

### UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS INSTITUTO DE ECOLOGÍA

#### INTERACCIÓN DE HISTONAS DESACETILASAS CLASE II Y PROTEÍNAS CON DOMINIO MADS EN Arabidopsis thaliana

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE: DOCTORA EN CIENCIAS

> PRESENTA: ANDREA SANJUAN BADILLO

DIRECTORA DE TESIS DRA. M. ELENA ÁLVAREZ-BUYLLA ROCES INSTITUTO DE ECOLOGÍA COMITÉ TUTOR DRA. ADRIANA GARAY ARROYO INSTITUTO DE ECOLOGÍA DR. MIGUEL LARA FLORES INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, OCTUBRE DE 2024



Universidad Nacional Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

#### DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

#### No desistas

Cuando vayan mal las cosas como a veces suelen ir, cuando ofrezca tu camino solo cuestas que subir, cuando tengas poco haber pero mucho que pagar, y precises sonreír aun teniendo que llorar, cuando ya el dolor te agobie y no puedas ya sufrir, descansar acaso debes pero nunca desistir.

Tras las sombras de la duda ya plateadas, ya sombrías, puede bien surgir el triunfo, no el fracaso que temías, y no es dable a tu ignorancia figúrate cuán cercano pueda estar el bien que anhelas y que juzgas tan lejano, lucha, pues por más que en la brega tengas que sufrir, ¡cuando todo esté peor, más debemos insistir! Si en la lucha el desino te derriba, si todo en tu camino es cuesta arriba, si tu sonrisa es ansia satisfecha, si hay faena excesiva y vil cosecha, si a tu caudal se contraponen diques, date una tregua ¡pero nunca claudiques! Porque en esta vida nada es definitivo, Toma en cuenta que: todo pasa, todo llega y todo vuelve.

Joseph Rudyard Kipling

# Agradecimientos

La presente tesis de doctorado se realizó en el laboratorio de Genética Molecular, Desarrollo y Evolución de Plantes del Instituto de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. M. Elena Álvarez-Buylla Roces en el Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas.

El trabajo de investigación fue financiado por una beca de doctorado otorgada por CONAHCyT con número 255569 y por los proyectos de CONACyT y UNAM-PAPIIT CB2014-240180-B; PN2015-687; IN211721 IN203223 A1-003/2017: ECO-IE482.

Mi reconocimiento y completa gratitud al Posgrado del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, del Instituto de Ecología, de la Universidad Nacional Autónoma de México por proporcionarme los recursos, oportunidades, total disposición y acompañamiento para llevar a cabo y finalizar el doctorado.

Mi muy profundo agradecimiento a la doctora M. Elena Álvarez-Buylla Roces por su dirección, todo su apoyo y comprensión para poder terminar el doctorado y obtener el grado.

Extiendo mi agradecimiento a mi comité tutoral: el Dr. Miguel Lara Flores, por sus cuestionamientos y aportaciones de conocimiento en cada tutoral. Al final encontré en él un remanso de comprensión, bondad y disponibilidad para poder titularme. A la Dra. Adriana Garay Arroyo, por todas sus aportaciones en cada tutoral y su apoyo para mi titulación. A la Dra. Alicia Gamboa, aunque oficialmente no era parte de mi comité tutoral, estuvo presente en mis tutorales aportando conocimiento e ideas.

A Diana Romo por el apoyo administrativo; a la Dra. Teresa Romero Romero y Laura Rodríguez por la elaboración de varios suministros para mi trabajo experimental.

Un muy especial agradecimiento a los co-autores y co-autoras del artículo, por sus aportaciones y conocimiento para hacer realidad la publicación del artículo y mi tesis: León P. Martínez Castilla, Ricardo García Sandoval, Patricia Ballester, Cristina Ferrándiz, Maria de la Paz Sanchez, Berenice García Ponce, Adriana Garay Arroyo y Elena Álvarez-Buylla.

A mi jurado: la Dra. Alejandra Covarrubias, el Dr. Eugenio Azpeitia, el Dr. Mario Zurita, el Dr. Luis Felipe Jiménez quienes revisaron mi tesis y me aportaron conocimiento para poder titularme.

A la Dra. M. Paz Sánchez Jiménez por su apoyo, colaboración y aportaciones en la realización del doctorado.

A la Dra. Berenice García Ponce de León por sus aportaciones académicas y conocimiento experimental durante todo el proceso del doctorado.

A la Dra. Fabiola Jaimes Miranda por todo su apoyo en los inicios del doctorado y su gran amistad.

A la Dra. Nora A. Gutiérrez Nájera, mi muy querida amiga, que fue una luz en la oscuridad en la que estaba. Un **reconocimiento muy especial a ella**, por su amistad, tiempo, disposición, sus palabras de aliento en todo momento, por su amplio conocimiento y visión para apoyarme y obtener el doctorado. Mi gratitud para siempre.

A mi buen amigo el Dr. M. Alberto Pacheco Escobedo, porque en los mementos más difíciles y de desilusión del doctorado me brindó su apoyo incondicional, mil gracias. Alberto la vida no me será suficiente para agradecer tu apoyo en esos tiempos tan, tan difíciles para mí.

A la Dra. Teresa Romero Romero, mi amiga, que siempre me alentó para terminar el doctorado, porque ha sido un ejemplo para seguir en muchos aspectos.

A la Dra. Rocío Cruz Ortega que siempre, siempre tuvo tiempo para mí, me brindó su apoyo tanto académico, como técnico y emocional.

Al M. en C. Sinué Gabriel Fonseca, mi gran amigo, quien me tendió la mano cuando recién entre al laboratorio donde hice el doctorado, quien tuvo la paciencia de realmente escuchar mis problemas tanto académicos, como personales y trato de comprenderme para poder darme un consejo y su apoyo.

A la M. en C. Aurora Gámez Reyes, por todo el apoyo que me brindo durante el doctorado, por los malos y buenos momentos que compartimos, un millón de gracias.

Al M. en C. J. César Flores Sánchez, por su apoyo, sus cuestionamientos, sus observaciones y comentarios objetivos que me hacían colocar los pies en la tierra durante mi estancia en el laboratorio donde hice el doctorado.

Al Dr. Ricardo Chávez Montes, gracias, Ricardo, por darme apoyo tanto metodológico como intelectual en todos los aspectos al inicio del doctorado.

A la M. en C. Manuela Nájera Martínez, mi muy querida amiga, gracias por todo tu apoyo durante todo el proceso, porque en el momento más crucial del doctorado me diste el empuje y ayuda desinteresada que necesitaba para terminar.

A mis compañeros Esther Zúñiga y Alexis Iribe, con los cuales compartí muchos momentos del doctorado y recibí apoyo en todos los aspectos.

A la Dra. Diana Sánchez Rangel que, en momentos de desasosiego, desesperanza y angustia, su positivismo me saco a flote.

Al Dr. Javier Plasencia que me enseñó la disciplina y que el trabajo duro es parte de nuestras vidas y que se puede lograr.

A la Dra. Marina Gavilánez Ruíz porque fue parte de mi formación previa, la cual me ayudó mucho para afrontar con valor y coraje las desavenencias del doctorado.

A mi madre, quien siempre ha sido mi ejemplo de lucha, constancia y trabajo; porque siempre me apoyó en todos los proyectos que emprendía y siempre me animó a que podía hacer las cosas por muy difícil que éstas parezcan.

A mi padre, que me brindó su apoyo y que hacía final del doctorado me alentó a seguir y terminar. Gracias a él pude concluir este trabajo.

A mi hermana Elena, que nos acompañamos y nos apoyamos en los momentos más oscuros, difíciles, tristes, desesperanzadores y desoladores de nuestras vidas. Sin ella no habría podido terminar el doctorado.

A mi hermano Jesús, que con mucha paciencia me ha apoyado en todo momento de mi vida.

A mis hermanos Verónica y Pedro porque sin mencionar palabra alguna, estuvieron siempre presentes para brindarme soporte y apoyo para poder lograr todo.

A Jorge Reyes Vázquez, quien me apoyo en incontables ocasiones. Gracias por no dejarme "desistir" porque en los momentos más oscuros, terribles y de desesperanza me diste aliento con objetividad para seguir adelante. Toda mi vida te estaré agradecida.

A mi prima Gabriela Vásquez José porque, así como fui incentivo para su maestría, fue un incentivo para seguir el doctorado. Muchas gracias Prima.

Mi agradecimiento muy especial a la Dra. Sobeida Sánchez Nieto, por darme su tiempo, apoyarme y sus enseñanzas. Gracias Sobeida.

Al Dr. Ricardo García Sandoval por ayudarme en hacer parte del artículo, por escucharme y darme su apoyo.

A el M. en C. Víctor R. Hernández Marroquín, querido amigo que me ayudó a soportar y procesar la pérdida de mis padres y poder terminar el doctorado... Muchas gracias, mi muy querido Víctor.

# Dedicatoria

Dedico este trabajo a mis padres, Filiberto Sanjuán Soriano y Celia Badillo Hernandez.

Principalmente a mi padre, quien siempre me impulsó a terminar y tenía la certeza de que lo lograría. Por todos sus consejos, porque me animaba a seguir y no claudicar. Por darme la vida, todo su amor y estar totalmente presente hacia final de su vida. No desistí, papaíto.

A mi mami, quien a pesar de que pensaba que el doctorado no era lo mejor para mí, siempre me apoyo incondicionalmente en mi decisión de hacerlo y terminarlo. Mi ejemplo de trabajo y amor.

Sin ellos no hubiera podido concluir todo este trabajo.

# Índice

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	4
1. Desacetilasas de Histonas	6
2. Factores de transcripción: proteínas con dominio MADS	9
OBJETIVO GENERAL	12
OBJETIVOS PARTICULARES	12
HIPÓTESIS	12
METODOLOGÍA	13
1 Material vagatal y condicionas da crecimiento	13
<ol> <li>Material vegetal y condiciones de crecimiento</li></ol>	13
3 Análisis filogenético	13 14
4 Cromatografía de afinidad en columna	11
5. Análisis bioinformáticos	
a. Análisis de agrupamiento hidrofóbico	
b. Simulación de acoplamiento rígido (Docking)	
6. Expresión de genes MADS y HDAC	17
7. Ensayo de doble híbrido	18
8. Ensayo de complementación de fluorescencia bimolecular	18
RESULTADOS	19
1. Análisis filogenético de desacetilasas de histonas	19
2. TSA como inhibidor de las desacetilasas de histonas	19
3. ¿XAL1 interacciona directamente con las HDACs?	23
4. Posible dominio de interacción entre HDACs y proteínas con dominio MADS de Arabidopsis	24
5. Los genes HDACs y XAL1 se expresan en raíz de Arabidopsis	
6. HDA15 interactúa con XAL1	30
7. Localización nuclear de la interacción HAD15-XAL1	32
DISCUSIÓN	35
CONCLUSIONES	40
PERSPECTIVAS	41
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
ANEXO	47
ARTÍCULO	51

### Resumen

Los mecanismos epigenéticos son esenciales para regular el funcionamiento celular en organismos eucariontes. Entre los mecanismos epigenéticos se encuentran las modificaciones postraduccionales de las histonas como es el caso de la acetilación y desacetilación que activan y reprimen, respectivamente, la transcripción del ADN. Las desacetilasas de histonas (**HDAC**: **H**istone **Deac**etylase) son enzimas que promueven la interacción de las histonas con el ADN al compactar el nucleosoma y provocar represión transcripcional, esta modificación puede alterar el estado epigenético del genoma, lo cual impacta sobre el proceso transcripcional global. Las HDACs actúan en complejos proteicos y los factores de transcripcionales que están altamente conservados en eucariontes y participan en el control de diversos procesos de desarrollo en animales y plantas. Asimismo, las proteínas de esta familia contribuyen a regular la respuesta al estrés en las plantas. Por lo tanto, no es difícil poder pensar en encontrar a las HDACs y la proteína MADS coexistiendo para regular procesos biológicos.

En el presente trabajo, nos enfocamos en descubrir interacciones putativas de las HDACs y proteínas con dominio MADS en *Arabidopsis thaliana*, utilizamos una perspectiva evolutiva en combinación con análisis bioinformáticos (filogenia, alineación proteica y de genes, BLAST, análisis de agrupamiento hidrofóbico y simulación de acoplamiento rígido), probamos las interacciones más prometedoras, a través de herramientas clásicas de biología molecular (expresión RNA, ensayo de 2 híbridos, BiFC) basándonos en las interacciones de HDACs y proteínas con dominio MADS reportadas en humanos.

Se hicieron análisis bioinformáticos para elegir las HDACs candidatas que tuvieran mayor similitud con las de humanos para detectar interacción con proteínas con dominio MADS. La filogenia, los patrones de hidrofobicidad el alineamiento y la búsqueda de motivos de interacción nos mostraron similitudes entre las HDACs clase II de Arabidopsis y las de humano para una posible interacción con proteínas con dominio MADS. La simulación de acoplamiento rígido (dockin) confirmó que había una muy alta probabilidad de interacción entre una HDAC y una proteina MADS. Sin embargo, no se pudo confirmar dicha interacción mediante el análisis bioquímico de cromatografía de afinidad. Resultados de los análisis de tamaño de raíz en mutantes simples, una doble y una triple de genes MADS (*xal1*, *xal2*, *agl19*, *xal1/xal2*, *xal1/xal2/agl19*) expuestas al inhibidor de HDACs (tricostatina A), no mostraron alteraciones o diferencias, evidenciando su redundancia funcional. En la parte molecular, analizamos la expresión de los transcritos de *HDA5*, *HDA15*, *HDA18*, *XAL1*, revelando la presencia de los transcritos en las primeras horas después de la germinación, apuntando a la probable co-localización de las proteínas.

Una parte importante era comprobar la interacción proteína-proteina *in vivo*. El ensayo de dos híbridos nos permitió evaluar y detectar la interacción entre proteínas, principalmente la interacción entre HDA15-XAL1. Si bien el ensayo de doble híbrido es un enfoque representativo de interacciones proteina-proteina *in vivo*, complementamos y verificamos la interacción con el análisis de complementación de fluorescencia bimolecular. No sólo verificamos la interacción de HDA15-XAL1 si no su muy posible ubicación en el núcleo.

Los resultados generados sobre la interacción y posible ubicación de HDA15-XAL1 tomando en cuenta la actividad funcional de cada proteina, revela que esta interacción podría estar involucrada en procesos de regulación del desarrollo en plantas de manera similar a las que podemos encontrar en animales.

### Abstract

Cellular functions in eukaryotes are regulated through epigenetic mechanism. These mechanisms include posttranslational histone modifications such as acetylation and deacetylation, which activate or repress DNA transcription, respectively. Histone deacetylases (HDACs) promote histone-DNA interaction by compacting nucleosomes, leading to transcriptional repression. This modification affects the genome's epigenetic state, affecting its transcriptional activity. HDACs function as part of protein complexes — in some cases, transcription factors are part of these complexes. MADS domain proteins, highly conserved transcriptional regulators in eukaryotes, control various developmental processes in animals and plants. They also contribute to stress response regulation in plants. Thus, we hypothesize that HDACs and MADS proteins collaborate in regulating biological processes.

This study investigates putative interactions between HDACs and MADS domain proteins in *Arabidopsis thaliana* using an evolutionary approach combined with bioinformatics analyses, including phylogeny, protein and gene alignment, BLAST, hydrophobic cluster analysis and docking simulation. The most promising interactions, identified on the basis of known HDAC and MADS interactions in humans, were further tested using classical molecular biology tools such as RNA expression analysis, two-hybrid assay and BiFC.

Bioinformatics analyses were performed to identify candidate HDACs with the highest similarity to human HDACs for potential interaction with MADS proteins. Phylogeny, hydrophobicity patterns, alignment, and interaction motifs searches showed similarities between Arabidopsis and human class II HDACs, suggesting a possible interaction with MADS proteins. Docking simulation confirmed a high probability of interaction between an HDAC and a MADS protein. However, this interaction could not be confirmed through biochemical analysis using affinity chromatography. Root size analysis in single, double, and triple MADS gene mutants (*xal1*, *xal2*, *agl19*, *xal1/xal2* and *xal1/xal2/agl19*) exposed to an HDAC inhibitor (trichostatin A) showed no significant alterations or differences, indicating functional redundancy of HDACs. At the molecular level, expression analysis of *HDA5*, *HDA15*, *HDA18*, and *XAL1* transcripts, revealed their presence within the first hours after germination, suggesting potential protein co-localization.

Verifying protein-protein interaction in vivo was a crucial aspect of the study. The two-hybrid assay enabled us to evaluate and detect protein-protein interaction, notably between HDA15 and XAL1. While the two-hybrid assay provides a representative approach for studying protein-protein interactions in vivo, we complemented and verified these findings with bimolecular fluorescence complementation analysis. We verified not only the interaction of HDA15-XAL1 but also location in the nucleus and possibly in nucleolus.

The findings on the interaction and potential localization of HDA15-XAL1, along with the functional activity of each protein, suggest that this interaction may play a role in developmental regulation processes in plants, similar to those observed in animals.

rabidopsis thaliana es una planta modelo utilizada en la investigación y en los últimos 50 años ha facilitado la generación de conocimiento para comprender la función de las plantas y su relación con el entorno (Provart et al. 2021). Se tiene la secuencia completa de su genoma, lo que ha facilitado el generar información de la biología celular, desarrollo, señalización y respuesta al ambiente de la planta. La raíz de Arabidopsis thaliana (en adelante Arabidopsis), concéntricamente presenta los siguientes tipos celulares: Epidermis, córtex, endodermis, periciclo, haz vascular, cofia lateral, células troncales iniciales, centro quiescente y columnela de la cofia (figura 1A). A nivel longitudinal, la raíz de Arabidopsis presenta una zona de diferenciación y una zona de crecimiento. La zona de diferenciación se caracteriza por que sus células terminaron de crecer, tienen una forma y función final. La zona de crecimiento está constituida por la zona de alargamiento (células que ya no son capaces de dividirse y que presentan una alta tasa de crecimiento) y el meristemo apical o RAM (por sus siglas en inglés Root Apical Meristem, células con una alta probabilidad de dividirse). El meristemo apical se divide en el dominio de proliferación y el dominio de transición. Las células del domino de transición, presentan una tasa de división cercana a cero, pero una alta velocidad de alargamiento. En el dominio de proliferación encontramos al centro quiescente, cuatro células con poca actividad mitótica, rodeado por células troncales o iniciales. Las células iniciales son células indiferenciadas que generarán los diferentes tipos celulares de la raíz (figura 1B) (Ivanov y Dubrovsky 2013; Yamoune et al. 2021).

En particular, la raíz de Arabidopsis, con sus linajes celulares y pocas células de cada línea celular, tiene ventajas importantes para estudiar la regulación molecular de la homeostasis celular y las consecuencias de sus alteraciones en la morfogénesis de un órgano multicelular. Además de las características de los tipos celulares, la raíz presenta un crecimiento continuo, presenta porciones de proliferación activa, de elongación celular y de diferenciación en un mismo órgano, es pequeña y fácil de manipular, su estructura es simple, con pocos tipos celulares y es factible seguir el linaje de cada uno de los tipos celulares, lo que facilita el estudio, seguimiento e implementación de técnicas para seguir la genética de procesos biológicos involucrados en este órgano (Krämer 2015; Roychoudhry y Kepinski 2021).

En cuanto al genoma de Arabidopsis y otros eucariontes, presentan diferente cantidad de genes que controlan y regulan, por diferentes mecanismos, la función de la célula a través de lo que llamamos regulación génica. Por ejemplo, en organismos modelo como el humano encontramos cerca de 25 000 genes (Carlberg y Molnár, 2020), en Arabidopsis alrededor de 38 000 genes, en *Saccharomyces cerevisiae* más de 6 000 genes y en el caso de *Escherichia coli* son alrededor de 5 000 genes (Taxonomy-NCBI 2018). El Ácido DesoxirriboNucleico (ADN), en donde se encuentran los genes, no está totalmente desnudo en eucariontes, al ADN se unen proteínas llamadas histonas que en conjunto conforman la cromatina, localizada en el núcleo de las células. Un complejo de histonas

(H2A, H2B, H3 y H4 dos de cada histona) conforman un octámero y una cadena de 147 pares de bases de ADN, da una doble vuelta al octámero de histonas integrando el nucleosoma, que es la unidad básica de condensación del ADN en eucariontes (figura 2). Gracias a las histonas, el ADN puede estar expuesto para que los genes se expresen en un momento, lugar o nivel determinado. El control de la expresión o represión de los genes en la célula va a depender de varios factores y mecanismos en los diferentes organismos, es lo que llamamos regulación génica.



Figura 1. Estructura de los diferentes linajes celulares de la raíz de Arabidopsis. A, tipos celulares en una disposición concéntrica (imagen modificada de Péret et al. 2009). B, esquema longitudinal de las zonas y dominios de la raíz (imagen modificada de (Yamoune et al. 2021).

En eucariontes, la regulación de los genes se da por la interacción con su entorno para poder responder ante él. En general, hay dos tipos de genes: los genes constitutivos, que controlan la replicación, expresión y reparación del ADN, así como la síntesis de proteínas y gran parte del metabolismo central. El otro tipo, son genes regulados que se expresan ocasionalmente. Una de las formas de activación y represión de estos dos tipos de genes es la epigenética, que se define como la regulación génica mediada por modificaciones en las histonas, sin alterar la secuencia de ADN. Las modificaciones de las histonas exponen o compactan al ADN regulando el acceso de otras proteínas como factores de transcripción, cofactores y toda la maquinaria transcripcional, activando o inactivando el proceso de la transcripción para generar un ARN que podrá ser traducido a una proteína funcional en el citoplasma de la célula. Se ha demostrado que mecanismos epigenéticos heredables son fundamentales para regular el

comportamiento celular (Hollender y Liu, 2008; Minard et al., 2009). Entre los elementos que participan en la regulación epigenética están las modificaciones post-traduccionales (MPT) de las histonas (Hollender y Liu, 2008; Recillas-Targa y Escamilla Del Arenal, 2004). Las MPT son modificaciones covalentes en el extremo amino terminal de las histonas e incluyen los siguientes tipos: Fosforilación, acetilación, metilación en el residuo de arginina, metilación activa y represiva en el residuo de lisina, ubiquitinación y sumoilación (figura 3).



Figura 2. Estructura del nucleosoma. A, estructura cristalina del nucleosoma, se muestra la ubicación de la super hélice del ADN (SHLs: superhelical locations) y las histonas (H2A, H2B, H3, H4; L1 loop1, L2 loop2 de la cadena proteica;  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ : hélices alfa de la proteina). B, plegamiento de los dímeros de las histonas 3 y 4. C, plegamiento de los dímeros de las histonas 2A y 2B (imagen tomada de Kujirai et al., 2023).

Por ejemplo, en el nucleosoma, la acetilación y la metilación de H3 y H4 están asociadas a modificaciones covalentes relacionadas con la represión o activación transcripcional de genes. En caso particular de la acetilación y la desacetilación de histonas, la primera se lleva a cabo mediante una acetiltransferasa, la cual adiciona un grupo acetil a lisinas específicas que se encuentran en el extremo amino de las histonas, provocando una pérdida de afinidad de las histonas a la doble cadena de ADN quedando expuesta para su transcripción. Por el contrario, las desacetilasas de histonas, responsables de eliminar la acetilación en las lisinas, provocan una mayor afinidad de las histonas por el ADN, inhibiendo la transcripción (Marmorstein y Zhou, 2015). Este mecanismo de acetilación/desacetilación está involucrado en una variedad de procesos celulares que va desde regulación en la diferenciación celular hasta procesos de un desequilibrio en la célula como es el cáncer.

#### 1. Desacetilasas de Histonas

Las desacetilasas de histonas (por sus siglas en inglés HDACs: Histone Deacetylases:) son enzimas que actúan en el grupo amino  $\varepsilon$  de los residuos de lisina, removiendo grupos acetilo de estos aminoácidos, los cuales están localizados cerca del extremo amino de las histonas. La desacetilación promueve la interacción de cargas positivas de las histonas con las cargas negativas del ADN, aumentando la afinidad de HDACs por el ADN y promoviendo con ello la compactación del nucleosoma, generalmente, provocando la represión transcripcional de genes. Las HDACs actúan como reguladores transcripcionales globales y se ha demostrado que su función es esencial en varios procesos durante el desarrollo de eucariontes (ciclo celular, desarrollo embrionario, diferenciación celular, respuesta a estrés y apoptosis) (Li et al., 2020; Seto y Yoshida, 2014).



Figura 3. Modificaciones postraduccionales en el extremo amino terminal de las histonas. En la parte izquierda se muestran los tipos de modificaciones. En el centro se muestra la secuencia del extremo amino terminal de las histonas, indicando el tipo y número de los residuos con sus modificaciones (Figura modificada de Araki y Mimura, 2017).

Las HDACs, tanto en animales como en plantas, se clasifican según su origen filogenético y función. En humanos, se agrupan en dos superfamilias: Superfamilia desacetilasa/arginasa, familia Histona desacetilasa, Clase I (HDAC1, HDAC 2, HDAC 3 y HDAC 8), subclase IIa (HDAC4, HDAC 5, HDAC 7 y HDAC 9) y subclase IIb (HDAC 6 y HDAC10), clase IV (HDAC11); Superfamilia con dominio de unión a FAD/Deoxihipusina sintasa como NAD, familia regulador-SIR2, clase III, subclase I (SIRT1, SIRT 2 y SIRT 3), subclase II (SIRT4), subclase III (SIRT5) y subclase IV (SIRT6 y SIRT7). Los integrantes de cada clase y subclase presentan dominios que se muestran en la figura 4A. En plantas, específicamente para Arabidopsis, la clasificación de las HDACs es: subfamilia RPD3/HDA1, clase I (HDA6, HDA9 y HDA19), clase II (HDA5, HDA8, HDA14, HDA15 y HDA18) y clase III (HDA2); subfamilia SIR 2 (SRT1 y SRT2); subfamilia HD2 (HDA2A, HDA2B, HDA2C y HDA2D); en la figura 4B se muestra los dominios de estas proteínas. Una característica importante de varios miembros de las HDACs de plantas es que poseen dedos de zinc, esta estructura ayuda a la interacción proteína-proteína y puede interaccionar con factores de transcripción regulando la transcripción de genes (Kumar, Thakur, y Prasad 2021). Análisis filogenéticos de las HDACs en plantas y animales revelan una conservación del dominio de desacetilación que sustenta su actividad fundamental de desacetilación en ambos grupos de eucariontes multicelulares; por lo tanto, cada uno de los grupos o linajes de desacetilasas se encuentran compartiendo un ancestro común más cercano entre las HDACs de plantas y animales, en comparación con las HDACs de las diferentes familias de plantas (Pandey et al. 2002).

La principal función de las HDACs es mantener el equilibro de la acetilación en las histonas, son reguladoras de la conformación de la cromatina con funciones específicas, como se muestran en la figura 5. Asimismo, su función está muy relacionada a su localización subcelular. Las HDACs presentan transporte núcleo-citoplásmico, por lo

tanto, se localizan en núcleo, pero principalmente en citoplasma. Sin embargo, se ha reportado que la HDA14 de Arabidopsis se ha localizado en cloroplasto desacetilando proteínas con una función en fotosíntesis. Adicionalmente la HDA14, puede desacetilar la  $\alpha$ -tubulina y asociarse con la  $\alpha/\beta$ -tubulina. La SRT2, que pertenece a la subfamilia SIR2 de las HDACs, se localiza en mitocondria desacetilando enzimas de ciclo del ácido tricarboxilico y proteínas de membrana (Alinsug et al. 2012; Cui et al. 2023).



Figura 4. Clasificación y estructura de los dominios de las desacetilasas de histonas. A, desacetilasa de histonas de humanos (modificado de Milazzo et al., 2020). B, desacetilasas de histonas de Arabidopsis (modificado de Hollender y Liu, 2008).

