

## **Las relaciones complejas entre los distintos elementos que participan en la regulación de la expresión génica en plantas y sus nexos con la Biotecnología.**

**Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. CC 242. Paraje «El Pozo»**

**Tel/Fax: +54 (0342) 4575219**

**E-mail: [rchan@fcb.unl.edu.ar](mailto:rchan@fcb.unl.edu.ar)**

### ***Regulación de la expresión génica en plantas***

Las plantas han adquirido evolutivamente la capacidad de modificar eventos específicos del desarrollo como respuesta a los cambios en las condiciones ambientales y de este modo optimizar la utilización de nutrientes disponibles. Esta plasticidad representa una ventaja significativa ya que el programa de expresión de genes que gobierna el desarrollo puede ser variado de acuerdo a las condiciones externas.

Las plantas perciben las señales del medio ambiente y las transmiten a la maquinaria celular. De esta forma activan procesos utilizando mecanismos variados y complejos que les permiten adaptarse a las nuevas condiciones de crecimiento. La respuesta consiste, en general, en cambios en el tipo, cantidad o actividad de determinadas proteínas de la planta, generando proteínas útiles para las nuevas condiciones y eliminando las superfluas. Esto implica la activación o inactivación de los genes a partir de los cuales estas proteínas son sintetizadas, procesos que suelen estar gobernados por un lado, por factores de transcripción y por otro por la presencia de elementos presentes en las regiones promotoras de los genes regulados. Además de este nivel de regulación de la expresión génica que podemos llamar transcripcional, existen otros puntos de regulación que incluyen las vías de procesamiento de los ARN mensajeros, el transporte de los mismos una vez maduros, su traducibilidad y por último el procesamiento y transporte, cuando ha lugar, de las proteínas codificadas. Más recientemente se han descrito mecanismos de silenciamiento de genes mediados por micro ARNs ya sean estos codificantes o no, como un punto importante de regulación de la expresión génica (para una revisión ver Balcoumbre, 2004).

### ***Los factores de transcripción***

Los elementos bioquímicos que actúan en *trans* son factores de transcripción, proteínas capaces de reconocer secuencias específicas de ADN localizadas en determinados genes (elementos que actúan en *cis*), alterando de esta manera la expresión de los mismos. La regulación de la expresión génica está gobernada en gran medida por la interacción de estos factores con las secuencias de ADN presentes en las regiones promotoras de los genes blanco en forma positiva o negativa, o sea induciendo o reprimiendo específicamente la expresión de otros genes.

En plantas, se han identificado y caracterizado numerosos genes que codifican factores de transcripción. La comparación de las secuencias aminoacídicas con las identificadas y caracterizadas en animales indica que estas proteínas están compuestas por segmentos o dominios presentes en ambos reinos. Esto sugeriría que los mecanismos fundamentales de regulación de la expresión génica serían similares. Sin embargo, la idea más aceptada actualmente es que si bien los dominios funcionales de los factores de transcripción están conservados en especies muy distantes, no necesariamente éstos están involucrados en la regulación del mismo tipo de evento.

Este hecho se puede ejemplificar con la familia de factores de transcripción que contienen homeodominios. La mutación puntual o expresión ectópica de este tipo de proteínas en *Drosophila melanogaster*, genera el fenómeno de homeosis, que es el cambio de un segmento corporal por otro (Gehring, 1987; Gehring *et al.*, 1994). Sin embargo, las proteínas encontradas en plantas que tienen un homeodominio en su estructura, no se han comportado como homeóticas. Son otros, los factores de transcripción llamados MADS, los que en plantas podrían asimilarse funcionalmente a los homeóticos de animales. Las proteínas codificadas por los genes MADS están involucradas principalmente en los procesos asociados al desarrollo floral (Dezar *et al.*, 2003; Moore *et al.*, 2005).

Por su lado, los factores de transcripción de plantas que tienen un homeodominio en su estructura, intervienen en procesos del desarrollo vegetal asociados a respuestas específicas a las condiciones medioambientales. Las proteínas codificadas por decenas de genes de este tipo en cada especie vegetal fueron divididas en distintas familias y subfamilias de acuerdo a la conservación de la secuencia de aminoácidos dentro y fuera del homeodominio, a su tamaño, a la presencia de otros motivos proteicos y a la composición estructural de los genes que las codifican que incluyen la presencia y ubicación de intrones y exones. Estos grupos se pueden identificar como: HD-Zip (subdividida en tres subfamilias), Glabra, FWA, Wuschel, PHD-finger, Knotted y Bell. Además de las características estructurales que las definen, los

miembros de cada una de estas familias parecen estar relacionados funcionalmente (Sचना y Davis, 1992; Sचना y Davis, 1994; Chan *et al.*, 1998; Henriksson *et al.*, 2005).

