

176

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS



LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA
PROTEÍNA RICA EN LEUCINA
CODIFICADA POR EL GEN *FLORI*

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO
B I O L O G O

P R E S E N T A:
MARIO IZAGUIRRE SIERRA

DIRECTORA:

DRA. FRANCISCA ACEVEDO GASMAN

CO - DIRECTORA:

DRA. MARIA ELENA ALVAREZ BUYLLA ROCES



2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunico a usted que hemos revisado el trabajo escrito: **"Localización subcelular de la proteína rica en leucina codificada por el gen FLOR1"**

realizado por **Mario Izaguirre Sierra**

con número de cuenta **9755790-0**, quien cubrió los créditos de la carrera de **Biología**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de tesis
Propietario

Dra. Francisca Acevedo Gasman

Propietario

Dra. Maria Elena Álvarez-Buylla Roces

Propietario

Dr. Luis Felipe Jiménez García

Suplente

Dra. Maria del Rocio Cruz Ortega

Suplente

Mta. Rosalinda Tapia López

Consejo Departamental de **Biología**

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.

Dra. Patricia Ramos Morales.



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Contenido

	Pag.
Resumen	1
Introducción	2
<i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo experimental.	2
Anatomía de la flor de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	3
Figura 1. Planta de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	4
Factores de Transcripción.	4
Desarrollo vegetal	5
Modelo ABC y genes tipo MADS-box.	7
Figura 2. Modelo ABC en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	7
Figura 3. Organización de las proteínas tipo MADS.	8
Tabla 1. Efectos fenotípicos de los mutantes en los genes A, B, C.	9
Proteínas ricas en leucina (LRR)	9
Tabla 2. Subfamilias LRR.	11
Biología y Genética de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Plásmidos binarios, Ti)	12
Proteína verde fluorescente de la medusa <i>Aequorea victoria</i> .	14
GFP como gen reportero en plantas.	15
Antecedentes del Proyecto.	16
Objetivos	18
Hipótesis	18
Materiales y Métodos	19
Figura 4. Secuencia en bases y aminoácidos de FLOR1. Localización de los cuatro fragmentos de la proteína rica en leucina codificada por el gen <i>FLOR1</i>	20
Diseño y amplificación de cuatro fragmentos del gen que codifica para la proteína rica en leucina (LRR) FLOR1.	21
Diseño de las construcciones	21
Clonación de los fragmentos en el vector pGFP-MRCp y formación de las secuencias quiméricas (cassette).	23
Clonación de los fragmentos en el vector pGEMTeasy (PROMEGA) y extracción de DNA.	24
Clonación de los fragmentos en el vector pGFP-MRCp (Rodríguez C. et al, 1999).	24
Figura 5. Diseño de la construcción #1, #2, #4 unidas a la parte anterior del extremo N-terminal de la secuencia de GFP del vector pGFP-MRCp.	25
Figura 6. Diseño de la construcción #3 unida a la parte posterior C-terminal de la secuencia GFP del vector pGFP-MRCp.	25
Clonación de las secuencias quiméricas FLOR1::GFP en el vector binario Ti de <i>A. tumefaciens</i> pBIN-mGFP5-ER.	26
Figura 7. Diseño de las construcciones quiméricas #1::GFP, 6, #2::GFP 6, #4::GFP unidas a la parte N-terminal del vector pBIN-mGFP5-ER.	27
Transformación de las construcciones quiméricas FLOR1-GFP en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	28
Material vegetal.	28

Análisis de segregación	29
Figura 8. Procedimiento de Selección para obtener Plantas Transgénicas Estables.	31
Localización subcelular de la proteína rica en leucina codificada por el gen FLOR-1.	32
Procedimiento general para la formación de las construcciones FLOR1-GFP	33
Resultados	34
Diseño, clonación y transformación de las construcciones pBIN-FLOR1-GFP.	34
Tabla 3. Tamaño esperado para las amplificaciones de las construcciones realizadas.	34
Fig. 9. Esquema de las cuatro construcciones dentro del gen de FLOR1	35
Figura 10. Corrimiento de los fragmentos. Electroforesis en gel de agarosa 1%.	35
Análisis de segregación.	37
Análisis de la expresión del gen FLOR-1 <i>in vivo</i> en <i>A. thaliana</i> .	38
Localización subcelular de las proteínas quiméricas 35S::N-FLOR1::GFP, construcciones #1 y #4 en plantas transgénicas.	38
Expresión de las proteínas quiméricas 35S::N-FLOR1::GFP, construcciones #1 y #4 en <i>A.thaliana</i> .	38
Imágenes del Gineceo de Plántulas transformadas con 35S::N-FLOR1-GFP (construcción #1).	40
Figura 11. Colección de imágenes del gineceo de una plántula de estadio 10-12 de <i>A.thaliana</i> , transformada con la construcción #1.	40
Imágenes del Gineceo de Plántulas transformadas con 35S::N-FLOR1-GFP (construcción #4).	41
Figura 12. Las siguientes imágenes se tomaron de una planta adulta de <i>A.thaliana</i> , transformada con la construcción #4.	41
Imágenes de Cotiledón y la Raíz de Plántulas transformadas con 35S::N-FLOR1-GFP (construcciones #1 y #4).	43
Figura 13. Imágenes de Cotiledón y la Raíz.	43
Figura 14. Controles. A) Control de la construcción #1 en el panel derecho, y B) Control de la construcción #4 en el panel izquierdo.	44
Discusión	45
Conclusiones	50
Apéndice I. Vectores	51
Apéndice II. Protocolos y Medios	53
Referencias.	59

Resumen

En el laboratorio de Genética Molecular y Evolución del Instituto de Ecología se ha comprobado que dos proteínas que no pertenecen a la familia MADS interactúan *in vitro* con AGAMOUS. Estas proteínas son una proteína fosfatasa de 29kDa (VSP1), la cual ya había sido descrita con el nombre "vegetative storage protein" (VSP1) y otra rica en leucinas de 36kDa a la cual se le denominó FLOR1.

AGAMOUS es un gen homeótico que determina la formación de estambres y carpelos en *Arabidopsis thaliana*, y al igual que los genes de determinación floral, pertenece a la familia de factores de transcripción con dominio MADS. Estos factores de transcripción se encuentran distribuidos en todos los eucariontes. Las proteínas con dominio MADS tienen varios dominios, un dominio de unión al DNA que es el más conservado, o dominio MADS, seguido por un dominio I, y un dominio K, el cual es poco conservado a nivel de secuencia pero muy conservado en estructura secundaria y se le ha atribuido un rol en la interacción proteína-proteína. En conjunto estas tres regiones contribuyen a la dimerización de los factores MADS. Al final de la proteína se encuentra un dominio C-terminal muy variable que posiblemente funcione como transactivador. Las proteínas con dominios ricos en leucina se encuentran presentes en todos los eucariontes y se han localizado tanto en el espacio extracelular como en el citoplasma, por lo que la localización celular de FLOR1 es de gran importancia. FLOR1 es una proteína nueva y en el laboratorio se ha demostrado que la expresión de este gen es específica de los meristemos de inflorescencia y floral así como de estambres y carpelos. Estos resultados aunados a que a nivel celular la expresión de FLOR1 coincide espacio-temporalmente con los patrones de expresión de AGAMOUS sugieren que FLOR1 es una proteína que pudiera estar involucrada en un sistema de transducción de señales junto con AGAMOUS. De ser así y para que estas dos proteínas puedan interactuar *in vivo*, es imprescindible que coincidan tanto en tiempo como en espacio en algún momento durante el desarrollo floral. Mi trabajo de tesis consistió en desarrollar un enfoque molecular para probar esta hipótesis. Construimos proteínas quiméricas con diferentes dominios de FLOR1 y la proteína verde fluorescente (GFP). Estas construcciones se pusieron bajo el efecto del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, para obtener expresiones constitutivas de los genes quiméricos en plantas transgénicas de *A.thaliana*. El análisis de las plantas en homocigosis permitió localizar a los diferentes fragmentos de FLOR1 dentro de las células de estigma, estilo y ovario, así como en estambres, raíz y cotiledón. Debido a que la localización subcelular de FLOR1 fue distinta en los tejidos observados, la ubicación de FLOR1 no parece depender solamente de su secuencia sino que probablemente depende de señales particulares o exclusivas de cada tejido; por lo que FLOR1 podría estar llevando acabo alguna función bioquímica que propicie la formación de complejos proteicos entre AGAMOUS, VSP1, u otras proteínas cercanamente relacionadas con la familia MADS. Hasta ahora no se había reportado interactores de genes MADS que no pertenecieran a la misma familia.

Introducción

Arabidopsis thaliana como modelo experimental.

El progreso en los campos de la biología molecular, celular, genética y biología del desarrollo, se ha debido, en gran parte a la caracterización funcional de genes particulares en organismos modelo. *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* se han utilizado para diversos estudios por sus características genéticas y su fácil manipulación (Meyerowitz, 2001). Dentro de las plantas, los sistemas modelo incluyen al maíz (*Zea mays*), al tomate (*Lycopersicon esculentum*), al tabaco (*Nicotiana sp*), al arroz (*Oryza sativa*), a *Antirrhinum majus* (*A. Majus*) y *Arabidopsis thaliana* (*A.thaliana*).

A.thaliana es una planta silvestre nativa de Eurasia y del Norte de África, fue dispersada al Oeste del Hemisferio después de la colonización europea y descrita por primera vez por Johannes Thal en el siglo XVI. *A. thaliana* se encuentra en ambientes perturbados en sucesión primaria (Sharbel *et al.*, 2000; Alonso-Blanco, *et al.*, 2000). Es fácil encontrarla en campos agrícolas así como lugares perturbados por la actividad humana (Meyerowitz, 2001). *A. thaliana* es un miembro de la familia de las mostazas (Brassicaceae, que incluye a la col, y a las colecitas de bruselas). Se escogió como planta modelo hace más de seis décadas debido a que representa a una planta con flores (angiospermas) típica. En condiciones ideales cada planta llega a producir de 5,000 a 10,000 semillas en tan sólo seis semanas (Meyerowitz, 1989); aunado a ello es una planta pequeña (15-20 cm) y de fácil manejo que se autofertiliza con facilidad. Tiene un tiempo generacional muy corto, lo que permite obtener líneas mutantes con una pequeña cantidad de individuos iniciales, además de que se puede cultivar en cajas de petri dentro de cuartos (cámaras) de cultivo, lo que facilita el aislamiento de mutantes y la selección de individuos transgénicos (Meyerowitz, 1989, 2001; Meinke *et al.*, 1998).



A. thaliana es ideal para usarse como modelo en análisis genéticos, su genoma es de los más pequeños dentro del reino vegetal, el cual ya ha sido secuenciado (con la excepción de algunas regiones alrededor de los telómeros y centrómeros, así como las regiones en tandem del RNA ribosomal; The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Cuenta con cinco cromosomas, los cuales contienen 125 Mb de DNA y 25,498 proteínas identificadas pertenecientes a 11,000 familias y tiene 14% de secuencias móviles en su genoma (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). En contraste con otras plantas, Arabidopsis está formada por un contenido de secuencias no repetidas de DNA (50-55%) mientras que del 45-40% restante, únicamente 10-15% se encuentra repetido. Esto es importante ya que la mayoría de las clonas genómicas contienen secuencias únicas, además de que el promedio de secuencias repetidas en el genoma es de entre 120-125 kb. El genoma de sus mitocondrias y cloroplastos es muy pequeño y codifica aproximadamente para 60 proteínas (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

Existen varios ecotipos de *Arabidopsis* los cuales difieren en la respuesta a las condiciones ambientales así como en el tiempo de floración, lo que refleja sus adaptaciones locales (Bowman, 1994). De acuerdo a las respuestas de los ecotipos a la vernalización y durante su crecimiento en luz continua, se han dividido en cuatro clases: anuales de invierno (ecotipos de altas latitudes como Stockolmo y Soderland), anuales verano-tardías; anuales verano-intermedias y anuales verano-tempranas. Los ecotipos que son utilizados comúnmente en experimentos de genética y biología molecular son Landsberg *erecta*, Columbia y Wassilewskija, que son ecotipos de floración temprana (Bowman, 1994).