Se ha tratado de esclarecer los mecanismos funcionales de las HDACs debido a que no tienen actividad de unión al ADN para llevar a cabo una represión sobre la secuencia de los genes. A la fecha se sabe que pueden modificar la expresión génica mediante la interacción con factores de transcripción u otras proteínas, en diferentes formas. En animales, las HDACs interaccionan con factores de transcripción regulando diferentes procesos fisiológicos (diferenciación, proliferación, migración y muerte celular) y patológicos (cáncer, enfermedades neurológicas, inflamatorias, cardiacas y pulmonares) para reprimir o activar genes blancos en determinados tipos celulares. Por ejemplo, la HDAC9 es parte de un complejo que recluta a factores de transcripción durante la diferenciación de miocitos y en el desarrollo de músculo cardiaco (Markus 2023; Yang, Croteau, y Hardy 2021). La HDAC4 se une con MEF2, reclutando complejos represores como el receptor de la hormona tiroidea (SMRT)/N-CoR-HDAC3 para promover represión génica. También se ha propuesto que HDAC4 tiene un papel en la fosforilación y sumoilación de MEF2 para disminuir su actividad transcripcional (Kang et al. 2024).



Figura 5. Principales funciones de las desacetilasas de histonas de la familia RPD3 en plantas. Modificado de Kumar et al. 2021.

En plantas, existen varios ejemplos de interacciones proteína-proteína con HDACs. La HDA9 de Arabidopsis, interacciona con el factor de transcripción WRKY53 para inhibir su función teniendo como consecuencia una respuesta de sensibilidad al estrés salino (Zheng et al. 2020). Las HDACs de plantas también pueden participar en complejos multi-proteicos, como es el caso de HDA6 de Arabidopsis que interactúa con FLOWERING LOCUS D (FLD) y la subunidad MULTICOPY SUPRPRESSOR OR IRA1 (MSI1) del Complejo Represivo Policomb 2, como parte del complejo a METILTRANSFERASE1 (MET1), SU(VAR)3-9 HOMOLOG 4, 5 y 6 (SUVH4/5/6) y SWI3B. La función específica del módulo de MSI1 y HDA6 es metilar y desacetilar, respectivamente, la histona 3 de los genes *FLOWERING LOCUS C (FLC), MADS AFFECTING FLOWERING (MAF4 y MAF5*), reprimiendo su expresión para detener la floración (J. Liu y Chang 2021; Y. Xu et al. 2022). En el caso de la HDA15, puede interaccionar con diversos factores de transcripción, uno de ellos es PHYTOCRHOME INTERACTING FACTOR (PIF): la interacción con PIF1, en obscuridad, suprime genes de respuesta a la luz durante la germinación; en tanto que su interacción con PIF3 reprime genes involucrados en la biosíntesis de clorofila y fotosíntesis. Otra interacción de HDA15 es con ELONGATED HYPOCOTYL 5 (HY5); la primera desacetila la histona 4 de genes implicados en la señalización de auxinas y la organización de la pared celular, regulando la foto-morfogénesis al suprimir la elongación celular del hipocótilo en Arabidopsis (Cui et al. 2023; Kumar, Thakur, y Prasad 2021).

### 2. Factores de transcripción: proteínas con dominio MADS

En la expresión génica un factor clave para la activación o represión de los genes, son los factores de transcripción, proteínas que regulan estos procesos. Su función es unirse a una secuencia específica del ADN para activar o inhibir

la transcripción. Los sitios de unión pueden estar en el promotor del gen o en otro sitio del ADN. Los factores de transcripción pueden trabajar en complejos proteicos para dar especificidad al proceso (Weidemüller et al. 2021). Los genes MADS codifican para factores transcripcionales con diversas e importantes funciones biológicas que abarcan desde el desarrollo de músculo cardíaco en animales, hasta la respuesta a estrés en *Saccharomyces cerevisiae* (Shore y Sharrocks 1995). En plantas, estos genes regulan la transición a la floración, la determinación de los tipos celulares durante el desarrollo floral y muchos otros aspectos del desarrollo vegetal (Liljegren et al., 1998; Riechmann y Meyerowitz, 1997). En Arabidopsis, existen más de 100 miembros de proteínas MADS (Martinez-Castilla y Alvarez-Buylla, 2003) que se agrupan en dos clases: tipo I (like SRF) y tipo II (like MEF2). Estos últimos en plantas tienen además otros dominios: K, COOH e I. El dominio K (Keratin-like), moderadamente conservado, tiene un papel importante en las interacciones proteína-proteína, mientras que la región carboxilo terminal (COOH), que es más variable, parece tener una función de transactivación (Coen y Meyerowitz, 1991). Finalmente, el dominio I conecta al MADS con el K y participa en la unión al ADN de la caja MADS y probablemente también en la interacción con otras proteínas.

El dominio MADS es capaz de unirse a secuencias específicas denominadas cajas CArG de regiones reguladoras de diversos genes blanco (Folter y Angenent, 2006), pero se unen y regulan a estos genes en forma de complejos heteroméricos. Probablemente, la elevada cantidad de miembros en esta familia, en plantas, permite una rica combinatoria en complejos de dímeros, trímeros o tetrámeros de proteínas MADS. Estas interacciones y aquellas con otras proteínas de diversas familias podrían ser responsables de la especificidad de los genes blanco que regulan, o bien, tener un papel en la modulación de la actividad de transactivación (Egea-Cortines et al., 1999; Herskowitz, 1989; Honma y Goto, 2001). La formación de homodímeros, heterodímeros, complejo ternario y posiblemente la unión con otras proteínas, así como la unión a elementos de secuencias de ADN denominados cajas CArG, requieren de los dominios I, K, C (Honma y Goto 2001; Kaufmann, Melzer, y Theißen 2005). Entender la estructura y función de estas complejas redes de interacción de proteínas en el balance entre diferenciación y proliferación celular es un reto importante para cualquier sistema vivo.

En plantas, los MADS tipo II y las HDACs son proteínas conservados con respecto a los ortólogos en animales. Esto sugiere que en plantas también puede estar conservada su interacción, ya que Han et al. (2005) reportaron la interacción de MADS (MEF2) con HDACs. Además, en animales, se ha descubierto que los genes MADS tipo *MEF* participan en la regulación del balance entre proliferación y diferenciación en cultivos celulares *in vitro* (Egea-Cortines, Saedler, y Sommer 1999). Mientras que, en plantas, a genes de esta familia se les han atribuido funciones más bien relacionadas con la determinación del tipo celular o de la identidad de órganos (Herskowitz 1989). Sin embargo, hasta ahora no se les ha implicado en las redes que subyacen tras el balance entre diferenciación y proliferación celular (la homeostasis celular).

En plantas y animales, la morfogénesis depende del balance entre la división y la diferenciación celular, pero aún no entendemos los mecanismos moleculares que subyacen esta homeostasis celular. Las plantas son sistemas adecuados para estudiar la genética molecular del balance entre diferenciación y proliferación ya que la morfogénesis ocurre durante todo el ciclo de vida a partir de las células indiferenciadas de los meristemos (Meyerowitz E. M. 2002). En sistemas animales se ha documentado *in vitro* que los genes de HDACs pueden ser importantes para modular la decisión de proliferación vs diferenciación (Barneda-Zahonero y Parra, 2012; Kouzarides, 1999; Molkentin y Olson, 1996). Por lo tanto, explorar la posible interacción de proteínas MADS y las desacetilasas en un sistema en donde sea posible hacer estudios en vivo puede ser muy útil.

## **Objetivo General**

Investigar interacciones entre HDACs clase II y proteínas con dominio MADS en raíz de Arabidopsis thaliana.

### **Objetivos particulares**

- 1. Realizar análisis filogenéticos y bioinformáticos para elegir proteínas con dominio MADS e histonas desacetilasas con características que indiquen que puedan interaccionar en el desarrollo de raíz de *Arabidopsis thaliana*.
- 2. Analizar la expresión de los genes *MADS* y *HDACs* de las interacciones seleccionadas como resultado de los análisis bioinformáticos de *Arabidopsis thaliana*.
- 3. Confirmar la interacción específica de proteínas con dominio MADS y HDACs in vitro e in vivo.

## Hipótesis

En animales y plantas las proteínas con dominio MADS y las HDACs están involucradas en procesos celulares como proliferación, diferenciación celular y desarrollo. MEF2 que es un MADS y las HDACs clase II, en animales, pertenecen a un complejo proteico que regulan la proliferación y diferenciación celular en el desarrollo. En la raíz de Arabidopsis están presentes tanto las proteínas MADS como las HDACs clase II cuya función es similar a la de animales y posiblemente pueden interaccionar para cumplir funciones similares en procesos de diferenciación y /o proliferación celular.

### Metodología

#### 1. Material vegetal y condiciones de crecimiento

Se utilizó a Arabidopsis thaliana ecotipo Columbia-0 (Col-0) como material vegetal en todos los experimentos.

**Desinfección de semillas**. Las semillas se desinfectaban dejándolas en una disolución de lavado (Cloro, 60 %; Tween-20, 3 %) por 5 minutos, en agitación constante. Pasado el tiempo, se hacían cuatro lavados con agua destilada esterilizada. Se incubaban por tres días a 4 °C en obscuridad para su sincronización.

**Crecimiento** *in vitro*. Las semillas esterilizadas y sincronizadas se cultivaban en placas verticalmente, con medio que contenía sal MS 0.2 X (Murashige & Skoog), 1 % (p/v) de sacarosa y 1 % (p/v) agar. Las cajas se colocaban en una cámara de ambiente controlado en un ciclo de 16 h de luz / 8 h de oscuridad, a una temperatura (22-24 °C), 45 % de humedad relativa.

**Cinética de crecimiento con TSA**. Semillas de Arabidopsis silvestres, mutantes simples (*xal1*, *xal2* y *agl19*), una mutante doble (*xal1/xal2*) y una mutante triple (*xal1/xal2/agl19*) se sembraron *in vitro* en cajas cuadradas (n = 31), se dejaron crecer por dos días en condiciones de luz y oscuridad, mencionadas en el apartado de crecimiento *in vitro*. Pasado el tiempo, las plántulas se pasaban a cajas con de tricostatina A (por sus siglas en inglés **TSA**: trichostatin **A**), un inhibidor de desacetilasas de histonas, a una concentración de 3.3 µM por 24 h; la TSA se diluía en DMSO. Posteriormente, las plántulas, se pasaban a cajas sin TSA y se dejaban crecer, tomando mediciones de la longitud de la raíz a los 3, 5, 7 y 10 días post germinación (**dpg**) con el programa ImageJ (https://imagej.net/ij). Al mismo tiempo se hizo el mismo procedimiento utilizando sólo DMSO como control de crecimiento.

**Crecimiento en tierra**. De las plántulas crecidas en la caja 10 días post-siembra (**dps**) se trasplantaron tres plántulas a macetas con tierra esterilizada. Las plantas se crecieron en cuartos controlados a una temperatura de 22-23 °C, con fotoperiodo de día largo.

**Semilleros**. Las plantas destinadas a semilleros se dejaron por lo menos un mes, hasta que dieran semillas, las cuales fueron recolectadas en bolsas de papel para dejarlas secar por tres días. Después, se les quitaban las cáscaras, las hojas y los tallos secos hasta tener sólo las semillas. Una vez limpias, las semillas se guardaban en tubos eppendorf de 2 mL a temperatura ambiente debidamente etiquetados.

#### 2. Muestreo de secuencias y alineación de aminoácidos

Se recuperaron secuencias de aminoácidos de Genbank para representar una diversidad de genes HDACs de Clase I y Clase II de plantas, animales y microorganismos. Se seleccionaron un total de 150 secuencias (tabla AI en anexo). Las secuencias se alinearon en MAFFT 7 (Katoh y Standley 2013) utilizando la opción automática. La alineación resultante se inspeccionó visualmente y se corrigió en Mesquite 3.6 (Maddison, W. P. and Maddison 2019).

#### 3. Análisis filogenético

En el análisis filogenético, los valores de soporte se estimaron en un marco de máxima verosimilitud (Por sus siglas en inglés ML: maximum likelihood) con un Bootstrap no paramétrico (Felsenstein 1985) en IQ-TREE (Nguyen et al. 2015); en el caso de los análisis de ML, la selección del modelo de aminoácidos se realizó con la estrategia ModelFinder implementada en IQ-TREE 22/10/2024 19:59:00. Una vez seleccionado el modelo, se llevó a cabo una estrategia de arranque ultrarrápida con 1000 réplicas.

Se realizó una búsqueda en el árbol de inferencia bayesiano en MrBayes 3.2.6, el modelo de sustituciones de aminoácidos se seleccionó con un método MCMC de salto reversible (Huelsenbeck, Larget, y Alfaro 2004), las tasas se establecieron en iguales. La cadena de MCMCMC, ejecutó 15 000 000 generaciones, tomando muestras de árboles y parámetros cada 1 000 generaciones. El análisis se realizó en el portal en línea CIPRES (Miller, Pfeiffer, y Schwartz 2010).

#### 4. Cromatografía de afinidad en columna

El laboratorio de la Dra. Alicia Gamboa proporcionó un péptido de 20 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de proteina XAL1. El péptido se acopló a una columna de afinidad; realizado por el Dr. Eleazar Martínez en el departamento de Bioquímica de Plantas de la Facultad de Química, UNAM.

Extracción de proteínas totales de raíz de Arabidopsis. Todo el proceso se realizó a 4 °C. Se describe para un gramo, pero se hicieron 6 g totales. Se pulverizó 1 g de tejido de raíz de 10 dpg con nitrógeno líquido; se mezcló con 5 mL de buffer de extracción (para 100 mL: Tris 0.5 M pH 7.5, 14 mL; EDTA 0.5 M pH 8.0, 1 mL; MgCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O, 0.02 g; KCl 0.186 g; sacarosa 0.0085 g; esta disolución se esterilizó por filtración y se adicionó  $\beta$ -mercaptoetanol a una concentración final de 15 mM y tritón X-100 a una concentración final de 0.1 %). Se incubó en hielo por 5 minutos y se centrifugó 30 minutos a 13 000 rpm a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó por 10 minutos a 13 000 rpm a 4 °C. Se tomó una alícuota de 200 µL (muestra extracto proteico total) y se guardó a -70 °C hasta su uso. El resto del sobrenadante se pasó por la columna.

Lavado de la columna. Se hizo pasar por la columna 20 mL de Tris 50 mM pH 7.5 sin dejar secar. Posteriormente, se adicionaron 40 mL de Tris 50 mM pH 7.5 con inhibidores de proteasas, sin dejar secar la columna.

**Incubación de la resina con el extracto proteico total**. A la columna equilibrada se le adicionó la muestra de extracto proteico total. Se mezcló hasta quedar homogéneo (1 h a temperatura ambiente en agitación). Pasado el tiempo, se drenó la columna y se recuperó una alícuota de 200  $\mu$ L (muestra extracto proteico) para guardarla (-70 °C) hasta su uso. La columna se lavó con Tris 50 mM pH 7.5. Las muestras se efluyeron con tres concentraciones distintas de cloruro de sodio (0.2 M eluato 1, 0.5 M eluato 2 y 1 M eluato 3) obteniendo un eluato con cada concentración.

**SDS-PAGE**. Las muestras se corrieron en un SDS-PAGE al 12 %. **Preparación de muestras**: A todas las muestras obtenidas de la columna se les añadió 1 mL de acetona fría, se mezclaron perfectamente y se dejaron a -20 °C

#### Motodología

durante 7 días. Transcurrido el tiempo las muestras con acetona se centrifugaron a 14 000 rpm por 30 minutos a 4 °C, recuperando sólo el botón para dejarlo secar a temperatura ambiente. A las muestras se le adicionó buffer de carga y se calentaron en agua hirviendo por 5 minutos. Tinción con plata para geles al 12 % poliacrilamida, modificación para MALDI-TOF. La tinción con plata se hizo con el kit "Silver Stain Kit Protein, GE Healtcare" (17-1150-01). Las dimensiones del gel eran 8.3 x 6.55 cm. Las proteínas se fijaron con 30 % de etanol, 10 % ácido acético, incubando a temperatura ambiente con agitación constante durante 30 minutos. Posteriormente, el gel se lavó incubando con etanol al 20 % a temperatura ambiente en agitación constante por 10 minutos, al término, se pasó a un contenedor con agua por 10 minutos en agitación a temperatura ambiente. Sensibilización, se adicionó 1 mL de tiosulfato (kit de tinción) más 24 mL de agua. Lavado, se hizo dos veces con agua por 20 minutos cada vez. Plata, 2 mL de AgNO<sub>3</sub> (kit de tinción) más 23 mL de agua se mezclaron, se adicionaron al gel y se dejó en agitación por 30 minutos. Lavado, se adicionó agua y se incubó por 10 segundos. Revelador, se adicionó al gel 18.5 µL formaldehido 37 % (kit: 0.75 g de carbonato de sodio, más 100 µL de tiosulfato de sodio en 25 mL de agua) hasta observar las bandas. Detener la reacción, se necesitaron 1.25 g de Tris en 0.625 mL de ácido acético. Se adicionó esta solución sólo por 1 minuto. Manejo en agua, se colocó el gel en agua y se cortaron fragmentos del gel donde se encontraban las bandas del eluato 3. Los fragmentos de gel se colocaron en tubos eppendorf, por separado, bien etiquetados y se mandaron por paquetería para secuenciar por MALDI-TOF en "Platform of the Eastern Genomic Center" Ouebec, Canadá.

#### 5. Análisis bioinformáticos

#### a. Análisis de agrupamiento hidrofóbico

El análisis de agrupamiento hidrofóbico (por sus siglas en inglés **HCA**: **H**ydrophobic Cluster **A**nalysis) analiza patrones en la secuencia primaria de proteínas para encontrar motivos basados en la conservación de las propiedades hidrofóbicas/hidrofílicas de los aminoácidos, en lugar de la conservación de la secuencia *per se* (Callebaut et al. 1997). HCA ha demostrado ser útil en la detección de homólogos distantes de dominios con propiedades poco comunes sin información previa. Se hizo el HCA con un conjunto de HDACs putativos. La secuencia de la proteína Human HDAC4 (Han et al. 2005), se utilizó como referencia en BLASTp contra la base de datos de proteínas NCBI (todas las traducciones CDS GenBank no redundantes-PDB-Swissprot-PIR-PRF excluyendo muestras ambientales de proyectos WGS). Se eligió HDAC4 humano porque presenta un motivo para la interacción con MEF2. Posteriormente, las secuencias recuperadas durante el BLASTp se utilizaron como referencia para buscar todas las HDACs de Arabidopsis utilizando PSI-BLAST. La convergencia se logró en la 50<sup>a</sup> ronda de PSI-BLAST. El siguiente paso fue analizar el HCA con el programa HCA-Analyze (Silva 2007) para comparar patrones hidrofóbicos y elegir las proteínas con un patrón similar al de la HDAC4 humana. Además, se buscaron y alinearon 56 secuencias de proteínas del dominio MADS de Arabidopsis usando BLASTp, con una matriz de sustitución personalizada, como lo describe Silva (2007), para identificar patrones hidrofóbicos similares al encontrado en el

#### Motodología

dominio de interacción HDAC4 de MEF2B. Finalmente, para obtener más información sobre los patrones de conservación de grupos hidrofóbicos entre HDACs y proteínas de dominio MADS seleccionadas, se dibujaron y compararon visualmente grupos hidrofóbicos de las siguientes proteínas utilizando el programa HCADraw (Gaboriaud et al. 1987) (disponible en https: //bioserv.impmc.jussieu.fr/hca-form.html en el momento del análisis): HDACs humanos, HDAC4 (identificador en UniProt P56524); HDAC de Arabidopsis, HDA5 (identificador en UniProt Q8RX28), HDA15 (identificador en UniProt Q8GXJ1), HDA18 (identificador en UniProt Q8LRK8); Proteínas con dominio MADS de humano, MEF2B (identificador en UniProt Q02080); proteínas con dominio MADS de humano, MEF2B (identificador en UniProt Q38841), PISTILLATA (PI, identificador en UniProt P48007), AGL15 (identificador en UniProt Q38847), AGL19 (identificador en UniProt O82743) y AGL64 (identificador en UniProt Q7XJK9).

#### b. Simulación de acoplamiento rígido (Docking)

Se realizaron simulaciones de acoplamiento para obtener más información sobre las posibles interacciones entre una proteína MADS y una HDAC que más prometía interacción (XAL1 y HDA15). Primero, obtuvimos una estructura 3D para el monómero XAL1 de la base de datos de estructura de proteínas AlphaFold (https://alphafold.ebi.ac.uk/); específicamente, utilizamos la predicción de AlphaFold para la proteína Uniprot Q38841 (predicción que se puede recuperar en https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q38841). Luego, construimos un homo-oligómero para XAL1 utilizando el servicio GalaxyHomomer de GALAXYweb (https://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=HOMOMER) sin especificar el estado oligomérico esperado. Los cinco mejores modelos de oligomerización ab initio eran dímeros, con puntuaciones de acoplamiento de oligómeros que oscilaban entre 1563.96 y 1394.14; todo el trabajo posterior se llevó a cabo con el modelo único de mejor puntuación. Las simulaciones de acoplamiento de cuerpos rígidos entre XAL1 y HDA15 se realizaron en el servidor HDOCK (http://hdock.phys.hust.edu.cn/; (Yan et al. 2020). Utilizamos como entrada el dímero XAL1 predicho de los pasos anteriores y la estructura cristalina 6J6T de PDB, que contiene el dominio de histona desacetilasa de HDA15, como proxy de HDA15 (https://www.rcsb.org/structure/6J6T; (C. Y. Chen et al. 2020). El homodímero XAL1 se designó como molécula receptora y el homotetrámero HDA15 como molécula ligando. A la corrida de acoplamiento se le permitió realizar acoplamientos *ab initio*, guiados por una plantilla. Se utilizó un control positivo de la capacidad de HDOCK para detectar interacciones genuinas, se realizó una simulación de acoplamiento en la que se intentó reproducir la unión entre el factor de transcripción del dominio MADS humano de MEF2b y el dominio de unión a MEF2 de la histona desacetilasa murina HDAC9, como es reportado en el archivo PDB 1TQE. Es decir, utilizamos las cadenas E y F de 1TQE (correspondientes a un dímero MEF2b) como receptor y la cadena G (correspondiente al dominio de unión a MEF2 de HDAC9) como ligando en una simulación de acoplamiento HDOCK para intentar obtener las mismas superficies de interacción, como está reportado en 1TQE.

#### 6. Expresión de genes MADS y HDAC

**Extracción de RNA**. Modificado de TRIzol<sup>®</sup>Reagent, ambion<sup>®</sup>RNA by life technologies<sup>TM</sup>. Se pulverizó el tejido (raíz a diferentes tiempos) con N<sub>2</sub> líquido. Se agregó 1 mL de TRIzol<sup>®</sup>Reagent por 100 mg de tejido. Se homogenizó en vortex. Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 0.2 mL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) por cada mL de TRIzol<sup>®</sup>Reagent. Se agitó por inversión durante 15 segundos. Se incubó 3 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 10 000 rpm por 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante se pasó a un tubo nuevo. Se agregaron 0.2 mL de cloroformo frío (4 °C) por cada mL de TRIzol<sup>®</sup>Reagent. Se agitó por inversión durante 15 segundos. Centrifugamos a 10 000 rpm por 15 minutos a 4 °C. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo. Se precipitó con 0.5 mL de isopropanol por mL de TRIzol<sup>®</sup>Reagent y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Concentramos incubando 2 horas a -20 °C. Las muestras se centrifugaron a 10 000 rpm por 10 minutos a 10 000 rpm por 5 minutos a 10 000 rpm por 5 minutos a 10 000 rpm por 10 minutos a 10 000 rpm a 4 °C. Se decantó el etanol y se dejó secar el pellet. El pellet se resuspendió en 20 µl de agua grado biología molecular. Guardamos a -20 °C por un par de semanas o a -80 °C por más tiempo.

**RT-PCR**. Según las especificaciones de SuperScript<sup>™</sup>II Reverse Transcriptase, Invitrogen<sup>™</sup> Life Technologies.

**Síntesis de cDNA**. Se usó SuperScript<sup>TM</sup>II RT. En una reacción de 20  $\mu$ L con 1  $\mu$ g de RNA total, se adicionó 1  $\mu$ L de Oligo dT (500  $\mu$ g/mL) en un microtubo libre de nucleasas, 1  $\mu$ L de una mezcla de dNTPs (10 mM por cada nucleótido) y con agua destilada llevar a 12  $\mu$ L. Se calentó la mezcla a 65 °C por 5 minutos e inmediatamente después pasamos a hielo. Colectamos el contenido del tubo con una breve centrifugación y adicionamos 4  $\mu$ L de amortiguador de primera cadena 5X, 2  $\mu$ L de DTT 0.1 M. Mezclamos suavemente el contenido del tubo. Se incubó a 42 °C por 2 minutos. Se adicionó 1  $\mu$ L (200 unidades) de SuperScript<sup>TM</sup>II RT y se mezcló suavemente aspirando y expulsando con una micropipeta. Se incubó a 42 °C por 50 minutos. Se inactivó la reacción calentando a 70 °C por 15 minutos. Todo el proceso se hizo en un termociclador 2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems.

**PCR para expresión**. Se hizo la PCR en un termociclador 2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems, con 1  $\mu$ L de cDNA con la siguiente mezcla de reacción: Amortiguador PCR 1X, MgCl<sub>2</sub>, 1 mM; dNTPs, 0.5 mM; oligo forward, 0.5  $\mu$ M; oligo reverse 0.5  $\mu$ M (tabla AII en el anexo), Taq DNA polimerasa 1 U/ $\mu$ L. Volumen final de 20  $\mu$ L. Las condiciones de temperatura y tiempo para amplificar el gen endógeno son las siguientes: desnaturalización inicial de 3 minutos a 94 °C, seguida por 30 ciclos con desnaturalización 94 °C por 30 segundos, alineación 58 °C por 35 segundos, extensión 72 °C por 1 minuto y una extensión final de 72 °C por 7 minutos. En el caso para amplificar el T-DNA sólo se modifica la temperatura de extensión a 61 °C por 30 segundos, el resto de las temperaturas y tiempos son iguales.

#### 7. Ensayo de doble híbrido

Los ensayos de dos híbridos con HDA15 y XAL1, las clonas del cebo y presa utilizados en los ensayos de doble híbrido se clonaron en la versión Gateway de los vectores pGBKT7-GW (cebo) y pGADT7-GW (presa) utilizando el sistema de clonación Gateway basado en recombinación (Invitrogen). Conjuntos de construcciones se transformaron conjuntamente en la cepa de levadura de oro Y2H (Clontech). Los transformantes de levadura se seleccionaron en medio sintético de doble caída mínima deficiente en Trp y Leu. Las pruebas de interacción de proteínas se evaluaron en un medio de abandono triple deficiente en His, Trp y Leu o en un medio deficiente en His, Trp, Leu y Ade con X- $\alpha$ -Gal. Se analizaron al menos tres clonas. Los experimentos se repitieron tres veces con resultados similares.