### ***¿Cuál es la contribución de nuestro grupo al conocimiento en este campo?***

Nuestro grupo de trabajo se ha dedicado a investigar la estructura de genes que codifican factores de transcripción de girasol, la interacción de las proteínas codificadas con sus secuencias blanco de ADN, la regulación de su expresión, su función específica en el desarrollo vegetal y la respuesta adaptativa a las condiciones externas. El objetivo general de nuestro proyecto es aunar los conocimientos estructurales y funcionales, de forma de poder contestar a preguntas básicas como: ¿Cuál es la función específica de cada uno de estos genes? ¿Cómo interaccionan con las regiones promotoras de otros genes? ¿Qué genes están regulando? ¿Cuáles inhiben y cuáles activan?

Planteándonos estas preguntas básicas es que iniciamos nuestro trabajo aislando genes pertenecientes a las distintas familias de genes con caja homeótica y de tipo MADS de girasol, determinamos su secuencia nucleotídica (el genoma de girasol no está secuenciado), estudiamos los patrones de expresión de cada uno de los genes aislados y los factores abióticos que influyen en los niveles de expresión, obtuvimos las proteínas codificadas en forma recombinante en bacterias y estudiamos sus formas de interacción con el ADN. Los resultados de esos estudios se han volcado en forma detallada en publicaciones científicas que se listan al final de este documento (González y Chan, 1993; Chan y González, 1994; González *et al.*, 1997; Valle *et al.*, 1997; Palena *et al.*, 1997, Chan *et al.*, 1998; Palena *et al.*, 1998; Palena *et al.*, 1999; Palena *et al.*, 2001; Tron *et al.*, 2001; Tron *et al.*, 2002; Dezar *et al.*, 2003; Tioni *et al.*, 2003; Zanetti *et al.*, 2004; Tioni *et al.*, 2005).

Una vez cumplida esa etapa de conocimiento básico a ritmos dispares según los genes en cuestión, nos propusimos indagar en la funcionalidad de estas proteínas y en la forma en que los elementos presentes en sus secuencias promotoras influían en estas funciones. Para esto fue necesario por un lado, aislar las regiones promotoras de los genes y transformar plantas de forma tal que estas regiones dirijan la expresión de un gen reportero (Dezar *et al.*, 2005b). Por otro, expresamos las proteínas bajo el control de un promotor constitutivo de forma tal de exagerar su función y así, poder determinarla. En una primera etapa elegimos como modelos dos genes pertenecientes a la familia HD-Zip, *Hahb-4* (subfamilia I) y *Hahb-10* (subfamilia II).

¿Por qué este tipo de proteínas resulta particularmente interesante? La respuesta es que siendo que tanto homeodominios como cierres de leucina han sido identificados en proteínas de todos los organismos eucariotas en los cuales se buscaron, la combinación de estos dos dominios proteicos en una sola molécula se halló sólo en vegetales. Existen entre 20 y 30 proteínas de este tipo en cada especie, y desde su identificación en el año 1992 se ha sugerido que tendrían funciones en procesos vinculados al desarrollo que son exclusivos de las plantas, como por ejemplo en el desarrollo en respuesta a distintas señales del medio ambiente (Schena *et al.*, 1993; Schena y Davis, 1994). Los dos genes elegidos, habían sido aislados y caracterizados estructuralmente con cierto detalle en trabajos previos por integrantes de nuestro laboratorio (González *et al.*, 1997; Gago *et al.*, 2002).

