o determinar en qué medida puede estar ocurriendo, se deberían hacer ensayos de especificidad con ASR2 recombinante. De todos modos, es importante mencionar que ASR2 de tomate tiene una expresión baja en comparación con la que muestra ASR1 en hojas de plantas estresadas [81].

Una vez concluido el ChIP, queda el interrogante de qué método utilizar para detectar el ADN precipitado. En casos en donde se conoce la región a buscar esto se puede realizar por Southern Blot, o real time PCR. Sin embargo, en el caso de búsqueda *de novo* de genes, las únicas opciones son clonado o secuenciación directa de todo el precipitado. En nuestro trabajo intentamos ambas opciones obteniendo únicamente resultados al realizar el ChIP seguido de "*deep sequencing*". Los datos mostraron 225 picos con diferentes valores de significancia estadística. Resulta importante destacar que si bien no se muestran, por razones de espacio, los resultados del ChIP-seq fueron analizados con otros dos programas además del *software* Macs. En los resultados que se obtuvieron con estos dos programas, cisgenome [73] y CSAR [62], observamos que los picos con un puntaje ("*score*") más alto resultaron estar presentes tanto en la muestra precipitada con anti-ASR1 como en el INPUT, en donde esperaríamos observar una distribución uniforme de las lecturas. Estos picos pre-existentes en el INPUT fueron descartados por el programa Macs. La aparición de estos picos artefactuales podría explicarse debido a que la secuencia del genoma de tomate no está totalmente depurada ni libre de errores [57]. Por ejemplo, si una secuencia altamente repetitiva en el

genoma tomate hubiese sido colocada una única vez en el mapa disponible, esto generaría una enorme cantidad de lecturas que se ubiquen en esa región. Otra explicación posible para esto puede ser una amplificación preferencial de estas regiones cuando se realizaron las reacciones de PCR durante la construcción de la biblioteca.

Del análisis con tres programas diferentes observamos que resulta fundamental utilizar varios para este tipo de análisis y elegir aquel o aquellos que tengan el mejor desempeño. Resultó también necesaria la observación manual de todos los picos para lograr determinar cual programa arrojó los resultados más consistentes.

### **Localización de los sitios genómicos de unión para ASR1**

La proteína ASR1 mostró una preferencia de unión en regiones génicas (62%), lo cual era esperado para un factor de transcripción. Si consideramos que la mayor parte del genoma, de tomate no codifica para genes (incluso considerando genes que codifican a ARNs regulatorios no traducidos), este porcentaje resulta aun más significativo. Al analizar más detalladamente la ubicación de los picos dentro de estas regiones génicas observamos que la mayoría de los picos se reparten entre la región promotora y el cuerpo de los genes. En este contexto está ampliamente aceptado que las secuencias regulatorias ya sean "*enhancers*" o "*silencers*" pueden ubicarse no sólo en la región promotora de los genes sino también dentro de los mismos e incluso pueden estarlo a grandes distancias de estos.



## **Clasificación de genes *target* de ASR1. Genes sobre-representados**

Este tipo de análisis capta las funciones sobre representadas pero difícilmente logra detectar genes únicos como relevantes. En el caso de factores de transcripción homeóticos o genes involucrados en alguna vía de señalización, un solo gen podría ser más relevante grupos de varios genes con funciones relacionadas. Sin embargo, a pesar de estas limitaciones, el análisis resultó muy informativo. Las funciones más afectadas fueron principalmente las relacionadas a la pared celular y las proteínas intrínsecas de membrana. Ambas funciones se encuentran estrechamente relacionadas con el estrés por falta de agua [82] y al crecimiento [83]. También se encontraron sobre-representados genes con funciones "varias". Esta diversidad de funciones es esperable en el caso de una respuesta frente a la falta de agua, la cual ocurre a nivel tisular, celular y molecular.

### **-Genes relacionados con la pared celular**

La pared celular es una estructura compleja que consiste en un entramado de celulosa-hemicelulosa embebida en una matriz de pectina y proteínas, y es fundamental para mantener la turgencia de las células. La celulosa se presenta en microfibrillas, las cuales son sintetizadas por un complejo de diferentes variantes de celulosa sintasa en el espacio periplásmico. Los demás componentes de la matriz (hemicelulosa y pectinas) son sintetizados dentro de la célula y secretados donde interactúan con la celulosa. La pérdida de agua en esta matriz resulta en una seria disrupción de la organización de sus polímeros, la cual según el caso puede ser irreversible [82]. Las plantas expuestas a estrés por falta de agua modifican las propiedades de su pared celular de modo de impedir el daño irreversible a la misma [82]. Además la presión de turgencia es fundamental en el mecanismo de crecimiento y división celular de las plantas [84]. De esta manera, como respuesta a la falta de agua, los tejidos

en activo crecimiento (como los ápices) flexibilizan su pared celular, mientras en los demás tejidos la misma se endurece, de modo de permitir que la planta siga creciendo a menores presiones de turgencia [85]. Lo más interesante es que el grupo de genes de pared observados abarca genes de síntesis de celulosa (3 genes de celulosa sintasa), genes de degradación de la pared y remodelación de la misma.