#### 8. Ensayo de complementación de fluorescencia bimolecular

En el ensayo de complementación de fluorescencia bimolecular (por sus siglas en inglés **BiFC**: **Bi**molecular **F**luorescence **C**omplementation), los ADNc de XAL1, HDA6, HDA15 y HDA19 se clonaron en pDONR201 (Invitrogen, ahora Life Technologies). Todos las clonas se recombinaron con pYFN43 para generar fusiones N-terminales con la parte N-terminal de YFP. XAL1 (pENTRY/D) también se recombinó con pYFC43 (Belda-Palazón et al. 2012) para generar una fusión N-terminal con la parte C-terminal de la proteína YFP. Las construcciones se introdujeron individualmente en *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 y se cultivaron en Luria Bertani (LB) con kanamicina 100 mg/mL y rifampicina 25 mg/mL. Se cultivó *A. tumefaciens* toda la noche (DO 1.2-1.6), se recolectaron, centrifugaron y resuspendieron en un volumen similar de medio de infiltración [MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ácido 2- (N-morfolina)-etano sulfónico (MES) 10 mM, pH 5.6, 200 mM acetosiringona], la DO se ajustó a 1,0 y se incubó a 25 °C durante 3 h con agitación lenta. Antes de la co-infiltración, *A. tumefaciens* que contenía pYFC43-XAL1 se mezcló con un volumen similar de *A. tumefaciens* con pYFN43-HDA15 o pYFN43-HDA19. Estas mezclas se introdujeron en el espacio aéreo abaxial de hojas jóvenes de *Nicotiana benthamiana* usando una jeringa sin aguja. La fluorescencia YFP se analizó 2-3 días después de la infiltración utilizando un microscopio confocal de escaneo láser LSM 510 META invertido (Zeiss). YFP se excitó usando una línea de 488 nm de un láser de argón y la emisión se filtró usando un filtro BP 500-550 nm

### Resultados

#### 1. Análisis filogenético de desacetilasas de histonas

Un análisis filogenético previo de desacetilasas de histonas entre plantas y animales reveló un dominio catalítico conservado (Gregoretti, Lee, y Goodson 2004). A fin de averiguar si las HDACs de plantas son ortólogas de las HDACs de animales en un amplio contexto filogenético, realizamos un análisis filogenético que incluye secuencias de HDACs representativas de bacterias, animales y plantas (figura 6). Después de 15 000 000 generaciones, encontramos una convergencia (la desviación estándar promedio entre cadenas fue de 0,01). Todos los parámetros tuvieron un tamaño de muestra efectivo de 6,150 o más. Para tener una perspectiva clara de la topología y las relaciones entre las secuencias, se seleccionó el árbol de máxima credibilidad, del clado de los árboles muestreados usando TreeAnnotator 2.6 (Bouckaert et al. 2019). Las secuencias de HDACs de Clase I y Clase II se recuperaron en grupos recíprocamente monofiléticos. Las secuencias HDA5 y HDA18 de Arabidopsis se recuperaron como un grupo monofilético (figura 7). La secuencia de HDA15 de Arabidopsis se recuperó en el clado hermano, con una topología interna muy similar, también en estrecha asociación con secuencias de humano; mientras que todas las secuencias de plantas se recuperaron en un grupo monofilético, las secuencias de animales se recuperaron en una configuración parafilética (figura 7). Aunque las HDACs de plantas no se encuentran en el mismo clado que las HDACs de humanos, pertenecen a un clado hermano, y este patrón se recupera en ambos clados, lo que puede sugerir una relación funcional más profunda. El encontrar una cercanía entre los clados de las desacetilasas de histonas clase II de Arabidopsis y humano, nos hace pensar que puede haber una conservación, no solo de secuencias, si no posiblemente de localización y función.

#### 2. TSA como inhibidor de las desacetilasas de histonas

En 2005, Xu et al. reportaron que la TSA, un inhibidor inespecífico de HDACs, alteraba el patrón celular de la epidermis de la raíz. Analizaron varias mutantes, una de ellas fue la mutante *hda18*; esta mutante presentaba un patrón de crecimiento de los pelos radiculares muy similar a la silvestre expuesta a 100 ng/mL de TSA. Una de sus conclusiones fue que la HDA18 tiene un papel importante en el patrón celular de la raíz. En Arabidopsis, las HDACs junto con las proteínas con dominio MADS (XAL1, XAL 2 y AGL19) podrían estar interaccionando y tener un papel fundamental en el desarrollo de la raíz. En este contexto y considerando lo reportado por Xu y colaboradores, las raíces de mutantes simples (*xal1, xal2 y agl19*), una doble mutante (*xal1/xal2*) y una triple mutante (*xal1/xal2/agl19*) se expusieron a TSA esperando encontrar diferencias en la longitud de la raíz o el crecimiento de pelos radiculares, tanto por la inhibición de la actividad de HDACs como por la ausencia de proteínas con dominio MADS. Los resultados en las gráficas muestran la dinámica de crecimiento en porcentaje. En la gráfica 1, no se observan cambios en la longitud de las raíces, ni aumento en la cantidad de pelos radiculares en ninguno de los

#### Resultados

tiempos en que se dejaron las plántulas de las mutantes simples. En la gráfica 2 se muestran los resultados de la mutante doble y la mutante triple en donde tampoco se encontraron cambios en la longitud de la raíz, ni cambios en el número de pelos radiculares. Se hicieron dos repeticiones de cada experimento, sin encontrar diferencias.



Figura 6. Árbol filogenético de las secuencias de desacetilasas de histonas de procariotas y eucariotas. Los miembros de HDACs de eucariontes y bacterias seleccionados, se incluyeron para representar mejor la gran diversidad de HDACs. El clado en azul corresponde a las HDACs de clase I y en rojo a las HDACs de clase II. Los valores en las ramas seleccionadas corresponden a frecuencias de arranque no paramétricas (bs)/probabilidades posteriores (p.p.).



Figura 7. Filogenia de las desacetilasas de histonas de clase II. HDA5 y HDA18 se recuperaron como un grupo monofilético y HDA15 en el clado hermano. Las secuencias de animales estaban en una topología parafilética, pero HDA15 de Arabidopsis y HDACs de humanos pertenecen a un clado hermano, lo que sugiere una conservación funcional; en verde HDACs clase II de Arabidopsis y en rojo HDACs clase II de *Homo sapiens*. Soya (SOYBN), *Oryza sativa japonica* (ORYSJ).



Gráfica 1. Determinación de la longitud de raíces primarias de las mutantes simples de Arabidopsis en los genes *XAL1*, *XAL2*, y *AGL19*, expuestas a TSA. La tabla muestra los porcentajes del promedio; n = 31, dpg.



Gráfica 2. Determinación de la longitud de raíces primarias de mutantes doble y triple de Arabidopsis, *xal1/xal2* y *xal1/xal2/agl19*, expuestas a TSA. La tabla muestra los porcentajes del promedio; n = 31, dpg.

#### 3. ¿XAL1 interacciona directamente con las HDACs?

La cromatografía de afinidad permite la separación de mezclas proteicas por su afinidad o capacidad de unión a un determinado ligando. Otra manera de abordar una posible interacción de HDAC-MADS fue a través del uso de cromatografía de afinidad, acoplando un péptido proveniente de XAL1 a una columna de afinidad. Se disponía de un péptido (20 aminoácidos: 14-KIEENNNSILDANFAVMETN) diseñado a partir del extremo carboxilo de la proteína XAL1, región menos conservada con respecto a XAL2, AGL19 y entre las diferentes proteínas con dominio MADS. Este péptido se acopló a una columna de afinidad, con el objetivo de determinar la posible asociación de XAL1 a una desacetilasa de histona. El procedimiento fue pasar a través de la columna extractos proteicos de raíces de plántulas de Arabidopsis silvestre crecidas durante 10 días. Se recuperaron tres eluatos provenientes de eluciones con diferentes concentraciones de sal (1, 2 y 3). Se esperaba que cada uno de estos eluatos contuvieran proteínas que se unieron específicamente al péptido de XAL1. En el gel teñido con plata (figura 8), técnica empleada por su sensibilidad para la detección de proteínas en geles, se observó que el eluato 3 (carril 5) presentó cinco bandas definidas (el eluato 3 contenía las proteínas con mayor pureza que los eluatos 1 y 2) las cuales denominamos P1, P2, P3, P4, P5, de menor a mayor peso molecular (figura 8). Las bandas del gel se cortaron y se mandaron a secuenciar. Ninguna de las secuencias obtenidas fue una desacetilasa de histona y no se siguieron debido a que no era nuestro objetivo principal, sin embargo, esto abre posibilidades interesantes de investigación sobre las interacciones de XAL1 con estas proteínas y su posible función.



Figura 8. Proteínas que interactúan con un oligopéptido de XAL1. Gel teñido con plata en donde se separaron las muestras que se obtuvieron a partir de la cromatografía de afinidad: M, marcador de peso molecular; carril 1, extracto proteico total; carril 2, extracto proteico después de incubar con la columna; carril 3, eluato 1 con 0.2 M de NaCl; carril 4, eluato 2 con 0.5 M de NaCl; carril 5, eluato 3 con 1 M de NaCl. Los recuadros con número indican las proteínas que se mandaron a secuenciar: P1, glutatión S-transferasa; P2, actina 2 o adenosil metionina sintasa; P3, factor de elongación 8 o cadena-β tubulina; P4, β-glucosidasa; P5, Heat shock.

# 4. Posible dominio de interacción entre HDACs y proteínas con dominio MADS de Arabidopsis

Con el fin de encontrar posibles interacciones entre proteínas HDACs y proteínas con dominio MADS en Arabidopsis, utilizamos herramientas informáticas para detectar posibles candidatos de HDACs clase II y factores transcripcionales MADS-box con motivo de unión a MEF2 y el dominio MADS-box/MEF2S, respectivamente (Han et al. 2005). Como el motivo de unión a MEF2 se conserva en las HDACs 4, 5, 7 y 9 clase IIa de animales, se llevó a cabo una alineación múltiple con Clustal entre HDACs de clase II de humano y de Arabidopsis; sin embargo, no encontramos la conservación de este dominio a nivel de secuencia primaria (figura 9). Por consiguiente, se realizó un HCA (Rebehmed et al. 2016; Silva 2007), en donde encontramos que la HDA15 clase II de Arabidopsis no conserva el patrón hidrofóbico del motivo de unión a MEF2. Sin embargo, las HDA5 y HDA18, también de la clase II, conservan un patrón hidrofóbico similar al motivo de unión a HDACs está altamente conservado entre ellas a nivel de secuencia primaria, pero no con HDAC4 (figura 10 B). Aunque HDA15 no conserva un patrón hidrofóbico similar al conserva algunos aminoácidos con respecto a HDA5 y HDA18 (figura 10C), lo que sugiere que estas HDACs de clase II podrían interactuar con las proteínas con dominio MADS en Arabidopsis.

Asimismo, se exploró si el motivo MADS-box/MEF2 se conserva en alguna proteína con dominio MADS de Arabidopsis, para ello, se llevó a cabo una alineación múltiple con el motivo MADS-box/MEF2 de MEF2B de 40 proteínas con dominio MADS de Arabidopsis (figura 11) y seleccionamos algunas de ellas con una puntuación >30 para analizar el patrón de hidrofobicidad. Sin embargo, ni AGL15, que contiene la puntuación principal (42,7), ni las otras, incluida la de puntuación más baja (XAL1), mostraron un patrón hidrofóbico similar al motivo MADS-box/MEF2S (figura 12). Mientras se realizaba este estudio, Zhao, et al. reportaron el dominio de interacción de MADS involucrado en la interacción con histonas desacetilasas en tomate (Zhao et al. 2015), por lo que analizamos este motivo en proteínas con dominio MADS en Arabidopsis, siendo el dominio MADS de XAL1 con más aminoácidos conservados (figura 13), lo que sugiere que XAL1 puede interactuar con HDACs en Arabidopsis.

#### Resultados

#### А

P56524 Q9UQL6 Q8WUI4 Q9UKV0 Q8RX28 Q8GXJ1 Q8LRK8	HDAC4_HUMAN HDAC5_HUMAN HDAC7_HUMAN HDAC9_HUMAN HDA5_ARATH HDA15_ARATH HDA18_ARATH	113 118 45 88 1 1 1	KQQQEMLAMKHQQELLEHQRKLERHRQEQELEKQHREQKLQQLKNKEKGK <mark>ESA</mark> KQQQEMLAAKQQQEMLAAKRQQELEQQRQREQQRQEELEKQRLEQQLLILRNKEKSK <mark>ESA</mark> PMRLSMDTPMPELQVGPQEQELRQLLHKDKSK <mark>RSA</mark> KELLAIKQQQELLEKEQKLEQQRQEQEVERHRREQQLPPLRGKDRGR <mark>ERA</mark>
P56524 Q9UQL6 Q8WUI4 Q9UKV0 Q8RX28 Q8GXJ1 Q8LRK8	HDAC4 HUMAN HDAC5 <sup>-</sup> HUMAN HDAC7 <sup>-</sup> HUMAN HDAC9 HUMAN HDA5 ARATH HDA15 ARATH HDA18 <sup>-</sup> ARATH	166 178 80 138 1 1	VASTEVKMKLQEFVLNKKKALAHRNLNHCISSDPRYWYGKTQHSSLDQSSPPQSG IASTEVKLRLQEFLLSKSKEPTPGGLNHSLPQHPKCWGAHHASLDQSSPPQSGPPG VASSVVKQKLAEVILKKQQAALERTVHPNSPGIPYRTLEPLETEGATRS VASTEVKQKLQEFLLSKSATKDTPTNGKNHSVSRHPKLWYTAAHHTSLDQSSPPLSG
P56524 Q9UQL6 Q8WU14 Q9UKV0 Q8RX28 Q8GXJ1 Q8LRK8	HDAC4_HUMAN HDAC5_HUMAN HDAC7_HUMAN HDAC9_HUMAN HDA5_ARATH HDA15_ARATH HDA18_ARATH	745 774 611 724 107 226 140	-VFVRLPCGGVGVDSDTIWNEVHSAGAARLAVGCVVELVFKVATGELKNGFAVVRPPGHH KMYAVLPCGGIGVDSDTVWNEMHSSSAVRMAVGCLLELAFKVAAGELKNGFAIRPPGHH RMFVMLPCGGVGVDTDTIWNELHSSNAARWAAGSVTDLAFKVASGELKNGFAVVRPPGHH KFFSSLPCGGLGVDSDTIWNELHSSGAARMAVGCVIELASKVASGELKNGFAVVRPPGHH NRIASQLNSIYLNGGSSEAAYLAAGSVVKLAEKVAEGELDCGFAIVRPPGHH LLYSYFTSDT-YANEYSARAARLAAGLCADLATDIFTGRVKNGFALVRPPGHH ::::::::::::::::::::::::::::::::::
В			
P56524 Q8RX28 Q8GXJ1 Q8LRK8	HDAC4_HUMAN HDA5_ARATH HDA15_ARATH HDA18_ARATH	121 1 1 1	MKHQQELLEHQRKLERHRQEQELEKQHREQKLQQLKNKEKGK <mark>ESAVASTEVKMKLQEFVL</mark>
P56524 Q8RX28 Q8GXJ1 Q8LRK8	HDAC4 HUMAN HDA5 ARATH HDA15 ARATH HDA18 ARATH	181 1 1 1	NKKKALAHRNLNHCISSDPRYWYGKTQHSSLDQSSPPQSGVSTSYNHPVLGMYDAKDDFP
P56524 Q8RX28 Q8GXJ1 Q8LRK8	HDAC4_HUMAN HDA5_ARATH HDA15_ARATH HDA18_ARATH	681 52 177 85	RIQSIWSRLQETG-LRGKCECIRGRKATLEELQTVHSEAHTLLYGTNPLNRQKLDSKKLL RIRVIWEKLQLAG-VSQRCVVLGSSKAEDKHLQLVHTKDHVNLVKSISTKQKDYRRNRIA RLRAIAASLATAGVFPGRCLPINAREITKQELQMVHTSEHVDAVDTTSQLL- RIRVIWEKLQLAG-VTQRCVVLGGSKAEDKHLKLVHTKKHVNLVKSISTKKKDSRRNKIA *:: * * :* :: :: :: :: :: :: :: :: :: ::
P56524 Q8RX28	HDAC4_HUMAN	740	GSLASVFVRLPCGGVGVDSDTIWNEVHSAGAARLAVGCVVELVFKVATGELKNGFAVVRP

Figura 9. Motivo de interacción MEF2 en la secuencia lineal de histonas desacetilasas de clase II en humano y Arabidopsis. A, alineación de las desacetilasas de histonas de clase IIa de humano (HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9) y HDACs de Arabidopsis (HDA5, HAD15, HAD15, HAD18). B, alineación de la HDAC4 de humano con HAD5, HAD15 y HAD18 de Arabidopsis. En A y B, el motivo de interacción con MEF2 de humanos reportado, está sombreado en rojo; el motivo de interacción putativo en Arabidopsis está sombreado en verde.



Figura 10. Dominio con un sitio putativo para la interacción entre MADS y HDACs en Arabidopsis. A, alineación múltiple de las secuencias del motivo de las HDACs clase II de humano (tomada de Han et al., 2005), a la izquierda el HCA con el motivo de la interacción reportada de HDAC4 para *Homo sapiens*. Debajo de la alineación y el gráfico de HCA, una representación gráfica de la HDAC4 de humano, la banda amarilla representa el motivo de interacción con MEF2C y la banda roja es el dominio de desacetilación. B, mapeo de residuos en el dominio MADS/MEF2 de HDACs necesarios para la interacción con MEF2. C, alineación múltiple de la secuencia del motivo de HDACs clase II y tres HCA mostrando el motivo putativo de interacción de HDACs de Arabidopsis; abajo, representación gráfica de HDA18 de Arabidopsis con motivo putativo (en amarillo) y dominio catalítico de desacetilasas (en verde). Las zonas sombreadas en amarillo de los gráficos de HCA indican los motivos de interacción con MADS putativos para los gráficos HCA de Arabidopsis. En A y B, dentro del alineación en las secuencias de HDACs, las letras en rojo son aminoácidos conservados en humano, en amarillo los no conservados, en verde residuos conservados de Arabidopsis.

	Proteina	Puntuación total	Valor "e"
1	AGL15	42.7	1e-07
2	AGL21	42.7	2e-07
3	SPV	42.4	2e-07
4	AGL18	42.4	2e-07
5	AGL24	40.8	6e-07
6	AGL16	40.4	7e-07
7	CAL	40.4	8e-07
8	AGL42	40.0	9e-07
9	API	39.7	1e-06
10	AGL72	38.9	2e-06
11	AGL79	38.9	2e-06
12	AGL71	38.5	3e-06
13	AGL20	38.5	3e-06
14	AGL6	37.7	5e-06
15	AGL44	37.7	5e-06
16	AGL17	35.8	2e-05
17	STK	35.4	2e-05
18	AG	35.4	2e-05
19	AGL19	35.4	2e-05
20	SEP2	35.4	3e-05
21	SHP1	35.0	3e-05
22	SHP2	35.0	3e-05
23	SEP1	34.7	4e-05
24	AGL13	34.3	5e-05
25	AGL63	34.3	5e-05
26	SEP3	34.3	5e-05
27	SEP4	33.5	9e-05
28	MAF4	32.7	1e-04
20	XAL2/AGL14	32.7	2e-04
30	PI	32.3	2e-04
31	AGL28	32.0	3e-04
32	AGL23	30.8	6e-04
33	AP3	30.8	6e-04
34	XAL1/AGL12	30.4	7e-04
35	FLC	29.6	0.001
36	AGL57	29.6	0.001
37	AGL62	29.6	0.001
38	AGL29	28.5	0.002
39	AGL31	28.5	0.003
40	AGL61	28.5	0.003

Figura 11. Lista de principales proteínas con dominio MADS con mejor puntuación de alineación. Se enlistan 40 proteínas con dominio MADS de Arabidopsis, sólo se eligieron aquellas con una puntuación >30 de la alineación múltiple con el motivo MADS-box/MEFS de MEF2B para posterior análisis.

MEF2 AGL15 AGL19 XAL1/AGL12 ΡI AGL64

Resultados

Figura 12. Análisis de agrupamiento hidrofóbico de proteínas con dominio MADS de Arabidopsis. Algunos gráficos de HCA representativos de proteínas con dominio MADS que no presentan en su secuencia un patrón parecido al motivo de interacción en MEF2.

Resultados



Figura 13. Motivo del dominio MADS/MEF2 se conserva en algunas proteínas del dominio MADS de Arabidopsis. A, representación gráfica de la proteína MEF2B, en rojo el dominio MADS y en verde el dominio MEF2; abajo de la representación gráfica está la secuencia de aminoácidos lineales indicando el dominio MADS, el motivo de unión a HDAC y el dominio MEF2 (modificada de Lu et al. 2000). B, alineación múltiple de la secuencia del motivo MEF2C, proteínas con dominio MADS de tomate y algunas proteínas con dominio MADS de Arabidopsis. En verde, residuos conservados en todas las proteínas con dominio MADS de las sustituciones menos conservadas y en azul residuos de las sustituciones conservadas. *Homo sapiens* (Hs), *Lycopersicon esculentum* (Le), *Arabidopsis thaliana* (At).

Han et al. (2005) reportaron un análisis que reveló la interacción entre HDAC9 de murino y MEF2B de humano. Basándonos en este reporte, exploramos la posibilidad de la interacción de HDACs con XAL1 mediante la simulación de acoplamiento. Elegimos a XAL1 porque presenta una alta expresión en el desarrollo de la raíz y el motivo de interacción de la proteína tiene una alta identidad con MEF2B de humano. En el caso de las HDACs seleccionamos a la HDA15 que se expresa en el desarrollo de raíz y tiene una secuencia primaria homóloga a HDA5. La simulación de acoplamiento se hizo entre un homodímero de XAL1 y un homotetrámero de HDA15 (X. Liu et al. 2013).

La simulación genera diferentes acoplamientos (modelos). Los diez modelos de interacción más probables presentaron puntuaciones de confianza que varían entre 0.8612 y 0.8827, así como una puntuación de energía de acoplamiento entre -250.93 y -241.25, respectivamente (los valores más negativos representan una interacción prevista más estable entre proteínas). De acuerdo con las sugerencias de Yan et al. (2020), incluimos los diez mejores modelos producidos por la puntuación de energía de acoplamiento HDOCK, así como el mejor modelo predicho para la interfaz MEF2B/HDAC9. La estructura de los dos primeros modelos de la interacción de XAL1-
HDA15 es de una confianza de 0.8827 y 0.8799, así como su comparación con el análisis de acoplamiento usando MEF2B-HDAC9 (0.8387), interacción descrita y reportada por Han et al. (2005) se puede ver en la tabla1. Estos resultados mostraron que una interacción entre HDA15 y XAL1 es muy posible.

### 5. Los genes HDACs y XAL1 se expresan en raíz de Arabidopsis

Considerando la hipótesis de una interacción entre tres miembros de clase II de las HDACs y XAL1, se investigó si los transcritos de HDA5, HDA15 y HDA18 se presentan en los mismos tejidos donde se encuentra el transcrito para XAL1. Un análisis de datos de microarreglos de la plataforma Genevestigator (Hruz et al. 2008) mostró que el transcrito de HDA15 y HDA5 están presente en tejidos de hipocótilo, raíz, cotiledón y semilla, mientras que el de HDA18 se encuentra en los mismos tejidos, pero en niveles más bajos en comparación con los transcritos de HDA5 y HDA15. Los altos niveles de transcrito de XAL1 en la raíz y el hipocótilo (figura 14) abren la posibilidad de que exista interacción entre estas HDACs y XAL1 en los tejidos del hipocótilo y de la raíz. No obstante, esto no indica que podrían estar interaccionando a nivel celular sólo por estar presentes en esos tejidos. Reportes previos muestran que XAL1 tiene una función esencial en el desarrollo radicular (García-Cruz et al. 2016; Tapia-López et al. 2008) por lo que se comparó la cinética de acumulación de los transcritos de HDA5, HDA15, HDA18 y XAL1 durante desarrollo radicular. El transcrito para HDA5 presentó altos niveles de abundancia de 5 a 10 días después de la siembra (dps), a diferencia del transcrito para HDA18 que solo se detectó a los 10 dps, pero en un nivel menor; mientras que el transcrito para HDA15 se acumula a los 3, 5 y 10 dps. El transcrito para XAL1 presentó niveles mayores de abundancia de 5 a 10 dps (figura 14). Por lo tanto, el transcrito para HDA5 presenta niveles de abundancia similares a los detectados para el transcrito de XAL1 durante el desarrollo de la raíz. Por el contrario, los transcritos para HDA15 y HDA18 se acumulan preferentemente a los 10 dps. Estos resultados sugieren que las tres HDACs se co-expresan con XAL1 en una determinada etapa de desarrollo de la raíz.

### 6. HDA15 interactúa con XAL1

Dada la predicción de la interacción entre HDA15-XAL1 y la posible co-expresión en alguna etapa de desarrollo, se realizó el ensayo de dos híbridos en levadura para evaluar esta interacción. Nuestros resultados mostraron que HDA15 puede unirse a XAL1 (figura 15A), ya que la cepa de levadura que porta el plásmido BD-HDA15/AD-XAL1 creció en un medio restrictivo (SD-Leucina-Triptófano-Histidina y SD-Leucina-Triptófano-Histidina con 3-amino-1, 2, 4-triazol). La interacción no se observó cuando se clonó XAL1 en BD y HDA15 en el plásmido AD (figura 15B), lo que indica que, aunque XAL1 es un factor transcripcional, no tiene actividad de transactivación en este sistema. Además, cuando se utilizaron diferentes concentraciones (0,25-1,5 mM) de 3-amino-1, 2, 4-triazol (3-AT), se observó una inhibición del crecimiento de las colonias, de manera dependiente de la concentración. Cuando se realizaron diluciones, el crecimiento se redujo significativamente, como se esperaba (figura 15C). Estos resultados se confirmaron por la actividad de beta-galactosidasa (figura 15D). Se hicieron controles negativos de las interacciones encontradas entre *HDA15* y otros genes para proteínas con caja MADS (BD-HDA15/AD-AGL11

Resultados

y BD-HDA15/AD-AGL77) (figura AI, en anexo), confirmando que la interacción de HAD15 con XAL1 no se debe a un artefacto de auto activación de HDA15. En conjunto, estos datos mostraron que existe una interacción entre HDA15 y XAL1 en este sistema heterólogo.

Tabla 1. Interacción de XAL1 con HDA15 en Arabidopsis según lo predicho por las simulaciones de acoplamiento HDOCK. La tabla muestra los resultados de los diez modelos principales que generó el análisis de acoplamiento y la interacción reportada para humanos de MEF2B con HDAC9 de ratón. Los dos últimos renglones muestran las imágenes de la estructura de las interacciones: En el modelo 1 y modelo 2 la HDA15 está en lila claro, XAL1 está en verde y aguamarina. En el modelo MEF2B/HDAC9 está MEF2B y HDAC9 en verde y aguamarina, respectivamente.

Organismo	Arabidopsis thaliana						Homo sapiens/Mus musculus					
Rango del modelo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Modelo 1 de MEF2B/HDAC9	
HDOCK docking energy score	-250.93	-249.58	-248.81	-248.53	-245.33	-245.20	-244.55	-242.01	-241.76	-241.25	-232.43	
Confidence score	0.8827	0.8799	0.8783	0.8777	0.8706	0.8703	0.8689	0.8630	0.8624	0.8612	0.8387	
Ligando RMSD (Å)	106.61	107.81	74.14	78.76	73.30	111.37	109.35	65.89	85.03	113.06	0.79	
Estructura (hélices)	Modelo 1					Modelo 2				Modelo MEF2B/HDAC9		
Estructura (hélices- superficie)	Modelo 1				Modelo 2				Modelo MEF2B/HDAC9			

### 7. Localización nuclear de la interacción HAD15-XAL1

Se utilizó el enfoque de complementación bimolecular de fluorescencia (BiFC) para verificar la interacción HAD15-XAL1 *in planta.* HDA15 y XAL1 se fusionaron con la porción N-terminal o C-terminal YFP en los vectores pYFN43 y pYFC43 que se introdujeron en *Agrobacterium tumefaciens* para realizar una expresión transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana*. La interacción de HDA15 con XAL1 se observó en el núcleo, confirmando la interacción en la planta (figura 16A). Curiosamente, la intensidad de la fluorescencia observada estaba fuertemente confinada en un área dentro del núcleo, posiblemente el nucléolo (figura 16C). En el ensayo de BiFC se utilizó como control positivo la interacción entre PISTILLATA (PI) y APETALA (AP3), las cuales co-localizan y por tanto se observó una señal fluorescente tras el análisis por microscopía confocal (figura 16B, D). En caso contrario, la subunidad  $\beta$  de la proteína quinasa 1 relacionada con la sacarosa no fermentadora (AKIN $\beta$ ), una subunidad de la quinasa SnRK1, con XAL1 y YFN (vector vacío) con XAL1 no mostraron señal de fluorescencia. Como control negativo utilizamos la interacción entre el SUPRESOR DE LA SOBREEXPRESIÓN DE CONSTANS 1 (SOC1) con AGAMOUS (AG), ya que estas dos proteínas no interactúan (Belda-Palazón et al. 2012; Ito et al. 2004; Lee et al. 2008) (figura AII en anexo). Todos estos resultados confirmaron la interacción de HDA15 con XAL1.



Figura 14. Niveles de acumulación de los transcritos para proteínas MADS y HDACs en raíces de Arabidopsis. A, niveles de abundancia de los transcritos para HDACs y XAL1 en diferentes tejidos de Arabidopsis (datos de microarreglos de la plataforma Genevestigator). B, niveles de acumulación de los transcritos para XAL1 y HDACs en diferentes tiempos en el desarrollo de la raíz de Arabidopsis (PCR punto final). Días después de la siembra (dps), tubulinas (*TUB*).