Anatomía de la flor de *Arabidopsis thaliana*.

Las flores de *A.thaliana* tienen la estructura típica de cualquier flor de una angiosperma, están conformadas por cuatro órganos o verticilos florales, los cuales están organizados concéntricamente en: 4 sépalos, 4 pétalos, 6 estambres y dos carpelos fusionados (Bowman, 1994). El perianto está compuesto por el cáliz de cuatro sépalos y una corola de cuatro pétalos los cuales están alternados con los sépalos. El androceo consiste en seis estambres; cuatro largos mediales en la parte interna, dos laterales cortos en la parte más externa y las

anteras son biloculadas con dehiscencia longitudinal. El gineceo (carpelo) tiene tres regiones principales. En la punta se encuentra el estigma cubierto por células papilares que permiten que los granos de polen germinen, seguido por el estilo e inmediatamente después el ovario, conformado por dos carpelos fusionados (sincárpico), que crean un solo ovario unido a un pequeño estigma con una papila estigmática (Bowman, 1994; Bowman *et al.*, 1999) (Figura 1).

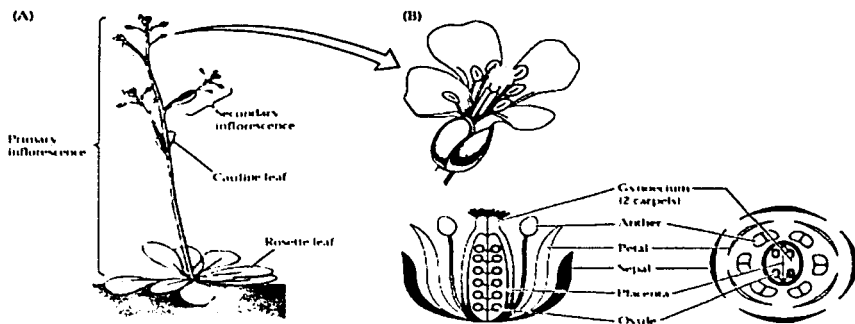


Figura 1. Estructura de *Arabidopsis thaliana*. (A) Diagrama de la planta de *Arabidopsis thaliana*. (B) Representación en corte longitudinal y transversal de la estructura de la flor de *A.thaliana* (Buchanan, *et al* 2000).

Factores de Transcripción.

Durante el desarrollo vegetal, un embrión llega a expresar alrededor de 20,000 genes (Howell, 1998). El que el embrión se desarrolle normalmente depende de la expresión diferencial y correcta de los genes en las distintas etapas de su desarrollo. Los factores de transcripción modulan la expresión diferencial del genoma de la planta durante su desarrollo (Calkhoven, 1996; Reichman *et al.*, 1997; Theissen, 2000a). La concentración y actividad de estos factores de transcripción varía dependiendo del tipo celular y momento del desarrollo en el que se encuentren. Se ha propuesto que los cambios en estas proteínas

así como en sus reguladores juegan un papel muy importante en la evolución de los patrones estructurales en todos los eucariontes (plantas y animales) (Doebley *et al*, 1998).

Los organismos multicelulares como las plantas necesitan expresar miles de genes que codifican para proteínas específicas a distintos tiempos en distintos lugares y en distintas cantidades (Schwechheimer *et al*, 1998b). El mecanismo de control más común en los eucariontes parece ser la regulación a nivel transcripcional, y esta se encuentra mediada por la acción de los factores de transcripción (Doebley *et al*, 1998; Schwechheimer, 1998b).

Los factores de transcripción son generalmente activadores o represores de la transcripción y normalmente están regulados por cientos de contingencias a diferentes niveles. Las modificaciones son principalmente a nivel post-transcripcionales y se basan en la correcta integración de las señales externas e internas que produzcan una tasa de transcripción. La regulación adecuada puede depender (Gerhart *et al*, 1997) del número de sitios de regulación, competencia por el sitio de unión al DNA, la especificidad con sus inhibidores, presencia /ausencia de un co-activador, fosforilaciones, ligandos y dimerización con miembros de la misma o distinta familia, (Calkhoven *et al*, 1996; Gamboa, *et al* 2001). Con base en sus dominios de unión al DNA, se han clasificado en varias clases: estas incluyen a las proteínas de tipo cierres de leucina "leucine zippers" (bZIP), las proteínas homeobox, proteínas tipo MYB (MYB-like), las proteínas de tipo MADS (MADS-box), y las proteínas de tipo dedos de zinc ("zinc-fingers").

Desarrollo vegetal.

El desarrollo vegetal en las angiospermas puede ser dividido en dos fases: una vegetativa y una reproductiva. Durante la fase vegetativa el tallo principal (inflorescencia primaria) crece de manera indeterminada, produce hojas (caulinas) y después tallos laterales (inflorescencias secundarias) que surgen de la axila de las hojas del tallo primario, donde finalmente se forman los primordios florales (Bowman, 1994) (figura 1A). La transición a la fase reproductiva está acompañada de cambios en la posición y distancia de los órganos laterales (filotaxia) y comienza cuando la planta es capaz de responder a señales y

estímulos externos como la intensidad de luz (fotoperíodo), disponibilidad de nutrientes, cambios hormonales (giberilinas), temperatura etc. (Bowman, 1994; Buchanan *et al*, 2000). Una vez que la planta se encuentra en la fase reproductiva, ésta comienza a producir flores (Bowman, 1994; Howell, 1998).

El desarrollo constante en la fase vegetativa es posible por la presencia de los meristemos. Los meristemos se encuentran en el ápice de los tallos (apicales y radiculares) y están compuestos por poblaciones de células pluripotenciales (no diferenciadas) las cuales están en constante división. El desarrollo vegetativo en las plantas superiores se caracteriza por la reiterativa formación de órganos laterales a partir del meristemo apical (SAM de "shoot apical meristem") (Bowman *et al*, 2000). La formación de la flor es una función mantenida y coordinada por el meristemo floral. Durante la floración el meristemo apical cambia de meristemo vegetativo a meristemo de inflorescencia y este a su vez produce meristemos florales en ramas laterales en las axilas de los primordios foliares (Bowman *et al*, 1999; Howell, 1998; Buchanan *et al*, 2000). El meristemo floral produce a los primordios de los órganos florales que se forman de afuera hacia adentro, comenzando por la aparición del primordio de sépalo alrededor del domo del meristemo, después nace el primordio de pétalo, simultáneamente nacen los primordios de los estambres y finalmente surge el primordio mas interno, el primordio de carpelo (Bowman *et al*, 1999). El desarrollo floral de *Arabidopsis* está dividido en varios estadios de acuerdo a los cambios en la morfología del meristemo floral (Bowman, 1994, Bowman *et al*, 2000).

Para poder comprender como se lleva acabo la determinación floral, como se controla la identidad de los órganos en la flor y cuales son los genes involucrados en el desarrollo de estos órganos, se han analizado mutantes (homeóticos) de *A.thaliana* y *A.majus*. En estos mutantes los órganos están bien desarrollados pero se encontraban en un lugar distinto. La existencia de estos mutantes sugirió que el desarrollo floral estaba dirigido por genes homeóticos. Tomando como base estos estudios genéticos, en 1991 Meyerowitz sugiere que el desarrollo normal de los distintos órganos florales (identidad de órgano) está mediado por la interacción de tres clases de genes homeóticos (A, B, C) los cuales predicen, la morfogénesis floral de todas las angiospermas (Meyerowitz *et al*, 1991).

Modelo ABC y genes tipo MADS-box.

El modelo ABC explica como la interacción entre los genes de las funciones A, B, C controla la identidad de los órganos florales (las funciones homeóticas) (Meyerowitz *et al*, 1991). La expresión de la función A únicamente específica para la formación de sépalos. La combinación de la expresión de AB es específica para el desarrollo de pétalos y la combinación de BC es específica para la formación de estambres. Solo la función C determina el desarrollo de carpelos (Figura 2).

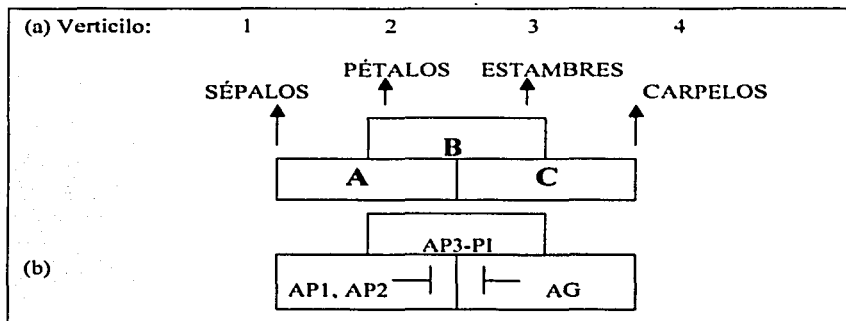


Figura 2. Modelo ABC en *Arabidopsis thaliana*.

(a) La identidad de órgano esta especificada por las funciones A, B y C. La función A determina la formación de sépalos, la combinación de A y B específica para pétalos, las funciones de B y C juntas especifican para estambres y la función C para carpelos. (b) genes involucrados en la determinación floral. Las funciones A y C son antagonicas.

En *A. thaliana* se conocen los genes que codifican para las tres actividades homeóticas. Los genes que contribuyen a la función A son: Apetala1 (AP1) y Apetala2 (AP2), para la función B, Apetala3 (AP3) y Pistillata (PI) y para la función C, Agamous (AG), todos estos genes con excepción de AP2 pertenecen a la familia de factores de transcripción con dominio MADS.

La familia MADS-box en *Arabidopsis* esta compuesta por más de 100 miembros (Theissen *et al*, 2000), muchos de ellos están involucrados en la iniciación floral y el desarrollo radicular, además de que se expresan en tricomas, polen, endospermo, células guarda, y

otras estructuras (Rounsley *et al.*, 1995; Álvarez-Buylla *et al.*, 2000). En plantas esta familia comparte varios dominios muy conservados como la caja K además del dominio MADS.

Estos genes no están confinados únicamente a las plantas sino que también están presentes tanto en vertebrados como en invertebrados (Shore, 1995; Rounsley, 1995). El término MADS se deriva de la primer letra de los cuatro dominios protéicos descritos en la literatura MCM1 (*Saccharomyces cerevisiae*), AGAMOUS (*Arabidopsis thaliana*), DEFICIENS (*Antirrhinum majus*) y SRF (de *Homo sapiens*) (Shore *et al.*, 1995).

Todas las proteínas de tipo MADS tienen cuatro dominios funcionales (cajas): el dominio N-terminal MADS-box se une a motivos consenso de DNA denominados CarG-boxes, presentes en la región promotora de los genes que regulan estas proteínas, la región I sin función clara, la caja K que está involucrada en la dimerización, heterodimerización y/o formación de tetrámeros de algunos factores MADS y otras proteínas (Reichmann *et al.*, 1997; Honma *et al.*, 2001). Los dominios M, I y K, contribuyen a la dimerización de los factores MADS. Al final de la proteína se encuentra el dominio C-terminal el cual parece que estabiliza las interacciones ternarias y cuaternarias entre proteínas de la misma o distinta familia (Shore *et al.*, 1995; Howell, 1998; Theissen *et al.*, 2000; 2001) (Figura 3). El que las proteínas MADS estén divididas modularmente no implica un funcionamiento independiente (Shore *et al.*, 1995).

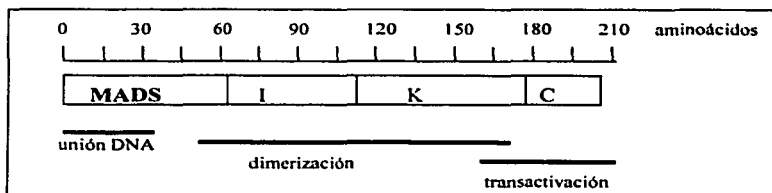


Figura 3.-Organización de las proteínas tipo MADS.