### **¿Qué sabemos ahora sobre la función de las proteínas HD-Zip?**

Los genes de la familia HD-Zip se expresan en diferentes órganos de la planta y a lo largo de estadios de desarrollo muy variados. La mayoría de los estudios han sido hechos en la planta *Arabidopsis thaliana*, que ha sido elegida como modelo experimental por los biólogos moleculares vegetales. El primer gen de la familia HD-Zip estudiado con cierta profundidad desde el punto de vista funcional fue *HAT4/Athb-2* de *Arabidopsis thaliana*. La sobreexpresión de este gen produce alteraciones en el desarrollo y en la velocidad de crecimiento. Las plantas transgénicas son más altas y se desarrollan más rápidamente, tienen menos hojas y de menor tamaño. En la oscuridad no germinan bien y cuando se hacen crecer en luz muestran un color verde más oscuro que las plantas de genotipo salvaje (no transformadas). Todas estas observaciones llevaron a la conclusión de que *HAT4* tendría un papel en la regulación del desarrollo de *Arabidopsis* en respuesta a las condiciones de iluminación, promoviendo la elongación del hipocotilo e inhibiendo la expansión de las células de las hojas (Carabelli *et al.*, 1993; Schena *et al.*, 1993). Es importante recordar que estos efectos son similares a los observados al crecer una planta de genotipo salvaje en oscuridad. También se describió que la expresión del gen aumenta en presencia de luz roja lejana en plantas crecidas en luz, y disminuye en presencia de cualquier tipo de luz en plantas crecidas en oscuridad. Debido a que las condiciones de iluminación alteran significativamente el desarrollo de las plantas, es posible que la función de este gen sea mediar el efecto de la luz en determinados procesos, particularmente en el fenómeno por el cual las plantas que crecen a la sombra de otras aumentan en altura para lograr captar la luz solar. Hahb-10 de girasol guarda bastante homología en secuencia aminoacídica con *HAT4/Athb-2*, al menos en los

dominios funcionales. Los estudios de tipo *northern blot* indicaron que este gen se expresa mayoritariamente en tejidos fotosintéticamente activos. Por otro lado se obtuvieron plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que lo sobreexpresan bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. Estas plantas presentaron también, como las que sobreexpresan HAT4, respuestas alteradas a las condiciones de iluminación. Sin embargo, el tipo de respuesta difiere en algunos puntos importantes con el observado en las plantas que llevan el gen homólogo. Más específicamente las plantas que sobreexpresan *HAT4/Athb-2* presentan un defecto de germinación en oscuridad, mientras que las que expresan *Hahb-10* germinan y toleran la oscuridad mucho mejor que las salvajes. Estas últimas presentan hipocotilos más cortos mientras que las primeras más largos. Los fenotipos de ambas transgénicas se asemejan en el hecho de que ambos tipos de plantas presentan un tiempo de floración acelerado que acorta el ciclo de vida total (Rueda *et al.*, 2005). El conjunto de observaciones nos lleva a contestar a la pregunta de si estos genes son ortólogos, con un No. Sí, son genes relacionados estructuralmente y ambos tienen implicancias en la respuesta a las condiciones de iluminación, pero tal vez existan otros en ambas especies que respondan a la denominación de ortólogos. Todavía el conocimiento es muy escaso para afirmar esto y serán necesarios estudios más profundos para señalar si este tipo de genes presenta alguna característica responsable de las diferencias genéricas. En el mismo sentido, seguimos estudiando funcionalmente otros genes pertenecientes a la familia HD-Zip de girasol y relacionando las observaciones experimentales con las realizadas por otros grupos sobre genes homólogos de la planta modelo y también de otras plantas.

En trabajos posteriores se describió la obtención de plantas transgénicas que sobreexpresan *Athb-7*, perteneciente a la subfamilia I de *Arabidopsis thaliana*. Estas plantas presentan cambios fenotípicos, pero éstos no tienen incidencia en la respuesta adaptativa al estrés hídrico, factor que regula positivamente la expresión del gen (Olsson *et al.*, 2004). Nuevamente, este gen junto con *Athb-12* son los más semejantes en el genoma de la planta modelo al *Hahb-4* aislado y caracterizado en nuestro laboratorio. *Hahb-4* produce cambios fenotípicos muy similares a los generados por los dos miembros de *Arabidopsis thaliana* que incluyen un retardo en la velocidad de desarrollo, inflorescencias compactas, tallos y pecíolos más cortos y hojas más redondeadas que las de plantas salvajes. Sin embargo, el gen de girasol confiere a las plantas transgénicas una fuerte tolerancia a condiciones de estrés hídrico mientras que la sobreexpresión de los homólogos no lo hacen (Dezar *et al.*, 2005a).