Figura 15. Interacción entre HDA15 y XAL1. El ensayo de dos híbridos en la levadura *S. cerevisiae* indica una interacción entre HDAC y XAL1 en Arabidopsis. A, SD/-L/-W/-H corresponde al medio de abandono que carece de los aminoácidos L, W, H e interacciones positivas, BD HDA15 y AD XAL1, lo que da como resultado el crecimiento de levadura en la placa SD/-L/-W/-H. B, interacción de HDA15 y XAL1 con diferentes concentraciones de 3-AT (0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25 y 1,5 mM). C, interacción de HDA15 con XAL1 a dos diluciones (1:50 y 1:1000). D, actividad de Lac-Z en la interacción HDA15 y XAL1. Se utilizaron AGAMOUS LIKE 6 (AGL6) y APETALA 3 (AP3) como controles positivos.



Figura 16. Localización subcelular de la interacción de HDA15 y XAL1. Ensayo de complementación de fluorescencia bimolecular de células de hojas de tabaco entre HDA15 y XAL1, expresados transitoriamente. A, interacción de HDA15-XAL1 posiblemente en el núcleo (YFC-XAL1 + YFN-HDA15). B, control positivo, interacción de PISTILLATA con APETALA3 (YFC-PI + YFN-AP3). En C y D es una amplificación de A y B, respectivamente. En C, la flecha amarilla apunta al posible nucléolo. El espectro de GFP se muestra en los paneles de la izquierda. Las señales visibles y fluorescentes fusionadas se muestran en el panel de la derecha. Barra blanca de escala: 20 µm.

Las HDACs son actores cruciales en todos los aspectos del desarrollo de las plantas, incluida la embriogénesis, la determinación de la polaridad abaxial/adaxial, la floración, la senescencia, las respuestas a la duración del día y el estrés ambiental (Kumar, Thakur, y Prasad 2021). Sin embargo, la mayoría de los estudios se han realizado en Arabidopsis y relativamente pocas HDACs se han caracterizado en otras especies de plantas (X. Chen, Ding, y Zhong 2020; Iype et al. 2013) y no hay suficiente información sobre la redundancia funcional de las HDACs. Sin embargo, se ha demostrado que HDA19 y HDA6 participan en la germinación, el desarrollo embrionario y la resistencia a la salinidad con una función parcialmente redundante (X. Chen, Ding, y Zhong 2020). Considerando que la especificidad en la regulación de otros genes puede estar relacionada con las interacciones de las HDACs con factores de transcripción, es fundamental conocer cuáles son estas interacciones, los tipos de células en donde ocurren y los procesos en los que participan. En este trabajo se realizó un análisis bioinformático y experimental para identificar la interacción entre HDA15 y XAL1, sin embargo, faltó hacer los análisis funcionales para esclarecer la actividad de dicha interacción.

A partir del análisis filogenético de las HDACs observamos que hay conservación de estas proteínas con respecto a la de animales. Greogoretti et al. (2004) en su filogenia muestran en un clado hermano a la HDAC15 de Arabidopsis con respecto a las de humano, sin embargo, Pandey et al. (2002) en sus resultados de filogenia contradicen nuestros resultados, donde HDAC5 y HDAC18 están más cercanos a las HDAC clase II de humanos, sin embargo, mencionan que es difícil establecer si las HDACs clase II son parálogos u ortólogos de las HDACs de humano. No obstante, la filogenia que hicimos aportó evidencia para enfocarnos en la clase II de las HDACs. Tomando en cuenta que las HDACs son redundantes, con respecto a su actividad en los procesos biológicos, la interacción con otras proteínas, la localización celular y subcelular podrían darle especificidad a su función. En este sentido, el estudio las interacciones entre proteínas para dar especificidad a la función, constatamos que las interacciones proteicas es un tema difícil de esclarecer experimentalmente. Abordamos el problema desde una perspectiva bioquímica utilizando un inhibidor de HDACs, el TSA, para saber si afectaba la raíz de Arabidopsis, basándonos en lo reportado por Xu et al. (2005), donde muestran que hay un crecimiento abundante de los pelos radiculares ante la exposición a TSA y una disminución en la raíz. Sugieren que la acetilación de histonas puede dirigir la expresión de genes involucrados en establecer el patrón de células epidérmicas de la raíz en Arabidopsis. Nosotros, al utilizar TSA, no observamos algún efecto en el crecimiento de pelos radiculares ni de la raíz principal, pero sirvió para entender que la redundancia funcional de las HDACs sería un factor decisivo en lo sucesivo. La bioquímica es una buena estrategia para indagar y ser más directos buscando la interacción proteina-proteina así como el saber su papel fisiológico. Lo primero era saber si interaccionaban las MADS con las HDACs y empleamos la cromatografía de afinidad para buscar directamente la interacción. El utilizar específicamente XAL1, además de tener a disponibilidad un oligopéptido, fue la importante actividad en la proliferación celular de la raíz de

Arabidopsis, razones para analizar si alguna HDAC pudiera interaccionar con una MADS como XAL1. Los resultados no arrojaron la interacción de XAL1 con alguna HDAC, este resultado nos hizo pensar que muy probablemente se necesitaba la proteína completa para la interacción y no sólo un oligopéptido de 20 residuos de XAL1, lo cual se comprobó con el ensayo de dos híbridos. En este ensayo se necesitó toda la secuencia, tanto de XAL1 como de HDA15 para poder recuperar la interacción. Lo que nos hace pensar que podríamos necesitar una metodología más robusta para indagar cómo es y en qué procesos está involucrada esta interacción.

Sin embargo, otras proteínas interaccionaron con el oligopéptido de XAL1 como la glutatión S-transferasa enzima que pertenece a la superfamilia de isoenzimas multifuncionales y participan en la detoxificación celular de compuestos electrofílicos como las especies reactivas de oxígeno; la actina 2, proteína que forma filamentos del citoesqueleto de la célula; la adenosil metionina sintasa es donante fundamental de grupos metilos en la proteínas de los organismos; el factor de elongación 8, proteína que actúa en la síntesis de proteínas en la fase de elongación; la cadena- $\beta$  tubulina, subunidad de la tubulina que conforman los microtúbulos celulares; la  $\beta$ -glucosidasa, enzima hidrolítica que rompe enlaces glucosídicos de oligosacáridos. Por último, una proteína de choque térmico, la cual pertenece a una familia de proteínas en respuesta al estrés con múltiples funciones. Cada una de estas proteínas y sus funciones son muy variadas y nos hace pensar en la complejidad de posibles interacciones, asimismo, nos cuestionamos si cada una de estas interacciones es especifica o la posible formación de complejos proteicos de estas proteínas con XAL1 en diferentes procesos celulares. Sería interesante corroborar la interacción de cada una de estas proteínas para investigar posibles funciones de XAL1 en cada contexto y tal vez una posible relación con su función en la proliferación celular en la raíz de Arabidopsis.

Las complicaciones experimentales a la cuales nos enfrentamos para detectar las interacciones entre proteínas con dominio MADS y HDACs recurrimos a la bioinformática. Las herramientas bioinformáticas son muy utilizadas para comparar y averiguar la función de genes y/o proteínas. En este trabajo utilizamos herramientas bioinformáticas para analizar las similitudes de la estructura de las proteínas en una condición nativa y nos permitieron detectar dominios conservados que no se encuentran mediante el análisis de conservación de secuencia primaria convencional.

Los gráficos de análisis de grupos hidrofóbicos nos permitieron identificar un patrón común entre las secuencias de proteínas HDACs de clase II de Arabidopsis, ya que la secuencia primaria de las HDACs no presentó un dominio aparentemente conservado. Si bien esta metodología no predice perfectamente una estructura exacta de la interacción proteína-proteína, nos permitió encontrar estructuras con características similares a las de las proteínas con dominio MADS y HDACs humanas, en específico, MEF2B y HDACs de clase II (Han et al. 2005) reduciendo las posibles HDACs que interaccionan con XAL1 y que por similitud con animales puedan tener un papel similar o posiblemente estar involucradas en la regulación de los procesos de proliferación celular en la raíz de Arabidopsis. Identificamos un sitio putativo de unión dentro del dominio MADS con la secuencia consenso, que puede participar en la interacción con las proteínas HDACs de clase II. Este sitio putativo de interacción MADS-box-MEF2S se estudió mediante análisis comparativo con un dominio reportado en la proteína con dominio MADS de tomate (Gaffe et al. 2011). A partir de esos análisis, encontramos que XAL1 contiene este dominio conservado y es capaz

de interactuar con HDA15. Aunque no sabemos si este dominio es responsable de la interacción con HDA15, esta interacción puede ser relevante para la función de XAL1, que regula la proliferación celular en el meristemo de la raíz (Tapia-López et al. 2008).

Otra herramienta bioinformática útil para explorar interacciones que son difíciles de determinar experimentalmente es el acoplamiento rígido proteína-proteína (Docking). Muchos trabajos han utilizado la simulación de acoplamiento para modelar interacciones, principalmente entre proteínas y fármacos o moléculas pequeñas. Un ejemplo son la HDAC1 y la HDAC2, que interactúan con flavonas para regular la actividad de las HDACs (Scafuri et al. 2020). De manera similar, el acoplamiento se ha utilizado como herramienta de investigación para explorar las interacciones proteína-proteína con resultados significativos (Durham et al. 2023) y una mejora constante de los métodos y resultados (Plateau-Holleville et al. 2023). En este estudio realizamos un análisis de acoplamiento proteína-proteína para probar la interacción con las proteínas completas y simulando la dimerización, tanto de XAL1 como de HDA15, como un referente más cercano a la realidad de la posible interacción. Presentamos diez modelos con diferentes conformaciones en la interacción. El predictor HDOCK proporciona modelos de las posibles interacciones entre dos proteínas ajustando la estructura y probando la complementariedad de la forma y la energía de enlace entre los aminoácidos que podrían participar en la interfaz entre las dos proteínas (tablas AIII y AIV, en anexo); este ajuste hace que las proteínas en cada modelo generen conformaciones diferentes y, en ocasiones, hacen que parezca que las interacciones que se predicen son muy diferentes de un modelo a otro. Además, estas diferencias surgen porque el análisis predice muchas conformaciones si no se dan restricciones. Los diez modelos con puntuaciones de confianza y energía de acoplamiento similares a MEF2B-HDAC9 indican que HDA15 y XAL1 podrían interactuar. Asimismo, encontramos que existe una superposición sustancial en las regiones de interfaz entre los diferentes modelos (tablas AIII y AIV, en anexo). Por lo tanto, los resultados de las simulaciones de acoplamiento son consistentes con el resto de los enfoques bioinformáticos que indicaron una posible interacción entre proteínas con dominio MADS y HDACs, específicamente HDA15-XAL1.

Los resultados obtenidos con las herramientas bioinformáticas nos indicaban con gran probabilidad la posible interacción de las proteínas completas de XAL1 y HDA15. Utilizamos la estrategia del ensayo de dos híbridos para confirmar la interacción proteina-proteina in vivo. Utilizamos la proteina completa tanto de XAL1 como de HDA15 obteniendo una interacción positiva. Cabe mencionar que, en estos ensayos, también probamos sólo el extremo carboxilo terminal o extremo amino terminal tanto de XAL1 como de HDA15. Los resultados de doble híbrido de esta última parte fueron negativos, lo que nos hace especular que, para la interacción, es fundamental las proteínas completas, no basta un dominio de la proteina, como en otros casos donde la interacción se facilita solo con un dominio de la proteína o dominios que presentan un motivo (Wang et al. 2020). Así mismo, podemos decir que las proteínas completas adquieren conformaciones específicas para su actividad y por lo tanto que suceda la interacción funcional o ser parte de complejos proteicos.

En las interacciones de proteina-proteina se utilizan dos o más metodologías para confirmar la interacción. En nuestro caso, la confirmación *in vivo* de la interacción de XAL1 y HDA15 con las proteínas completas se hizo con el ensayo de BiFC. Detectamos y confirmamos la interacción *in vivo* de HDA15 y XAL1. En los resultados de BiFC

podemos observar la particularidad de que la señal es muy intensa en una zona dentro del núcleo, lo que nos da a pensar que la interacción tiene localización subcelular que podría ser el nucleolo. Sin embargo, se necesita el control de las células con la tinción de DAPI para asegurar que la interacción se localiza en nucleolo. Si la interacción entre HDA15-XAL1 está en núcleo es innegable pensar la posible función de represión de genes blancos en los procesos donde XAL1 está involucrada: proliferación celular, sin descartar otras funciones. En lo que se refiere al nucleolo, es un compartimento dentro del núcleo y su función primaria es la biogénesis de los ribosomas y la síntesis de ARN ribosomal. Evidencia de la presencia de proteínas no relacionadas con la función primaria del nucleolo, han sugerido funciones adicionales como la regulación de la mitosis, progresión del ciclo celular, respuesta a estrés y biogénesis de complejos ribonucleo-proteicos, tanto en animales como en plantas (Dubois y Boisvert 2016; Kalinina et al. 2018). Con estos antecedentes es factible que la interacción HDA15-XAL1 tenga un papel de regulación transcripcional en los procesos involucrados de HDA15 o XAL1, con la premisa de confirmar la localización subcelular de la interacción HDA15-XAL1 en nucleolo.

Nuestros resultados confirman la interacción de HDA15-XAL1, pero siguen sin resolver los cuestionamientos de ¿cuál es la función e importancia de esta interacción? ¿la interacción está regulando uno o varios genes involucrados en la proliferación celular de raíz de Arabidopsis? ¿Esta interacción tiene un papel en otros procesos que no sean proliferación celular?

En este trabajo no alcanzamos a hacer los experimentos para poder responder a todas estas preguntas. Sin embargo, si revisamos la función de XAL1, se sabe que está regulado por las auxinas y muy probablemente no tenga un papel en este aspecto. Tapia et al. (2004) reporta que las auxinas inducen la transcripción de *XAL1*, en consecuencia, al tratarse de una interacción proteina-proteina no tendría tal función. En el caso de la floración, XAL1 se encuentra río arriba de *FT* y *SOC1*, promotores de la transición a la floración. En la mutante *xal1-1*, los niveles de transcritos de *FT* y *SOC1* disminuyen, colocando a XAL1 como un promotor de la floración y no un represor, entonces en esta vía, al parecer, no tendría una función la interacción de HDA15-XAL1.

En otro contexto, las HDACs además de ser represoras epigenéticas en procesos de desarrollo, se les ha propuesto como modificadores de proteínas no histonas con la misma función de represión. La unión de las HDACs o la desacetilación de lisinas de ciertas proteínas, reprime su actividad o su unión al DNA modificando la actividad transcripcional de proteínas, ejemplo de ello son PTEN, APEX, NF-κB que forman complejos proteicos, cuya función es la represión (Fantini et al. 2008; Hahnen et al. 2008; Hasselgren 2007; Ikenoue et al. 2008). No obstante, HDA15-XAL1 podrían tener un papel regulador reprimiendo la transcripción de genes no estudiados que podemos probar utilizando el modelaje de redes proteicas con sus interactores. En UNIPROT muestran redes de este tipo para XAL1 con 10 posibles interactores: AGL16, AGL20, AGL21, ATAF2, SEP1, TRY, AT1G48150, AT5G11340, AT5G66730 y posiblemente estarán involucrados en algún proceso no estudiado, en nuestro caso ya no los analizamos, pero se puede hacer una búsqueda futura de posibles blancos que estén involucrados en proceso de proliferación celular por todas las similitudes con humanos. Así mismo, tomar todos los posibles blancos y hacer Docking para ver posibles interacciones entre XAL1 y sus blancos.

En el caso de la HDA15 de Arabidopsis, consideramos, en el pasado, que no era la única proteína que pude interactuar con XAL1. Elegimos HDA15 por las razones y características mencionadas anteriormente. Por otra parte, ensayos de dos híbridos realizados por la Dra. Ana Paola Rojas (resultados no publicados), muestran que XAL1 no interactúa con otras HDACs, pero varias HDACS sí interactúan con MADS. En el caso de HDA15 sí interactúa con AGL38, AGL35, AGL103. La HDA5 se detectó la interacción con AGL16, AGL35, AGL38, AGL67 y AGLL79; para HDA18 la interacción fue con AGL35, AGL79 y AGL96. Se probaron otras HDACs, pero que no pertenecen a la clase II (HDA6 y HDA19 que sí interactúan con MADS). Sería interesante confirmar las interacciones *in vivo* con BiFC u otro método.

El análisis del comportamiento de las mutantes simples de las HDACs (resultados no publicados) se realizaron, pero no se detectó ningún efecto en el desarrollo de la raíz, en el patrón celular o en la parte aérea de Arabidopsis. Estudios futuros generando un doble mutante de *xal1-hda15*, triples mutantes de las HDACs (dada su redundancia funcional) o el silenciamiento de *hda15* en la mutante *xal1*, así como el estudio de la expresión de los transcritos de los posibles blancos y el análisis de la interacción *in vitro* e *in vivo* de las proteínas involucradas, en conjunto, podríamos empezar a dilucidar el posible papel de la interacción entre XAL1 y HDA15 o de las HDACs y MADS en el comportamiento celular en el desarrollo de la raíz o de otros tejidos de la planta en Arabidopsis.

# Conclusiones

En este trabajo podemos plantear las siguientes conclusiones:

- Las herramientas metodológicas bioinformáticas son herramientas útiles para una aproximación hacia la investigación de procesos que todavía son muy difíciles de esclarecer mediante la experimentación.
- Sin duda, lo experimental siempre nos dará una manera un poco más cercana a los eventos que ocurren en la planta, pero todavía no tenemos el conocimiento y las herramientas metodológicas que puedan cubrir todos los aspectos de los procesos biológicos en interacciones proteicas.
- Las herramientas bioinformáticas y experimentales, en conjunto, son un buen método para establecer respuestas factibles que puedan generar conocimiento en todos los campos de la investigación biológica.
- En este trabajo fue de gran ayuda el tener a disposición herramientas bioinformáticas, en el caso específico de nuestra investigación, conseguimos saber si las HDACs y MADS, estrictamente HDA15-XAL1, interaccionan en raíz de Arabidopsis.
- Se encontró la interacción entre las proteínas HDACs y proteínas con dominio MADS, que posiblemente pueden tener un papel en los procesos de proliferación y diferenciación celular.
- Determinar la interacción de proteínas con su función o papel en los procesos celulares, no es una situación fácil de resolver, debido a que las proteínas aquí estudiadas, podrían estar trabajando en complejos multiproteicos además de presentar redundancia funcional, pero es un acercamiento a la posibilidad de encontrar estas interacciones dando una pauta para empezar a dilucidar sus funciones.

## Perspectivas

La interacción HDA15-XAL1 se demostró por medio de dos híbridos de levadura y ensayos de BiFC, lo que indica que esta interacción ocurre en la planta. Además, se ha reportado que HDA15 está localizado en el núcleo (Alinsug et al. 2012), y encontramos que la interacción HDA15-XAL1 también está en el núcleo, lo que sugiere que HDA15-XAL1 puede tener un papel en la desacetilación de histonas o proteínas no histonas. Se podrían realizar trabajos futuros para dilucidar la función de esta interacción durante el desarrollo de la planta. En animales se ha comprobado que los genes MEF2 participan en el equilibrio entre proliferación y diferenciación en cultivos celulares in vitro. Mientras que, en las plantas, a los genes MADS-box se les han atribuido diferentes funciones, algunas de ellas relacionadas con la determinación del tipo celular o identidad de órganos, y otras en diversos procesos de desarrollo desde la embriogénesis hasta el desarrollo floral (Castelán-Muñoz et al. 2019) y se les ha implicado en las redes que subvacen al equilibrio entre la proliferación y diferenciación celular (García-Cruz et al. 2016; Pacheco-Escobedo et al. 2016). Nuestros datos revelaron que HDA15 y XAL1 se expresan durante el desarrollo de la raíz, lo que respalda una posible interacción entre HDA15-XAL1. XAL1 participa en la regulación de varios genes del ciclo celular, como lo son CYCLIN D3;1 (CYCD3;1), CYCLIN A2;3 (CYCA2;3), CYCLIN B1;1 (CYCB1;1), QUINASA DEPENDIENTE DE CICLINA (CDKB1 ;1) y LICENCIA DE CROMATINA Y FACTOR DE REPLICACIÓN DE ADN 1 (CDT1a) (García-Cruz et al. 2016), por lo que será importante estudiar si HDA15 contribuye a la función XAL1 en la regulación genética del ciclo celular. Así, las HDACs también participan en varios procesos biológicos en las plantas y pueden coincidir espacialmente con MADS. En el caso de las HDACs, se ha reportado que, específicamente las de clase II, interactúan con MEF2 en animales. Suponiendo todos los contextos de HDA15 y XAL1, podríamos explorar la función de la interacción HDA15 con XAL1 en otros procesos biológicos como diferenciación o proliferación celular de la raíz de Arabidopsis.

En el caso del área bioinformática, resulta ventajoso utilizar o predecir puntos calientes (pequeños conjuntos de residuos que contribuyen significativamente a la formación de interacciones proteína-proteína) para generar un acoplamiento más apegado a la realidad, como lo mencionan Tsuchiya et al. (2022), y aumentar la precisión y confiabilidad de las predicciones. En el futuro, analizaremos los puntos críticos de interacción para proporcionar más bases a las posibles interacciones entre HDA15 y XAL1.

# Referencias Bibliográficas

- Alinsug, Malona V., Fang Fang Chen, Ming Luo, Ready Tai, Liwen Jiang, y Keqiang Wu. 2012. "Subcellular Localization of Class II HDAs in Arabidopsis Thaliana: Nucleocytoplasmic Shuttling of HDA15 Is Driven by Light". Editado por Qiang Wu. PLoS ONE 7 (2): e30846. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030846.
- Araki, Yasuto, y Toshihide Mimura. 2017. "The Histone Modification Code in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases". *Mediators of Inflammation* 2017 (enero). https://doi.org/10.1155/2017/2608605.
- Barneda-Zahonero, Bruna, y Maribel Parra. 2012. "Histone deacetylases and cancer." *Molecular oncology* 6 (6): 579–89. https://doi.org/10.1016/j.molonc.2012.07.003.
- Belda-Palazón, Borja, Leticia Ruiz, Esmeralda Martí, Susana Tárraga, Antonio F. Tiburcio, Francisco Culiáñez, Rosa Farràs, Pedro Carrasco, y Alejandro Ferrando. 2012. "Aminopropyltransferases Involved in Polyamine Biosynthesis Localize Preferentially in the Nucleus of Plant Cells". *PLoS ONE* 7 (10): e46907. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046907.
- Bouckaert, Remco, Timothy G. Vaughan, Joëlle Barido-Sottani, Sebastián Duchêne, Mathieu Fourment, Alexandra Gavryushkina, Joseph Heled, et al. 2019. "BEAST 2.5: An Advanced Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis". Editado por Mihaela Pertea. *PLOS Computational Biology* 15 (4): e1006650. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006650.
- Callebaut, I, G Labesse, P Durand, A Poupon, L Canard, J Chomilier, B Henrissat, y J P Mornon. 1997. "Review Deciphering protein sequence information through hydrophobic cluster analysis (HCA): current status and perspectives". *Cellular and Molecular Life Sciences* 53 (8): 621–45. https://doi.org/10.1007/s000180050082.
- Carlberg, Carsten, y Ferdinand Molnár. 2020. *Gene Regulation: How Science Works*. Suiza: Springer International Publishing.
- Castelán-Muñoz, Natalia, Joel Herrera, Wendy Cajero-Sánchez, Maite Arrizubieta, Carlos Trejo, Berenice García-Ponce, María de la Paz Sánchez, Elena R. Álvarez-Buylla, y Adriana Garay-Arroyo. 2019. "MADS-box genes are key components of genetic regulatory networks involved in abiotic stress and plastic developmental responses in plants". *Frontiers in Plant Science* 10 (julio). https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00853.
- Chen, Chia Yang, Yi Tsung Tu, Jhe Cheng Hsu, Heng Chen Hung, Ting Chun Liu, Yu Hsuan Lee, Chun Chi Chou, Yi Sheng Cheng, y Keqiang Wu. 2020. "Structure of arabidopsis histone deacetylase15". *Plant Physiology* 184 (3): 1585–1600. https://doi.org/10.1104/pp.20.00604.
- Chen, Xiangsong, Adeline B. Ding, y Xuehua Zhong. 2020. "Functions and mechanisms of plant histone deacetylases". *Science China Life Sciences* 63 (2): 206–2016. https://doi.org/10.1007/s11427-019-1587-x.
- Coen, E S, y E M Meyerowitz. 1991. "The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development." *Nature* 353 (6339): 31–37. https://doi.org/10.1038/353031a0.
- Cui, Xiaoyun, Avilien Dard, Jean Philippe Reichheld, y Dao Xiu Zhou. 2023. "Multifaceted functions of histone deacetylases in stress response". *Trends in Plant Science* 28 (11): 1245–56. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2023.06.006.
- Dubois, Marie-Line, y François-Michel Boisvert. 2016. "The Nucleolus: Structure and Function". En The Functional Nucleus, editado por David P. Bazett-Jones y Graham Dellaire, 29–49. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-38882-3\_2.
- Durham, Jesse, Jing Zhang, Ian R. Humphreys, Jimin Pei, y Qian Cong. 2023. "Recent advances in predicting and modeling protein-protein interactions". *Trends in Biochemical Sciences* 48 (6): 527–38. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2023.03.003.
- Egea-Cortines, M, H Saedler, y H Sommer. 1999. "Ternary Complex Formation between the MADS-Box Proteins SQUAMOSA, DEFICIENS and GLOBOSA Is Involved in the Control of Floral Architecture in Antirrhinum Majus." *The EMBO Journal* 18 (19): 5370–3759. https://doi.org/10.1093/emboj/18.19.5370.
- Fantini, Damiano, Carlo Vascotto, Marta Deganuto, Nicoletta Bivi, Stefano Gustincich, Gabriella Marcon, Franco Quadrifoglio, et al. 2008. "APE1/Ref-1 Regulates PTEN Expression Mediated by Egr-1". Free Radical Research 42 (1): 20–29. https://doi.org/10.1080/10715760701765616.
- Felsenstein, J. 1985. "Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap". *Evolution* 39 (4): 783–91.
- Folter, Stefan de, y Gerco C. Angenent. 2006. "trans meets cis in MADS science". Trends in Plant Science 11 (5):

224-31. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.03.008.