El dominio MADS de 56 aa se localiza en el extremo N-terminal de la proteína y codifica para un factor de unión al DNA y está involucrado en la dimerización. Unido al dominio I de 30aa que está muy poco conservado. El dominio K (70aa) está involucrado en la interacción proteína-proteína y posiblemente en la dimerización y finalmente el extremo C-terminal.

Como se mencionó anteriormente los mutantes homeóticos de *A. thaliana* se dividen en tres clases A, B, C y cada una de estas afecta la identidad del órgano en dos verticilos adyacentes. Los mutantes de la clase A: *apetala1(ap1)* y *apetala2(ap2)* afectan el primero y segundo verticilio, de manera que los sépalos se convierten en carpelos y los pétalos en estambres. Los mutantes de la clase B: *apetala3(ap3)* y *pistillata(pi)*, afectan el segundo y tercer verticilio, transformando los pétalos en estambres, y a los estambres en carpelos. El mutante de la clase C: *agamous(ag)* afecta el tercer y cuarto verticilio, causando un desarrollo de pétalos en lugar de estambres y en lugar del gineceo se forma una segunda flor con sépalos-pétalos-pétalos de manera reiterativa (Meyerowitz *et al.* 1991). Debido a que los mutantes de la clase A producen estructuras parecidas a estructuras de órgano verticilares tipo C y viceversa, se ha propuesto una mutua represión entre los genes de la clase A y C. Los genes de la clase A excluyen a los de la clase C del verticilo uno (sépalos) y dos (pétalos), mientras que los genes de la clase C excluyen a los de la clase A de los verticilios tres (estambres) y cuatro (carpelos), (figura.1; tabla.1) (Howell. 1998; Theissen, 2001).

Tabla 1.- Efectos fenotípicos de los mutantes en los genes A, B, C

Mutación	Verticilo 1	Verticilo 2	Verticilo 3	Verticilo 4
Silvestre	Sépalos	Pétalos	Estambres	Carpelos
Función A	Carpelos	Estambres	Estambres	Carpelos
Función B	Sépalos	Sépalos	Carpelos	Carpelos
Función C	Sépalos	Pétalos	Pétalos	Flor Nueva

Proteínas ricas en leucina (LRR)

La superfamilia de las proteínas ricas en leucina (LRR) está conformada por un gran número de proteínas con localizaciones y funciones diferentes en una variedad de organismos (Buchanan *et al.* 2000; Kajava, 1998). Dentro de los miembros de esta superfamilia se encuentran proteínas requeridas para el ensamblaje de ribonucleoproteínas (snRNP), proteínas de adhesión celular (glicanos, fibromodulina, lumincano, etc.), proto-oncogenes (*trk*), la adenilato ciclasas en levaduras, marcadores de orientación celular como la proteína *Toll* en *Drosophila*. En plantas se han descrito más de 100 cinasas y genes tipo

R involucrados en la resistencia a patógenos así como varias familias de proteínas (receptores) con dominios LRR extracelulares e intracelulares involucradas en vías de transducción de señales (Kobe y Deisenhofer, 1994, 1995; Xiaorong, 1998; Kajava, 1998).

A diferencia del desarrollo animal, el desarrollo vegetal carece de migración celular, por lo que el establecimiento de patrones a lo largo de eje vegetal requiere de elaborados mecanismos de regulación transcripcional, y de transducción de señales así como de grandes complejos de comunicación célula-célula que permitan una apropiada diferenciación y desarrollo (Meyerowitz, 1999b). Los motivos ricos en leucina se han descrito como mediadores en las interacciones proteína-proteína (Suzuki, *et al.* 1990; Calkhoven *et al.* 1996; Schwechheimer *et al.* 1998a, 1998b) interacciones receptor-ligando en muchos organismos de distintos reinos (Kajava, 1998).

En las plantas se han descrito muchas proteínas ricas en leucina (LRR) que regulan varios procesos del desarrollo como: la percepción de fitohormonas (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1), respuestas de defensa (genes tipo *R*), especificación de la forma de los órganos (ERECTA), destino celular del meristemo (CLAVATA1), entre otras (Reichmann, 1997; Torii, 2000).

Los motivos ricos en leucina dentro de las proteínas LRR se encuentran uno junto del otro, es decir, en tandem. Estas proteínas contienen otros aminoácidos hidrofóbicos a diferentes intervalos, estos aminoácidos se caracterizan por que participan en las interacciones hidrofóbicas de las estructuras de proteínas (Alberts, 1994; Turner, 1997). La cantidad de motivos LRR (-LxxLxLxx-) varía entre uno y 30. La longitud promedio de la secuencia LRR es de 24 residuos, pero hay proteínas con repeticiones entre 20 y 29 residuos (Kobe, 1994). La mayoría de las proteínas ricas en leucina (LRR), también poseen un sitio de unión a nucleótidos que contiene varios motivos conservados y su función no ha sido documentada del todo (Schwechheimer *et al.* 1998; Buchanan *et al.* 2000).

Con base en estudios de cristalografía del inhibidor de la ribonucleasa (una proteína LRR), se estableció que 11 de los 24 residuos de la secuencia consenso de las LRR se encuentran en todas las proteínas descritas hasta ahora, por ello se considera a esta como característica

principal de la superfamilia; mientras que los diferentes residuos en la región hipervariable sirvieron para clasificar a las LRR en seis subfamilias (tabla.2) sugiriendo como punto de divergencia entre las diferentes subfamilias a la región hipervariable (Kobe y Deisenhofer, 1994; Kajava 1998).

Tabla 2. Subfamilias LRR según Kajava (1994).

Subfamilia LRR	Residuos	Origen	Localización
Típica	24	Animales y Hongos	Extracelular
RI-like ("ribonuclease inhibitor")	28-29	Animales	Intracelular
CC ("cysteinecontaining")	26	Animales, Hongos y Plantas	Intracelular
PS ("plant Specific")	24	Plantas y Euca. primitivos	Extracelular
SD22-like	22	Animales y Hongos	Intracelular
Bacterial	20	Bacterias Gram. -	Extracelular

Aunque las subfamilias de las proteínas ricas en leucina están compuestas por un gran número de proteínas con diversas funciones, todas las proteínas parecen estar involucradas en interacciones proteína-proteína, y al menos la mitad de ellas forman parte de las complejas vías de señalización extra e intracelulares. Esta clasificación propone que la especificidad entre las interacciones proteína-proteína y la función de estas proteínas; se debe a la composición y longitud de los residuos en donde posiblemente la estructura tridimensional de estas proteínas juegue un papel determinante (Kobe y Deisenhofer, 1994; Kajava 1998; Schwechheimer *et al.* 1998).

Las proteínas que contienen motivos ricos en leucina representan a una familia muy grande y diversa, el amplio rango de funciones que caracterizan a estas proteínas sugiere que las LRR son motivos de unión que juegan un papel muy importante en las interacciones con proteínas de la misma familia y otras proteínas (Kobe y Deisenhofer, 1994; Kajava 1998; Schwechheimer *et al.* 1998; Gamboa *et al.* 2001).

Biología y Genética de *Agrobacterium tumefaciens* (Plásmidos binarios, Ti)

La habilidad de introducir DNA dentro de un organismo, es un concepto muy común en la biología molecular básica y aplicada. La transformación es un mecanismo que se utiliza con cotidianidad en organismos unicelulares como *E.coli* y *S. cerevisiae*, pero en eucariontes multicelulares y específicamente en plantas esta metodología es mas complicada (Old *et al*, 1994).

Desde 1970 se ha podido transformar células vegetales utilizando a la bacteria *A. tumefaciens*, para poder llevara acabo la selección de células transformantes. se han desarrollado plásmidos con genes de resistencia a antibióticos y/o herbicidas con los cuales se puedan seleccionar las líneas de expresión. el DNA de interés es clonado junto con un marcador genético que normalmente es *nptII* que codifica para resistencia a kanamicina o con marcadores celulares como GUS ó GFP. Existen dos métodos principales para transformar células vegetales, uno se lleva acabo en cultivos de tejidos y el otro utiliza al órgano o la planta *in situ*. Se han descrito varias técnicas de transformación entre las que destacan: la microinyección directa, la biobalística (que utiliza una pistola cargada con minúsculas balas de tungsteno y/o oro cubiertas por el DNA que se quiere integrar en el genoma de la planta) y la más común, que es la transformación mediada por *Agrobacterium* (infiltración, infiltración-vació, por rocío) (Potrykus *et al*, 1995 y Buchanan *et al*, 2000).

La relación *Agrobacterium*-planta involucra principalmente a dos especies de bacterias de tierra Gram-negativas: *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*. Básicamente estas bacterias han desarrollado una estrategia con la cual transfieren un fragmento plasmídico al genoma de la planta (Old *et al*, 1994). Naturalmente para que esto se lleve acabo se requiere que la planta tenga una lesión por donde la bacteria llegue a infectarla. El síntoma producido por la infección es la formación de un tumor en el área de la lesión (que puede ser en cualquier parte de la planta), producido por un acelerado crecimiento celular debido a la expresión de los genes T-DNA, que codifican para enzimas que catalizan la producción de auxinas y citocininas. Estos compuestos son fitoreguladores esenciales para el desarrollo y crecimiento de la planta que en exceso producen la formación de estructuras tumorales (callos) (Potrykus *et al*, 1995; Buchanan *et al*, 2000).

La virulencia de esta bacteria esta dada por la presencia de una secuencia conocida como T-DNA (transferred-DNA) que se encuentra dentro de un plásmido de alrededor de 200-250kpb conocido como Ti-plásmido ("tumor inducing"), estos plásmidos están conformados por varias secuencias, entre ellas la región *vir*, la *ocs* y una región conocida como T-DNA, que es la secuencia que se transmite e inserta en el genoma del hospedero. La secuencia de T-DNA contiene unos extremos repetidos de adhesión génica, que forman un borde repetido de 24pb que funcionan como señales de reconocimiento del sistema de transferencia para la incorporación de la secuencia bacteriana al genoma de la planta. Los plásmidos-Ti son agrupados de acuerdo a su habilidad de producir aminoácidos derivados (opines) los cuales le sirven a la bacteria como fuente de carbono y nitrógeno. Estos compuestos son fáciles de detectar en el tejido y han servido para marcar a las cepas basándose en el tipo de opine que sintetizan (nopalina, octopina, leucinopina, succinamopina, etc.) (Potrykus *et al*, 1995).

El primer paso en la transferencia de la secuencia T-DNA dentro de la planta, esta mediado por la producción de distintas sustancias producidas por las células de la planta en el lugar de la herida. Estas sustancias son compuestos fenólicos derivados del siringol, estos inducen la formación de compuestos que actúan como agentes quimotácticos para las bacterias, además de que activan genes de la región *vir* del plásmido-Ti. Se cree que los genes de esta región se activan por medio de autofosforilaciones, además de que funciona a manera de operón cortando y creando una copia de hebra sencilla de la secuencia de T-DNA, la cual es protegida de nucleasas de la planta por proteínas bacterianas (Old *et al*, 1994; Potrykus *et al*, 1995). Esta secuencia junto con las proteínas de protección se conoce como complejo-T, este complejo se transloca al citoplasma de la planta por medio de un pili de transformación producido por la misma bacteria. Finalmente se introduce el complejo-T al núcleo de la planta el cual se inserta con los bordes de adhesión al genoma del hospedero. Una vez transformada la planta produce opinas mediante la activación de genes dentro de la región del plásmido-Ti. Al mismo tiempo estas opinas inducen la expresión y propagación del plásmido-Ti hacia la población de *Agrobacterium* en la herida.

Proteína verde fluorescente de la medusa *Aequorea victoria*.