Además de la implicancia que pueda tener esta observación en el campo de la Biotecnología, también nos genera la pregunta de ¿Cuáles son los mecanismos fisiológicos y

moleculares responsables de esta tolerancia? y ¿Cuáles son las diferencias funcionales entre estos genes pertenecientes a distintas especies que presentan tanta homología estructural? Aparentemente, ninguno de los cambios habituales de adaptación a la sequía (cierre de estomas, producción de proteínas de defensa ante el estrés, etc.) se produce en nuestras plantas transgénicas. No sólo esto, sino que además las plantas transformadas parecen transpirar más e intercambiar gases con la misma tasa que lo hacen las plantas salvajes, tanto en condiciones normales de crecimiento como cuando son sometidas a estrés hídrico. Por otro lado las plantas son más compactas y poseen hojas más pequeñas, lo que les permitiría sobrevivir con menores cantidades de agua durante el período vegetativo de desarrollo. Otra característica fenotípica sobresaliente de las plantas transgénicas es que en condiciones en las que el agua escasea vuelven más lento su crecimiento, desarrollan hojas aún más pequeñas y tallos más cortos. Esto también se observa en las plantas normales, pero en menor medida y en forma más tardía. Se puede decir que la sobreexpresión del transgen de girasol hace que las plantas estén preparadas para un período de sequía. Cuando se les agrega agua nuevamente, estas plantas aceleran su crecimiento y alcanzan el tamaño de una planta control que no ha sufrido estrés. La producción de semillas de la planta transformada es igual a la de la planta control. Ningún evento fundamental del desarrollo se ve afectado seriamente o de forma irreversible. Simplemente pareciera que la planta siente que no tiene el agua suficiente y espera a que la situación mejore. Considerando esta hipótesis como una respuesta probable a la pregunta planteada, transformamos plantas con una construcción que expresa el gen bajo el control de su propio promotor, inducible por estrés hídrico y salino (Dezar *et al.*, 2005b), y también bajo el control de otros promotores inducibles más estudiados en detalle. En forma paralela, hicimos un estudio detallado de las secuencias en *cis* presentes en este promotor, responsables de la inducción. Las plantas transgénicas obtenidas con esta construcción no presentaban un fenotipo alterado en condiciones normales de crecimiento, ni tampoco en apariencia cuando fueron sometidas a estrés hídrico. Sin embargo, resultaron ser muy tolerantes en condiciones de escasez de agua, presentando valores intermedios de supervivencia entre los obtenidos con plantas salvajes y transgénicas con el promotor constitutivo (manuscrito en preparación). La diferencia de tolerancia con una planta sin transformar se incrementó notablemente, dando valores de 100% de sobrevivientes contra 0% para el genotipo salvaje, cuando en lugar de utilizar la tierra fertilizada del laboratorio, pasamos a usar suelos salinos gentilmente donados por productores agropecuarios. Estos experimentos nos indicaron que la tolerancia a la sequía no es producto del cambio morfológico observado en las plantas transgénicas, ya que las que llevan el promotor inducible presentan una muy buena tolerancia y ningún cambio

morfológico. En función de estos resultados decidimos hacer experimentos de microarreglos para poder analizar a nivel molecular los cambios producidos a causa de la presencia del transgen. El resultado de los microarreglos no es simple de interpretar. Casi tres mil quinientos genes de *Arabidopsis thaliana* cambiaron sus niveles de expresión entre las muestras tomadas de plantas salvajes y transformadas, crecidas en condiciones normales o sometidas a estrés hídrico. Utilizando programas informáticos adecuados pudimos seleccionar aquellos cuyo nivel de expresión cambiado era responsabilidad única de la presencia del transgen. Aún así el panorama siguió siendo complejo y hasta el momento, pudimos sacar algunas conclusiones parciales. Entre éstas, que toda la biogénesis de cloroplastos, particularmente la de componentes de la membrana tilacoide que participan en el transporte de electrones fotosintético está fuertemente inhibida. Este fenómeno también es observable en menor medida, en plantas salvajes sometidas a estrés hídrico. Encontramos inducida la expresión de genes responsables de la síntesis de osmoprotectores, así como muchos involucrados con la respuesta a estrés hídrico, calórico o salino. También pudimos observar que muchos genes involucrados en la biosíntesis de etileno se encuentran fuertemente reprimidos, lo que indicaría un alargamiento del período de senescencia o un retardo del mismo causado por la disminución de los niveles de esta hormona explicando en parte, la mayor supervivencia de las plantas transformadas en condiciones de estrés. Dentro de todos estos grupos pudimos identificar los posibles blancos directos por tener en su secuencia promotora el pseudopalíndromo reconocido por la proteína Hahb-4 *in vitro* (Palena *et al.*, 1999). Nos es difícil en esta etapa experimental armar un modelo de la/s vía/s de transducción de señales disparada/s por este factor de transcripción. Sin embargo pudimos aclarar algunas ideas sobre los mecanismos fisiológicos involucrados en la tolerancia. En resumen, la tolerancia conferida por *Hahb-4* parece ser producto de la combinación de una fuerte inducción de la síntesis de compuestos osmoprotectores, un ahorro de energía en la síntesis de compuestos involucrados en la fotosíntesis, sin disminución acoplada de la tasa de fijación de CO<sub>2</sub> y una fuerte inhibición de la biosíntesis de etileno (resultados no publicados). Seguiremos trabajando en el análisis de estos ensayos de microarreglos y en la caracterización de los genes blanco de *Hahb-4* para poder, en un futuro, responder con más certidumbre a las preguntas planteadas.