- Gaboriaud, C, V Bissery, T Benchetrit, y J P Mornon. 1987. "Hydrophobic cluster analysis: an efficient new way to compare and analyse amino acid sequences." *FEBS letters* 224 (1): 149–55.
- Gaffe, Joël, Claudie Lemercier, Jean Pierre Alcaraz, y Marcel Kuntz. 2011. "Identification of three tomato flower and fruit MADS-box proteins with a putative histone deacetylase binding domain". *Gene* 471 (1–2): 19–26. https://doi.org/10.1016/j.gene.2010.10.002.
- García-Cruz, Karla V., Berenice García-Ponce, Adriana Garay-Arroyo, María De La Paz Sanchez, Yamel Ugartechea-Chirino, Bénédicte Desvoyes, Mario A. Pacheco-Escobedo, et al. 2016. "The MADS-box XAANTAL1 increases proliferation at the Arabidopsis root stem-cell niche and participates in transition to differentiation by regulating cell-cycle components". *Annals of Botany* 118 (4): 787–96. https://doi.org/10.1093/aob/mcw126.
- Gregoretti, Ivan V., Yun M. Lee, y Holly V. Goodson. 2004. "Molecular evolution of the histone deacetylase family: Functional implications of phylogenetic analysis". *Journal of Molecular Biology* 338 (1): 17–31. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.02.006.
- Hahnen, Eric, Jan Hauke, Christian Tränkle, Ilker Y Eyüpoglu, Brunhilde Wirth, y Ingmar Blümcke. 2008. "Histone Deacetylase Inhibitors: Possible Implications for Neurodegenerative Disorders". *Expert Opinion on Investigational Drugs* 17 (2): 169–84. https://doi.org/10.1517/13543784.17.2.169.
- Han, Aidong, Ju He, Yongqing Wu, Jun O. Liu, y Lin Chen. 2005. "Mechanism of recruitment of class II histone deacetylases by myocyte enhancer factor-2". *Journal of Molecular Biology* 345 (1): 91–102. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.10.033.
- Hasselgren, Per-Olof. 2007. "Ubiquitination, Phosphorylation, and Acetylation—Triple Threat in Muscle Wasting". *Journal of Cellular Physiology* 213 (3): 679–89. https://doi.org/10.1002/jcp.21190.
- Herskowitz, Ira. 1989. "A regulatory hierarchy for cell specialization in yeast". Nature 342 (6251): 749-57.
- Hollender, Courtney, y Zhongchi Liu. 2008. "Histone deacetylase genes in Arabidopsis development." Journal of Integrative Plant Biology 50 (7): 875–85. https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00704.x.
- Honma, Takashi, y Koji Goto. 2001. "Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into foral organs". *Nature* 409 (January): 525–29. https://doi.org/doi:10.1038/35054083.
- Hruz, T, O Laule, G Szabo, F Wessendorp, S Bleuler, L Oertle, P Widmayer, W Gruissem, y P Zimmermann. 2008. "Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes". Adv Bioinformatics 2008. https://doi.org/10.1155/2008/420747.
- Huelsenbeck, John P., Bret Larget, y Michael E. Alfaro. 2004. "Bayesian phylogenetic model selection using reversible jump Markov chain Monte Carlo". *Molecular Biology and Evolution* 21 (6): 1123–33. https://doi.org/10.1093/molbev/msh123.
- Ikenoue, Tsuneo, Ken Inoki, Bin Zhao, y Kun-Liang Guan. 2008. "PTEN Acetylation Modulates Its Interaction with PDZ Domain". *Cancer Research* 68 (17): 6908–12. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1107.
- Ito, Toshiro, Frank Wellmer, Hao Yu, Pradeep Das, Natsuko Ito, Má Rcio Alves-Ferreira, José Luis Riechmann, y Elliot M Meyerowitz. 2004. "The homeotic protein AGAMOUS controls microsporogenesis by regulation of SPOROCYTELESS". www.nature.com/nature.
- Ivanov, Victor B., y Joseph G. Dubrovsky. 2013. "Longitudinal Zonation Pattern in Plant Roots: Conflicts and Solutions". Trends in Plant Science 18 (5): 237–43. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.10.002.
- Iype, Joseena Mariam, Rashmi Mishra, S Karthikeyan, S Babu, y K M Gothandam. 2013. "Analysis of histone deacetylase families of Arabidopsis thaliana and Oryza sativa". *African Journal of Agricultural Research* 8 (2): 201–7. https://doi.org/10.5897/AJAR11.1906.
- Kalinina, Natalia O., Svetlana Makarova, Antonida Makhotenko, Andrew J. Love, y Michael Taliansky. 2018. "The Multiple Functions of the Nucleolus in Plant Development, Disease and Stress Responses". Frontiers in Plant Science 9 (febrero):132. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00132.
- Kang, Hyunju, Young-Ki Park, Ji-Young Lee, y Minkyung Bae. 2024. "Roles of Histone Deacetylase 4 in the Inflammatory and Metabolic Processes". *Diabetes & Metabolism Journal* 48 (3): 340–53. https://doi.org/10.4093/dmj.2023.0174.
- Katoh, Kazutaka, y Daron M. Standley. 2013. "MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability". *Molecular Biology and Evolution* 30 (4): 772–80. https://doi.org/10.1093/molbev/mst010.
- Kaufmann, Kerstin, Rainer Melzer, y Günter Theißen. 2005. "MIKC-Type MADS-Domain Proteins: Structural

Modularity, Protein Interactions and Network Evolution in Land Plants". *Gene* 347 (2): 183–98. https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.12.014.

- Kouzarides, Tony. 1999. "Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation". *Current Opinion in Genetics* and Development 9 (1): 40–48. https://doi.org/10.1016/S0959-437X(99)80006-9.
- Krämer, Ute. 2015. "Planting molecular functions in an ecological context with Arabidopsis thaliana". *eLIFE* 4:E06100. https://doi.org/10.7554/eLife.06100.001.
- Kujirai, Tomoya, Haruhiko Ehara, Shun Ichi Sekine, y Hitoshi Kurumizaka. 2023. "Structural Transition of the Nucleosome during Transcription Elongation". *Cells* 12 (10). https://doi.org/10.3390/cells12101388.
- Kumar, Verandra, Jitendra K. Thakur, y Manoj Prasad. 2021. "Histone acetylation dynamics regulating plant development and stress responses". *Cellular and Molecular Life Sciences* 78 (10): 4467–86. https://doi.org/10.1007/s00018-021-03794-x.
- Lee, Jungeun, Mijin Oh, Hanna Park, y Ilha Lee. 2008. "SOC1 translocated to the nucleus by interaction with AGL24 directly regulates LEAFY". *Plant Journal* 55 (5): 832–43. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03552.x.
- Li, Guo, Yuan Tian, y Wei Guo Zhu. 2020. "The Roles of Histone Deacetylases and Their Inhibitors in Cancer Therapy". *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8 (septiembre). https://doi.org/10.3389/fcell.2020.576946.
- Liljegren, Sarah J., Cristina Ferrándiz, Elena R. Alvarez-Buylla, Soraya Pelaz, y Martin F. Yanofsky. 1998. "Arabidopsis MADS-box genes involved in fruit dehiscence". *Flowering Newsletter*, núm. 25, 9–19.
- Liu, Jiao, y Cheng Chang. 2021. "Concerto on Chromatin: Interplays of Different Epigenetic Mechanisms in Plant Development and Environmental Adaptation". *Plants* 10 (12): 2766. https://doi.org/10.3390/plants10122766.
- Liu, Xuncheng, Chia-Yang Chen, Ko-Ching Wang, Ming Luo, Ready Tai, Lianyu Yuan, Minglei Zhao, et al. 2013. "PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR3 Associates with the Histone Deacetylase HDA15 in Repression of Chlorophyll Biosynthesis and Photosynthesis in Etiolated Arabidopsis Seedlings". *The Plant Cell* 25 (4): 1258–73. https://doi.org/10.1105/tpc.113.109710.
- Lu, Jianrong, Timothy A. McKinsey, Chun-Li Zhang, y Eric N. Olson. 2000. "Regulation of Skeletal Myogenesis by Association of the MEF2 Transcription Factor with Class II Histone Deacetylases". *Molecular Cell* 6 (2): 233–44. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00025-3.
- Maddison, W. P. and Maddison, D. R. 2019. "Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.61".
- Markus, Hugh S. 2023. "HDAC9 Inhibition as a Novel Treatment for Stroke". *Stroke* 54 (12): 3182–89. https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.123.044862.
- Marmorstein, Ronen, y Ming-Ming Zhou. 2015. "Writers and Readers of Histone Acetylation: Structure, Mechanism, and Inhibition". En *Epigenetics*, editado por Davis Allis C, Marie-Laure Caparros, Thomas Jenuwein, Danny Reinberg, y Monika Lachner, 1–984. New York: Cold Spring Harbor.
- Martinez-Castilla, León Patricio, y Elena R Alvarez-Buylla. 2003. "Adaptive evolution in the Arabidopsis MADSbox gene family inferred from its complete resolved phylogeny." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (23): 13407–12. https://doi.org/10.1073/pnas.1835864100.
- Meyerowitz E. M. 2002. "Plants Compared to Animals: The broadest Comparative Study of Development". *Science* 295 (5559): 1482–85.
- Milazzo, Giorgio, Daniele Mercatelli, Giulia Di Muzio, Luca Triboli, Piergiuseppe De Rosa, Giovanni Perini, y Federico M. Giorgi. 2020. "Histone deacetylases (HDACs): Evolution, specificity, role in transcriptional complexes, and pharmacological actionability". *Genes* 11 (5): 556. https://doi.org/10.3390/genes11050556.
- Miller, M.A., W. Pfeiffer, y T. Schwartz. 2010. "Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees". En *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 1–8. New Orleans, LA.
- Minard, Meghan E., Abhinav K. Jain, y Michelle Craig Barton. 2009. "Analysis of Epigenetic Alterations to Chromatin during Development". *Genesis* 47 (8): 559–72. https://doi.org/10.1002/dvg.20534.
- Molkentin, Jeffery D, y Eric N Olson. 1996. "Defining the regulatory networks for muscle development". *Current Opinion in Genetics & Development* 6 (4): 445–53. https://doi.org/10.1016/S0959-437X(96)80066-9.
- Nguyen, Lam Tung, Heiko A. Schmidt, Arndt Von Haeseler, y Bui Quang Minh. 2015. "IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies". *Molecular Biology and Evolution* 32 (1): 268–74. https://doi.org/10.1093/molbev/msu300.
- Pacheco-Escobedo, Mario A., Victor B. Ivanov, Iván Ransom-Rodríguez, Germán Arriaga-Mejía, Hibels Ávila,

Ilya A. Baklanov, Arturo Pimentel, et al. 2016. "Longitudinal zonation pattern in Arabidopsis root tip defined by a multiple structural change algorithm". *Annals of Botany* 118 (4): 763–76. https://doi.org/10.1093/aob/mcw101.

- Pandey, R, A Müller, C A Napoli, D A Selinger, C S Pikaard, E J Richards, J Bender, D W Mount, y R A Jorgensen. 2002. "Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of Arabidopsis thaliana suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes". Nucleic Acids Research 30 (23): 5036–55. https://doi.org/doi: 10.1093/nar/gkf660.
- Péret, Benjamin, Bert De Rybel, Ilda Casimiro, Eva Benková, Ranjan Swarup, Laurent Laplaze, Tom Beeckman, y Malcolm J. Bennett. 2009. "Arabidopsis Lateral Root Development: An Emerging Story". *Trends in Plant Science* 14 (7): 399–408. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.05.002.
- Plateau-Holleville, Cyprien, Simon Guionnière, Benjamin Boyer, Brian Jimenez-Garcia, Guillaume Levieux, Stephane Merillou, Maxime Maria, y Matthieu Montes. 2023. "UDock2: interactive real-time multi-body protein-protein docking software". *Bioinformatics* 39 (10). https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btad609.
- Provart, Nicholas J., Siobhan M. Brady, Geraint Parry, Robert J. Schmitz, Christine Queitsch, Dario Bonetta, Jamie Waese, Korbinian Schneeberger, y Ann E. Loraine. 2021. "Anno genominis XX: 20 years of Arabidopsis genomics". *Plant Cell* 33 (4): 832–45. https://doi.org/10.1093/plcell/koaa038.
- Rebehmed, Joseph, Flavien Quintus, Jean-Paul Mornon, y Isabelle Callebaut. 2016. "The Respective Roles of Polar/Nonpolar Binary Patterns and Amino Acid Composition in Protein Regular Secondary Structures Explored Exhaustively Using Hydrophobic Cluster Analysis". Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics 84 (5): 624–38. https://doi.org/10.1002/prot.25012.
- Recillas-Targa, Felix, y Martín Escamilla Del Arenal. 2004. "Participación de la estructura de la cromatina en la regulación de la expresión génica". En *Mensaje Bioquímico*, XXVIII:173–201.
- Riechmann, Jose Luis, y Elliot M Meyerowitz. 1997. "MADS Domain Proteins in Plant Development". *Biol. Chem* 378 (October): 1079–1101. https://doi.org/Amino Acid Sequence; Angiosperms, genetics; Cloning, Molecular; DNA-Binding Proteins, genetics; Dimerization; MADS Domain Proteins; Molecular Sequence Data; Plant Proteins, genetics; Sequence Homology, Amino Acid; Transcription Factors, genetics; Transcription, Genetic, genetics.
- Roychoudhry, Suruchi, y Stefan Kepinski. 2021. "Auxin in Root Development". Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, julio, a039933. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a039933.
- Scafuri, Bernardina, Paola Bontempo, Lucia Altucci, Luigi De Masi, y Angelo Facchiano. 2020. "Molecular docking simulations on histone deacetylases (Hdac)-1 and-2 to investigate the flavone binding". *Biomedicines* 8 (12): 1–10. https://doi.org/10.3390/biomedicines8120568.
- Seto, Edward, y Minoru Yoshida. 2014. "Erasers of Histone Acetylation : The Histone Deacetylase Enzymes". Cold Spring Harb Perspect Biol. 6:a018713.
- Shore, Paul, y Andrew D. Sharrocks. 1995. "The MADS-Box Family of Transcription Factors". *European Journal* of Biochemistry 229 (1): 1–13. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.00011.x.
- Silva, Pedro J. 2007. "Assessing the reliability of sequence similarities detected through hydrophobic cluster analysis". *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 70 (4): 1588–94. https://doi.org/10.1002/prot.21803.
- Tapia-López, Rosalinda, Berenice García-Ponce, Joseph G Dubrovsky, Adriana Garay-Arroyo, Rigoberto V Pérez-Ruíz, Sun-Hyung Kim, Francisca Acevedo, Soraya Pelaz, y Elena R Alvarez-Buylla. 2008. "An AGAMOUSrelated MADS-box gene, XAL1 (AGL12), regulates root meristem cell proliferation and flowering transition in Arabidopsis." *Plant Physiology* 146 (3): 1182–92. https://doi.org/10.1104/pp.107.108647.
- Taxonomy-NCBI. 2018. "Taxonomy-National Center for Biotechnology Information". https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF\_000008865.2/.
- Tsuchiya, Yuko, Yu Yamamori, y Kentaro Tomii. 2022. "Protein-protein interaction prediction methods: from docking-based to AI-based approaches". *Biophysical Reviews* 14 (6): 1341–48. https://doi.org/10.1007/s12551-022-01032-7.
- Wang, Qian, Maoqing Liu, Yuepeng Zang, y Wei Xiao. 2020. "The C-Terminal Extension of Arabidopsis Uev1A/B with Putative Prenylation Site Plays Critical Roles in Protein Interaction, Subcellular Distribution and Membrane Association". *Plant Science* 291 (febrero):110324. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110324.
- Weidemüller, Paula, Maksim Kholmatov, Evangelia Petsalaki, y Judith B. Zaugg. 2021. "Transcription factors:

Bridge between cell signaling and gene regulation". *Proteomics* 21 (23–24). https://doi.org/10.1002/pmic.202000034.

- Xu, Cheng-Ran, Cui Liu, Yi-Lan Wang, Lin-Chen Li, Wen-Qian Chen, Zhi-Hong Xu, y Shu-Nong Bai. 2005. "Histone acetylation affects expression of cellular patterning genes in the Arabidopsis root epidermis". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (40): 14469–74. https://doi.org/10.1073/pnas.0503143102.
- Xu, Yingchao, Qing Li, Lianyu Yuan, Yisui Huang, Fu-Yu Hung, Keqiang Wu, y Songguang Yang. 2022. "MSI1 and HDA6 Function Interdependently to Control Flowering Time via Chromatin Modifications". *The Plant Journal* 109 (4): 831–43. https://doi.org/10.1111/tpj.15596.
- Yamoune, Amel, Abigail Rubiato Cuyacot, Marketa Zdarska, y Jan Hejatko. 2021. "Hormonal Orchestration of Root Apical Meristem Formation and Maintenance in Arabidopsis". Editado por Joseph Dubrovsky. *Journal* of Experimental Botany 72 (19): 6768–88. https://doi.org/10.1093/jxb/erab360.
- Yan, Yumeng, Huanyu Tao, Jiahua He, y Sheng You Huang. 2020. "The HDOCK server for integrated proteinprotein docking". Nature Protocols 15 (5): 1829–52. https://doi.org/10.1038/s41596-020-0312-x.
- Yang, Chun, Stéphane Croteau, y Pierre Hardy. 2021. "Histone Deacetylase (HDAC) 9: Versatile Biological Functions and Emerging Roles in Human Cancer". *Cellular Oncology* 44 (5): 997–1017. https://doi.org/10.1007/s13402-021-00626-9.
- Zhao, Linmao, Jingxia Lu, Jianxia Zhang, Pei Ying Wu, Songguang Yang, y Keqiang Wu. 2015. "Identification and characterization of Histone deacetylases in Tomato (Solanum Lycopersicum)". *Frontiers in Plant Science* 5 (JAN): 1–9. https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00760.
- Zheng, Yu, Jingyu Ge, Chun Bao, Wenwen Chang, Jingjing Liu, Jingjie Shao, Xiaoyun Liu, Lufang Su, Lei Pan, y Dao Xiu Zhou. 2020. "Histone Deacetylase HDA9 and WRKY53 Transcription Factor Are Mutual Antagonists in Regulation of Plant Stress Response". *Molecular Plant* 13 (4): 598–611. https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.12.011.

# Anexo

Tabla AI. Secuencia de proteínas de histonas desacetilasas clase I y II utilizadas en análisis filogenéticos.

ID	N		CI	ID	N	<u> </u>	<b>C1</b>
ID	Name	Organism	Class	ID	Name	Organism	Class
Q8RX28	HDA5	Arabidopsis	CII	Q88C43		Pseudomonas	CII
Q8GXJ1	HDA15	Arabidopsis	CII	Q91315		Pseudomonas	
Q941D6	HDA14	Arabidopsis	CII	Q98NK3		Mesorhizobium	CII
Q94EJ2	HDA8	Arabidopsis	CII	Q8RAS9		Caldanaerobacter	CII
Q8LRK8	HDA18	Arabidopsis	CII	A0A0E3RFD8		Methanosarcina	CII
IIJZJI		SOYBN	CII	Q8TLY4		Methanosarcina	CII
A0A0R0FIH2	2	SOYBN	CII	O30107		Archaeoglobus	CII
A0A0R0K0I2	2	SOYBN	CII	I6TW68		Pyrococcus	CII
K7KR69		SOYBN	CII	O58986		Pyrococcus	CII
I1MUF8		SOYBN	CII	Q9UZJ4		Pyrococcus	CII
Q2QWU2		Oriza	CII	Q96Y42		Sulfurisphaera	CII
Q8LHS7		Oriza	CII	Q8H0W2	HDA9	Arabidopsis	CI
Q0D4V4		Oriza	CII	O22446	HDA19	Arabidopsis	CI
B6THU7		MAIZE	CII	Q9FML2	HDA6	Arabidopsis	CI
Q8LK09		MAIZE	CII	Q9FH09	HDA7	Arabidopsis	CI
Q99N13	HDAC9	MOUSE	CII	Q9LXN8	HDA17	Arabidopsis	CI
Q8C2B3	HDAC7	MOUSE	CII	Q9M1N8	HDA10	Arabidopsis	CI
Q9Z2V5	HDAC6	MOUSE	CII	I1LKU7		SOYBN	CI
Q6P3E7	HDA10	MOUSE	CII	I1LWR2		SOYBN	CI
Q6NZM9	HDAC4	MOUSE	CII	I1JB12		SOYBN	CI
Q9Z2V6	HDAC5	MOUSE	CII	I1LFN1		SOYBN	CI
P56524	HDAC4	HUMAN	CII	K7KKZ9		SOYBN	CI
Q8WUI4	HDAC7	HUMAN	CII	I1MTD8		SOYBN	CI
Q9UKV0	HDAC9	HUMAN	CII	K7KL00		SOYBN	CI
O9UBN7	HDAC6	HUMAN	CII	K7K0Q1		SOYBN	CI
Q969S8	HDA10	HUMAN	CII	I1K037		SOYBN	CI
09UOL6	HDAC5	HUMAN	CII	A0A0R0JU82		SOYBN	CI
086NK9	O86NK9	Drosophila	CII	A0A0R0H2W2		SOYBN	CI
O59E49	O59E49	Drosophila	CII	O6YV04	HDAC2	Orvza	CI
020296	HDA6	Caenorhabditis	CII	07Y0Y8	HDAC1	Orvza	CI
017323	HDA4	Caenorhabditis	CII	O6ZB59		Orvza	CI
O9U266		Caenorhabditis	CII	O5NAP6		Orvza	CI
081419		Caenorhabditis	CII	094D35		Orvza	CI
08F7M9	08F7M9	Lentosnira	CII	07Y0Y6		Orvza	CI
067877	200 1000	Aquifex	CII	094F82		MAIZE	CI
09K0J2		Neisseria	CII	08W508		MAIZE	CI
089RV9		Bradyrhizobium	CII	O9ZTP8		MAIZE	CI
A0A1A5UL1		Rhizobium	CII	08VH37	HDAC8	MOUSE	CI
092RI8		Rhizobium	CII	088895	HDAC3	MOUSE	CI
A9CIY5		Agrobacterium	CII	P70288	HDAC2	MOUSE	CI
08Y0X4		Ralstonia	CII	009106	HDAC1	MOUSE	CI
Q010/14		Caulobacter	CII	09BY41	HDAC8	HIMAN	CI
MATR35		Acetoin	CII	015379	HDAC3	HUMAN	CI
		Vanthomonas	CII	013377	HDAC2	HUMAN	CI
087780		Nostoc	CII	013547	HDAC1	HUMAN	CI
027262	V1104	Moth anoth ann ab actor	CII	Q13347	IDACI	Drosonhila	CI
027202	11194	Decudomonas	CII	004517		Drosophila	
DOD204	11.1-1	<i>F seudomonas</i>		CSECUO	IDAUI	Caenowly what did	
BUK2Q0	Hdai	naiobacterium	CII	017(05		Caenorhabaitis	
Q98/Q0		Mesorhizobium	CII	01/695		Caenornabaitis	
Q98HF4		Mesorhizobium		Q09440	HDA2	Caenorhabditis	
Q916H0		Pseudomonas	CII	P32561	KPD3	YEAST	

Gene	Sequences				
110 4 19	F 5'CCA TGG AGT TGA GAC TAG TTG ACC C3'				
HDA18	R 5'AGA TCT AGA CTT TCC CAA TGA CTC3'				
110 415	F 5'ACC CAC TAG GAT GCT GTG AT3'				
HDAIS	R 5'GGA ATT CGT TTA TCC AAA CCG3'				
UD 45	F 5'GAA GCT CCT TTG ATA GTT G3'				
HDAS	R 5'GAA TAA GAA TGT TTC TCT CCG3'				
VALI	F 5'TGG TCG TGG TTC TTC TTC TGC T3'				
XALI	R 5'TGT CTC CAT GAC TGC GAA GTT3'				
TUD	F 5'CTC AAG AGG TTC TCA GCA GTA3'				
TUB	R 5'TCA CCT TCT TCA TCC GCA GTT3'				

Tabla AII. Lista de primers usados en el RT-PCR semicuantitativo.

Tabla AIII. Tetrámero de HDA15. Residuos de aminoácidos que forman la interfaz con XAL1 como lo predicen los diez modelos HDOCK con mejor puntuación. Los números corresponden a la posición de los aminoácidos en el polipéptido. Las letras en la tabla corresponden a las diferentes cadenas en el homotetrámero de HDA15.

HDA15								
Chain	А	В	С	D	A,B	C,D	A, D	B, D
Model1	196, 197, 198, 199, 205, 206, 214, 215, 257, 258, 261, 263, 281, 301, 302, 303	-	176, 179, 180, 181, 183, 186, 187, 188, 446, 447, 450	202, 328, 351, 352, 353, 357, 358, 359, 361, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 495, 498, 501	-	-	604	-
Model2	215, 281, 282, 322, 325, 326, 355, 356	-	168, 170, 174, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 186, 187, 188, 189, 407, 408, 409, 410, 445, 446, 447, 448, 451, 603	148, 150, 194, 265, 266, 422, 426, 455, 459, 460, 461, 462, 463, 604	-			-
Model3		146, 147, 148, 199, 204, 205, 206, 209, 214, 261, 262, 263, 264, 305, 306, 391, 492, 495	202, 224, 225, 243, 246	149, 156, 179, 182, 183, 186, 187, 188, 189, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 603		-	-	
Model4	148, 149, 172, 179, 193, 194, 196, 197, 198, 199, 257, 258, 261, 262, 263, 264, 265, 370, 371, 406, 407, 414, 415	183, 186, 187, 188, 448, 450, 451, 604	-	-	169, 170, 174, 176, 337, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 444, 445, 446, 447			
Model5	209, 210, 280, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 323, 326, 327, 328, 329, 356, 357, 375, 382, 383, 407, 418, 419, 422, 423, 426, 427, 430, 451, 454, 455, 458, 463, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 499, 604		445, 447			-	-	-
Model6	209, 210, 211, 215, 280, 281, 282, 297, 300, 301, 303, 304, 305, 322, 323, 324, 326, 327, 329, 355, 356, 357, 359, 604	-	170, 171, 172, 174, 176, 180, 407, 408, 410, 444, 445, 446, 447	225				
Model7	209, 210, 211, 212, 213, 215, 280, 281, 297, 300, 301, 303, 304, 305, 306, 326, 327, 329, 356, 390, 391, 392, 393, 430, 492, 495, 496, 499, 604		174, 176, 337, 406, 407, 408, 409, 410, 413, 414, 415, 445, 446, 447			-	-	
Model8		485		187, 188, 194, 382, 391, 418, 419, 422, 423, 426, 455, 458, 459, 462, 463, 474, 477, 480, 481, 484, 492, 495, 496, 497, 498, 507				488, 491, 499, 501, 502, 503, 505, 506
Model9	206, 209, 210, 212, 213, 214, 215, 280, 281, 297, 300, 301, 302, 303, 305, 327, 329, 604	-	154, 156, 176, 179, 180, 182, 183, 184, 186, 187, 191, 192, 254, 257, 258, 262, 263, 265, 429, 430, 432, 433, 434, 446	193, 194, 195, 196, 197, 200, 202	-	198, 199, 201	-	
Model10		300, 305, 306, 328, 329, 356, 361, 392, 494, 496, 498, 499, 603,		326	-	-	-	357, 359, 491, 492, 493, 495
Los número	Los números corresponden a la posición de residuos en el polipeptido.							
Las letras er	Las letras en el encabezado de la tabla corresponden a las diferentes cadenas en el homotetrámero.							

Tabla AIV. Residuos de aminoácidos del homodímero de XAL1 formando la interfaz con HDA15 como lo predicen los diez modelos HDOCK con mejor puntuación. Los números corresponden a la posición de los aminoácidos en el polipéptido. Las letras en la tabla corresponden a las diferentes cadenas en el homodímero de XAL1.

XAL1						
Chain	А	В				
Model 1	37, 40, 42, 60, 69	3, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 50, 51, 99, 102, 103, 106, 109, 110, 113, 164, 167, 168, 171, 174, 175, 178, 179, 182, 186, 198, 199, 200, 203, 204, 205				
Model2	173, 175, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185,186,187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 200, 204	18, 19, 21, 22, 25, 26, 49, 51, 53, 54, 55				
Model3	10, 12, 102, 104, 106,108,109, 112, 113, 116, 120, 142, 153, 157, 164, 174, 175, 178, 179, 182, 186, 194, 197, 198, 199, 200, 201, 203, 204, 205, 206.	40, 42, 60, 61, 69				
Model4	15, 18, 19, 21, 22, 23, 25, 26, 33, 49, 53, 54,	159, 162, 163, 165, 166, 167, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 183, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204				
Model5	4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 153, 156, 157, 163, 164, 166, 167, 168, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 178, 181, 200, 202, 204, 205	25, 26, 29, 30, 33, 37, 40, 55, 56, 57, 59, 60, 61				
Model6	-	98, 102, 106, 109, 110, 112, 113, 114, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 132, 135, 136, 139, 140, 142, 143, 146				
Model7	42, 59, 60, 61, 62, 69, 72	10, 98, 101, 102, 105, 109, 110, 113, 114, 116, 117, 119, 120, 121, 122, 123, 139, 140, 142, 143, 145, 146, 147, 149, 150, 154, 156				
Model8	10, 11, 12, 13, 14, 17, 49, 50, 51, 77, 78, 79, 105, 108, 109, 112, 116, 141, 142, 145, 146, 148, 149, 150, 152, 153, 156, 157, 197, 198, 199, 200, 201, 205	40, 42, 60, 61, 62, 69				
Model9	18, 51, 53, 54, 97	73, 75, 80, 81, 82, 83, 147, 150, 151, 154, 155, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 165, 166, 167, 169, 170, 173, 175, 176, 177, 179, 180, 183, 184 187, 188, 190, 191, 192, 193, 196				
Model10	178, 182, 185, 186, 190, 194, 195, 197, 198, 200, 201, 203, 204, 205	1, 2, 3, 15, 18, 19, 20, 22, 23				
Lo snúmero corresponden a la posición de los residuos en el polipéptido.						