#### **-Genes de proteínas intrínsecas de membrana. Las acuaporinas**

Las proteínas intrínsecas de membrana son canales con seis pasos transmembrana que pueden transportar agua o solutos [86]. Las proteínas intrínsecas halladas en nuestro estudio pertenecen a la familia de las acuaporinas de membrana plasmática. Dentro de éstas, encontramos cuatro acuaporinas de la subfamilia XIP [87]. Esta subfamilia de acuaporinas no está presente en Arabidopsis y son transportadores de solutos como glicerol, urea y ácido bórico [87], esta función de transporte de solutos podría ser preponderante para el ajuste osmótico necesario ante situaciones de estrés como las impuestas en los experimentos de esta tesis. Además encontramos también una acuaporina del tipo NIP y otra del tipo TIP. Las acuaporinas TIP localizan en tonoplasto, mientras la localización de las acuaporinas de la familia NIP aún no está del todo dilucidada. Estas dos familias de acuaporinas transportan agua y en algunos casos también solutos. Se encuentra descrito que la exposición de las raíces a estrés salino induce cambios en la expresión de acuaporinas de la familia TIP entre otras [88]. Estos cambios incluyen tanto una disminución en la expresión como una relocalización subcelular de las proteínas existentes [88].

#### **-Genes con funciones "varias"**

Dentro de esta categoría, encontramos cuatro genes de citocromos P450. En plantas de arroz sometidas a estrés por falta de agua, se encontró un alto aumento en la expresión cinco genes de citocromos P450. Por otra

parte en *Arabidopsis* identificó un citocromo P450 (CYP707A), cuya expresión aumenta en condiciones de falta de agua y que tiene actividad de hidroxilasa de ácido absisico (ABA) [89], hormona vegetal paradigmática en los escenarios de respuesta a estreses abióticos [90]. Sin embargo, es necesario considerar que en *Arabidopsis* hay tantos como 272 genes que codifican para citocromos P450 y que estas proteínas resultan fundamentales para muchas otras funciones celulares. Al calcular cuán sobre-representados se encuentran los citocromos P450, observamos una relación de 2,5 veces. Sin embargo, esta escasa sobre-representación para el caso de los citocromos P450 podría resultar relevante si la función de estos pocos genes estuviesen relacionados con alguna vía de señalización como en el caso de CYP707A [89].

Finalmente, también se encontraron varios genes que codifican a plastocianinas, peroxidasas, glutatión S transferasas, todos genes asociados a procesos en los cuales intervienen o se generan especies reactivas de oxígeno (EROs, ROS en inglés). En plantas de maíz, el estrés por falta de agua induce un aumento en los niveles de ABA, lo cual a su vez produce un aumento en la producción de EROs y un concomitante aumento de expresión de genes de detoxificación de las mismas.

Aun se están realizando experimentos para determinar si los ARNm de los genes que poseen estos sitios de *binding* se encuentran diferencialmente expresados frente a condiciones de estrés por falta de agua y también observar si sus niveles de expresión se encuentran alterados en plantas cuyo ASR1 está silenciado.

### Secuencia consenso de *binding* para ASR1

Nuestros resultados mostraron un motivo consenso de *binding* de 6-7 nucleótidos con poca variación: **TGGGC(T/C)T**. Esta secuencia muestra coincidencia con la secuencia complementaria a la obtenida anteriormente por otros autores mediante la estrategia *in vitro* SELEX [18] (**Figura 38**).



**Figura 38: Motivo consenso y comparación con otro reportado anteriormente.**

La secuencia consenso se alineó con la secuencia complementaria a la obtenida por SELEX. Las bases que concuerdan totalmente están marcadas con líneas gruesas, mientras las concordancias parciales con línea delgada.

Nuestros resultados mostraron una secuencia más larga que la obtenida por SELEX, agregando información a lo previamente descrito. Además cabe destacar que el ensayo de ChIP captura las secuencias *in vivo* a diferencia de SELEX se basa en el *binding in vitro* con la proteína pura y el ADN desnudo sin asociar a histonas, una situación totalmente artificial.

Por otra parte, es interesante que nuestros datos de ChIP-seq no exhibieron enriquecimiento de promotores de los genes de tomate ortólogos al gen VvHT1 de uva [27], a tal punto que uno de ellos lo consideramos nuestro control negativo en las validaciones mediante qPCR. Este resultado es consistente con la ausencia de nuestra secuencia consenso en VvHT1 y con la presencia de la misma repetida varias veces en todas las

regiones enriquecidas por el ChIP realizado en esta Tesis. En este caso, resulta importante considerar que el gen VvHT1 fue "pescado" utilizando un sistema heterólogo [27] (levaduras, sin ASR endógeno). Además, VvHT1 normalmente se halla en un contexto nuclear (elementos en cis y factores en trans) que puede ser sustancialmente diferente al de los genes blanco de la proteína ASR1 de tomate, que por otra parte no es idéntica a la ASR de uva.

### **Conclusiones integradoras y perspectivas futuras**

#### **En cuanto a bioquímica y biología celular:**

En este trabajo hemos demostrado la presencia de dímeros en el núcleo. En este contexto, algunos autores han demostrado que ASR1 puede adquirir plegamiento y dimerizar *in vitro* en presencia de  $Zn^{2+}$  y en condiciones de deshidratación [17]. De este modo, ASR1 podría actuar como sensor celular de la falta de agua, adquiriendo un plegamiento definido y dimerizando. Por otro lado, tal plegamiento podría también estar relacionado con su función propuesta de chaperona en el citosol, no estudiada en esta Tesis. Resultaría muy interesante explorar un eventual cambio de conformación *in vivo* producido por el estrés, mediante el uso de la técnica de FRET y de constructos similares a los de la proteína Camaleón [3, 91], la cual modifica su fluorescencia al sufrir alteraciones conformacionales. Es también atractiva la opción de investigar la posibilidad de que la localización subcelular de ASR1 cambie, por ejemplo desde el citosol hacia el núcleo, en situaciones de estrés por falta de agua. Un experimento diseñado en este sentido debería realizarse con plantas transgénicas, dado que la expresión transiente resulta ya de por sí un gran estrés para las hojas y podría generar interpretaciones erróneas debido a artefactos metodológicos. En tal escenario, ASR1 podría regular la expresión de otros genes (ver párrafo siguiente), lo cual llevaría a tolerar las condiciones ambientales adversas generadas por la sequía.