La medusa marina *Aequorea victoria* al igual que varios miembros del phylum Cnidaria emiten luz verde a partir de la energía proveniente de una fotoproteína (Leffell *et al*, 1997; Tsien, 1998). La proteína verde fluorescente (GFP) de la medusa marina *Aequorea victoria* fue descubierta por Shimura en 1962, y su gen fue clonado en 1992 por Prasher. Se han descrito proteínas similares en otros celenterados (*Obellia*, *Renilla* y *Phialidium*), pero sus características bioquímicas han sido poco exploradas (Haseloff *et al*, 1998, 1999b; Leffell *et al*, 1997; Tsien, 1998).

La GFP es una proteína estable de 238 aminoácidos y 27-30kDa, su pequeño tamaño la hace fácilmente difundible dentro del núcleo. Su estado nativo es monomérico, pero en altas concentraciones se ha encontrado como dímero. Una característica muy importante es que esta proteína no necesita ningún tipo de sustrato y/o cofactor, su tamaño es pequeño lo que la hace apta para fusiones con otras proteínas, ya que su fluorescencia se mantiene uniendo proteínas en cualquiera de los extremos de ésta N- y C-. La GFP es una proteína muy estable ya que resiste un amplio rango de pH (5.5-12) así como de proteasas. La longitud de onda de excitación es de 360-480nm (λ verde-azul) y produce un pico de emisión de 509nm (luz verde). Las propiedades de fluorescencia se adquieren por modificaciones post-traduccionales que modifican al cromóforo y a la estructura terciaria de la proteína. La GFP esta conformada por 11 láminas- β antiparalelas que protegen al cromóforo de la presencia de agua u oxígeno en el interior de la proteína, así como por 2 α -hélices en los extremos, una de ellas cruza a la estructura de barril y justo en la mitad de ella se encuentra unido covalentemente el cromóforo (Leffell *et al*, 1997; Tsien, 1998).

La bioluminiscencia de *Aequorea victoria* surge de unas masas de tejido amarillento las cuales están compuestas por alrededor de 6000-7000 células fotogénicas. El citoplasma de estas células está densamente empaquetado con finos gránulos de 0.2 μ de diámetro (luminisomas) que contienen los componentes necesarios para la bioluminiscencia (Haseloff *et al*, 1998). Los componentes requeridos para la misma incluyen una fotoproteína activada por Ca^{2+} (aeuorina) la cual emite luz azul-verde, y la proteína GFP, que recibe la energía de la aeuorina y re-emite ésta como luz verde (Haseloff, 1999a;

Leffel *et al.*, 1997). La aequorina es un complejo conformado por una apoproteína, oxígeno molecular y una enzima llamada coelenterazina (compuesto de imidazol). Cuando la aequorina es activada por Ca^{2+} , este cataliza la oxidación de la coelenterazina en coelenteramida (forma activa), ésta regresa a su forma inactiva emitiendo luz a 470nm transmitiendo esta energía a la GFP, resultando la fluorescencia de luz verde.

GFP como gen reportero en plantas.

Existen diferentes mutantes así como variantes naturales de la GFP (Haseloff *et al.*, 1998; 1999a; Tsien, 1998). La fluorescencia producida por la GFP de *Aequorea victoria* (wtGFP) se visualiza bien en organismos inferiores pero no en plantas y mamíferos debido a su bajo nivel de fluorescencia, a la lenta formación del cromóforo y a problemas de isomerización compleja y de expresión deficiente. Esto ha permitido que se desarrollen un amplio rango de variantes tanto para animales como para plantas. A partir del gen silvestre de la GFP se han producido variantes las cuales se han clasificado en siete clases con base en la composición y longitud de onda de excitación de su cromóforo. A estas variantes se les han adaptado codones específicos para cada linaje, como las sGFP y EGFP para animales y las mGFP y pGFP para plantas. Sin embargo se encontró que específicamente en plantas el cDNA silvestre de la GFP no se expresaba de manera apropiada en *Arabidopsis* (Haseloff *et al.*, 1998; 1999b), al cual para mejorar su expresión, se le hicieron varias modificaciones a nivel de secuencia. Una de las mutantes más frecuentes es la S65T, la cual tiene más brillo que la wtGFP, se oxida cuatro veces más rápido y no fotoisomeriza. Esta es la variante utilizada en las construcciones hechas en este estudio.

Antecedentes del Proyecto.

En el laboratorio de Genética Molecular y Evolución del Instituto de Ecología de la UNAM, dirigido por la Dra. Elena Álvarez-Buylla; la Dra Alicia Gamboa de Buen diseñó una columna de afinidad con el péptido RXXT para identificar posibles proteínas que interactuaran con AGAMOUS. Muchas de las proteínas tipo MADS contienen un posible sitio de fosforilación RXXT en el sitio RXVTF del dominio MADS, que puede ser blanco con otras proteínas (Theissen *et al*, 2000; Gamboa, *et al* 2001).

Se aislaron 2 proteínas; una proteína fosfatasa de 29kDa (VSP1), la cual ya había sido descrita con el nombre vegetative storage protein (VSP1, GenBank número de acceso AB006777) y otra rica en leucinas de 36kDa a la cual se le denominó FLOR1 (GenBank número de acceso AC069472) (Gamboa, *et al* 2001).

FLOR1 es una proteína nueva y en el laboratorio se ha demostrado que la expresión del gen que codifica para esta proteína es específica de los meristemos de inflorescencia y floral (Gamboa, *et al* 2001), así como de estambres y carpelos (Acevedo, *et al*, 2002). También se demostró que existe una interacción *in vitro* entre FLOR1 y AGAMOUS mediante el ensayo de doble-híbrido (Gamboa, *et al* 2001). Estos resultados aunados a que a nivel celular la expresión de FLOR1 coincide espacio-temporalmente con los patrones de expresión de AGAMOUS (Acevedo, *et al*, 2002), sugieren que la proteína rica en leucina FLOR1 es una proteína que pudiera estar involucrada en un sistema de transducción de señales relacionado con *AGAMOUS* (Gamboa, *et al* 2001). Hasta ahora no se había reportado interactores de genes MADS que no fueran de la misma familia.

Esta es la primera proteína reportada de esta naturaleza y su caracterización es muy importante porque puede convertirse en una herramienta útil para entender como se integran las señales de los factores de transcripción entre células durante el proceso de desarrollo. Esta es un área nueva tanto en la biología del desarrollo de plantas como de animales. Las proteínas con dominios repetidos ricos en leucina se encuentran presentes en todos los eucariontes y se han localizado tanto en el espacio extracelular como en el

citoplasma (Kajava, 1998), por lo que la localización subcelular de FLOR1 es de gran importancia.

Para que FLOR1 y AGAMOUS puedan interactuar *in vivo*, es imprescindible que coincidan tanto en tiempo como en espacio y se localicen en los mismos compartimentos celulares en algún momento del desarrollo floral. Mi trabajo de tesis consistió en desarrollar un enfoque molecular dirigido a comprobar esta hipótesis. En colaboración y bajo la dirección técnica de la Dra. Francisca Acevedo Gasman, se construyeron proteínas quiméricas con diferentes dominios de FLOR1 y la proteína verde fluorescente (GFP). Estas construcciones se pusieron bajo el efecto del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S). Se obtuvo expresión constitutiva de las construcciones quiméricas en plantas transgénicas de *A.thaliana* y esto se pudo observar *in vivo*.

Objetivos

Generales

El objetivo de este trabajo fue el determinar la localización subcelular de la proteína rica en leucina en *A. thaliana* codificada por el gen FLOR-1.

Para cumplir con este objetivo se propusieron como objetivos específicos:

-Clonar los los fragmentos del gen que codifica para la proteína rica en leucina FLOR1 en el vector pGFP-MRCp, y las construcciones provenientes de pGFP-MRCp en el vector binario Ti pBIN-mGFP5-ER .

-Transformar las construcciones en la planta *A. thaliana*.

-Conocer la distribución subcelular *in vivo* de la proteína rica en leucina codificada por el gen FLOR-1 en la planta *A. thaliana*, mediante microscopía confocal.

Hipótesis

La proteína rica en leucina se localiza, al menos transitoriamente, en el citoplasma y posiblemente en el núcleo de las células de las plantas transgénicas de *A.thaliana*.

Materiales y Métodos

Comparando secuencias de distintas proteínas LRR se identificaron algunos módulos conservados a lo largo del gen que codifica para FLOR-1 (figura 4). Esta comparación se llevó a cabo entre secuencias de proteínas con funciones conocidas y la secuencia de FLOR1: lo que nos permitió establecer la(s) posible(s) función(es) de esta proteína.

Con la finalidad de obtener construcciones quiméricas FLOR1-GFP bajo el control del promotor CaMV35S y de la fracción terminal NOS del vector binario pBIN de *Agrobacterium tumefaciens* (*A.tumefaciens*) (Apéndice I), se amplificaron cuatro fragmentos del gen codificante para la proteína rica en leucina FLOR1. Estos se fusionaron al inicio o al final (según el caso) de la secuencia de la proteína verde fluorescente (GFP), del vector pGFP-MRCp (donado por el Dr. Rodríguez-Concepción, Rodríguez, *et al.* 1999, Apéndice de vectores). Los fragmentos #1, #2 y #4 se fusionaron en fase al inicio de la secuencia de la proteína fluorescente en la región N-terminal de este vector, mientras que el fragmento #3 se fusionó al final de la secuencia de la proteína fluorescente en la parte C-terminal. Una vez que estas construcciones se habían comprobado y con el fin de introducirlas en un sistema binario que sirve como vector para transformar plantas, se liberaron las construcciones quiméricas fusionadas de cada uno de los fragmentos con la secuencia de la proteína verde fluorescente del vector pGFP-MRCp. Se hicieron cortes simétricos (romos) tanto los extremos de las secuencias y los del vector binario pBIN-mGFP5-ER (al cual se le había quitado previamente la secuencia mGFP5-ER que contiene una señal de localización subcelular específica para retículo endoplásmico), para luego ligar en éste cada uno de los cassettes generados. Después de ligar las secuencias quiméricas en el vector binario, se obtuvieron las diferentes construcciones 35S::FLOR1-GFP que se transformaron por electroporación a *A.tumefaciens*. Explotando la interacción planta-bacteria se utilizó el *Agrobacterium* transformado con cada una de la construcciones para después transformar por infiltración a *A.thaliana*. Se generaron plantas transgénicas estables (T3) con las que se llevó a cabo el análisis de localización subcelular utilizando microscopía confocal .

Secuencia FLOR1.