Las letras en el encabezado de la tabla corresponden a las diferentes cadenas en el homodímero de XAL1.



Figura AI. Controles negativos de dos ensayos híbridos de levadura. Interacción entre AD-AGL11 con BD-HDA15 y AD-AGL77 con BD-HDA15 en tres concentraciones diferentes de 3AT.



Figura AII. Controles negativos de BiFC. A, interacción de SUPRESOR DE CONSTANS 1 (SOC1) y AGAMOUS (AG); B, interacción entre la subunidad  $\beta$  (AKIN $\beta$ ) de la PROTEINA QUINASA 1 RELACIONADA CON LA SACAROSA NO FERMENTANTE-1 y XAANTAL 1 (XAL1); C, interacción de XAL1 con un vector vacío YFC.

## Artículo

Sanjuan-Badillo, A., P. Martínez-Castilla, L., García-Sandoval, R., Ballester, P., Ferrándiz, C., Sanchez, M. de la P., García-Ponce B., Garay-Arroyo A., R. Álvarez-Buylla, E. (2024). HDACs MADS-domain protein interaction: a case study of HDA15 and XAL1 in Arabidopsis thaliana. *Plant Signaling & Behavior*, 19(1): e2353536. https://doi.org/10.1080/15592324.2024.2353536

#### HDACs MADS-domain protein interaction: A case study of HDA15 and XAL1 in

Arabidopsis thaliana

Andrea Sanjuan-Badillo<sup>1,2</sup>, León P. Martínez-Castilla<sup>3</sup>, Ricardo García-Sandoval<sup>4</sup>, Patricia Ballester<sup>5</sup>, Cristina Ferrándiz<sup>5</sup>, Maria de la Paz Sanchez<sup>1</sup>, Berenice García-Ponce<sup>1</sup>, Adriana Garay-Arroyo<sup>1</sup> and Elena R. Álvarez-Buylla <sup>1,6</sup>\*

1. Laboratorio de Genética Molecular, Epigenética, Desarrollo y Evolución de Plantas, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.

2. Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

3. Investigadoras e Investigadores por México, Grupo de Genómica y Dinámica Evolutiva de Microorganismos Emergentes, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Av. Insurgentes Sur 1582, Crédito Constructor, Benito Juárez, Ciudad de México C.P. 03940, México.

 Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Av Universidad 3000, CP 04510, CDMX, México.

5. Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, CSIC-UPV Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.

6. Centro de Ciencias de la Complejidad, Universidad Nacional Autónoma de México (C3-UNAM), Ciudad de México, México.

- Andrea Sanjuan-Badillo, asbadillo@ciencias.unam.mx, ORCID ID: 0000-0001-5093-5750
- León P. Martínez-Castilla, martinez.castilla@gmail.com
- □ Ricardo García-Sandoval, r.garciasandoval@gmail.com
- □ Patricia Ballester, pballester@ibmcp.upv.es
- Cristina Ferrándiz, cferrandiz@ibmcp.upv.es
- □ Maria de la Paz Sanchez, mpsanchez@iecologia.unam.mx, ORCID: 0000-0003-4153-5119
- Berenice García-Ponce, bgarcia@ecologia.unam.mx, ORCID ID: 0000-0002-7312-0754
- Adriana Garay-Arroyo, agaray@iecologia.unam.mx, ORCID ID: 0000-0003-1575-6284
- Elena R. Álvarez-Buylla, eabuylla@gmail.com, ORCID ID: 0000-0002-7938-6473

\*Corresponding author: Elena R. Álvarez-Buylla, eabuylla@gmail.com

Instituto de Ecología, UNAM. Lab. Genética Molecular, Epigenética, Desarrollo y Evolución de Plantas Circ. Exterior anexo al Jardín Botánico, CU.

Del. Coyoacán, CDMX 04510. Tel. (52-55) 5622-9013

1

#### Abstract

Cellular behavior, cell differentiation and ontogenetic development in eukaryotes result from complex interactions between epigenetic and classic molecular genetic mechanisms, with many of these interactions still to be elucidated. Histone deacetylase enzymes (HDACs) promote the interaction of histones with DNA by compacting the nucleosome, thus causing transcriptional repression. MADS-domain transcription factors are highly conserved in eukaryotes and participate in controlling diverse developmental processes in animals and plants, as well as regulating stress responses in plants. In this work, we focused on finding out putative interactions of *Arabidopsis thaliana* HDACs and MADS-domain proteins using an evolutionary perspective combined with bioinformatics analyses and testing the more promising predicted interactions through classic molecular biology tools. Through bioinformatic analyses, we found similarities between HDACs proteins from different organisms, which allowed us to predict a putative protein-protein interaction between the *Arabidopsis thaliana* deacetylase HDA15 and the MADS-domain protein XAANTAL1 (XAL1). The results of two-hybrid and Bimolecular Fluorescence Complementation analysis demonstrated *in vitro* and *in vivo* HDA15-XAL1 interaction in the nucleus. Likely, this interaction might regulate developmental processes in plants as is the case for this type of interaction in animals.

#### Keywords: MADS-domain protein, HDA15, XAL1, Arabidopsis thaliana.

**Funding**: This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología under Grant CB2014-240180b; Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología under Grant PN2015-687; Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM): IN208417; IN211721 (EAB); IN203223 (BG). Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático under Grant INECC/A1-003/2017:ECO-IE482.

#### **Author Contributions**

AS-B, EA-B, MPS, BG-P, and AG-A performed the experiments and data analysis; RG-S participated in data interpretation of phylogenetic analysis; LP M-C contributed with HCA and Docking analyses; PB and CF contributed with BiFC analyses. AS-B, LM-C, MPS, RG-S, B G-P, and EA-B wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

#### Introduction

Acetylation and deacetylation are important post-translational modifications of histones that are critical to gene expression regulation. While acetylation is associated with gene activation, deacetylation promotes the interaction

of histones with DNA, causing nucleosome compaction, thus causing gene transcription to be repressed. The enzymes that participate in these processes are known as histone acetylases (HATs) and histone deacetylases (HDACs), respectively. Contrary to the HAT enzymes, which catalyze the transfer of an acetyl group from acetyl-CoA to an ε-amino group of histone lysine residues, HDACs remove an acetyl group. The deacetylation carried out by HDACs contributes to various eukaryote development processes such as embryogenesis, cell differentiation, apoptosis, and others (Chen et al., 2020b; Lucchesi, 2019; Pandey et al., 2002).

In humans, HDACs can be classified into two families. The first one comprises proteins related to Reduced Potassium Dependency 3 (RPD3) proteins that are grouped into four classes (I, IIa, IIb, and IV). The second family is the Silent Information Regulator 2 (SIR2) family which also consists of four classes (I-IV) (Milazzo et al., 2020). In plants, there are three subfamilies of HDACs: 1) RPD3/histone deacetylase 1 (HDA1), includes proteins with a zinc finger motif in addition to the conserved histone deacetylase domain; 2) SIR2, is a NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylase with two distinct domains that bind NAD, and 3) Histone deacetylase 2 (HD2) which is specific of plants and include proteins with the deacetylase domain in its N-terminus. Additionally, the subfamily RPD3/HDA1 has three classes: class I (HDA6, HDA7, HDA9, HDA10, and HDA19) involved in germination, flowering, signaling, and stress tolerance; class II (HDA5, HDA8, HDA14, HDA15, HDA18) implicated in germination, ABA signaling, autophagy, heat tolerance, sperm cell formation, and photosynthesis; and class III sirtuin-like HDACs (SRT1, SRT2) involved in ethylene signaling, energy metabolism, cell division cycle and cellular response to DNA damage (Chen et al., 2020b; Kumar et al., 2021).

The role of HDACs in transcriptional repression is conserved among plants and animals. Furthermore, phylogenetic analysis of HDACs revealed a conserved deacetylation domain and several other similarities among their orthologs (Gregoretti et al., 2004; Pandey et al., 2002). HDACs can work as part of co-repressor protein complexes or in association with chromatin remodeling proteins as modulators of accessibility to DNA (Seto & Yoshida, 2014). However, due to the large family number, it is primordial to unravel how their function is regulated to achieve specificity between the different HDACs. One possibility is that they associate with transcription factors that determine the specificity binding to specific DNA sites. For instance, it has been reported that HDACs can form complexes with MADS-domain proteins (Gaffe et al., 2011a; Han et al., 2005a; Lemercier et al., 2000), which function as transcriptional regulators in a broad spectrum of developmental stages and processes in animals, plants, and fungi (Mead et al., 2002; Messenguy & Dubois, 2003; Gaffe et al., 2011; Dong et al., 2017).

Two lineages of MADS-box genes have been described in eukaryotes: type I, or serum response factor (SRF)-like members, which play an essential role during early development in animals and in plant reproduction; and type II myocyte enhancer factor 2 (MEF2)-like, whose members are involved in muscle development and, in plants,

participate in different developmental processes along the life cycle (Alvarez-Buylla et al., 2019; Smaczniak et al., 2012). Plant type II members or MIKC have been well described as modular proteins with several functional domains, including the highly conserved MADS-domain implicated in DNA binding (M), the intervening domain (I), the keratin-like (K) domain that participates in dimer formation and the variable C-terminal domain (C) (Lai et al., 2019).

In animals, HDAC4 and HDAC5, belonging to class IIa, interact with the MADS-domain transcription factor, MEF2A, inhibiting its transcriptional activity *in vivo* and *in vitro* during muscle cell differentiation. HDAC4 binds and represses MEF2A, regulating the specification of cardiomyoblasts (Wang et al., 2014) whereas the N-terminal in HDAC5 is sufficient to repress MEF2A (Lemercier et al., 2000). Additionally, HDAC9 acts as a negative regulator of muscle differentiation and cardiac tissue development, at least in the latest, by binding to MEF2 and suppressing fetal cardiac gene expression. All these data suggests that HDACs class II from animals have a crucial role in different cell proliferation / differentiation processes.

Growing evidence indicates that HDACs play a key regulatory role in plant development and the plant's responses to abiotic and biotic stresses (Kumar et al., 2021). However, few reports have been devoted to uncovering HDAC-MADS-domain protein interactions and their role in developmental regulation. The *Arabidopsis thaliana* (from now on Arabidopsis) MADS-domain protein AGL15 is known to interact with members of the Swi-independent 3/histone deacetylase (SIN3/HDAC) complex; this interaction is required to regulate AGL15 target genes (Hill et al., 2008). Moreover, during the floral transition, SAP30 FUNCTION-RELATED 1 (AFR1) and SAP30 FUNCTION-RELATED 2 (AFR2) form a complex with AGL18 to be recruited to a HDAC complex and inhibit the *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) expression via deacetylation. FT is an important component of the photoperiodic regulation of flowering (Gu et al., 2013). In tomato, three MADS-domain proteins expressed during flowering and fruit formation *Lycopersicon esculentum* MADS1, 5, and 6 (LeMADS1, LeMADS5, and LeMADS6) possess a histone deacetylase binding domain which is needed to interact with mammalian HDA5 (Gaffe et al., 2011). In addition, *Solanum lycopersicum* HDA1, 3, and 4 (SIHDA1, SIHDA3 and SIHDA4; members of the RPD3/HDA1 family) interacted with TOMATO AGAMOUS1 (TAG1), and TOMATO MADS BOX29 (TM29) (Zhao et al., 2015).

To have a global knowledge of the HDAC-MADS protein interactions in Arabidopsis, we analyzed the sequences of HDACs and MADS-domain proteins and compared their putative interaction domains. Sequence analyses and hydrophobic cluster analyses (HCA) methods delineated a similarity between the MADS-domain binding motifs of human HDACs and those of Arabidopsis. Here, we demonstrate the interaction of XAANTAL 1 (XAL1)/AGL12, a key regulator of root cell proliferation and flowering transition (Rodríguez-Bolaños et al., 2023; García-Cruz et

al., 2016; Tapia-López et al., 2008), with HDA15 *in vitro* and *in vivo*. BiFC analysis revealed a primarily nuclear location of this protein-protein interaction, specifically in the nucleolus. We suggest that the interaction between XAL1 and HDA15 could be involved in regulating cell proliferation / differentiation similar to what is reported in animals for homologs of XAL1 and HDA15.

#### **Materials and Methods**

#### **Plant Material and Growth Conditions**

All experiments used wild type *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia-0 (Col-0). Sterilized and scarified (3 days incubation at 4°C in darkness) seeds were grown on vertical plates with medium containing 0.2X MS (Murashige & Skoog) salt, 1% (w/v) sucrose, and 1% (w/v) agar in a controlled environment chamber in a 16 h light/8 h dark cycle with 22-24°C temperature, 45% relative humidity and illumination of 120 mmol m<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>.

#### **Gene Expression Analysis**

Arabidopsis Col-0 roots on different days after sowing (3, 5, 8, 10) were collected and frozen immediately with liquid nitrogen to isolate RNA. Total RNA was extracted from 100 mg of roots by homogenizing the tissue in liquid nitrogen and using TRIzol reagent (Invitrogen<sup>TM</sup>) according to the manufacturer's instructions.

From 1-2 micrograms of RNA, the first-strand cDNA was synthesized using the SuperScript<sup>TM</sup>II kit (Invitrogen<sup>TM</sup>) according to the manufacturer's specifications. Reversed transcription products were then used as the template for PCR reactions. The endpoint PCR analysis was performed using a thermocycler (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems). Reactions contained a master mix in a final volume of 20  $\mu$ L with appropriated primers for *HDA5*, *HDA15*, *HDA18* and *XAL1* (Table S1). PCR conditions were 94°C for 3 min, followed by 24 cycles of 94°C for 30 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 30 s. Each experiment included three independent biological replicates. Samples were normalized using the *At-TUB* expression.

#### **Sequences Sampling and Amino Acid Sequences Alignment**

Amino acid sequences were retrieved from Genbank to represent a diversity of Class I and Class II *HDAC* genes in plants and animals, a total of 150 sequences (Table S2) were selected. Sequences were aligned in MAFFT 7 (Katoh & Standley, 2013) using the -auto option; the resulting alignment was visually inspected and corrected in Mesquite 3.6 (Maddison and Maddison, 2019).

#### **Phylogenetic Analysis**

Support values were estimated in a maximum likelihood (ML) frame with a non-parametric bootstrap (Felsenstein, 1985) in IQ-TREE (Nguyen et al., 2015). For ML analyses, amino acids model selection was conducted with the ModelFinder strategy implemented in IQ-TREE (Kalyaanamoorthy et al., 2017); once the model was selected, an

ultra-fast bootstrap strategy with 1000 replicates was conducted (Hoang et al., 2018). A Bayesian inference tree search was conducted in MrBayes 3.2.6 (Ronquist et al., 2012), the amino acid substitutions model was selected with a reversible jump MCMC method (Huelsenbeck et al., 2004), rates were set to equal, MCMCMC chain ran 15,000,000 generations, sampling trees and parameters every 1,000 generations. The analysis was conducted in CIPRES online portal (Miller et al., 2010).

#### **Bioinformatics Analysis: Hydrophobic Cluster Analysis**

Hydrophobic Cluster Analysis (HCA) analyzes patterns in protein primary sequence to find motifs based on the conservation of amino acid hydrophobic/hydrophilic properties rather than sequence conservation per se (Callebaut et al., 1997). HCA has proven useful in the detection of distant homologs of domains with uncommon properties without prior information. To perform an HCA, we built a set of putative HDACs. The Human HDAC4 protein sequence (Han et al., 2005) was used as a query in BLASTp against the NCBI nr protein database (all non-redundant GenBank CDS translations-PDB-Swiss Prot-PIR-PRF excluding environmental samples from WGS projects). Human HDAC4 was chosen because it presents a motif for interaction with MEF2. Subsequently, the sequences recovered during the BLASTp were used as a query to search all Arabidopsis HDACs using PSI-BLAST. Convergence was attained in the 50th PSI-BLAST round. The next step was to analyze the HCA with the HCA-Analyze program (Silva, 2007) to compare hydrophobic patterns and choose the proteins with a similar pattern to the one in human HDAC4. Additionally, 56 Arabidopsis MADS-domain protein sequences were searched and aligned using BLASTp, with a custom substitution matrix, as described by Silva (2007), in order to identify hydrophobic patterns similar to the one found in the HDAC4 interaction domain of MEF2B (Fig. S1). Finally, to gain further insights into the conservation patterns of hydrophobic clusters among selected HDACs and MADSdomain proteins, hydrophobic clusters of the following proteins were drawn and visually compared using the program HCADraw (Gaboriaud et al., 1987) (available on https://bioserv.impmc.jussieu.fr/hca-form.html at the time of analysis): Human HDACs, HDAC4 (UniProt entry P56524); Arabidopsis HDACs, HDA5 (UniProt entry Q8RX28), HDA15 (Q8GXJ1), HDA18 (Q8LRK8); Human MADS-domain proteins, MEF2B (UniProt entry Q02080); Arabidopsis MADS-domain proteins, XAANTAL1 (XAL1, UniProt entry Q38841), PISTILLATA (PI, UniProt entry P48007), AGL15 (UniProt entry Q38847), AGL19 (UniProt entry O82743), and AGL64 (UniProt entry Q7XJK9).

#### **Protein-protein Docking Simulations**

To gain further insight into the possible interactions between XAL1 and HDA15, docking simulations were performed. First, we obtained a predicted 3D structure for the XAL1 monomer from the AlphaFold Protein Structure Database (https://alphafold.ebi.ac.uk/); specifically, we used AlphaFold's prediction for Uniprot protein Q38841 (prediction retrievable at https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q38841). Then, we constructed a homo-oligomer for

#### Anexo

XAL1 (https://galaxy.seoklab.org/cgiusing the GalaxyHomomer service from GALAXYweb bin/submit.cgi?type=HOMOMER) without specifying the expected oligomeric state. All the five best ab initio oligomerization models were 2-mers, with oligomer docking scores ranging from 1563.96 to 1394.14; all further work was pursued with the single best scoring model. Docking simulations between XAL1 and HDA15 were done on the HDOCK server (http://hdock.phys.hust.edu.cn/; Yan et al. 2020), which carries out a hybrid algorithm of template-based and *ab initio* free docking. We used as input the predicted XAL1 dimer from the previous steps and PDB crystal structure 6J6T, which contains the histone deacetylase domain of HDA15, as a proxy for HDA15 (https://www.rcsb.org/structure/6J6T; Chen et al., 2020a). The XAL1 homodimer was designated as the receptor molecule, and the HDA15 homotetramer was the ligand molecule. The docking run was allowed to perform both free ab initio and template-guided dockings. As a positive control for the ability of HDOCK to detect bona fide interactions, we ran a docking simulation in which we tried to reproduce the union between the human MADSdomain transcription factor MEF2b and the MEF2-binding domain of murine histone deacetylase HDAC9, as reported in PDB file 1TQE. Namely, we used chains E and F from 1TQE (corresponding to a MEF2b dimer) as a receptor and chain G (corresponding to the MEF2-binding domain of HDAC9) as a ligand on an HDOCK docking simulation to try to obtain the same interaction surfaces as reported in 1TQE.

#### Y2H Assays

For two-hybrid assays, the bait and prey clones used were cloned into the Gateway version of pGBKT7-GW (bait) and pGADT7-GW (prey) vectors using the recombination-based Gateway cloning system (Invitrogen<sup>TM</sup>). Sets of constructs were co-transformed into Y2H Gold yeast strain (Clontech). The transformed yeasts were selected in a minimal synthetic medium without tryptophan and leucine. Protein interactions were evaluated in a triple dropout medium without histidine, tryptophan, and leucine or in a quadruple dropout medium without histidine, tryptophan, leucine, and adenine with X- $\alpha$ -Gal. At least three clones with three repetitions were analyzed, giving similar results.

#### **Bimolecular Fluorescence Complementation Assay**

The *XAL1* and *HDA15* cDNA were cloned in pDONR201 (Invitrogen, now Life Technologies). All clones were recombined with pYFN43 (Belda-Palazón et al., 2012) to generate N-terminal fusions with the N-terminal part of YFP. XAL1 (pENTRY/D) was also recombined with pYFC43 (Belda-Palazón et al., 2012) to generate an N-terminal fusion with the C-terminal part of the YFP protein. The constructs were individually introduced in *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 and cultured on Luria Bertani (LB) with 100-mg/ml kanamycin and 25-mg/ml rifampicin. Overnight cultures of *Agrobacterium* (OD 1.2–1.6) were collected and re-suspended in a similar volume of infiltration medium [10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM 2-(N-morpholine)-ethane sulphonic acid (MES), pH 5.6, 200 mM acetosyringone], the OD was adjusted to 1.0 and incubated at 25°C for three h with weak shaking. Before the co-infiltration, *Agrobacterium* containing pYFC43-XAL1 was mixed with a similar volume of *Agrobacterium* with

pYFN43-HDA15. This mixture was introduced in the abaxial air space of young leaves of *Nicotiana benthamiana* using a needleless syringe. YFP fluorescence was assayed 2-3 days after infiltration using an inverted LSM 510 META confocal laser-scanning microscope (Zeiss). YFP was excited using a 488-nm line of an argon laser, and emission was filtered using a BP 500-550 nm filter.

#### Results

#### Phylogenetic analysis of histone deacetylases class I and II

A broad phylogenetic analysis of representative HDAC sequences was performed using sequences of homolog proteins from bacteria, animals, and plants (Fig. S2). A Markov chain Monte Carlo search of the phylogenetic tree with the highest posterior probability was performed with the MrBayes program. After 15,000,000 generations the chains converged (the average standard deviation between chains was 0.01), and all parameters had an adequate sample size of 6,150 or above. To have a clear perspective of the topology and relationships between sequences, the maximum clade credibility tree was selected from the sampled trees using TreeAnnotator 2.6 (Bouckaert et al., 2019). Class I and Class II HDAC sequences were recovered in reciprocally monophyletic groups (Fig. S2). Sequences from Arabidopsis HDA5 and HDA18 were recovered as a monophyletic group, followed by other plant HDA sequences, and as a sister group with a monophyletic group of animal HDAC sequences (Fig. 1). The Arabidopsis HDA15 sequence was recovered in another clade, with a very similar inner topology. While all the plant sequences were recovered in a monophyletic group, animal sequences were in a paraphyletic topology (Fig. 1). Although plant HDACs do not belong to the same clade as animal HDACs, they belong to a sister clade, suggesting functional conservation. Our data were consistent with those previously reported by Gregoretti et al (2004) where the catalytic domain of histone deacetylases was shown to be conserved between plants and animals.

#### Arabidopsis HDAC and MADS-domain proteins conserve a human interaction domain

To study the interactions of HDACs and MADS-domain proteins in Arabidopsis, bioinformatic tools were used to detect putative members of the animal class II HDACs. The class II (HDAC 5, 15, and 18 in Arabidopsis) was selected due to its high conservation and the interaction between HDACs class II and MEF2 in humans, as reported by Han and collaborators (2005); in fact, plant HDACs are similar to human class II HDACs in our phylogeny (Fig. 1). Since the MEF2-binding domain is conserved in the animal class II HDAC (HDACs 4, 5, 7 and 9) (Han et al., 2005), multiple alignments between animals and Arabidopsis class II HDACs were performed. However, the conservation of this domain was not evident at the primary sequence level (Fig. S3). Therefore, a Hydrophobic Cluster Analysis (HCA) was carried out. This methodology can detect domains with unusual characteristics following patterns of amino acids with similar biochemical characteristics in secondary structures of proteins (Silva, 2007). Our results showed that Arabidopsis HDA5 and HDA18 conserve a similar hydrophobic pattern of the

#### Anexo

MEF2-binding domain compared to the human HDAC4 (yellow shaded area in Fig. S4a, c), while HDA15, does not conserve the hydrophobic pattern of MEF2-binding domain. The hydrophobic pattern between HDA5, HDA18 and HDAC4 is highly conserved, even though HDAC4 is much more divergent at the primary sequence level (Fig. S4b). Although HDA15 does not retain a similar hydrophobic pattern, its primary sequence shows some conserved amino acids with HDA5 and 18 (Fig. S4c), suggesting a possible conserved interaction between class II HDACs with MADS-domain proteins in Arabidopsis. To pursue this possibility, we explored whether the hydrophobicity pattern of the MEF2 domain is conserved in some Arabidopsis MADS-domain proteins. To this end, multiple alignments were first performed with MEF2-domain from MEF2B and MADS-domain of 40 Arabidopsis MADSdomain proteins (Fig. 2a and Fig. S5). We selected some of them with a score >30 to analyze the hydrophobicity pattern; however, neither AGL15, which contains the major similarity score (42.7), nor the other ones, including the MADS-box with a lower score (AGL64), showed a hydrophobic pattern similar to the one in the MEF2 domain (Fig. S5). Since Gaffe, et al. (2011) reported the binding site of the tomato MADS-domain proteins (LeMADS1, LeMADS5 and LeMADS6) involved in the interaction with HDAC5 in tomato; this domain was also analyzed in the Arabidopsis MADS-domain dataset, showing that XAL1 the MADS-domain protein with higher similarity (Fig. 2b). Additionally, as XAL1 regulates root development by controlling cell proliferation of the root meristem (Tapia-López et al., 2008), could interact with HDACs in Arabidopsis.

Han and collaborators (2005) reported an analysis that revealed the interaction between murine HDAC9 and human MEF2B. To further establishes a possible interaction between HDACs and XAL1 in Arabidopsis, we selected HDA15, which has a primary sequence homologous to HDA5, to make a docking simulation between a XAL1 homodimer and an HDA15 homotetramer (Liu et al., 2013). The simulation yielded the ten most probable interaction modes, presenting confidence scores varying between 0.8612 and 0.8827, as well as docking energy score between -250.93 and -241.25, respectively (more negative values represent a more stable predicted interaction between proteins). In accordance with the suggestions from Yan et al (2017), we are including the ten best models produced by HDOCK docking energy score, as well as the best predicted model for the MEF2B / HDAC9 interface (Table 1). The structure of the first two models with confidence of 08827 and 0.8799 as well as its comparation with the docking analysis (0.8387) reported by Han and collaborators (2005) can be seen in Table 1. These results showed that an interaction between HDA15 and XAL1 is possible.

#### The HDACs 15 and XAL1 genes are expressed in Arabidopsis roots

Considering the hypothesis of an interaction between three members of class II HDAC and XAL1, we investigated whether *HDA5*, *15* and *18* are expressed in the same tissues where *XAL1* is expressed. An analysis of microarrays data from the Genevestigator platform (Hruz et al., 2008), showed that *HDA15* is expressed in hypocotyl, root,

cotyledon, and seed tissues, while *HDA18* is expressed in the same tissues but at lower levels in comparison with *HDA5* and *HDA15*. The high levels of *XAL1* transcript levels found in root and hypocotyl (Fig. S6), opens a possible interaction between *HDACs* and *XAL1* in hypocotyl and root tissues. In fact, previous reports indicated that XAL1 has an essential function in root development(García-Cruz et al., 2016a; Tapia-López et al., 2008), therefore we compared the expression kinetics of *HDA5*, *15* and *18* and *XAL1* during root development. *HDA5* is highly expressed from 5 to 10 days after sowing (DAS), in contrast to *HDA18*, which is only expressed at 10 DAS but at a lower level, whereas *HDA15* is expressed at 3, 5, and 10 DAS. *XAL1* has an increased expression from 5-10 DAS (Fig. 3). Therefore, *HDA5* is expressed similarly to *XAL1* during root development. In contrast, *HDA15* and *HDA18* are expressed preferentially at 10 DAS. These results indicate that all three *HDACs* are co-expressed with *XAL1* at a certain root development stage.

#### HDA15 interacts with XAL1

Given the prediction of interaction between HDA15 and XAL1 and the co-expression at some development stage, we performed the yeast two-hybrid assay to evaluate this interaction. Our results showed that HDA15 can bind to XAL1 (Fig. 4a) since the yeast strain carrying the BD-HDA15/AD-XAL1 plasmid grew in a restrictive medium (SD-Leucine-Tryptophan-Histidine and SD-Leucine-Tryptophan-Histidine with 3-AT). The interaction was not observed when XAL1 was cloned in the BD and HDA15 in the AD plasmid (Fig. 4b), indicating that although XAL1 is a transcriptional factor, it has no transactivation activity in this system. Besides, when different concentrations of 3AT were used (0.25-1.5 mM), it was observed an inhibition of colony growth, in a concentration dependent manner. When dilutions were made, growth reduced significantly, as expected (Fig. 4c). These results were confirmed by Lac-Z activity (Fig. 4d). In addition, the negative interactions found between HDA15 and other MADS-box genes (BD-HDA15/AD-AGL11 and BD-HDA15/AD-AGL77) (Fig. S7) confirmed that the interaction of HAD15 with XAL1 is not due to an artifact of HDA15 self-activation. Together these data showed an interaction between HDA15 and XAL1 in this heterologous system.