**En cuanto a genómica:**

Se ha concluido que ASR1 de hojas de tomate es una proteína que en condiciones de falta de agua se une a determinados loci, con preferencia por la secuencia TGGGC(T/C)T, presente en genes asociados a la pared celular, en genes de acuaporinas y en muchos otros genes cuya relevancia funcional queda aún por establecer. Estos resultados refuerzan la noción, antes solamente sospechada, sobre la función de ASR1 como factor de transcripción que regula una amplia batería de genes.

Gracias a herramientas de mesada y de bioinformática combinadas, hemos descubierto un novedoso repertorio de genes blanco de un factor de transcripción exclusivo de plantas, algunos de los cuales están claramente involucrados en la respuesta fisiológica a la escasez de agua.

# Bibliografía

---

1. Marris E: Water: more crop per drop. *Nature* 2008, 452(7185):273-277.
2. Eckardt NA, Cominelli E, Galbiati M, Tonelli C: The future of science: food and water for life. *Plant Cell* 2009, 21(2):368-372.
3. Caramelo JJ, Iusem ND: When cells lose water: Lessons from biophysics and molecular biology. *Prog Biophys Mol Biol* 2009, 99(1):1-6.
4. Tunnacliffe A, Lapinski J: Resurrecting Van Leeuwenhoek's rotifers: a reappraisal of the role of disaccharides in anhydrobiosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003, 358(1438):1755-1771.
5. Bernacchia G, Furini A: Biochemical and molecular responses to water stress in resurrection plants. *Physiologia plantarum* 2004, 121(2):175-181.
6. Billi D, Potts M: Life and death of dried prokaryotes. *Res Microbiol* 2002, 153(1):7-12.
7. Brosche M, Vinocur B, Alatalo ER, Lamminmaki A, Teichmann T, Ottow EA, Djilianov D, Afif D, Bogeat-Triboulot MB, Altman A *et al*: Gene expression and metabolite profiling of *Populus euphratica* growing in the Negev desert. *Genome biology* 2005, 6(12):R101.
8. Franca MB, Panek AD, Eleutherio EC: Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2007, 146(4):621-631.
9. Maskin L, Frankel N, Gudesblat G, Demergasso MJ, Pietrasanta LI, Iusem ND: Dimerization and DNA-binding of ASR1, a small hydrophilic protein abundant in plant tissues suffering from water loss. *Biochem Biophys Res Commun* 2007, 352(4):831-835.
10. MAUSETH JD: Structure–Function Relationships in Highly Modified Shoots of Cactaceae. *Annals of Botany* 2006, 98(5):901-926.
11. Ackerson RC: Stomatal response of cotton to water stress and abscisic Acid as affected by water stress history. *Plant physiology* 1980, 65(3):455-459.
12. Yoshida Y, Kiyosue T, Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K: Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant & cell physiology* 1997, 38(10):1095-1102.
13. Iusem ND, Bartholomew DM, Hitz WD, Scolnik PA: Tomato (*Lycopersicon esculentum*) transcript induced by water deficit and ripening. *Plant physiology* 1993, 102(4):1353-1354.
14. Frankel N, Carrari F, Hasson E, Iusem ND: Evolutionary history of the Asr gene family. *Gene* 2006, 378:74-83.
15. Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Garciarrubio A, Campos F, Covarrubias AA: The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant physiology* 2008, 148(1):6-24.
16. Maskin L: Estudio de la familia génica Asr de tomate (*Lycopersicon esculentum*). Universidad de Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires; 2003.
17. Goldgur Y, Rom S, Ghirlando R, Shkolnik D, Shadrin N, Konrad Z, Bar-Zvi D: Desiccation and zinc binding induce transition of tomato abscisic acid stress ripening 1, a water stress- and salt stress-regulated plant-specific protein, from unfolded to folded state. *Plant physiology* 2007, 143(2):617-628.
18. Kalifa Y, Gilad A, Konrad Z, Zaccari M, Scolnik PA, Bar-Zvi D: The water- and salt-stress-regulated Asr1 (abscisic acid stress ripening) gene encodes a zinc-dependent DNA-binding protein. *Biochem J* 2004, 381(Pt 2):373-378.
19. Chou KC, Shen HB: Plant-mPLOC: a top-down strategy to augment the power for predicting plant protein subcellular localization. *PLoS One* 2010, 5(6):e11335.