(GeneBank[™] número de acceso AF136588, FLR y AC069472)

1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
FASF					
MKLF →	VHL	SIF	FSIL	FIT	LPS
ATGAAGCTCT	TGTTCATCT	CTCTATCTTC	TCTCCATCC	TCTTCATCA	TCTCCATCT
SYNC	TEN	DKN	ALLQ	IKK	ALG
TCTTACAACT	GCACCGGAAA	TGACAAGAAU	GCCTCTCTTC	AAATCAAGAA	AGCACTGGC
NPPL	LSS	WNP	RTDC	CTG	WTG
AACTCTCCCC	TCTATCTCT	CTGGAACTCC	CGAACTGACT	GTGTGACCGG	CTGGACCGCC
VECT ←	FABR	VTG	LSVT	SGE	VSG
GTCGAAATGA	CFAACCGTCC	CGTTACCGGT	CTCAGCGTTA	CTCTCCGGCA	AGTCTCCGGT
← FA7R	QIG	DLV	DLRT	LDF	SYL
CAGATCTCGT	ACCAGATCGG	CGACCTCGTT	GACCTCCGTA	CACTAGATTT	CAGCTACCTG
PHLT	GNI	PRT	ITKL	KNL	NTL
CCACACTCA	CCGGAAACAT	CCACCGCAC	ATCACCAAA	TCAAGAAGCT	CAACACTCT
YLKH	TSL	SGP	IPDY	ISE	LKS
DACTGAAGC	ACACTAGTCT	CTCCGACTCT	ATCCAGATF	ACATCAGCGA	GCCTCAAGAGC
LTFL	DLB	FNQ	FTGP	IPG	SLS
CTCACGTTCT	TGGACTTTC	TFTTACC ² AA	TFTACCGGTC	CAATCTCCGG	TCTCGTATCT
QMPK	LEA	IQI	NDNK	LTG	SIP
CAGAATCGGA	AGCTTGAAGC	CATTC ³ AAATC	AAGCAJAAFA	AGCTAACCGG	TCTTATACCA
NSFG	SFV	GNV	PNLY	LSN	NKL
AACCTTTTCG	GTCTTTTFTG	TGGCAACGTC	CCTAACTCT	ACTTGTCTAA	CAALAAAGCTG
SGKI	PES	LSK	YDFN	AVD →	LSG
TCAGGAAAAA	TACCGGAATC	GTGTCT ⁴ TAAA	TACGACTTCA	ACCGAGTGGT	FTTGTCCGGA
NGFE	GDA	FMF	GGRN	KTT	VRV
AAIGGTTTCG	AAGGAGATGC	CTTATGTTC	TTCGGACGGA	ACAAAACAAC	AGTACGAGTGT
DL SR	NMF	NFD	LKVK	FAR	SIV
CAATTTTCGA	GAAATATGTT	CAATTTCCGAT	CTCAAGGTTFA	AGTCTCGTAG	AAGCATAGTT
SLDL	SNQ	HIY	AKGP	PAL	TKL
TCGTGTGGAIC	TGAGCCAGAA	CCATATCTAC	GGGAAGATAC	CACCGACT	GACTAAACTA
HLEH	FNV	SDN HLCG	KIP	SG G	SG G
CACCTCGAGC	ATTCAACGTT	GAGCGACAAC	CACTCTCGCG	GAAAAATCCC	AAGTGGCGGT
LLQT	FEP	SAF	AHNI	CLC	GTP
CTACTTCAGA	CTTTGAACC	ATCTGCCCTC	GCCTACAACA	CTGTCTTTG	TGGAACTCCC
← FA6R					
LKAC					
CTTAAAGCTT	GTAA				
← FA9R					

Figura 4. Secuencia en bases y aminoácidos de FLOR1. Localización de los cuatro fragmentos y sus oligos, de la proteína rica en leucina codificada por el gen FLOR1

Proteína Completa: ■ #1; Fragmentos #2, ■ #3, ■ #4

Diseño y amplificación de cuatro fragmentos del gen que codifica para la proteína rica en leucina (LRR) FLOR1.

Diseño de las construcciones

Para sintetizar los cuatro fragmentos del gen FLOR1 (figura 4) se diseñaron en el programa oligo IV los oligos específicos para los extremos de cada fragmento.

Fragmento #1 de 975pb: incluye el gen completo de *FLOR1*. Para amplificar por PCR este fragmento se eligieron oligonucleótidos de las regiones flanqueantes de la proteína sin incluir el codón de término. Se agregaron las dianas *EcoRI* en el oligo FA5F ("forward") y *NcoI* en el FA6R (reverse) para poder clonarlo en el vector pGFP-MRCp.

oligonucleótidos :

EcoRI

FA5F: 5'GGAATTCATGAGGCTCTTTGTTTCATCTC 3'

FA6R: 5'GTACCCATGGACAAGCCTTAAGGGGAGTTC 3'

NcoI

Fragmento #2 de 250pb: incluye desde el codón de inicio de la proteína FLOR1 (ATG) hasta, e incluyendo, la señal de unión a nucleótidos, así como la señal a retículo endoplásmico, se agregaron las secuencias de *EcoRI* en el oligo FA5F ("forward") y *NcoI* en el FA7R ("reverse").

oligonucleótidos:

EcoRI

FA5F: 5'GGAATTCATGAGGCTCTTTGTTTCATCTC 3'

FA7R: 5'GTACCCATGGAGATCTGACCGGAGACTTC 3'

NcoI

Construcción #3 de 575pb: Debido a que la secuencia del gen *FLOR1* contiene un sitio interno de restricción *SacI* en el nucleótido 411 se decidió amplificar el fragmento desde ahí, excluyendo una parte anterior de la región rica en leucinas, e incluyendo hasta el codón de término, mas las secuencia de *BamHI* en el oligo FA9R (reverse).

oligonucleótidos:

SacI

FA10F: 5'GGGAGCTCACCCGCTCACG 3'

FA9R: 5'CGGGATCCTTAGCAAGCCTTTAGAGGAGT 3'

BamHI

Construcción #4 de 210pb: desde el codón de inicio (ATG) incluyendo la región del péptido señal a membrana y la de retículo endoplásmico con las secuencias *EcoRI* en el oligo FA5F ("forward") y *NcoI* en el FA8R ("reverse").

oligonucleótidos:

EcoRI

FA5F: 5'GGAATTCATGAGGCTCTTTGTTTCATCTC 3'

FA8R: 5'GTACCCATGGAGGTAACGCGATTAGTG 3'

NcoI

Como control de la transformación se utilizó la secuencia (cassette) que incluye desde la diana *EcoRI* hasta *BamHI* del vector pGFP-MRCp que después se insertó en el vector binario pBIN-mGFP5-ER.

Una vez sintetizados los oligos (FA5F, FA6R, FA7R, FA8R, FA10F y FA9R), estos se utilizaron para amplificar los fragmentos 1, 2, 3 y 4, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando un termociclador Perkin Elmer 9600. La reacción se hizo con un volumen final de 50µl (Apéndice II) con el siguiente programa: 3' de desnaturalización a 94°C, seguido por 35 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 20 segundos de alineamiento a 47°C y 1.5 minutos de extensión a 72°C, seguidos por una extensión final de 5 minutos a 72°C. La amplificación de los cuatro fragmentos se comprobó por electroforesis en geles de agarosa al 1% utilizando los marcadores moleculares de 100pb y *λHind III*.

Clonación de los fragmentos en el vector pGFP-MRCp y formación de las secuencias quiméricas (cassette).

Clonación de los fragmentos en el vector pGEMTeasy (PROMEGA) y extracción de DNA.

Ya verificada la amplificación de los fragmentos por electroforesis, cada uno de estos se clonó (Apéndice I) en el vector pGEMTeasy (PROMEGA; Apéndice II) con el fin de obtener cada fragmento para así poder comprobar su secuencia, y una vez que se obtuviera la secuencia idéntica de cada fragmento al correspondiente de *FLORI* poderlo manipular integrándolo a los vectores pGFP-MRCp y luego al vector pBIN-mGFP5-ER.

El vector pGEMTeasy permite clonar productos de PCR con facilidad, ya que cuenta con timidinas en cada extremo 3' que se pegan a los extremos de adeninas que deja la polimerasa. Este vector contiene un sitio de clonación múltiple que incluye varios sitios de restricción, y contiene una secuencia de resistencia a ampicilina para la selección de la cepa transformante. Otra característica de este vector es que cuenta con dos promotores de la RNA polimerasa flanqueando al sitio de clonación múltiple dentro de la región codificante al péptido- α de la enzima β -galactosidasa (*lacZ*). Esto permite que cualquier inserción de otro gen en la región del péptido- α produzca una activación por inserción y así permitir que las clonas recombinantes se identifiquen inmediatamente por el color blanco de las colonias bacterianas. Las colonias no recombinantes serán de un color azul debido a la expresión del gen *lacZ* que es inducido por la acción del IPTG (isopropiltiogalactósido; 0.1M) y el X-Gal (5-bromo-4-cloro-3indol- β -D-galactopiranosido; 50mg/ml) (Sambrook *et al*, 1987; PROMEGA) que se aplica en la caja de petri con el medio de selección.

Una vez ligados cada uno de los fragmentos al vector, se transformaron a la cepa TOP 10 de *Escherichia coli* por choque térmico (Apéndice II) y se incubaron durante hora y media a 250rpm en medio LB con carbenicilina (100 μ g/ μ l). Las transformaciones se plaquearon en cajas de petri con medio LB mas carbenicilina (100 μ g/ μ l) IPTG y X-Gal y se incubaron durante toda la noche a 37°C. De cada transformación se escogieron 10-20 colonias blancas (recombinantes) y se inocularon en tubos de cultivo (miniprep) con medio LB mas carbenicilina (100 μ g/ μ l) durante toda la noche a 37°C y 250 rpm.

De los cultivos de las colonias transformantes se extrajo el DNA plasmídico usando la técnica de boiling miniprep (Apéndice II). Luego se digirió con la enzima *EcoRI* (sitio incluido en el sitio múltiple de clonación del vector pGEMTeasy y ausente en los fragmentos a clonar) para aislar los fragmentos #1, #2, #3 y #4 y comprobar por electroforesis el tamaño aproximado de los fragmentos.

Los fragmentos de DNA se secuenciaron para corroborar la fidelidad de la amplificación de las cuatro construcciones.

Clonación de los fragmentos en el vector pGFP-MRCp (Rodríguez C. et al, 1999).

Para clonar los fragmentos amplificados y corroborados por secuenciación, en el vector pGFP-MRCp (Rodríguez C. et al. 1999, Apéndice vectores), éste se linearizó con las dianas respectivas dependiendo de si se quería introducir los fragmentos a la región N-terminal (*EcoRI* y *NcoI*) o C-terminal (*SacI* y *BamHI*) con respecto a la secuencia de GFP (ver figura diseño de construcciones). A su vez, cada uno de los fragmentos fue aislado de pGEMTeasy utilizando las mismas enzimas, *EcoRI* y *NcoI* para los fragmentos #1, #2 y #4 y *SacI* y *BamHI* para el fragmento #3. Esto permitió clonar de manera dirigida en cada uno de los casos en el vector pGFP-MRCp.

Las ligaciones se comprobaron digiriendo y corriendo en geles de agarosa al 1% por electroforesis las secuencias que incluían al fragmento correspondiente más la secuencia de la GFP del plásmido pGFP-MRCp. Las secuencias quiméricas #1::GFP, #2::GFP y #4::GFP se aislaron utilizando las dianas *EcoRI* y *SacI* (Apéndice II), mientras que la secuencia GFP::#3 se aisló utilizando *NcoI* y *BamHI* (Apéndice protocolos). Posteriormente, se aislaron con las dianas *EcoRI* y *BamHI* las fusiones quiméricas de FLOR1::GFP (#1::GFP, #2::GFP, #3::GFP y #4::GFP) del vector pGFP-MRCp (Rodríguez, et al, 1999) para poder insertarlos en el vector pBIN-mGFP5-ER al que previamente se le había quitado la secuencia mGFP5-ER. El cassette intacto del vector pGFP-MRCp que se utilizó como control se aisló con las dianas *EcoRI* y *BamHI*

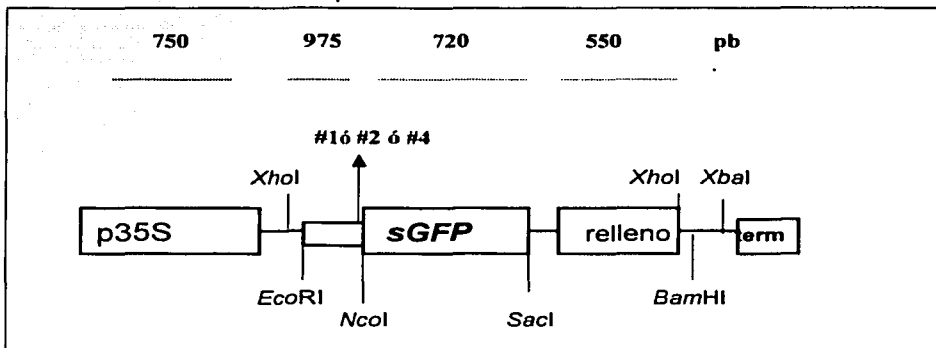


Figura 5. Diseño de la construcción #1, #2, #4 unidas a la parte anterior del extremo N-terminal de la secuencia de GFP del vector pGFP-MRCp.