En otro orden, estamos caracterizando funcionalmente otros genes pertenecientes a la familia HD-Zip de factores de transcripción de girasol y hemos avanzado razonablemente con algunos de ellos. Como se deduce más arriba, las regiones promotoras que dirigen la expresión de estos genes en plantas transgénicas son de vital importancia para obtener los resultados

deseados en el campo de la Biotecnología. Conocer estas regiones en detalle es otro de los desafíos que nos hemos planteado, pero esto ya sería objeto de otro artículo.

### **Relaciones complejas**

El título de este escrito surge de la idea de la serie que se publica en la página web de la SAFV, con la cual fui invitada a contribuir gentilmente por la Comisión Directiva.

¿Quién es quién en Fisiología Vegetal? Es el título de esta serie.

Nuestro grupo empezó y sigue trabajando en aspectos básicos de la Biología Molecular del desarrollo. Nos hemos centrado durante años en estudios moleculares y funcionales de factores de transcripción de plantas y hemos elegido como modelo el girasol, por la importancia económica que tiene este cultivo en nuestro país. Fueron estos estudios básicos los que cruzaron nuestro camino con la Biotecnología. Los factores de transcripción estudiados, y sus secuencias promotoras resultaron ser herramientas biotecnológicas con alto potencial de aplicabilidad. Pero tenemos en claro, que nada de esto hubiese sido posible ni lo sería ahora si no sigue acompañado de experimentación en estudios básicos.

### **Plantas transformadas tolerantes a estrés hídrico**

*A la izquierda se muestran plantas salvajes y a la derecha transformadas con la construcción en la que la expresión del ADNc de Hahb-4 es dirigida por su propio promotor. Todas las plantas fueron sometidas a un estrés hídrico severo en estado vegetativo avanzado (plantas adultas) y regadas después de observar pérdida notoria de turgencia en las hojas. La foto fue tomada dos días después de regar.*