#### Nucleolar localization of the HAD15-XAL1 interaction

The biomolecular fluorescence complementation (BiFC) approach was used to verify the HAD15-XAL1 interaction *in planta*. HDA15 and XAL1 were fused to either the N-terminal or C-terminal portion YFP in the pYFN43 and pYFC43 vector which were introduced to *Agrobacterium tumefaciens* to perform transient expression in *Nicotiana benthamiana* leaves. The interaction of HDA15 with XAL1 was observed in the nucleus, confirming the interaction *in planta* (Fig. 5a). Interestingly, the observed fluorescence intensity was strongly confined in an area within the nucleus, possibly the nucleolus (Fig. 5c). For the BiFC assay, the interaction between PISTLLATA (PI) and APETALA (AP3) was used as a positive control, which co-localize, giving a fluorescent signal observed with confocal microscopy (Fig 5b, d). Otherwise,  $\beta$  subunit of sucrose non-fermenting-1-related protein kinase 1

(AKIN $\beta$ ), a subunit of the SnRK1 kinase, with XAL1 and YFN (empty vector) with XAL1 did not show fluorescence signal. As a negative control we used the interaction between the SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1) with AGAMOUS (AG), as these two proteins do not interact (Belda-Palazón et al., 2012b; Ito et al., 2004; Lee et al., 2008) (Fig. S8). All these results confirm an interaction of HDA15 with XAL1, however future work will be necessary to determine the function of this specific interaction during the plant development.

#### Discussion

HDACs are crucial players in all aspects of plant development, including embryogenesis, abaxial/adaxial polarity determination, flowering, senescence, responses to day length, and environmental stresses (Kumar et al., 2021). However, most studies have been performed in Arabidopsis, and relatively few HDACs have been characterized in other plant species (Chen et al., 2020b; Iype et al., 2013). Still, there is not enough information about the functional redundancy of HDACs. However, it has been shown that HDA19 and HDA6 participate in germination, embryonic development, and salt resistance with a partially redundant function (Chen et al., 2020b). Considering that the specificity in regulating other genes may be related to the interaction of HDACs with transcription factors, it is essential to know what these interactions are, the cell types where they occur, and the processes in which they participate. In this work, a bioinformatic and experimental analysis was carried out to identify the interaction between HDA15 and XAL1.

The tools used here to analyze the protein structure similarities in a native condition allowed us to detect conserved domains not found by conventional primary sequence conservation analysis. The hydrophobic cluster analysis graphs allowed us to identify a common pattern between Arabidopsis class II HDAC protein sequences since the primary sequence of the HDAs did not present an apparent conserved domain. Although this methodology does not perfectly predict an exact structure of the protein-protein interaction, it allowed us to find structures with characteristics similar to those of human HDAC and MADS-domain proteins, namely MEF2B and class II HDACs (Han et al., 2005). Thus, we identified a putative binding site within the MADS-domain with the consensus sequence, which may participate in the interaction with class II HDAC proteins. This putative MADS-box/MEF2S interaction site was studied by comparative analysis with a domain reported in the MADS-domain protein from tomato (Gaffe et al., 2011). From those analyses, we found that XAL1 contains this conserved domain and is able to interact with HDA15. Although we do not know if this domain is responsible for the interaction with HDA15, this interaction may be relevant to the function of XAL1, regulating cell proliferation in the root meristem (Tapia-López et al., 2008). Future studies generating double mutant of *xal1-hda15* could elucidate the possible role of the interaction between XAL1 and HDA15.

#### Anexo

Protein-protein docking is a bioinformatics tool that can be useful in exploring interactions that are difficult to determine experimentally (Vakser, 2014). Many works have used docking simulation to model interactions, mainly between proteins and drugs or small molecules. This is the case of HDAC1 and HDAC2, interacting with flavones that regulate the activity of HDACs (Scafuri et al., 2020). Similarly, docking has been used as a research tool to explore protein-protein interactions with significant results (Durham et al., 2023) and a steady ongoing improvement of methods and results (Plateau-Holleville et al., 2023). In this study we performed a protein-protein docking analysis, and we presented ten models with different conformations in the interaction. The HDOCK predictor provides models of the possible interactions between two proteins by adjusting the structure and testing shape complementarity and bonding energy between the amino acids that could participate in the interface between the two proteins (Tables S3 and S4); this adjustment causes proteins in each model to have different conformations and occasionally to make it appear that the predicted interactions are very different from model to model. Also, these differences arise because the analysis predicts many conformations if no restrictions are given. The ten models with confidence and docking energy scores similar to MEF2B/HDAC9 indicate that HDA15 and XAL1 could interact. Moreover, we found that there is substantial overlap in the interface regions among the different models (Tables S3 and S4). Thus, the results from docking simulations are consistent with the rest of the bioinformatics approaches that indicated a putative interaction between XAL1 and HDA15 and congruent with both molecular assays we performed.

#### Perspectives

The HDA15-XAL1 interaction was demonstrated by yeast two hybrid and by BiFC assays, indicating that this interaction occurs *in planta*. Moreover, HDA15 is localized in the nucleus (Alinsug et al., 2012), and we found that HDA15-XAL1 interaction is in the nucleus too, suggesting that HDA15-XAL1 may have a role in deacetylating histone or non-histone proteins. Future work could be carried out to elucidate the function of this interaction during plant development. In animals, it has been found that MEF2 genes participate in the balance between proliferation and differentiation in *in vitro* cell cultures. While in plants, MADS-box genes have been attributed to different functions, some of them related to the determination of cell type or identity of organs, and others in diverse developmental processes from embryogenesis to floral development (Castelán-Muñoz et al., 2019; ) and they have been implicated in the networks that underlie the balance between cellular proliferation and differentiation (García-Cruz et al. 2016; Pacheco-Escobedo et al. 2016). Our data revealed that *HDA15* and *XAL1* are expressed during root development, supporting a possible interaction between HDA15-XAL1. *XAL1* is involved in the regulation of several cell-cycle genes such as *CYCLIN D3;1* (*CYCD3;1*), *CYCLIN A2;3* (*CYCA2;3*), *CYCLIN B1;1* (*CYCB1;1*), *CYCLIN-DEPENDENT KINASE* (*CDKB1;1*) and *CHROMATIN LICENSING AND DNA REPLICATION FACTOR 1* (*CDT1a*) (García-Cruz et al., 2016), therefore it will be important to study if HDA15 contributes to *XAL1* function in cell-cycle gene regulation. Besides, HDACs are also involved in several biological processes in plants (Fig. 6)

12

and can coincide spatially with MADS. Likewise, it has been reported that HDACs, specifically class II, interact with MEF2 in animals. Assuming all the contexts of HDAC15 and XAL1, we could explore the function of the HDA15 with XAL1 interaction in other biological processes of Arabidopsis.

In docking, it is advantageous to use or predict hot spots (small sets of residues that contribute significantly to protein-protein interaction formation), as mentioned by Tsuchiya and collaborators (2022), to increase the accuracy and reliability of docking predictions. In the future, we will analyze interaction hot spots to provide more grounding to the potential interactions between HDA15 and XAL1.

#### Acknowledgments

Andrea Sanjuan Badillo is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and has received CONAHCYT fellowship 255569. We thank Diana Romo, Teresa Romero, and Laura Rodríguez for their logistic help.

#### **Conflict of interest statement**

The authors declare no conflict of interest.

#### References

- Alinsug, M. V., Chen, F. F., Luo, M., Tai, R., Jiang, L., & Wu, K. (2012). Subcellular localization of class II HDAs in Arabidopsis thaliana: Nucleocytoplasmic shuttling of HDA15 is driven by light. *PLoS ONE*, 7(2). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030846
- Alvarez-Buylla, E. R., García-Ponce, B., Sánchez, M. de la P., Espinosa-Soto, C., García-Gómez, M. L., Piñeyro-Nelson, A., & Garay-Arroyo, A. (2019). MADS-box genes underground becoming mainstream: plant root developmental mechanisms. In *New Phytologist* (Vol. 223, Issue 3, pp. 1143–1158). Blackwell Publishing Ltd. https://doi.org/10.1111/nph.15793
- Belda-Palazón, B., Ruiz, L., Martí, E., Tárraga, S., Tiburcio, A. F., Culiáñez, F., Farràs, R., Carrasco, P., & Ferrando, A. (2012a). Aminopropyltransferases Involved in Polyamine Biosynthesis Localize Preferentially in the Nucleus of Plant Cells. *PLoS ONE*, 7(10), e46907. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046907
- Bouckaert, R., Vaughan, T. G., Barido-Sottani, J., Duchêne, S., Fourment, M., Gavryushkina, A., Heled, J., Jones, G., Kühnert, D., De Maio, N., Matschiner, M., Mendes, F. K., Müller, N. F., Ogilvie, H. A., Du Plessis, L., Popinga, A., Rambaut, A., Rasmussen, D., Siveroni, I., ... Drummond, A. J. (2019). BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Computational Biology*, 15(4), 1–28. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006650
- Callebaut, I., Labesse, G., Durand, P., Poupon, A., Canard, L., Chomilier, J., Henrissat, B., & Mornon, J. P. (1997). Review Deciphering protein sequence information through hydrophobic cluster analysis (HCA): current status and perspectives. In *CMLS, Cell. mol. life sci* (Vol. 53).
- Castelán-Muñoz, N., Herrera, J., Cajero-Sánchez, W., Arrizubieta, M., Trejo, C., García-Ponce, B., Sánchez, M. de la P., Álvarez-Buylla, E. R., & Garay-Arroyo, A. (2019). MADS-box genes are key components of genetic regulatory networks involved in abiotic stress and plastic developmental responses in plants. *Frontiers in Plant Science*, 10(July). https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00853

- Chen, C. Y., Tu, Y. T., Hsu, J. C., Hung, H. C., Liu, T. C., Lee, Y. H., Chou, C. C., Cheng, Y. S., & Wu, K. (2020a). Structure of arabidopsis histone deacetylase15. *Plant Physiology*, *184*(3), 1585–1600. https://doi.org/10.1104/pp.20.00604
- Chen, X., Ding, A. B., & Zhong, X. (2020b). Functions and mechanisms of plant histone deacetylases. *Science China Life Sciences*, 63(2), 206–2016. https://doi.org/10.1007/s11427-019-1587-x
- Dong, C., Yang, X. Z., Zhang, C. Y., Liu, Y. Y., Zhou, R. Bin, Cheng, Q. Di, Yan, E. K., & Yin, D. C. (2017). Myocyte enhancer factor 2C and its directly-interacting proteins: A review. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 126, 22–30. https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2017.02.002
- Durham, J., Zhang, J., Humphreys, I. R., Pei, J., & Cong, Q. (2023). Recent advances in predicting and modeling protein– protein interactions. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 48, Issue 6, pp. 527–538). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2023.03.003

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution, 39(4), 783–791.

- Gaboriaud, C., Bissery, V., Benchetrit, T., & Mornon, J. P. (1987). Hydrophobic cluster analysis: An efficient new way to compare and analyse amino acid sequences. *FEBS Letters*, 224(1), 149–155. https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)80439-8
- Gaffe, J., Lemercier, C., Alcaraz, J. P., & Kuntz, M. (2011). Identification of three tomato flower and fruit MADS-box proteins with a putative histone deacetylase binding domain. *Gene*, 471(1–2), 19–26. https://doi.org/10.1016/j.gene.2010.10.002
- García-Cruz, K. V., García-Ponce, B., Garay-Arroyo, A., De La Paz Sanchez, M., Ugartechea-Chirino, Y., Desvoyes, B., Pacheco-Escobedo, M. A., Tapia-López, R., Ransom-Rodríguez, I., Gutierrez, C., & Alvarez-Buylla, E. R. (2016). The MADS-box XAANTAL1 increases proliferation at the Arabidopsis root stem-cell niche and participates in transition to differentiation by regulating cell-cycle components. *Annals of Botany*, 118(4), 787–796. https://doi.org/10.1093/aob/mcw126
- Gregoretti, I. V., Lee, Y. M., & Goodson, H. V. (2004). Molecular evolution of the histone deacetylase family: Functional implications of phylogenetic analysis. *Journal of Molecular Biology*, 338(1), 17–31. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.02.006
- Gu, X., Wang, Y., & He, Y. (2013). Photoperiodic regulation of flowering time through periodic histone deacetylation of the florigen gene FT. *PLoS Biology*, 11(9), e1001649. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001649
- Han, A., He, J., Wu, Y., Liu, J. O., & Chen, L. (2005a). Mechanism of recruitment of class II histone deacetylases by myocyte enhancer factor-2. *Journal of Molecular Biology*, 345(1), 91–102. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.10.033
- Hill, K., Wang, H., & Perry, S. E. (2008). A transcriptional repression motif in the MADS factor AGL15 is involved in recruitment of histone deacetylase complex components. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 53(1), 172–185. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03336.x
- Hoang, D. T., Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B. Q., & Vinh, L. S. (2018). UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. Molecular biology and evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 35(2), 518–522. https://doi.org/10.5281/zenodo.854445
- Hruz, T., Laule, O., Szabo, G., Wessendorp, F., Bleuler, S., Oertle, L., Widmayer, P., Gruissem, W., & Zimmermann, P. (2008). Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Adv Bioinformatics*, 2008. https://doi.org/10.1155/2008/420747
- Huelsenbeck, J. P., Larget, B., & Alfaro, M. E. (2004). Bayesian phylogenetic model selection using reversible jump Markov chain Monte Carlo. *Molecular Biology and Evolution*, 21(6), 1123–1133. https://doi.org/10.1093/molbev/msh123
- Ito, T., Wellmer, F., Yu, H., Das, P., Ito, N., Rcio Alves-Ferreira, M., Riechmann, J. L., & Meyerowitz, E. M. (2004). The homeotic protein AGAMOUS controls microsporogenesis by regulation of SPOROCYTELESS. *Nature*. 2004 Jul 15;430(6997):356-60. doi: 10.1038/nature02733. PMID: 15254538.
- Iype, J. M., Mishra, R., Karthikeyan, S., Babu, S., & Gothandam, K. M. (2013). Analysis of histone deacetylase families of Arabidopsis thaliana and Oryza sativa. *African Journal of Agricultural Research*, 8(2), 201–207. <u>https://doi.org/10.5897/AJAR11.1906</u>
- Jiang, J., Ding, A. B., Liu, F., & Zhong, X. (2020). Linking signaling pathways to histone acetylation dynamics in plants. *Journal of experimental botany*, 71(17), 5179–5190. https://doi.org/10.1093/jxb/eraa202
- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K. F., Von Haeseler, A., & Jermiin, L. S. (2017). ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*, 14(6), 587–589. https://doi.org/10.1038/nmeth.4285
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772–780. https://doi.org/10.1093/molbev/mst010
- Kumar, V., Thakur, J. K., & Prasad, M. (2021). Histone acetylation dynamics regulating plant development and stress responses. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 78, Issue 10, pp. 4467–4486). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. https://doi.org/10.1007/s00018-021-03794-x

- Lai, X., Daher, H., Galien, A., Hugouvieux, V., & Zubieta, C. (2019). Structural Basis for Plant MADS Transcription Factor Oligomerization. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17, 946–953. https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.06.014
- Lee, J., Oh, M., Park, H., & Lee, I. (2008). SOC1 translocated to the nucleus by interaction with AGL24 directly regulates LEAFY. *Plant Journal*, 55(5), 832–843. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03552.x
- Lemercier, C., Verdel, A., Galloo, B., Curtet, S., Brocard, M. P., & Khochbin, S. (2000). mHDA1/HDAC5 histone deacetylase interacts with and represses MEF2A transcriptional activity. *Journal of Biological Chemistry*, 275(20), 15594–15599. https://doi.org/10.1074/jbc.M908437199
- Liu, X., Chen, C.-Y., Wang, K.-C., Luo, M., Tai, R., Yuan, L., Zhao, M., Yang, S., Tian, G., Cui, Y., Hsieh, H.-L., & Wu, K. (2013). PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR3 Associates with the Histone Deacetylase HDA15 in Repression of Chlorophyll Biosynthesis and Photosynthesis in Etiolated Arabidopsis Seedlings. *The Plant Cell*, 25(4), 1258–1273. https://doi.org/10.1105/tpc.113.109710
- Lucchesi, J. C. (2019). Epigenetics, Nuclear Organization & Gene Function. In *Epigenetics, Nuclear Organization & Gene Function*. Oxford University Press. https://doi.org/10.1093/oso/9780198831204.001.0001
- Maddison, W. P. and Maddison, D. R. (2019). *Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.61* (3.61; p. http://www.mesquiteproject.org).
- Mead, J., Bruning, A. R., Gill, M. K., Steiner, A. M., Acton, T. B., & Vershon, A. K. (2002). Interactions of the Mcm1 MADS box protein with cofactors that regulate mating in yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 22(13), 4607–4621. https://doi.org/10.1128/MCB.22.13.4607-4621.2002
- Messenguy, F., & Dubois, E. (2003). Role of MADS box proteins and their cofactors in combinatorial control of gene expression and cell development. *Gene*, *316*(1–2), 1–21. https://doi.org/10.1016/S0378-1119(03)00747-9
- Milazzo, G., Mercatelli, D., Di Muzio, G., Triboli, L., De Rosa, P., Perini, G., & Giorgi, F. M. (2020). Histone deacetylases (HDACs): Evolution, specificity, role in transcriptional complexes, and pharmacological actionability. In *Genes* (Vol. 11, Issue 5). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/genes11050556
- Miller, M. A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 1–8.
- Mughal, W., Nguyen, L., Pustylnik, S., Da Silva Rosa, S. C., Piotrowski, S., Chapman, D., Du, M., Alli, N. S., Grigull, J., Halayko, A. J., Aliani, M., Topham, M. K., Epand, R. M., Hatch, G. M., Pereira, T. J., Kereliuk, S., McDermott, J. C., Rampitsch, C., Dolinsky, V. W., & Gordon, J. W. (2015). A conserved MADS-box phosphorylation motif regulates differentiation and mitochondrial function in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. *Cell Death and Disease*, 6(10), 1–13. https://doi.org/10.1038/cddis.2015.306
- Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., Von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268–274. https://doi.org/10.1093/molbev/msu300
- Pacheco-Escobedo, M. A., Ivanov, V. B., Ransom-Rodríguez, I., Arriaga-Mejía, G., Ávila, H., Baklanov, I. A., Pimentel, A., Corkidi, G., Doerner, P., Dubrovsky, J. G., Álvarez-Buylla, E. R., & Garay-Arroyo, A. (2016). Longitudinal zonation pattern in Arabidopsis root tip defined by a multiple structural change algorithm. *Annals of Botany*, 118(4), 763–776. https://doi.org/10.1093/aob/mcw101
- Pandey, R., Müller, A., Napoli, C. A., Selinger, D. A., Pikaard, C. S., Richards, E. J., Bender, J., Mount, D. W., & Jorgensen, R. A. (2002). Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of Arabidopsis thaliana suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes. *Nucleic Acids Research*, 30(23), 5036–5055. https://doi.org/doi: 10.1093/nar/gkf660
- Plateau-Holleville, C., Guionnière, S., Boyer, B., Jimenez-Garcia, B., Levieux, G., Merillou, S., Maria, M., & Montes, M. (2023). UDock2: interactive real-time multi-body protein-protein docking software. *Bioinformatics*, 39(10). https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btad609
- Rodríguez-Bolaños, M., Martínez, T., Juárez, S., Quiroz, S., Domínguez, A., Garay-Arroyo, A., Sanchez, M. de la P., Álvarez-Buylla, E. R., & García-Ponce, B. (2023). XAANTAL1 Reveals an Additional Level of Flowering Regulation in the Shoot Apical Meristem in Response to Light and Increased Temperature in Arabidopsis. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(16). https://doi.org/10.3390/ijms241612773
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., & Huelsenbeck, J. P. (2012). Mrbayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3), 539–542. https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029
- Scafuri, B., Bontempo, P., Altucci, L., De Masi, L., & Facchiano, A. (2020). Molecular docking simulations on histone deacetylases (Hdac)-1 and-2 to investigate the flavone binding. *Biomedicines*, 8(12), 1–10. https://doi.org/10.3390/biomedicines8120568
- Seto, E., & Yoshida, M. (2014). Erasers of Histone Acetylation : The Histone Deacetylase Enzymes. Cold Spring Harb Perspect Biol., 6(4), a018713. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018713
- Silva, P. J. (2007a). Assessing the reliability of sequence similarities detected through hydrophobic cluster analysis. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *70*(4), 1588–1594. https://doi.org/10.1002/prot.21803
- Smaczniak, C., Immink, R. G. H., Angenent, G. C., & Kaufmann, K. (2012). Developmental and evolutionary diversity of plant MADS-domain factors: Insights from recent studies. *Development (Cambridge)*, 139(17), 3081–3098. https://doi.org/10.1242/dev.074674
- Tapia-López, R., García-Ponce, B., Dubrovsky, J. G., Garay-Arroyo, A., Pérez-Ruíz, R. V, Kim, S.-H., Acevedo, F., Pelaz, S., & Alvarez-Buylla, E. R. (2008). An AGAMOUS-related MADS-box gene, XAL1 (AGL12), regulates root meristem cell proliferation and flowering transition in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 146(3), 1182–1192. <u>https://doi.org/10.1104/pp.107.108647</u>
- Tsuchiya, Y., Yamamori, Y., & Tomii, K. (2022). Protein-protein interaction prediction methods: from docking-based to AIbased approaches. *Biophysical reviews*, 14(6), 1341–1348. https://doi.org/10.1007/s12551-022-01032-7
- Vakser, I. A. (2014). Protein-protein docking: From interaction to interactome. In *Biophysical Journal* (Vol. 107, Issue 8, pp. 1785–1793). Biophysical Society. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.08.033
- Wang, Z., Qin, G., & Zhao, T. C. (2014). HDAC4: Mechanism of regulation and biological functions. In *Epigenomics* (Vol. 6, Issue 1, pp. 139–150). Future Medicine Ltd. <u>https://doi.org/10.2217/epi.13.73</u>
- Xiong, L., Zhou, W., & Mas, P. (2022). Illuminating the Arabidopsis circadian epigenome: Dynamics of histone acetylation and deacetylation. *Current opinion in plant biology*, 69, 102268. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2022.102268
- Yan, Y., Tao, H., He, J., & Huang, S. Y. (2020). The HDOCK server for integrated protein–protein docking. *Nature Protocols*, 15(5), 1829–1852. https://doi.org/10.1038/s41596-020-0312-x
- Zhao, L., Lu, J., Zhang, J., Wu, P. Y., Yang, S., & Wu, K. (2015). Identification and characterization of Histone deacetylases in Tomato (Solanum Lycopersicum). *Frontiers in Plant Science*, 5(JAN), 1–9. https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00760

## Table

**Table 1.** Interaction of XAL1 with HDA15 in Arabidopsis as predicted by HDOCK docking simulations. The table shows the top ten models that docking analysis generated and the reported interaction for humans of MEF2B with HDAC9. The two last rows show the images of the structure of the interactions. HDA15 is in light lilac, XAL1 is in helices green and aquamarine, and the last column is HDAC9 and MEF2B in aquamarine and green, respectively.

Organism	Arabid	lopsis the	aliana								Homo sapiens/Mus musculus
Model rank	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Model 1 from MEF2B/HDAC9
HDOCK docking energy score	-250.93	-249.58	-248.81	-248.53	-245.33	-245.20	-244.55	-242.01	-241.76	-241.25	-232.43
Confidence score	0.8827	0.8799	0.8783	0.8777	0.8706	0.8703	0.8689	0.8630	0.8624	0.8612	0.8387
Ligand RMSD (Å)	106.61	107.81	74.14	78.76	73.30	111.37	109.35	65.89	85.03	113.06	0.79
Struture (helices)		Model 1			Ν	Aodel 2		A CONTRACTOR OF THE OWNER	Mod	el MEF2B/I	HDAC9
Struture (helices- surface)	Model 1				Model 2		and and a second	Mo	del MEF2B	P/HDAC9	



**Figure 1**. Phylogeny of class II histone deacetylase. HDA5 and HDA18 were recovered as a monophyletic group, and HDA15 in the sister clade. The sequences of animals were in a paraphyletic topology, but HDA15 of Arabidopsis and HDAC of humans belong to a sister clade suggesting functional conservation; in green HDAC class II of Arabidopsis and red HDAC class II of *Homo sapiens*. Soybean (SOYBN), *Oriza sativa japonica* (ORYSJ).



**(b)** 

HsMEF2	LCDCEIALIIFNSTNKLFQYASTD-MDKVLLKYTEY
LeMADS1	SVLCDAEVALIIFSNRGKLYEFCSTSSMVKTIEKYQRC
LeMADS5	SVLCDAEVALIIFSNRGKLYEFCSSSSMLKTLERYQKC
LeMADS6	SVLCDAEVALLVFSNRGKLYEFCSTNNMLKTLDRYQKC
AtAGL15	LCDAEVAVIVFSKSGKLFEYSSTG-MKQTLSRY
AtAGL19	LCDAEVALVIFSPRSKLYEFSSSS-IAATIERY
AtAGL14	LCDAEVALIIFSPRGKLYEFSSS
AtXAL1	LCDAEIGVVIFSPQGKLFELATKGTMEGMIDKYMK-
	***.*:.::***:: .:.

**Figure 2**. MADS-domain/MEF2 motif is conserved in some MADS-domain proteins of Arabidopsis. (a) Graphic representation of MEF2 protein, in red the MADS-domain and in orange the MEF2-domain. Below the model representation, there is the linear amino acid sequence indicating the MADS-domain, HDAC binding region and MEF2 domain (Figure was modified from Lu et al., 2000). (b) Multiple alignments of the MEF2C motif sequence, tomato MADS-domain proteins, and some Arabidopsis MADS-domain proteins. In orange are identical amino acids, in yellow less conserved substitutions, and in blue conservative substitutions. *Homo sapiens* (Hs), *Lycopersicon esculentum* (Le), *Arabidopsis thaliana* (At).

19



**Figure 3**. Expression of MADS and HDACs in root of *Arabidopsis thaliana*. *XAL1* expression HDAs and different times in the development of the root from Arabidopsis (PCR endpoint); days after sowing (DAS), tubulins (*TUB*).



**Figure 4**. Protein-protein interaction between HDA15 and XAL1. A two-hybrid assay indicates an interaction between HDAC and XAL1 in Arabidopsis. (a) SD/-L/-W/-H correspond to dropout medium lacking L, W, H and positive interactions, BD HDA15 and AD XAL1, resulting in yeast growth on the SD/-L/-W/-H plate. (b) HDA15 and XAL1 interaction with different concentrations of 3-AT (0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25 and 1.5 mM). (c) HDA15 interaction with XAL1 at different dilutions (1:50 and 1: 1000). (d) Lac-Z expression in interaction HDA15 and XAL1. AGAMOUS LIKE 6 (AGL6) and APETALA 3 (AP3) was used as a positive control.

21



**Figure 5**. Subcellular localization of the interaction of HDA15 and XAL1. Bimolecular fluorescence complementation assay in tobacco leaf cell nuclei between transiently expressed HDA15 and XAL1. (a) HDA15-XAL1 interaction in the nucleus (YFC-XAL1 + YFN-HDA15). (b) Positive control, PISTILLATA interaction with APETALA3 (YFC-PI + YFN-AP3). In c and d is a zoom of a and b, respectively. In c, the yellow arrow points to the possible nucleolus. The GFP spectrum is shown in the left column panels. Merged visible and fluorescent signals are shown in the right column panel. Scale bar: 20  $\mu$ m.