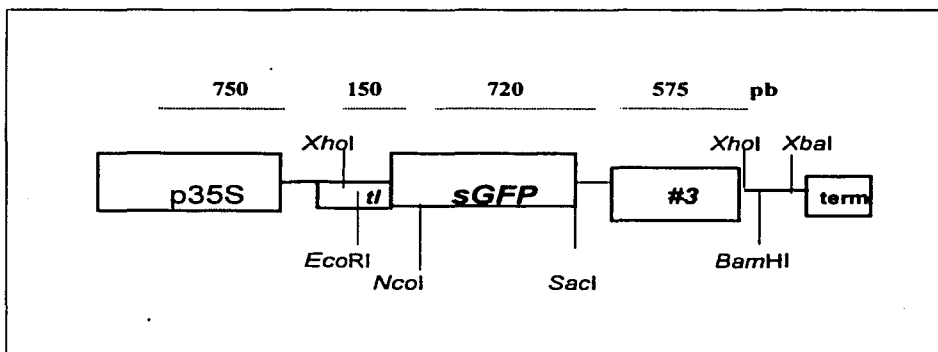


Figura 6. Diseño de la construcción #3 unida a la parte posterior C-terminal de la secuencia GFP del vector pGFP-MRCp.

Clonación de las secuencias quiméricas FLOR1::GFP en el vector binario Ti de *A. tumefaciens* pBIN-mGFP5-ER.

Para clonar las secuencias quiméricas FLOR1::GFP (provenientes del vector pGFP-MRCp) en un vector binario Ti de *A. tumefaciens*, utilizamos el vector pBIN-mGFP5-ER (Apéndice I). No nos interesaba conservar la secuencia que codifica para la GFP modificada, debiendo así remover la secuencia mGFP5-ER del mismo, ya que incluye una señal de localización subcelular específica al retículo endoplásmico. Esta se quitó digiriendo con *Xba*I y *Ssr*I (Apéndice II).

Debido a que el vector y las secuencias quiméricas FLOR1::GFP no contaban con sitios de restricción compatibles, fue necesario hacer simétricos (romear) a los extremos del vector pBIN, así como a los de las construcciones. Esto se llevó a cabo utilizando la actividad de exonucleasa 3'-5' y polimerasa 5'-3' de la subunidad mayor de la DNA polimerasa (Klenow) de *E. coli* (Sambrook *et al.*, 1989; Old *et al.*, 1994; Apéndice protocolos); con la cual se quitaron bases en el extremo 3' y se agregaron bases en el extremo 5' para crear extremos romos y así poder ligar las secuencias quiméricas (FLOR1-GFP) en el vector pBIN-mGFP5-ER.

Existen dos maneras para digerir DNA de dos hebras; una de ellas es utilizando enzimas de restricción específicas para el reconocimiento de secuencias particulares, pero que producen un corte asimétrico de bases complementarias en las hebras, permitiendo así la ligación de las mismas por complementariedad de bases. Estas enzimas producen extremos cohesivos ya que hidrolizan el esqueleto de azúcar-fosfato generando un extremo 5' con un fosfato y un extremo 3' con un OH (Sambrook *et al.*, 1989; Turner *et al.*, 1997; Old *et al.*, 1994; Apéndice II). Otra manera es producir extremos romos, utilizando enzimas de restricción que dejen extremos romos en las hebras. Estas enzimas producen ataques igual al esqueleto azúcar-fosfato. La ligación de extremos simétricos, (romos) se puede dar espontáneamente debido a que solo depende de la cercanía de los extremos de las secuencias, por lo que generalmente se desfosforilan los extremos 5' del vector con cortes simétricos (romos) para evitar la recircularización de las hebras. La ligación de fragmentos

de DNA con extremos no complementarios se puede llevar acabo llenando los huecos en el extremo 5' o utilizando la enzima Klenow, produciendo así extremos simétricos, romos (Sambrook, 1989; Turner, 1997; Old, 1994).

Una vez ligadas las diferentes secuencias FLOR1-GFP al vector binario (romeado y desfosforilado), fusionadas al promotor 35S CaMV (figura 5 y 6) se determinó la direccionalidad de las secuencias quiméricas (inserción) con respecto al vector, debido a que al haber clonado utilizando extremos simétricos existía la posibilidad de que las construcciones #1::GFP, #2::GFP, #3::GFP y #4::GFP se insertaran contrario al de la lectura del gen (antisentido). La direccionalidad de las secuencias FLOR1::GFP se comprobó mediante PCR utilizando combinaciones de uno de los oligos originales con los que se amplificó cada fragmento inicial de FLOR1, con uno de los dos oligos: el 35S-5' anclado en el promotor 35S de CaMV o el NOS-3' anclado en la secuencia NOS de término presentes ambos en el vector binario. Se utilizaron todas las combinaciones para corroborar la direccionalidad en cada caso.

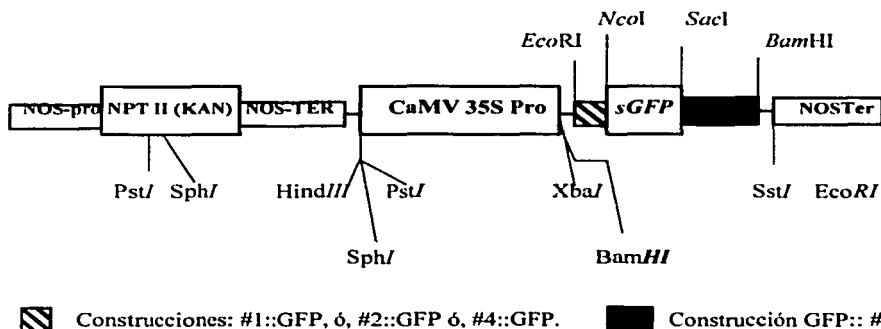


Figura 7. Diseño de las construcciones quiméricas #1::GFP, #2::GFP, #4::GFP unidas a la parte N-terminal del vector pBIN-mGFP5-ER. Construcción GFP:: #3 unida a la parte C-terminal del vector pBIN-mGFP5-ER.

Las clonas positivas (entiéndase positivas por aquellas donde la amplificación de PCR nos comprobó la orientación en sentido de las construcciones con respecto al resto del vector), se eligieron para transformar la bacteria *A tumefaciens*.

Aquellas clonas en *E.coli* que dieron un producto de amplificación de tamaño esperado, que nos indicaba la orientación sentido de nuestras construcciones en el vector binario, se utilizaron para transformar la bacteria *A tumefaciens*. De las amplificaciones positivas se tomaron reacciones independientes de cada construcción quimérica (fragmento-GFP en pBIN) mas el control, con las cuales se transformó a la cepa de *Agrobacterium* AGL0 por electroporación (BIO-RAD Gene-Pulser; II). Después de realizar la electroporación, las cepas transformadas se plaquearon en cajas de LB con Kanamicina (50µg/µl) y se incubaron por dos días a 30°C.

Transformación de las construcciones quiméricas FLORI-GFP en *Arabidopsis thaliana*.

Material vegetal.

Se utilizaron plantas tipo silvestre o "wild type" (wt) de *A. thaliana* del ecotipo Landsberg *erecta* (Ler), crecidas en cámaras ambientales REVCO a 24° C y en luz continua. La transformación en *A.thaliana* se realizó mediante infiltración (Apéndice protocolos). Una vez transformadas las plantas se mantuvieron en la cámara ambiental a 20°C hasta que las vainas maduraron y se embolsaron para coleccionar las semillas (T1) y así poder llevar a cabo el análisis de segregación en la segunda generación (Figura 8) y obtener líneas homocigas (puras), para la inserción con que se transformaron las plantas en la tercera generación (T3).

Análisis de segregación (Figura 8)¹.

La transformación de *A. thaliana* mediante infiltración se basa en el principio de que la bacteria transformada con el gen de la construcción (proteína quimérica) penetra a las células meristemáticas y es ahí donde ésta introduce el plásmido al genoma de la planta, esta se desarrolla normalmente produciendo flores que dan lugar a algunas semillas transformantes heterocigas ($t/+$, T1). Las semillas heterocigas T1 ($t/+$), para el gen transformante, se seleccionaron con kanamicina ($50\mu\text{g}/\mu\text{l}$), debido que la construcción transformada incluye un gen de resistencia a kanamicina (conferida por el vector binario-Ti). La semillas T1 se sembraron en cajas de petri con medio MS con kanamicina ($50\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (Apéndice de II). Cuando las semillas germinaron se observaron dos fenotipos muy claros, las plántulas susceptibles a la kanamicina eran albinas, no poseían coloración y no se desarrollaban más allá de los cotiledones; y las plántulas resistentes a kanamicina tenían un aspecto normal, es decir, verdes y con la posibilidad de presentar formación de hojas de roseta en la caja de petri. El que la mayoría de las plantas hayan sido susceptibles al antibiótico indica que carecían del inserto, así de esta manera, pudimos desechar las plántulas homocigas $wt (+/+)$.

Las plántulas transformantes seleccionadas (todas $t/+$, "t" se refiere al fragmento transformante) de la generación T1 se transplantaron a suelo (Metromix 200) y se crecieron en cámaras ambientales REVCO a 24°C con luz continua. Una vez ocurrida la anthesis y la maduración de las semillas, se repitió el proceso de selección de las semillas para obtener la siguiente generación de semillas (T2). Para ello se seleccionaron las semillas T2 en placas con kanamicina ($50\mu\text{g}/\mu\text{l}$). En aquellos casos en que hubiese un solo inserto "t" en el genoma de la planta, se esperaba la siguiente segregación: $1/2$ de las semillas heterocigas para el gen transformante ($t/+$), $1/4$ homocigotas transformantes (t/t) y $1/4$ del genotipo silvestre o wild type ($+/+$), es decir, se esperaba una segregación fenotípica 3:1. 3 plantas

¹ El análisis de segregación en T2 y el seguimiento de las líneas a T1, T2, T3 de las plantas transformadas fue realizado por la Dra. Francisca Acevedo con la ayuda de la Dra Alicia Gamboa de Buen del Laboratorio de Genética Molecular y Evolución del Instituto de Ecología de la UNAM.

resistentes a kanamicina por cada planta susceptible. Al igual que con la generación anterior, se seleccionaron las plántulas resistentes a kanamicina y por lo tanto, transformantes, y se eligieron aquellas líneas que a través de su segregación en kanamicina, indicaran el contener un solo inserto. Posteriormente se sembraron las plántulas (*U+* y *t/t*) para cada construcción en tierra. Una vez ocurrida la anthesis y que las semillas T3 maduraran se seleccionaron con el mismo procedimiento. Las plantas homocigas T3 (*t/t*) para cada construcción produjeron el 100% de sus semillas resistentes a kanamicina en T3. Las líneas homocigas seleccionadas en T3 corresponden a las líneas FLORI-GFP estudiadas en el confocal.

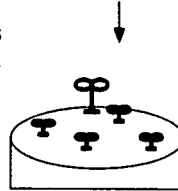
Figura 8. Procedimiento de Selección para obtener Plantas Transgénicas Estables.

Transformación de *A.thaliana* mediante infiltración.



Incubación en cámaras ambientales REVCO a 24° C y en luz continua.

Plaqueo de semillas T1 en medio MS con kanamicina (50µg/µl).
Colecta de las semillas transformantes (t/+).
(las plántulas silvestres (+/+) de la generación T1 se desechan)



Transplante de las plántulas heterocigas (t/+) T1 (resistentes a kanamicina) en suelo. Plántula albina wild type (+/+). Incubación de plantas T1 en cámaras ambientales REVCO a 24°C y en luz continua, hasta su autofertilización Colecta de semillas T2.

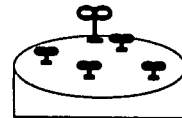


Plaqueo en cajas de petri en Ms con Kanamicina (50µg/µl) de semillas T2. Las líneas que tengan un solo inserto de la construcción transformante deben segregarse: ¼ homocigas (t/t), ¼ homocigas wt (+/+), ½ heterocigas (t/+). Es decir, en una relación 3:1.