20. Briesemeister S, Rahnenfuhrer J, Kohlbacher O: YLoc--an interpretable web server for predicting subcellular localization. *Nucleic acids research* 2010, 38(Web Server issue):W497-502.
21. Hawkins J, Davis L, Boden M: Predicting nuclear localization. *J Proteome Res* 2007, 6(4):1402-1409.
22. Dai JR, Liu B, Feng DR, Liu HY, He YM, Qi KB, Wang HB, Wang JF: MpAsr encodes an intrinsically unstructured protein and enhances osmotic tolerance in transgenic Arabidopsis. *Plant Cell Rep* 2011, 30(7):1219-1230.
23. Jha B, Lal S, Tiwari V, Yadav SK, Agarwal PK: The SbASR-1 Gene Cloned from an Extreme Halophyte *Salicornia brachiata* Enhances Salt Tolerance in Transgenic Tobacco. *Mar Biotechnol (NY)* 2012.
24. Konrad Z, Bar-Zvi D: Synergism between the chaperone-like activity of the stress regulated ASR1 protein and the osmolyte glycine-betaine. *Planta* 2008, 227(6):1213-1219.
25. Demir I, Samit Y: Seed quality in relation to fruit maturation and seed dry weight during development in tomato. *Seed Science and Technology* 2001, 29(2):453-462.
26. Atanassova R, Leterrier M, Gaillard C, Agasse A, Sagot E, Coutos-Thevenot P, Delrot S: Sugar-regulated expression of a putative hexose transport gene in grape. *Plant physiology* 2003, 131(1):326-334.
27. Cakir B, Agasse A, Gaillard C, Saumonneau A, Delrot S, Atanassova R: A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling. *Plant Cell* 2003, 15(9):2165-2180.
28. Frankel N, Nunes-Nesi A, Balbo I, Mazuch J, Centeno D, Iusem ND, Fernie AR, Carrari F: ci21A/Asr1 expression influences glucose accumulation in potato tubers. *Plant molecular biology* 2007, 63(5):719-730.
29. Shkolnik D, Bar-Zvi D: Tomato ASR1 abrogates the response to abscisic acid and glucose in Arabidopsis by competing with ABI4 for DNA binding. *Plant Biotechnol J* 2008, 6(4):368-378.
30. Liu HY, Dai JR, Feng DR, Liu B, Wang HB, Wang JF: Characterization of a novel plantain Asr gene, MpAsr, that is regulated in response to infection of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense and abiotic stresses. *J Integr Plant Biol* 2010, 52(3):315-323.
31. Moretti MB, Maskin L, Gudesblat G, García SC, Iusem ND: ASR1, a stress-induced tomato protein, protects yeast from osmotic stress. *Physiologia plantarum* 2006, 127(1):111-118.
32. Virlouvét L, Jacquemot MP, Gerentes D, Corti H, Bouton S, Gilard F, Valot B, Trouverie J, Tcherkez G, Falque M *et al*: The ZmASR1 protein influences branched-chain amino acid biosynthesis and maintains kernel yield in maize under water-limited conditions. *Plant physiology* 2011, 157(2):917-936.
33. Yang CY, Chen YC, Jauh GY, Wang CS: A Lily ASR protein involves abscisic acid signaling and confers drought and salt resistance in Arabidopsis. *Plant physiology* 2005, 139(2):836-846.
34. Hsu YF, Yu SC, Yang CY, Wang CS: Lily ASR protein-conferred cold and freezing resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol Biochem* 2011, 49(9):937-945.
35. Saumonneau A, Agasse A, Bidoyen MT, Lallemand M, Cantereau A, Medici A, Laloi M, Atanassova R: Interaction of grape ASR proteins with a DREB transcription factor in the nucleus. *FEBS Lett* 2008, 582(23-24):3281-3287.
36. Hoelz A, Debler EW, Blobel G: The structure of the nuclear pore complex. *Annu Rev Biochem* 2011, 80:613-643.



37. Mohr D, Frey S, Fischer T, Guttler T, Gorlich D: Characterisation of the passive permeability barrier of nuclear pore complexes. *EMBO J* 2009, 28(17):2541-2553.
38. Gorlich D: Transport into and out of the cell nucleus. *EMBO J* 1998, 17(10):2721-2727.
39. Grebenok RJ, Pierson E, Lambert GM, Gong F-C, Afonso CL, Haldeman-Cahill R, Carrington JC, Galbraith DW: Green-fluorescent protein fusions for efficient characterization of nuclear targeting. *The Plant Journal* 1997, 11(3):573-586.
40. Wang R, Brattain MG: The maximal size of protein to diffuse through the nuclear pore is larger than 60 kDa. *FEBS Letters* 2007, 581(17):3164-3170.
41. Lange A, McLane LM, Mills RE, Devine SE, Corbett AH: Expanding the Definition of the Classical Bipartite Nuclear Localization Signal. *Traffic* 2010, 11(3):311-323.
42. Pfluger J, Wagner D: Histone modifications and dynamic regulation of genome accessibility in plants. *Current opinion in plant biology* 2007, 10(6):645-652.
43. Chen M, Lv S, Meng Y: Epigenetic performers in plants. *Development, growth & differentiation* 2010, 52(6):555-566.
44. Zhang K, Sridhar VV, Zhu J, Kapoor A, Zhu JK: Distinctive core histone post-translational modification patterns in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 2007, 2(11):e1210.
45. Fuchs J, Demidov D, Houben A, Schubert I: Chromosomal histone modification patterns--from conservation to diversity. *Trends Plant Sci* 2006, 11(4):199-208.
46. Peterson D, Boehm K, Stack S: Isolation of milligram quantities of nuclear DNA from tomato (&Lycopersicon esculentum ), A plant containing high levels of polyphenolic compounds. *Plant Molecular Biology Reporter* 1997, 15(2):148-153.
47. Bowler C, Benvenuto G, Laflamme P, Molino D, Probst AV, Tariq M, Paszkowski J: Chromatin techniques for plant cells. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 2004, 39(5):776-789.
48. Das PM, Ramachandran K, vanWert J, Singal R: Chromatin immunoprecipitation assay. *Biotechniques* 2004, 37(6):961-969.
49. Zhang X, Bernatavichute YV, Cokus S, Pellegrini M, Jacobsen SE: Genome-wide analysis of mono-, di- and trimethylation of histone H3 lysine 4 in *Arabidopsis thaliana*. *Genome biology* 2009, 10(6):R62.
50. Zhang X, Yazaki J, Sundaresan A, Cokus S, Chan SW, Chen H, Henderson IR, Shinn P, Pellegrini M, Jacobsen SE *et al*: Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. *Cell* 2006, 126(6):1189-1201.
51. Millar CB, Grunstein M: Genome-wide patterns of histone modifications in yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006, 7(9):657-666.
52. Bhandare R, Schug J, Le Lay J, Fox A, Smirnova O, Liu C, Naji A, Kaestner KH: Genome-wide analysis of histone modifications in human pancreatic islets. *Genome Res* 2010, 20(4):428-433.
53. Sambrook J, Russell D: *The Condensed Protocols*: CSHL PRESS; 2006.
54. Ricardi MM, Guaimas FF, Gonzalez RM, Burrieza HP, Lopez-Fernandez MP, Jares-Erijman EA, Estevez JM, Iusem ND: Nuclear import and dimerization of tomato ASR1, a water stress-inducible protein exclusive to plants. *PLoS One* 2012, 7(8):e41008.
55. Larionov A, Krause A, Miller W: A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics* 2005, 6:62.
56. [[http://cancan.cshl.edu/labmembers/gordon/fastx\\_toolkit/](http://cancan.cshl.edu/labmembers/gordon/fastx_toolkit/)]
57. Consortium TTG: The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 2012, 485(7400):635-641.
58. [[http://solgenomics.net/organism/Solanum\\_lycopersicum/genome](http://solgenomics.net/organism/Solanum_lycopersicum/genome)]

59. Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL: Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome biology* 2009, 10(3):R25.
60. Robinson JT, Thorvaldsdottir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, Mesirov JP: Integrative genomics viewer. *Nature biotechnology* 2011, 29(1):24-26.
61. Zhang Y, Liu T, Meyer CA, Eeckhoute J, Johnson DS, Bernstein BE, Nusbaum C, Myers RM, Brown M, Li W *et al*: Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome biology* 2008, 9(9):R137.
62. Muino JM, Kaufmann K, van Ham RC, Angenent GC, Krajewski P: ChIP-seq Analysis in R (CSAR): An R package for the statistical detection of protein-bound genomic regions. *Plant methods* 2011, 7:11.
63. Team RC: R: A Language and Environment for Statistical Computing. In.; 2012.
64. van Heeringen SJ, Veenstra GJ: GimmeMotifs: a de novo motif prediction pipeline for ChIP-sequencing experiments. *Bioinformatics* 2010, 27(2):270-271.
65. Thimm O, Blasing O, Gibon Y, Nagel A, Meyer S, Kruger P, Selbig J, Muller LA, Rhee SY, Stitt M: MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 2004, 37(6):914-939.
66. Wang H-J, Hsu C-M, Jauh GY, Wang C-S: A lily pollen ASR protein localizes to both cytoplasm and nuclei requiring a nuclear localization signal. *Physiologia plantarum* 2005, 123(3):314-320.
67. Schumacher J, Sanger HL, Riesner D: Subcellular localization of viroids in highly purified nuclei from tomato leaf tissue. *EMBO J* 1983, 2(9):1549-1555.
68. Conconi A, Ryan CA: DNase I and micrococcal nuclease analysis of the tomato proteinase inhibitor I gene in chromatin. *J Biol Chem* 1993, 268(1):430-435.
69. O'Neill LP, Turner BM: Immunoprecipitation of native chromatin: NChIP. *Methods* 2003, 31(1):76-82.
70. Haring M, Offermann S, Danker T, Horst I, Peterhansel C, Stam M: Chromatin immunoprecipitation: optimization, quantitative analysis and data normalization. *Plant methods* 2007, 3:11.
71. Powell AL, Nguyen CV, Hill T, Cheng KL, Figueroa-Balderas R, Aktas H, Ashrafi H, Pons C, Fernandez-Munoz R, Vicente A *et al*: Uniform ripening encodes a Golden 2-like transcription factor regulating tomato fruit chloroplast development. *Science* 2012, 336(6089):1711-1715.
72. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW: NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012, 9(7):671-675.
73. Ji H, Jiang H, Ma W, Johnson DS, Myers RM, Wong WH: An integrated software system for analyzing ChIP-chip and ChIP-seq data. *Nature biotechnology* 2008, 26(11):1293-1300.
74. Fan J, Upadhye S, Worster A: Understanding receiver operating characteristic (ROC) curves. *Cjem* 2006, 8(1):19-20.
75. Kerppola TK: Visualization of molecular interactions by fluorescence complementation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006, 7(6):449-456.
76. Jares-Erijman EA, Jovin TM: FRET imaging. *Nature biotechnology* 2003, 21(11):1387-1395.
77. Digman MA, Dalal R, Horwitz AF, Gratton E: Mapping the number of molecules and brightness in the laser scanning microscope. *Biophysical journal* 2008, 94(6):2320-2332.
78. Mathieu O, Probst AV, Paszkowski J: Distinct regulation of histone H3 methylation at lysines 27 and 9 by CpG methylation in Arabidopsis. *EMBO J* 2005, 24(15):2783-2791.