**Figure 6**. Summary of principal function of histone deacetylation in plants. **1**, repression thermal-responsive genes and warm temperatures induce PIF4 inhibiting HDA15/HFR1 interaction. **2**, hypoacetylation at the *YUCCA8* by HDA9/PWR/HOS15 complex in warm temperatures. **3**, HOS15/CBFs/HD2C complex repress COR genes at normal temperature; the cold induces HD2C degradation. **4**, HDA15, PIF1, and PIF3 are associated in dark

conditions, deacetylating histores (3 and 4) to repress chlorophyll biosynthetic/photosynthetic and seed germination genes. In light, HDA15 is released to degradation of PIF1 and PIF3. 5, In light, the HDA15-NFYCs-HY5 complex inhibits the expression of *IAA19* and *XTH17* genes, which are related to auxin biosynthetic, signaling, and cell wall organization. 6, In light, the HY5/HDA9 interaction inhibits ATG5 and ATG8e (cell autophagy genes). In Darkness and nitrogen deficiency, these genes are released for the degradation of HY5-inducing autophagy. In bacterial infection: 7, SA induction occurs, WRKY38/62 is expressed, and WRKY38/62 recruits HDA19 to elicit a basal defense response.; 8, The expression of WRKY53 is induced, recruiting the HDA9/PWR/HOS15 complex. This complex suppresses NLR genes and leaf senescence genes. Hormone signaling: 9, HDA19 and Aux/IAA-TPL/TPR induced deacetylation, and auxin-responsive genes were repressed without Aux. In the presence of Aux, the Aux/IAA protein is degraded, and ARFs are released; 10, BR stimulates BES1 and BZR1 activity to recruit TPL/TPR/HDA19 complex and repress BR-repressed genes; 11, High concentrations of ABA stimulate the MYB96 - HDA15 interaction, regulating ABA-repressed genes for hyperacetylation of histones (3 and 4); 12, JAZ and HDA6 repress transcription factors EIN3/EIL1, and ethylene stabilizes EIN3/EIL1. JAZ is degraded for JA to express ethylene-responsive genes; 13, The interaction of JAZ and NINJA with TPL/TPR recruits HDA19 and HDA6 for transcriptional repression in the absence of JA. Circadian clock: 14 morning, HDA6/LDL1-2/CCA1/LHY complex repress TOC1; 14 evening, Evening Complex (EC), HDA9 and HOS15 repress TOC1 and GI expression; 14 nighttime, HDA6, LDL1/2, TOC1 repress the expression of CCA1/LHY. ABA INSENSITIVE3 (ABI3). AUTOPHAGY-RELATED GENES (ATG5/8), BRASSINOSTEROIDS AT VASCULAR AND ORGANIZING CENTER (BRAVO). CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATEDI (CCA1). COLD-RESPONSIVE (COR). CUP SHAPED COTYLEDON3 (CUC3). DWARF4 (DWF4). ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 (ERF1). INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 19 (IAA19), LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY), PLANT DEFENSIN 1,2 (PDF1.2), RHO OF PLANTS (ROP), XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLUCOSYLASE/HYDROLASE 17 (XTH17). TIMING OF CAB EXPRESSION 1 (TOC1). Auxin (Aux). Abscisic Acid (ABA). Salicylic Acid (SA). AUXIN RESPONSE FACTOR (ARFs). Brassinosteroid (BR). BRI1-EMS-SUPPRESSOR1 (BES1). BRASSINAZOLE-RESISTANT1 (BZR1). C-REPEAT BINDING FACTORSs (CBFs). CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED1 (CCA1). ELONGATED HYPOCOTYL5 (HY5). ETHYLENE INSENSITIVE 3 (EIN3). ETHYLENE INSENSITIVE 3-LIKE 1 (EIL1). HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENES15 (HOS15). HD2-type HDACs (HD2C). VARIANT HISTONE 2A (H2A.Z). INDOLE-3-ACETIC ACID (IAA). JASMONATE ZIM DOMAIN (JAZ). Jasmonic Acid (JA). LONG HYPOCOTYL IN FAR-RED1 (HRF1). LSD1-LIKE1/2 (LDL1/2). LYSINE-SPECIFIC DEMETHYLASE1 (LSD). LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY). TRANSCRIPTION FACTOR MYB 96 (MYB96). TRANSCRIPTION FACTOR MYC (MYC). NOVEL INTERACTOR OF JAZ (NINJA). NUCLEAR FACTOR-YC HOMOLOGS (NF-YCs). PHYTOCROME-INTERACTING FACTOR (PIF). POWERDRESS (PWR). TRANSCRIPTION FACTOR (TF). TOPLESS (TPL). TOPLESS-RELATED (TPR). TIMING OF CAB EXPRESSION (TOC). TRANSCRIPTION FACTOR WRKY (WRKY). Figure was modified from Jian et al., 2020

and Xiong et al., 2022.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

	Protein	Total score	Evalue
	AGL15	42.7	1e-07
	AGL21	42.7	2e-07
	SPV	42.4	2e-07
	AGL18	42.4	2e-07
	AGL24	40.8	6e-07
	AGL16	40.4	7e-07
	CAL	40.4	8e-07
	AGL42	40.0	9e-07
	AP1	39.7	1e-06
	AGL72	38.9	2e-06
	AGL79	38.9	2e-06
	AGL71	38.5	3e-06
	AGL20	38.5	3e-06
	AGL6	37.7	5e-06
	AGL44	37.7	5e-06
	AGL17	35.8	2e-05
	STK	35.4	2e-05
	AG	35.4	2e-05
	AGL19	35.4	2e-05
	SEP2	35.4	3e-05
	SHP1	35.0	3e-05
	SHP2	35.0	3e-05
	SEP1	34.7	4e-05
	AGL13	34.3	5e-05
	AGL63	34.3	5e-05
	SEP3	34.3	5e-05
	SEP4	33.5	9e-05
	MAF4	32.7	1e-04
	XAL2/AGL14	32.7	2e-04
	PI	32.3	2e-04
	AGL28	32.0	3e-04
	AGL23	30.8	6e-04
	AP3	30.8	6e-04
	XAL1/AGL12	30.4	7e-04
	FLC	29.6	0.001
	AGL57	29.6	0.001
	AGL62	29.6	0.001
	AGL29	28.5	0.002
	AGL31	28.5	0.003
	AGL61	28.5	0.003
	MAF5	27.3	0.006
	MAF3	26.6	0.011
	AGL91	26.6	0.012
	AGL66	25.8	0.018
	AGL104	25.4	0.022
The program used to create the	AGL54	23.5	0.086
artwork in this figure was	AGL102	22.7	0.17
Microsoft® Excel	AGL40	21.9	0.26
MICIOSOIL® EACEI	AGL 22	21.0	0.55
	AGL33	21.2	0.45
	AGLI01	21.2	0.48
	AGL59	20.4	0.70
	AGL64	20.0	1.1
	AGL85	19.6	1.3
	ACL 92	10.9	2.2
	AGL82	1/./	5.7

Figure S1. The Blast of the MADS-box/MEF2S motif in 56 Arabidopsis MADS-box proteins.



**Figure S2**. Phylogenetic tree of eukaryotic and prokaryotic HDAC sequences. HDAC members from selected eukaryotes and additional bacteria are included to represent HDAC diversity better. The clade in blue corresponds to the HDAC of class I, and the red HDAC of class II. Values on selected branches correspond to non-parametric bootstrap frequencies (bs)/posterior probabilities (p.p.).

## (a)

P56524 Q9UQL6 Q8WUI4 Q9UKV0 Q8RX28 Q8GXJ1 Q8LRK8	HDAC4_HUMAN HDAC5_HUMAN HDAC7_HUMAN HDAC9_HUMAN HDA5_ARATH HDA15_ARATH HDA18_ARATH	113 118 45 88 1 1 1	KQQQEMLAMKHQQELLEHQRKLERHRQEQELEKQHREQKLQQLKNKEKGKESA KQQQEMLAAKQQQEMLAAKRQQELEQQRQREQQRQEELEKQRLEQQLLILRNKEKSKESA 
P56524 Q9UQL6 Q8WUI4 Q9UKV0 Q8RX28 Q8GXJ1 Q8LRK8	HDAC4 HUMAN HDAC5 HUMAN HDAC7 HUMAN HDAC9 HUMAN HDA5 ARATH HDA15 ARATH HDA18 ARATH	166 178 80 138 1 1 1	VASTEVKMKLQEFVLNKKKALAHRNLNHCISSDPRYWYGKTQHSSLDQSSPPQSG IASTEVKLRLQEFLLSKSKEPTPGGLNHSLPQHPKCWGAHHASLDQSSPPQSGPPG VASSVVKQKLAEVILKKQQAALERTVHPNSPGIPYRTLEPLETEGATRS VASTEVKQKLQEFLLSKSATKDTPTNGKNHSVSRHPKLWYTAAHHTSLDQSSPPLSG
P56524 Q9UQL6 Q8WUI4 Q9UKV0 Q8RX28 Q8GXJ1 Q8LRK8	HDAC4_HUMAN HDAC5_HUMAN HDAC7_HUMAN HDAC9_HUMAN HDA5_ARATH HDA15_ARATH HDA18_ARATH	745 774 611 724 107 226 140	-VFVRLPCGGVGVDSDTIWNEVHSAGAARLAVGCVVELVFKVATGELKNGFAVVRPPGHH KMYAVLPCGGIGVDSDTVWNEMHSSSAVRMAVGCLLELAFKVAAGELKNGFAIIRPPGHH RMFVMLPCGGVGVDTDTIWNELHSSNAARWAAGSVTDLAFKVASRELKNGFAVVRPPGHH KFFSSLPCGGLGVDSDTIWNELHSSGAARMAVGCVIELASKVASGELKNGFAVVRPPGHH NRIASQLNSIYLNGGSSEAAYLAAGSVVKLAEKVAEGELDCGFAIVRPPGHH LLYSYFTSDT-YANEYSARAARLAAGLCADLATDIFTGRVKNGFALVRPPGHH NKIASQLDSIYLNGGSSEAAYLAAGSVVKVAEKVAEGELDCGFAIVRPPGHH :: : : *: *. *.*
(b) P56524 Q8RX28 Q8GXJ1 Q8LRK8	HDAC4 HUMAN HDA5 ARATH HDA15 ARATH HDA18 ARATH	121 1 1 1	MKHQQELLEHQRKLERHRQEQELEKQHREQKLQQLKNKEKGKESAVASTEVKMKLQEFVL 
P56524 Q8RX28 Q8GXJ1 Q8LRK8	HDAC4 HUMAN HDA5 ARATH HDA15 ARATH HDA18 ARATH	181 1 1	NKKKALAHRNLNHCISSDPRYWYGKTQHSSLDQSSPPQSGVSTSYNHPVLGMYDAKDDFP
P56524 Q8RX28 Q8GXJ1 Q8LRK8	HDAC4_HUMAN HDA5_ARATH HDA15_ARATH HDA18_ARATH	681 52 177 85	RIQSIWSRLQETG-LRGKCECIRGRKATLEELQTVHSEAHTLLYGTNPLNRQKLDSKKLL RIRVIWEKLQLAG-VSQRCVVLGSSKAEDKHLQLVHTKDHVNLVKSISTKQKDYRRNRIA RLRAIAASLATAGVFPGRCLPINAREITKQELQMVHTSEHVDAVDTTSQLL- RIRVIWEKLQLAG-VTQRCVVLGGSKAEDKHLKLVHTKKHVNLVKSISTKKKDSRRNKIA *:: * * :* : : : : : : : : : : : : : :
P56524 Q8RX28 Q8GXJ1 Q8LRK8	HDAC4 HUMAN HDA5 ARATH HDA15 ARATH HDA18 ARATH	740 111 228 144	GSLASVFVRLPCGGVGVDSDTIWNEVHSAGAARLAVGCVVELVFKVATGELKNGFAVVRP SQLNSIYLNGGSSEAAYLAAGSVVKLAEKVAEGELDCGFAIVRP YSYFTSDTYANEYSARAARLAAGLCADLATDIFTGRVKNGFALVRP SQLDSIYLNGGSSEAAYLAAGSVVKVAEKVAEGELDCGFAIVRP . :: *: ** ** .*: *: *: ******

**Figure S3**. Location of the MEF2 interaction motif in the linear sequence of class II histone deacetylases in Humans and Arabidopsis. (a) Alignment of all histone deacetylase class II of Human (HDAC 4, 5, 7, 9) and Arabidopsis (HDA5, 15, 18). (b) Alignment of the HDAC4 with HDA5, HDA15 and HDA18 Arabidopsis. In **a** and **b**, the interaction motif with MEF2 of humans is shaded in red; putative interaction motif in Arabidopsis is shaded in green.

27



**Figure S4.** Domain with a putative site for interaction between MADS and HDAC in Arabidopsis. HCA plots of structure and amino acid sequence of motif interaction in HDAC and MADS. (a) Multiple alignments of the human HDAC class II motif sequence (taken from Han et al., 2005) and the reported HCA interaction of HDAC4 for *Homo sapiens*. HCA corresponds to the motif of the human HDAC4 class II proteins, and the left predicted segment of human HDAC4 was used as a query in PSI-BLAST searches and analyzed through the HCA procedure. Under the

alignment and plot HCA, a graphic representation of human HDAC4 protein, the yellow band is the motif interaction with MEF2C, and the red band is the deacetylation domain. (b) Mapping residues in MADS/MEF2 domains of MEF2 required for interaction with HDA. (c) Multiple alignments of the Arabidopsis HDAC class II motif sequence and HCA interaction of HDAC. HCA corresponds to the putative domain of the Arabidopsis HDA class II proteins, and the left is the predicted segment of the Arabidopsis HDA18 protein. Under the alignment and plot HCA, graphic representation of Arabidopsis HDA15 protein, the yellow band in HDA5 and HDA18 is the interaction domain with MEF2C, and the green band is the deacetylation domain. In **a** and **b**, the letters in red inside the alignment are amino acids conserved and not conserved in the yellow inside of the sequences of histone deacetylases; the green ones are conserved. The shaded area in yellow (**a**, **c**) indicates the interaction motif.



**Figure S5**. Hydrophobic analysis of 40 Arabidopsis MADS-domain proteins. Some representative hydrophobicity patterns of the MADS-domain do not present in their sequence a pattern like the motif of interaction in MEF2.

Anexo



**Figure S6**. Expression of MADS and HDACs in tissues of *Arabidopsis thaliana*. HDACs and *XAL1* expression in different tissues of Arabidopsis (data from microarrays of the Genevestigator platform).



**Figure S7**. Negative controls of yeast two hybrid assays. **a**, interaction between AD-AGL11 with BD-HDA15 and AD-AGL77 with BD-HDA15 at three different concentrations of 3AT.



**Figure S8**. Negative controls of BiFC. **a**, interaction of SUPPRESSOR OF CONSTANS 1 (SOC1) and AGAMOUS (AG); **b**, interaction between SUCROSE NON-FERMENTATING-1-RELATED PROTEIN KINASE 1 subunit  $\beta$  (AKIN $\beta$ ) and XAANTAL 1 (XAL1); **c**, interaction of XAL1 with an YFC empty vector.

Gene	Sequences
110.440	F 5'CCA TGG AGT TGA GAC TAG TTG ACC C3'
ПДАТО	R 5'AGA TCT AGA CTT TCC CAA TGA CTC3'
HDA15	F 5'ACC CAC TAG GAT GCT GTG AT3'
	R 5'GGA ATT CGT TTA TCC AAA CCG3'
UDAE	F 5'GAA GCT CCT TTG ATA GTT G3'
праз	R 5'GAA TAA GAA TGT TTC TCT CCG3'
VAL 1	F 5'TGG TCG TGG TTC TTC TTC TGC T3'
XALI	R 5'TGT CTC CAT GAC TGC GAA GTT3'
TIID	F 5'CTC AAG AGG TTC TCA GCA GTA3'
IUD	R 5'TCA CCT TCT TCA TCC GCA GTT3'

Table S1. List of primers used in semiquantitative RT-PCR.

ID	Name	Organism	Class	ID	Name	Organism	Class
Q8RX28	HDA5	Arabidopsis	CII	Q88C43		Pseudomonas	CII
Q8GXJ1	HDA15	Arabidopsis	CII	Q9I3T5		Pseudomonas	CII
Q941D6	HDA14	Arabidopsis	CII	Q98NK3		Mesorhizobium	CII
Q94EJ2	HDA8	Arabidopsis	CII	Q8RAS9		Caldanaerobacter	CII
Q8LRK8	HDA18	Arabidopsis	CII	A0A0E3RFD8		Methanosarcina	CII
I1JZJ1		SOYBN	CII	Q8TLY4		Methanosarcina	CII
A0A0R0FIH2		SOYBN	CII	O30107		Archaeoglobus	CII
A0A0R0K0I2		SOYBN	CII	I6TW68		Pyrococcus	CII
K7KR69		SOYBN	CII	O58986		Pyrococcus	CII
I1MUF8		SOYBN	CII	Q9UZJ4		Pyrococcus	CII
Q2QWU2		Oriza	CII	Q96Y42		Sulfurisphaera	CII
Q8LHS7		Oriza	CII	Q8H0W2	HDA9	Arabidopsis	CI
Q0D4V4		Oriza	CII	O22446	HDA19	Arabidopsis	CI
B6THU7		MAIZE	CII	Q9FML2	HDA6	Arabidopsis	CI
Q8LK09		MAIZE	CII	Q9FH09	HDA7	Arabidopsis	CI
Q99N13	HDAC9	MOUSE	CII	Q9LXN8	HDA17	Arabidopsis	CI
Q8C2B3	HDAC7	MOUSE	CII	Q9M1N8	HDA10	Arabidopsis	CI
09Z2V5	HDAC6	MOUSE	CII	IILKU7		SOYBN	CI
O6P3E7	HDA10	MOUSE	CII	I1LWR2		SOYBN	CI
Q6NZM9	HDAC4	MOUSE	CII	I1JB12		SOYBN	CI
09Z2V6	HDAC5	MOUSE	CII	I1LFN1		SOYBN	CI
P56524	HDAC4	HUMAN	CII	K7KKZ9		SOYBN	CI
08WUI4	HDAC7	HUMAN	CII	I1MTD8		SOYBN	CI
O9UKV0	HDAC9	HUMAN	CII	K7KL00		SOYBN	CI
O9UBN7	HDAC6	HUMAN	CII	K7K001		SOYBN	CI
096958	HDA10	HUMAN	CII	I1K037		SOYBN	CI
O9UOL6	HDAC5	HUMAN	CII	A0A0R0JU82		SOYBN	CI
086NK9	086NK9	Drosonhila	CII	A0A0R0H2W2		SOYBN	CI
059E49	059E49	Drosophila	CII	06YV04	HDAC2	Orvza	CI
020296	HDA6	Caenorhabditis	CII	07Y0Y8	HDAC1	Oryza	CI
017323	HDA4	Caenorhabditis	CII	06ZB59		Oryza	CI
09U266		Caenorhabditis	CII	O5NAP6		Orvza	CI
081419		Caenorhabditis	CII	Q94D35		Oryza Oryza	CI
08F7M9	08F7M9	Lentosnira	CII	07Y0Y6		Oryza	CI
067877	201 / 101 /	Aquifex	CII	Q94F82		MAIZE	CI
09K0J2		Neisseria	CII	Q8W508		MAIZE	CI
089RV9		Bradyrhizohium	CII	09ZTP8		MAIZE	CI
A0A1A5IIL1		Rhizobium	CII	08VH37	HDAC8	MOUSE	CI
092R18		Rhizobium	CII	088895	HDAC3	MOUSE	CI
A9CIY5		Agrohacterium	CII	P70288	HDAC2	MOUSE	CI
08Y0X4		Ralstonia	CII	009106	HDAC1	MOUSE	CI
Q946M1		Caulobacter		098Y41	HDAC8	HUMAN	CI
M4TR35		Acetoin	CII	015379	HDAC3	HUMAN	CI
O8PCD9		Xanthomonas		092769	HDAC2	HUMAN	CI
087789		Nostoc		013547	HDAC1	HUMAN	CI
027262	V119/	Methanothermobacter		Q13347	moner	Drosonhila	CI
09HXM1	11174	Pseudomonas		094517	HDAC1	Drosophila	CI
BOR206	НЧаТ	Halobactarium		G5ECH0	IDACI	Caenorhabditis	CI
098700	Tudi	Mesorhizohium		017695	HDA1	Caenorhabditis	
098HE4		Mesorhizohium		009440		Caenorhabditis	CI
001640		Davidomonas		P32561	PDD2	VEACT	CI
V210U0		r seudomonas	UI	1 32301	NED3	I EAS I	U

ID	Name	Organism	Class	ID	Name	Organism	Class
Q12214	HOS1	YEAST	CI	A3GH68		Scheffersomyces	NC
P53096	HOS2	YEAST	CI	Q6FWB7		Candida	NC
O59702	CLR6	SCHPO	CI	Q4D762		Trypanosoma	NC
Q9WX04		Streptomyces	CI	Q114J1		Trichodesmium	NC
Q841U6		Thermus	CI	Q7MMB6		Vibrio	NC
Q8EP92		Oceanobacillus	CI	Q2SC27		Hahella	NC
Q9K7X1		Bacillus	CI	Q4QI60		Leishmania	NC
P39067		Bacillus	CI	Q6CGA7		Yarrowia	NC
A0A0E3GUS6		Sulfolobus	CI	A6QAF4		Sulfurovum	NC
O67135		Aquifex	CI	B4U8T2		Hydrogenobaculum	NC
A3DNS7		Staphylothermus	NC	Q6AJC0		Desulfotalea	NC
Q8ZU23		Pyrobaculum	NC	B2JV93		Paraburkholderia	NC
A1W7T1		Acidovorax	NC	Q4FNF7		Pelagibacter	NC
Q48935		Mycoplana	NC	Q4MYQ3		Theileria	NC
A9A062		Desulfococcus	NC	A0DIS2		Paramecium	NC
Q3AFN8		Carboxydothermus	NC	Q22CW6		Tetrahymena	NC
A4X4X7		Salinispora	NC	W7X9B2		Tetrahymena	NC
Q2S035		Salinibacter	NC	K3ZRV5		Setaria	NC
Q5SL18		Thermus	NC	A7SSG8		Nematostella	NC
Q5K8L3		Cryptococcus	NC	Q31EP6		Hydrogenovibrio	NC
A7SUP8		Nematostella	NC	Q0ARF0		Maricaulis	NC
Q38C74		Trypanosoma	NC	Q10X35		Trichodesmium	NC
Q6C3Y5		Yarrowia	NC	Q54X15		Dictyostelium	NC
Q4QAJ4		Leishmania	NC	A2BL29		Hyperthermus	NC

Class I (CI) Class II (CII) No class (NC)

Table S2. Sequence proteins of histone deacetylases class I and II used in phylogenetic analysis.

				HLW15				
Chain	A	В	C	D	A,B	0,0	A, D	B, D
Model1	196, 197, 198, 199, 205, 206, 214, 215, 257, 258, 261, 263, 281, 301, 302, 303		176, 179, 180, 181, 183, 186, 187, 188, 446, 447, 450	202, 328, 351, 352, 353, 357, 358, 359, 361, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 495, 498, 501	•	~	604	-
Model2	215, 281, 282, 322, 325, 326, 355, 356		168, 170, 174, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 186, 187, 188, 189, 407, 408, 409, 410, 445, 446, 447, 448, 451, 603	148, 150, 194, 265, 266, 422, 426, 455, 459, 460, 461, 462, 463, 604	*:	-	•	5
Model3	. •	146, 147, 148, 199, 204, 205, 206, 209, 214, 261, 262, 263, 264, 305, 306, 391, 492, 495	202, 224, 225, 243, 248	149, 156, 179, 182, 183, 186, 187, 188, 189, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 603		•		20
Model4	148, 149, 172, 179, 193, 194, 196, 197, 198, 199, 257, 258, 261, 262, 263, 264, 265, 370, 371, 406, 407, 414, 415	183, 186, 187, 188, 448, 450, 451, 604	2	12	169, 170, 174, 176, 337, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 444, 445, 446, 447	25	12	1
Model5	209, 210, 280, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 323, 328, 327, 328, 329, 356, 357, 375, 382, 383, 407, 418, 419, 422, 423, 426, 427, 430, 451, 454, 455, 458, 463, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 479, 604		445, 447	14. 14	10	-8		•
Model®	209, 210, 211, 215, 280, 281, 282, 297, 300, 301, 303, 304, 305, 322, 323, 324, 326, 327, 329, 355, 356, 357, 359, 604		170, 171, 172, 174, 176, 180, 407, 408, 410, 444, 445, 446, 447	225	•	-	1.0	2
Model7	209, 210, 211, 212, 213, 215, 280, 281, 297, 300, 301, 303, 304, 305, 306, 326, 327, 329, 356, 390, 391, 392, 393, 430, 492, 495, 496, 499, 604	3	174, 176, 337, 406, 407, 408, 409, 410, 413, 414, 415, 445, 446, 447			-		70
ModelB		485		187, 188, 194, 382, 391, 418, 419, 422, 423, 426, 455, 458, 459, 462, 463, 474, 477, 480, 481, 484, 492, 495, 496, 497, 498, 507	2	2		488, 491, 499, 501, 502, 503, 505, 506
Model9	206, 209, 210, 212, 213, 214, 215, 280, 281, 297, 300, 301, 302, 303, 306, 327, 329, 604	<i></i>	154, 156, 176, 179, 180, 182, 183, 184, 186, 187, 191, 192, 254, 257, 258, 262, 263, 265, 429, 430, 432, 433, 434, 446	193, 194, 195, 196, 197, 200, 202	10 10	198, 199, 201		
Model10		300, 305, 306, 328, 329, 356, 361, 392, 494, 496, 498, 499, 603.	÷	326	2	2		357, 359, 491, 492, 493 495

**Table S3.** HDA15 tetramer amino acid residues forming the interface with XAL1 as predicted by the ten best-scoring HDOCK models.

	¥AI 1	
Chain	A	в
Model1	37, 40, 42, 60, 69	3, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 50, 51, 99, 102, 103, 106, 109, 110, 113, 164, 167, 168, 171, 174, 175, 178, 179, 182 186, 198, 199, 200, 203, 204, 205
Model2	173, 175, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185,186,187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 200, 204	18, 19, 21, 22, 25, 26, 49, 51, 53, 54, 55
Model3	10, 12, 102, 104, 106,108,109, 112, 113, 116, 120, 142, 153, 157, 164, 174, 175, 178, 179, 182, 186, 194, 197, 198, 199, 200, 201, 203, 204, 205, 206.	40, 42, 60, 61, 69
Model4	15, 18, 19, 21, 22, 23, 25, 26, 33, 49, 53, 54,	159, 162, 163, 165, 166, 167, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175 176, 177, 178, 179, 180, 181, 183, 196, 197, 198, 199, 200, 207 202, 203, 204
Model5	4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 153, 156, 157, 163, 164, 166, 167, 168, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 178, 181, 200, 202, 204, 205	25, 26, 29, 30, 33, 37, 40, 55, 56, 57, 59, 60, 61
Model6		98, 102, 106, 109, 110, 112, 113, 114, 116, 117, 118, 119, 120 121, 122, 123, 124, 125, 132, 135, 136, 139, 140, 142, 143, 14
Model7	42, 59, 60, 61, 62, 69, 72	10, 98, 101, 102, 105, 109, 110, 113, 114, 116, 117, 119, 120, 121, 122, 123, 139, 140, 142, 143, 145, 146, 147, 149, 150, 154 156
Model8	10, 11, 12, 13, 14, 17, 49, 50, 51, 77, 78, 79, 105, 108, 109, 112, 116, 141, 142, 145, 146, 148, 149, 150, 152, 153, 156, 157, 197, 198, 199, 200, 201, 205	40, 42, 60, 61, 62, 69
Model9	18, 51, 53, 54, 97	73, 75, 80, 81, 82, 83, 147, 150, 151, 154, 155, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 165, 166, 167, 169, 170, 173, 175, 176, 177 179, 180, 183, 184 187, 188, 190, 191, 192, 193, 196
Model10	178, 182, 185, 186, 190, 194, 195, 197, 198, 200, 201, 203, 204, 205	1, 2, 3, 15, 18, 19, 20, 22, 23

**Table S4.** XAL1 homodimer amino acid residues forming an interface with HDA15, as predicted by the ten best-scoring HDOCK models.