Aquellas líneas T2 que hayan segregado 3:1 en la placa petri, es decir, dando a entender que solo indican un evento de transformación correspondiente a un solo inserto en el genoma de la planta, darán semillas (T3) que se pondrán en placas de petri a crecer en medio Ms con kanamicina para seleccionar.

Aquellos casos en que el 100% de las semillas T3 provenientes de una línea T2 sean resistentes a kanamicina apuntan a que la línea T2 era homociga para el inserto, es decir, t/t. Estas nuevamente se pasan a tierra, se les deja crecer y dar semilla.

Esta es la semilla T3 con la que se trabaja de aquí en adelante para los estudios



Localización subcelular de la proteína rica en leucina codificada por el gen FLOR-1

Una vez obtenidas las plantas homocigas T3, se observó la expresión de las construcciones en distintos tejidos utilizando plantas homocigas T3 y heterocigas T2. Las plantas se removieron del agar y de la tierra, se disectaron los órganos y en algunos casos se montó la plántula completa en agua sobre un portaobjetos para microscopía. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio confocal (BIO-RAD MRC-600) con un laser de Krypton-Argón, equipado con un microscopio de epifluorescencia Zeiss (Axioskop) con lentes oculares de inmersión en agua 63X W Korr, N.A. 1.2, W.D. 0.25nm. Para visualizar la expresión del gen reportero (GFP) el laser exitó al fluoroforo de la GFP a 488 nm y a 568 nm a la clorofila.²

Las imágenes se analizaron con el programa Confocal Assistant. Version 4.02.

² Microscopio facilitado por el Laboratorio de Microscopía del Instituto de Biotecnología de la UNAM, con la ayuda técnica de la Dra. Xochitl Alvarado.

Procedimiento general para la formación de las construcciones quiméricas FLOR1-GFP en *Arabidopsis thaliana*, y localización subcelular en planta.

- 1.-Diseño de las cuatro construcciones 1, 2, 3 y 4.
- 2.-Diseño de oligonucleótidos.
- 3.-Amplificación de los fragmentos por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- 4.-Clonación de los fragmentos en el vector pGEMTeasy.
- 5.-Comprobación de fragmentos por: a) Digestión b) Secuenciación.
- 6.-Clonación en el vector pGFP-MRCp.
 - a) Linearización del vector con las dianas EcoRI y NcoI para cada una de las construcciones #1, #2 y #4 y SacI y BamHI para la #3.
 - b) Digestión de pGEMTeasy + fragmento con las dianas EcoRI y BamHI para liberar al fragmento.
 - c) Clonación de los fragmentos con las dianas específicas en el vector pGFP-MRCp.
- 7.-Digestión del vector pGFP-MRCp para aislar los cassetes *FLOR1-GFP* con las dianas EcoRI y SacI para las construcciones #1, #2 y #4 y NcoI y BamHI para la #3.
- 8.- Clonación de los cassetes *FLOR1-GFP* en el vector binario pBIN .
 - a) Linearización del vector pBIN-mGFP5-ER con las dianas XbaI y SstI.
 - b) Romeo del vector y de los fragmentos con Klenow.
 - c) Desfosforilación.
 - d) Ligación en el vector binario (romeado y desfosforilado) de las diferentes construcciones quiméricas *FLOR1-GFP*.
- 9.-PCRs para comprobar la inserción y la direccionalidad de los cassetes en el vector binario, utilizando combinaciones de oligos específicos de la región del promotor 35S-5', y de la región terminal NOS-3', con los oligos de los diferentes fragmentos para cada construcción.
- 10.-Transformación de las construcciones quiméricas *FLOR1-GFP* en la cepa de *Agrobacterium* AGL0 por electroporación.
- 11.-Transformación por infiltración en *Arabidopsis thaliana*.
- 12.-Selección por resistencia a Kanamicina de transformantes.
- 13.-Análisis de segregación.
- 14.-Localización subcelular de la proteína.

Resultados

Diseño, clonación y transformación de las construcciones pBIN-FLOR1-GFP.

Una vez diseñadas las construcciones y los oligos se amplificaron los fragmentos por PCR y se obtuvieron los tamaños esperados (Tabla 3 y Figura 9).

Tabla 3. Tamaño esperado para las ampliaciones de las construcciones realizadas

Fragmento	Tamaño (pb)
#1 incluye el gen completo de FLOR-1. Fusionado a la región N-terminal del vector pGFP-MRCp (fusionado en fase al ATG de inicio de la secuencia que codifica para GFP)*.	975pb
#2 desde ATG hasta, la señal de unión a nucleótidos, así como la señal a retículo endoplásmico. Fusionado a la región N-terminal *(idem).	250pb
#3 región rica en leucinas de la proteína. Fusionada a la región C-terminal.	575pb
#4 desde ATG hasta la región del péptido señal a membrana y la de retículo endoplasmático, unido a la N-terminal *(idem).	210pb

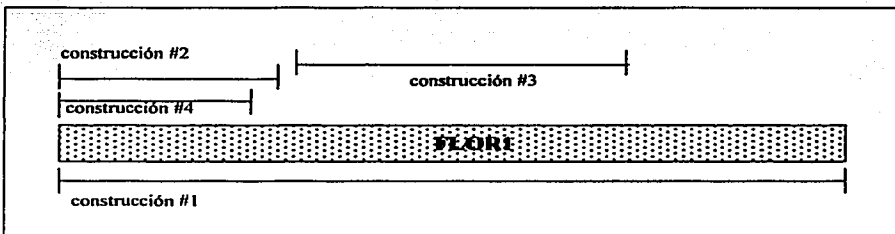


Figura 9. Esquema de las cuatro construcciones dentro del gen de FLOR1.

Ya comprobadas las ampliificaciones por migración en geles de agarosa al 1%, los fragmentos se clonaron individualmente en el vector pGEMTeasy. La clonación de los fragmentos se corroboró por digestión (Figura 10) y posteriormente la fidelidad de la ampliificación por PCR se comprobó secuenciando al menos 2 clonas positivas de cada fragmento.

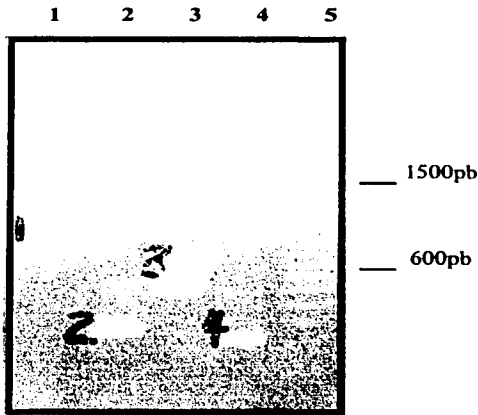


Fig 10. Corrimiento de los fragmentos. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las ampliificaciones para verificar el tamaño de los fragmentos generados por PCR. Carril 1: ampliificación del fragmento #1 de 975 pb, carril 2: ampliificación del fragmento #2 de 250pb, carril 3: ampliificación del fragmento #3 de 575pb, carril 4: ampliificación del fragmento #4 de 210 pb y carril 5: marcador 100pb.

Ya linearizado el vector pGFP-MRCp con las dianas específicas: *EcoRI* y *NcoI* para el extremo N-terminal y *SacI* y *BamHI* para el extremo C-terminal se ligaron (figura 5 y 6) los fragmentos de FLOR1 amplificados por PCR y corroborados con las mismas dianas; tres de ellos (# 1, #2, y #4) se clonaron en la parte amino terminal y uno (#3) en la parte carboxilo terminal de la secuencia de la GFP del vector pGFP-MRCp, obteniéndose la secuencia quimérica GFP::FLOR1-C (#3::GFP) para el fragmento #3 así como las quimeras N-FLOR1::GFP (#1::GFP, #2::GFP y #4::GFP) para los fragmentos # 1, #2, y #4 en el vector pGFP-MRCp (Figura 5 y 6).

Con las dianas *NcoI* y *BamHI* se aisló la secuencia GFP::FLOR1-C del vector pGFP-MRCp correspondiente a la secuencia quimérica que incluye a la secuencia de la GFP más el fragmento #3; mientras que con las enzimas *EcoRI* y *SacI* se aislaron las secuencias N-FLOR1::GFP, correspondientes a los quimeras que incluyen individualmente a los fragmentos #1, #2 y #4 mas la secuencia de la GFP .

Una vez romeadas y desfosforiladas las secuencias N-FLOR1::GFP y GFP::FLOR1-C provenientes del vector pGFP-MRCp (Rodríguez C, 1999); se removió del vector binario pBIN-mGFP-ER (Haseloff *et al.*, 1998) la secuencia del gen reportero (mGFP-ER) además de que no nos era útil para linearizarlo. Se preparó el vector romeado sin desfosforilar y romeado desfosforilado, se utilizaron ambos en reacciones independientes, para clonar las construcciones provenientes del paso anterior (o sea, las que se habían aislado del vector pGFP-MRCp) en este vector.

La direccionalidad de las clonas se comprobó mediante PCR utilizando combinaciones específicas de oligos de cada fragmento con oligos de la región del promotor 5'-35S y NOS-3' terminal del vector pBIN-mGFP5-ER (Haseloff, 1998). De las alícuotas del tratamiento sin desfosforilar se obtuvieron un mayor número de clonas positivas, es decir, en marco de lectura (sentido) con las que se continuó trabajando.

Las amplificaciones positivas así como el control se transformaron por electroporación en *A. tumefaciens*. A diferencia de las transformaciones de la construcción GFP::FLOR1-C, donde nunca se obtuvo un crecimiento razonable de *A.tumefasciens*, después de 48 horas

se obtuvieron colonias de las bacterias transformadas con las construcciones N-FLOR1::GFP, al igual que con el control. La inexistencia de colonias de la construcción GFP::FLOR1-C pudo deberse a que esta construcción (correspondiente a la gran mayoría de la parte rica en leucinas de la proteína FLOR1) haya resultado tóxica impidiendo el desarrollo de las bacterias que nunca mostraron colonias después de varios días en la incubadora. Estas colonias también las utilizamos para transformar pues el que éstas hayan crecido nos indicó que contenían el gen de la resistencia que se encontraba en la construcción y por lo tanto sí fueron transformadas. Una vez identificadas las colonias transformantes se prepararon los cultivos según el protocolo de infiltración y se transformó a *A.thaliana* por infiltración (Apéndice II).

Análisis de segregación³.

Una vez que las vainas de las plantas habían madurado, se embolsaron las plantas y se colectaron las semillas, de las cuales se iban a obtener semillas transformantes heterocigas ($t/+$, T1). Las semillas transformantes, se esterilizaron y se sembraron en placas de medio MS con kanamicina (50 μ g/ μ l) para iniciar el análisis de segregación (Figura 8) sembrando las semillas en cajas de petri en medio de selección.

Al llevar acabo la selección, ninguna de las plantas que se transformaron con el control y la construcción #2 llegaron a producir semillas transformantes ($t/+$), lo que quiere decir que no hubo eventos de transformación. La transformación con estas construcciones se repitió, sin éxito. Mientras que las plantas que se transformaron con las construcciones #1 y #4 produjeron semillas con una baja eficiencia de transformación en la T1, es decir, semillas que contuvieran el genotipo heterocigo ($t/+$) para cualquiera de estas construcciones. Posteriormente se continuó con la selección de las plantas hasta obtener líneas puras (t/t) en la generación T3 que produjeron el 100% de sus semillas resistentes a kanamicina. Finalmente se obtuvieron varias líneas homocigas para las construcciones N-FLOR1::GFP:

³ El análisis de segregación en T2 y el seguimiento de las líneas a T1, T2, T3 de las plantas transformadas fue realizado por la Dra. Francisca Acevedo con la ayuda de la Dra. Alicia Gamboa de Buen del Laboratorio de Genética Molecular y Evolución del Instituto de Ecología de la UNAM.

para la construcción #1 que incluye a la secuencia de la proteína FLOR1 completa se obtuvieron 43 líneas y 23 líneas para la construcción #4.