79. Bernatavichute YV, Zhang X, Cokus S, Pellegrini M, Jacobsen SE: Genome-wide association of histone H3 lysine nine methylation with CHG DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 2008, 3(9):e3156.
80. Houben A, Demidov D, Gernand D, Meister A, Leach CR, Schubert I: Methylation of histone H3 in euchromatin of plant chromosomes depends on basic nuclear DNA content. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 2003, 33(6):967-973.
81. Maskin L, Gudesblat GE, Moreno JE, Carrari FO, Frankel N, Sambade A, Rossi M, Iusem ND: Differential expression of the members of the *Asr* gene family in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Science* 2001, 161(4):739-746.
82. Moore JP, Vicre-Gibouin M, Farrant JM, Driouich A: Adaptations of higher plant cell walls to water loss: drought vs desiccation. *Physiologia plantarum* 2008, 134(2):237-245.
83. Lu Z, Neumann PM: Water stress inhibits hydraulic conductance and leaf growth in rice seedlings but not the transport of water via mercury-sensitive water channels in the root. *Plant physiology* 1999, 120(1):143-152.
84. CT. B, KW W: *Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls*, Second Edition edn; 1996.
85. Wu Y, Cosgrove DJ: Adaptation of roots to low water potentials by changes in cell wall extensibility and cell wall proteins. *Journal of experimental botany* 2000, 51(350):1543-1553.
86. Zardoya R: Phylogeny and evolution of the major intrinsic protein family. *Biol Cell* 2005, 97(6):397-414.
87. Bienert GP, Bienert MD, Jahn TP, Boutry M, Chaumont F: Solanaceae XIPs are plasma membrane aquaporins that facilitate the transport of many uncharged substrates. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 2011, 66(2):306-317.
88. Boursiac Y, Chen S, Luu DT, Sorieul M, van den Dries N, Maurel C: Early effects of salinity on water transport in *Arabidopsis* roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. *Plant physiology* 2005, 139(2):790-805.
89. Kushiro T, Okamoto M, Nakabayashi K, Yamagishi K, Kitamura S, Asami T, Hirai N, Koshiba T, Kamiya Y, Nambara E: The *Arabidopsis* cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *EMBO J* 2004, 23(7):1647-1656.
90. Jiang M, Zhang J: Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. *Journal of experimental botany* 2002, 53(379):2401-2410.
91. Truong K, Sawano A, Mizuno H, Hama H, Tong KI, Mal TK, Miyawaki A, Ikura M: FRET-based in vivo Ca<sup>2+</sup> imaging by a new calmodulin-GFP fusion molecule. *Nat Struct Biol* 2001, 8(12):1069-1073.

# APÉNDICE

---

## **Soluciones buffer y reactivos**

Los buffers que contienen sacarosa fueron autoclavados para evitar su contaminación. Los componentes subrayados fueron agregados a las soluciones el justo antes de usarlas, teniendo especialmente cuidado de agregar los inhibidores de proteasas en frío y con el buffer pre-enfriado.

### **Buffers**

#### **Bufere extraccion 1**

0,44 M	Sacarosa
10 mM	Tris-HCl ph 8,0
<u>5 mM</u>	<u><math>\beta</math>-Mercaptoetanol</u>
<u>0,1 mM</u>	<u>PMSF</u>

#### **Bufere extraccion 2**

0,25 M	Sacarosa
10 mM	Tris-HCl ph 8,0 }
10 mM	MgCl <sub>2</sub>
<u>1%</u>	<u>Triton X-100</u>
<u>5 mM</u>	<u><math>\beta</math>-Mercaptoetanol</u>
<u>0,1 mM</u>	<u>PMSF</u>
<u>Inhibidores de proteasas SIN EDTA</u>	

**Buffer 95% Percoll**

0,25 M	Sacarosa
10 mM	Tris-HCl ph 8,0
10 mM	MgCl <sub>2</sub>
95 %	Percoll
<u>1 %</u>	<u>Triton X-100</u>
<u>5 mM</u>	<u>β-Mercaptoetanol</u>
<u>200 μM</u>	<u>PMSF</u>

Inhibidores de proteasas SIN EDTA

**Bufen extracion 3**

1,7 M	Sacarosa
10 mM	Tris-HCl ph 8,0 }
2 mM	MgCl <sub>2</sub>
<u>0,15 %</u>	<u>Triton X-100</u>
<u>5 mM</u>	<u>β-Mercaptoetanol</u>
<u>0,1 mM</u>	<u>PMSF</u>

Inhibidores de proteasas SIN EDTA

**Lisis nuclear**

50 mM	Tris-HCl ph 8,0
10 mM	EDTA
1 %	SDS
<u>0,1 mM</u>	<u>PMSF</u>

Inhibidores de proteasas CON o SIN EDTA

**Dilución**

16,7 mM	Tris-HCl ph 8,0
1,1 %	Tritón X-100
1,2 mM	EDTA
167mM	NaCl

Inhibidores de proteasas CON o SIN EDTA

**Buffer resuspensión nuclear**

20 %	Glicerol
50 mM	Tris-HCl ph 8,0
5 mM	MgCl <sub>2</sub>
<u>5 mM</u>	<u>β-Mercaptoetanol</u>
<u>0,1 mM</u>	<u>PMSF</u>

Inhibidores de proteasas CON o SIN EDTA

**Elución**

1 %	SDS
0,1 M	NaHCO <sub>3</sub>

**Buffer baja sal**

20 mM	Tris-HCl ph 8,0
150 mM	NaCl
0,1 %	SDS
1 %	Tritón X-100
2 mM	EDTA
<u>0,1 mM</u>	<u>PMSF</u>

**Buffer alta sal**

20 mM	Tris-HCl ph 8,0
500 mM	NaCl
0,1 %	SDS
1 %	Tritón X-100
2 mM	EDTA
<u>0,1 mM</u>	<u>PMSF</u>