## Referencias

- Baulcombe D (2004) RNA silencing in plants. *Nature* 431, 356-363.
- Carabelli M, Morelli G, Whitelam G, Ruberti I (1996) Twilight-zone and canopy shade induction of the Athb-2 homeobox gene in green plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 3530-3535.
- Chan RL, Gago GM, Palena CM, Gonzalez DH (1998) Homeoboxes in Plant Development. *Biochimica et Biophysica Acta* 1442, 1-19.
- Chan RL, González DH (1994) A cDNA encoding an HD-Zip protein from sunflower. *Plant Physiology* 106, 1687-1688.
- Dezar CA, Fedrigo GV, Chan RL (2005b) The promoter of the sunflower HD-Zip protein gene *Hahb4* directs tissue-specific expression and is inducible by water stress, high salt concentrations and ABA. *Plant Science* 169, 447-459.
- Dezar CA, Gago GM, González DH, Chan RL (2005a) *Hahb-4*, a sunflower homeobox-leucine zipper gene, confers drought tolerance to *Arabidopsis thaliana* plants. *Transgenic Research* 14, 429-440.
- Dezar CA, Tioni MF, González DH, Chan RL (2003) Identification of three MADS-box genes expressed in sunflower capitulum. *Journal of Experimental Botany* 54, 1637-1639.
- Gago GM, Almoguera C, Jordano J, González DH, Chan RL (2002) *Hahb-4*, a homeobox-leucine zipper gene potentially involved in ABA-dependent responses to water stress in sunflower. *Plant Cell and Environment* 25, 633-640.
- Gehring WJ (1987) Homeo boxes in the study of development. *Science* 236, 1245-1252.
- Gehring, W.J., Affolter, M., Bürglin, T. (1994) Homeodomain proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 63: 487-526.
- González DH, Chan RL (1993) Screening cDNA libraries by PCR using lambda sequencing primers and degenerate oligonucleotides. *Trends in Genetics* 9 (7), 231-232.
- González DH, Valle EM, Gago G, Chan RL (1997) Interaction between proteins containing homeodomains associated to leucine zippers from sunflower. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1351, 137-149.
- Henriksson E, Olsson ASB, Johannesson H, Johansson H, Hanson J, Engstrom P, Söderman E (2005) Homeodomain leucine zipper class I genes in *Arabidopsis*. Expression patterns and phylogenetic relationships. *Plant Physiology* (in press)
- Olsson ASB, Engström P, Söderman E (2004) The homeobox genes *ATHB12* and *ATHB7* encode potential regulators of growth in response to water deficit in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 55, 663-677.
- Moore RC, Grant SR, Purugganan MD (2005) Molecular population genetics of redundant floral regulatory genes in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Biology Evolution* 22, 91-103
- Palena CM, Chan RL, González, DH (1997) A novel type of dimerization motif related to leucine zippers in plant homeodomain containing proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1352, 203-212.
- Palena CM, Gonzalez DH, Guelman S, Chan RL (1998) Expression of sunflower homeodomain containing proteins in *Escherichia coli*. Purification and functional studies. *Protein Expression and Purification* 13, 97-103.
- Palena CM, Gonzalez DH, Chan RL (1999) A monomer-dimer equilibrium modulates the interaction of the sunflower homeodomain-leucine zipper protein *Hahb-4* with DNA. *Biochemical Journal* 341 (1), 81-87.
- Palena CM, Tron AE, Bertoncini CW, González DH, Chan RL (2001) Positively charged residues at the N-terminal arm of the homeodomain are required for efficient DNA binding by homeodomain-leucine zipper proteins. *Journal of Molecular Biology* 308, 39-47.
- Rueda EC, Dezar CA, Gonzalez DH, Chan RL (2005) *Hahb-10*, a sunflower homeobox-leucine zipper gene, is involved in the response to dark/light conditions and promotes a reduction of the life cycle when expressed in *Arabidopsis*. (en revisión)
- Schena M, Davis RW (1992) HD-Zip protein members of *Arabidopsis* homeodomain protein superfamily. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89, 3894-3898.

Schena, M., Davis, R.W. RW (1994) Structure of homeobox-leucine zipper genes suggests a model for the evolution of gene families. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91, 8393-8397

Schena M, Lloyd AM, Davis RW (1993) The HAT4 gene of *Arabidopsis* encodes a developmental regulator. *Genes and Development* 7, 367-379.

Tioni MF, González DH, Chan RL (2003) Knotted1-like genes are strongly expressed in differentiated cell types in sunflower. *Journal of Experimental Botany* 383, 681-690.

Tioni MF, Viola IL, Chan RL, González DH (2005) Site directed mutagenesis and footprinting analysis of the interaction of the sunflower KNOX protein HAKN1 with DNA. *FEBS Journal* 272, 190-202.

Tron AE, Bertoncini CW, Chan RL, González DH (2002) Redox regulation of plant homeodomain transcription factors. *Journal of Biological Chemistry* 277, 34800-34807.

Tron AE, Bertoncini CW, Palena CM, Chan RL, Gonzalez DH (2001) Combinatorial interactions of two amino acids with a single base pair define target site specificity in plant dimeric homeodomain proteins. *Nucleic Acids Research* 29, 4866-4872.

Valle EM, Gonzalez DH, Gago GM, Chan RL (1997) Isolation and expression pattern of *hahr1*, a homeobox-containing cDNA from *Helianthus annuus*. *Gene* 196 (1-2), 61-68.

Zanetti ME, Chan RL, Godoy VA, González DH, Casalongué C (2004) Homeodomain-leucine zipper proteins interact with a plant homologue of the transcriptional coactivator multiprotein bridging factor 1. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 37, 320-324.

#### ***Nota de agradecimiento:***

*En este proyecto de investigación han participado activamente estudiantes de grado, de doctorado e investigadores formados a lo largo de los últimos años. Exceptuando los que se han incorporado muy recientemente al grupo (Lic. Pablo Manavella, estudiantes: Federico Ariel, Agustín Arce y Julieta Cabello), todos figuran en las publicaciones científicas incluida en la lista de referencias. A todos les agradezco sinceramente su participación, sin la cual este trabajo no se hubiese podido llevar a cabo. También quiero agradecer a las Instituciones que han financiado nuestro trabajo en distintos períodos: Fundación Antorchas, Conicet, ANPCyT, UNL así como a la empresa Bioceres que actualmente nos apoya en los proyectos de enfoque biotecnológico.*