**Buffer LiCl**

10 mM	Tris-HCl ph 8,0
0,25 M	LiCl
1 %	NP-40
1 %	Deoxicolato de sodio
1 mM	EDTA
<u>0,1 mM</u>	<u>PMSF</u>

**TE**

10 mM	Tris-HCl ph 8,0
1 mM	EDTA

**LB**

10 g/l	Extracto de Peptona
5 g/l	Extracto de Levadura
10 g/l	Cloruro de Sodio

**Buffer digestión micrococal**

50 mM	Tris-HCl ph 8,0
5mM	Acetato de magnesio
25%	Glicerol
1mM	Cl <sub>2</sub> Ca

**Buffer acoplamiento**0,1 M NaHCO<sub>3</sub>

0,5 M NaCl

ph = 8,4

**Buffer ácido**

0,1 M NaHCOOH

0,5 M NaCl

ph = 4

**Buffer bloqueo**

0,2 M Glicina ph=8

**Buffer extracción de proteínas**

50mM TRIS ph=7,4

1mM EDTA

1mM DTT

**Buffer de elución**

0,2 M Ácido acético, pH 2.7,

500 mM NaCl

**Soluciones luminol****Solución A**

100 mM Tris-HCl ph=8,5

2,5 mM luminol

0,4 mM ácido cumárico



**Solución B**

100 mM Tris-HCl ph=8,5

0,1 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**PBS**

137 mM NaCl

10 mM Phosphate

2,7 mM KCl

ph = 7,4

**Mezcla de tierra**

4 Tierra autoclavada

2 Turba

1 Perlita

1 Bermiculita

**"Primers" para Real Time**

<b>Amplicon</b>	<b>Primer</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Eficiencia PCR</b>
T135	Fw	CCAGCCATAACAACCAACTTC	96,5%
	Rev	GCAGACCACCAAATCCAACTC	
To1	Fw	CCATCCTTTACTTCCATCATTG	99,5%
	Rev	ATCACATAGACCTCCTCGTTTC	
To3	Fw	ATGAAGAGGAAGAAGAATACCG	97,0%
	Rev	TGGCAATGATGAGTGAAGAG	
EF-1	Fw	GATTGGTGGTATTGGAAGTGC	96,5%
	Rev	AGCTTCGTGGTGCATCTC	
UBI3	Fw	GCCGACTACAACATCCAGAAGG	97,0 %
	Rev	TGCAACACAGCGAGCTTAACC	
9-950	Fw	TAACCCTTGTGAGCCCATTC	91,1%
	Rev	AGTTGATGAAAGCCCAGCAC	
10-800	Fw	TTGCCCTATGGCAGAAAGAG	89,5%
	Rev	TAGCCCGGACTCAATAATGG	
10-810	Fw	GCCTCTTTTAGCGGTGATTG	97,5%
	Rev	TTGGCCTTGTCACTGTCTTG	
10-820	Fw	AAGGAAACCCATACATCACC	99,3%
	Rev	GGGTTGTTAAGGCTTTGTCG	
3-830	Fw	TGGACCGATGACATCTTAGC	98,8%
	Rev	AAGACTCTGGACTCGGGTTG	
5-080	Fw	TCCTCGAACATGACTCGAAC	90,5%
	Rev	TGGCCAATACTTCTTGCTG	
5-130	Fw	AACAAGCTTTGGGCTTTGG	93,0%
	Rev	TGTTGGCCCAGTCTATTGAG	
7-660	Fw	CCCAAAGCAACAGTTGTCAC	94,0%
	Rev	GGGCTTCTAGGCCTGTATTTTC	
ST-3	Fw	GGATGAGCATCATATGCGTAG	98,8%
	Rev	TTTACACGTCTCTGCCAAG	

**Clonados****-Vectores**

<b>Vector</b>	<b>Características</b>
pCAMBIA 1300[78]	Vector Binario sin promotor
pCAMBIA 1302[78]	Vector Binario con GFP
pCAMBIA 1303[78]	Vector Binario GUS-GFP
pCAMBIA 1304[78]	Vector Binario GFP-GUS
pSAT1-cEYFP-C1-B	Vector Binario con cEYFP
pSAT1-nEYFP-C1	Vector Binario con nEYFP
pVYNE-R	Vector binario con nVenus
pVYCE-R	Vector binario con cVenus
pDONOR 207	Vector de ingreso a gateway
pGWB2	Vector Binario de expresión

**- "Primers"**

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Características</b>
ASR1 Fw	AACCATGGAGGAGGAGAAAC	Sitio Nco I
ASR1 Rev	TGCCATGGCGAAGAGATGGTGGTGTCC	Sitio Nco I
sNLS Rev	AACCATGGTCTCATGATGCTCATGGAAT	Sitio Nco I
pNLS Fw	CATGGGTAAAAAAGATGCCAAGAAAGA AAAAAAGCTGAGGC	Sitio Nco I
pNLS Fw	CATGGCCTCAGCTTTTTTTCTT CTTCTTGGCATCTTTTTTACC	Sitio Nco I
NLS+ Fw	ACTCCATGGGACAGCCTTCTCTTAAACGCAT GAAAATAGAGCCATCTTCTCAACCCATGGTA G	Sitio Nco I
NLS+ Rev	TGAGGTACCCTGTTCGGAAGAGAATTTGCGT ACTTTTATCTCGGTAGAAGAGTTGGGTACCA TC	Sitio Nco I
ASR1 Bifc Fw	AGATCTATGGAGGAGGAGAAAC	Sitio Bgl II
ASR1 Bifc Rev	GAATTCAGAAGAGATGGTGGTG	Sitio Eco RI
Cassete Bifc Fw	CCGAAGCTTGCCTCTTCGCTATTACGC	Sitio Hind III
Cassete Bifc Rev	TCAAAGCTTGCTTTACACTTTATGCTTCCG	Sitio Hind III
ASR1 AttB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT CATGGAGGAGGAGAAACAC	Sitio AttB1
ASR1 AttB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT TAGAAGAGATGGTGGTG	Sitio AttB2
GUS AttB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC ACTGCTGCGGTTTTTC	Sitio AttB2
GUS-vNLS 1	AGATGGCTCTATTTTCATGCGTTTAAGAGAA GGCTGCTGCTGCGGTTTTTC	
GUS-vNLS AttB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC AAGGTTGAGAAGATGGCTCTAT	Sitio AttB2

**-Detalle clonados**

<b>Constructo</b>	<b>Templado</b>	<b>Fw</b>	<b>Rev</b>	<b>Vector</b>	<b>Tipo de clonado</b>
ASR1-GFP	ASR1 en pGEMT	ASR1 Fw	ASR1 Rev	pCambia1302	Restricción
ASR1sNLS-GFP	ASR1 en pGEMT	ASR1 Fw	sNLS Rev	pCambia1302	Restricción
pNLS-GFP	anillado	pNLS Fw	pNLS Rev	pCambia1302	Anillado y restricción
vNLS-GFP	anillado	NLS+ Fw	NLS+ Rev	pCambia1302	Anillado y fosforilación
ASR1-GUS-GFP	ASR1 en pGEMT	ASR1 Fw	ASR1 Rev	pCambia1303	Restricción
ASR1sNLS-GUS-GFP	ASR1 en pGEMT	ASR1 Fw	sNLS Rev	pCambia1303	Restricción
pNLS-GUS-GFP	anillado	pNLS Fw	pNLS Rev	pCambia1303	Anillado y restricción
vNLS-GUS-GFP	anillado	NLS+ Fw	NLS+ Rev	pCambia1303	Anillado y fosforilación
ASR1-GFP-GUS	ASR1 en pGEMT	ASR1 Fw	ASR1 Rev	pCambia1304	Restricción
ASR1sNLS-GFP-GUS	ASR1 en pGEMT	ASR1 Fw	sNLS Rev	pCambia1304	Restricción
pNLS-GFP-GUS	anillado	pNLS Fw	pNLS Rev	pCambia1304	Anillado y restricción
vNLS-GFP-GUS	anillado	NLS+ Fw	NLS+ Rev	pCambia1304	Anillado y fosforilación
Cassete ASR1-cEYFP	ASR1 en pGEMT	ASR1 Bifc Fw	ASR1 Bifc Rev	pSAT1-cEYFP-C1-B	Restricción
Cassete ASR1-nEYFP	ASR1 en pGEMT	ASR1 Bifc Fw	ASR1 Bifc Rev	pSAT1-nEYFP-C1	Restricción
Epresion ASR1-cEYFP	Cassete ASR1-cEYFP	Cassete Bifc Fw	Cassete Bifc Rev	pCambia1300	Restricción
Epresion ASR1-nEYFP	Cassete ASR1-nEYFP	Cassete Bifc Fw	Cassete Bifc Rev	pCambia1300	Restricción
pDONOR207-ASR1	ASR1 en pGEMT	ASR1 AttB1	ASR1 AttB2	pDONOR207	Recombinación BP
pDONOR207-ASR1-GUS	ASR1-GUS-GFP	ASR1 AttB1	GUS AttB2	pDONOR207	Recombinación BP
ASR1-GUS-vNLS 1	ASR1-GUS-GFP	ASR1 AttB1	GUS-vNLS 1	No se clonó	Producto intermedio de PCR
pDONOR207-ASR1-GUS-vNLS	ASR1-GUS-vNLS 1	ASR1 AttB1	GUS-vNLS AttB2	pDONOR207	Recombinación BP

Parámetros Macs

**Parámetros Macs**

This file is generated by MACS version 1.4.2 20120305

ARGUMENTS LIST:

name = m\_chip

format = AUTO

ChIP-seq file = chip\_a8.bam

control file = input.bam

effective genome size = 7.00e+08

band width = 200

model fold = 10,30

pvalue cutoff = 1.00e-05

Large dataset will be scaled towards smaller dataset.

Range for calculating regional lambda is: 1000 bps and 10000 bps

tag size is determined as 51 bps

total tags in treatment: 6977570

tags after filtering in treatment: 6977570

maximum duplicate tags at the same position in treatment = 1

Redundant rate in treatment: 0.00

total tags in control: 2071128

tags after filtering in control: 2071128

maximum duplicate tags at the same position in control = 1

Redundant rate in control: 0.00

d = 54

**Parámetros Gimmemotif**

lwidth 500  
backgroundgenomic\_matched,random  
tools MDmodule, MEME, MotifSampler, trawler, Improbizer,  
BioProspector, Weeder  
weird\_option False  
use\_strand False  
abs\_max 1000  
analysis large  
enrichment 1.5  
width 200  
keep\_intermediate False  
genome Slyco  
fraction 0.2  
cluster\_threshold 0.95  
max\_time None  
available\_tools, MDmodule, MEME, GADEM, MotifSampler, trawler,  
Improbizer, BioProspector, Weeder  
user\_background None  
pvalue 0.05  
markov\_model 1