Análisis de la expresión del gen FLOR-1 *in vivo* en *A. thaliana*.

Localización subcelular de las proteínas quiméricas 35S::N-FLOR1::GFP, construcciones #1 y #4 en plantas transgénicas.

Para conocer la localización subcelular de la proteína FLOR1 en *A. thaliana*, se estudió la distribución de esta proteína fusionada en fase a la proteína GFP bajo el efecto del promotor CaMV35S (virus del mosaico de la coliflor) en plantas transgénicas de *A. thaliana*. Se obtuvo expresión constitutiva de las proteínas quiméricas dentro de las células de los tejidos de toda la planta. El análisis se llevó a cabo en los tejidos del carpelo (estigma, estilo, ovario, valvas) (Figura 11 y 12), estambre, raíz y cotiledón (Figura 13).

La localización subcelular de las proteínas quiméricas en las células de las plantas transformantes de *A. thaliana* fue intracelular. En la mayoría de los tejidos observados las proteínas se encontraron dispersas en el citoplasma carpelo, raíz y cotiledón, así como dentro y fuera del núcleo celular; ovario y raíz respectivamente. En algunos casos las proteínas se encontraron compartimentalizadas en lo que podrían ser organelos subcelulares de forma ovoide (Figura 13D). Durante las observaciones y la captura de las imágenes fue evidente el flujo (movimiento) de los organelos así como el del citoplasma en las células vegetales *in vivo*.

Expresión de las proteínas quiméricas 35S::N-FLOR1::GFP, construcciones #1 y #4 en *A. thaliana*.

Analizando los cortes ópticos de los tejidos que conforman al gineceo de *A. thaliana*, en la parte superior del carpelo (estigma y estilo) la expresión de la proteína quimérica #1 se registró en las células de la papila estigmática y solo en algunos estomas del estilo (Figura 11A). Aunque la construcción #4 no mostró expresión alguna en el estigma (Figura 12A),

la fluorescencia que se observó fue homogénea desde el estilo hasta el gineceo (Figura 12A y C).

Figura 12A y C).

Particularmente en la epidermis del estilo de las plantas transformadas con la construcción #1 algunos de los estomas expresaron la proteína en los núcleos de las células guarda y en su periferia (Figura 11A). No se registró ninguna fluorescencia en el replum para esta construcción (#1) mientras que la expresión en las plantas transformadas con la construcción #4 fue similar en todo el carpelo, desde el estilo hasta la base del ovario (ginoforo) (Figura 12 A, B y C).

La localización subcelular de las proteínas 35S::N-FLOR1-GFP presentó un patrón muy similar en las células del ovario (valvas y replum). La proteína codificada por la construcción #1 se encontró principalmente en la periferia y en el núcleo de la mayoría de las células de la epidermis (abaxial) de las valvas; así como en las capas de los tejidos subsecuentes. Estas fueron fáciles de distinguir ya que la colección de imágenes digitales nos permitió observar con mayor detalle la localización subcelular de las quimeras en las distintas capas celulares del ovario. En las plantas transformadas con la construcción #4 el citoplasma presentó una señal de mayor intensidad que el núcleo de las células del gineceo de las plantas transformadas con la construcción #1.

Específicamente en las valvas de las plantas transformadas con la construcción #1, la fluorescencia se observó con mayor intensidad en el núcleo aunque en muchas de las células mostraron también compartimentalización nuclear.

En los estambres, la fluorescencia de las plantas transgénicas fue de mayor intensidad que la de las plantas control, pero debido a que los estambres presentaron mucha autofluorescencia no se tomaron en cuenta los análisis de estas estructuras.

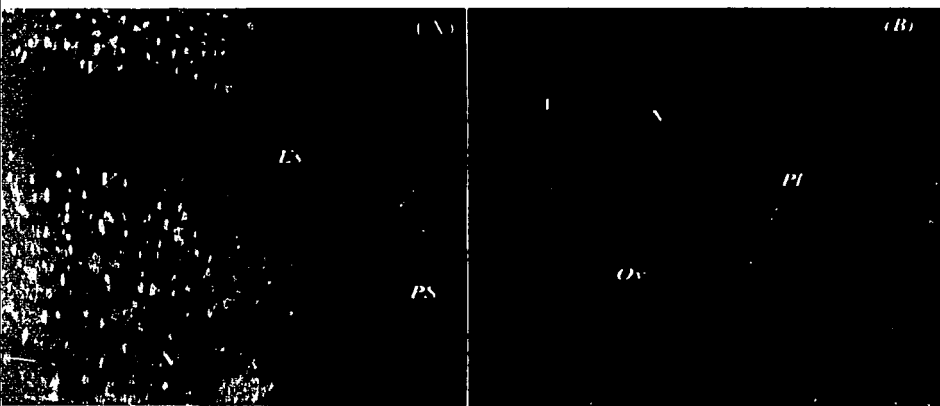


Figura 11. Expresión en el Gineceo de Plántulas transformadas con 35S::N-FLORI-GFP (construcción #1). Colección de imágenes del gineceo de una plántula de estadio 10-12 de *A.thaliana*. En las dos imágenes se observa que la expresión de la proteína es uniforme en todo el tejido de la epidermis del ovario. (A) La expresión de la proteína se localiza en la periferia celular de las células de la epidermis de las valvas del carpelo, mientras que la intensidad de la expresión es de mayor intensidad en los núcleos de las mismas células. En la parte superior del carpelo hay poca señal en el estilo mientras que la papila estigmática muestra una expresión uniforme en todas las células (fusión de 32 cortes). (B) Parte media del ovario en donde la distribución de la GFP es principalmente nuclear, y rodeando algunas células. El que las valvas estén abiertas permite distinguir que la señal se encuentra en el replum, la placenta y el óvulo (fusión de 38 cortes). (Abreviaturas: *N*, Núcleo, *V*, Valva, *PS*, Papila Estigmática, *Ov*, Óvulo, *Pl*, Placenta, *Es*, Estomas).

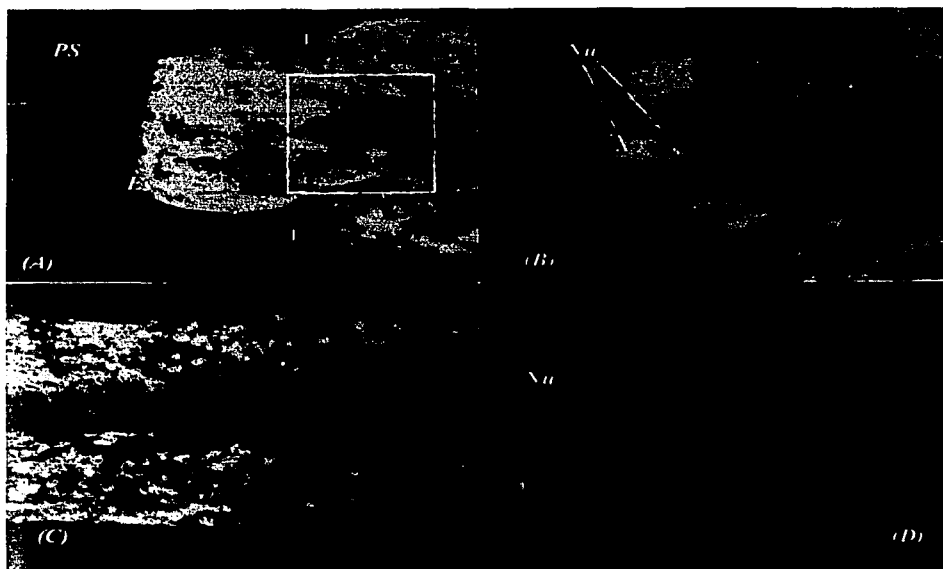


Figura 12. Expresión en el Gineceo de Plántulas transformadas con 35S::N-FLOR1-GFP (construcción #4). Las siguientes imágenes se tomaron de una planta adulta de *A.thaliana*, transformada con la construcción # 4. (A) y (B) En estas imágenes se muestra la colección de 35 cortes longitudinales de la parte superior del carpelo de una planta adulta. La expresión de la proteína quimérica se restringe dentro de la célula, específicamente en el citoplasma y en el núcleo de la mayoría de las células, la localización subcelular de la proteína es semejante en el estilo y el ovario. (B) Acercamiento de las valvas, el replum (Ovario) y el estilo, la fluorescencia se observa en el núcleo de algunas células epiteliales, así como delimitando la superficie celular. (C) Fusión de 42 cortes longitudinales de la parte media del ovario. (D) Corte óptico en células del estilo, la localización intracelular de la proteína se observa claramente dentro de la célula, específicamente en núcleo y parece estar compartamentalizada dentro del citoplasma.

(Abreviaturas; V, Valva, PS, Papila Estigmática, Es, Estilo, Ov, Óvulo, Pl, Placenta, Nu, Núcleo).

En cuanto a las otras estructuras vegetales, las dos proteínas quiméricas mostraron una regionalización en toda la periferia celular, así como una clara localización nuclear en las células de la epidermis de los cotiledones. A diferencia de los estomas de las estructuras superiores la localización subcelular de las proteínas se concentró en la región perinuclear de las células guarda y en el límite celular de las mismas (Figura 13 A y B).

En algunos tejidos como meristemo, cotiledón y ovario, la acumulación de las proteínas dentro del citoplasma se encontró compartimentalizada en unos posibles organelos en forma de diatomea (Figura 13B y D), mientras que en otras células muy vacuoladas la forma del citoplasma aparecía como una delgada capa entre las membranas de la célula y la vacuola.

La localización subcelular de las proteínas quiméricas 35S::N-FLOR1::GFP #1 y #4 en la raíz, nos permitió observar claramente la disposición celular en las diferentes capas del tejido radicular, así como el plano de división celular en el cortex y la endodermis. En los tejidos de este órgano las proteínas se encontraron compartimentalizadas dentro del citoplasma de varias formas en la misma célula (burbujas, cilindros), pero siempre excluyendo al núcleo y a veces la fluorescencia parecía estar rodeando al núcleo celular (perinuclear) (Figura 13 C y D).

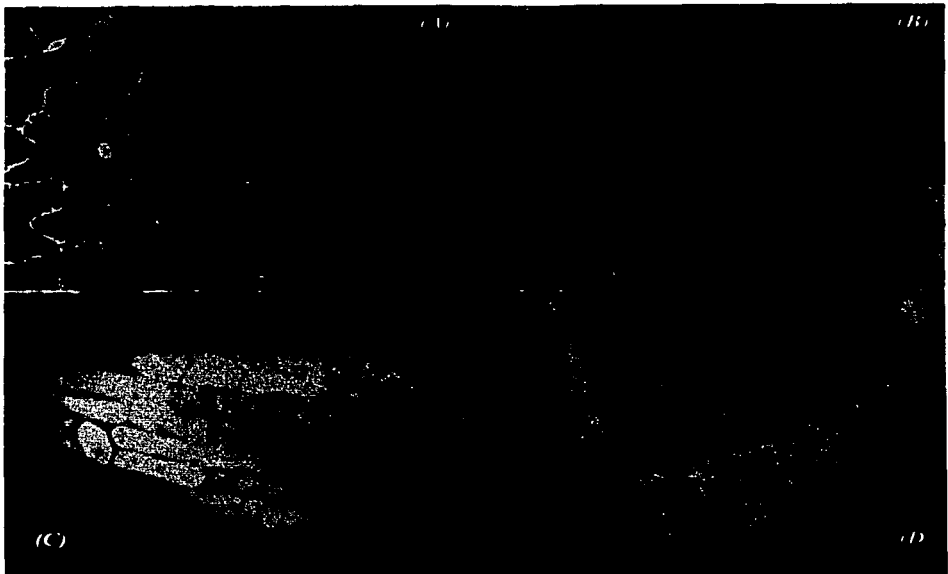


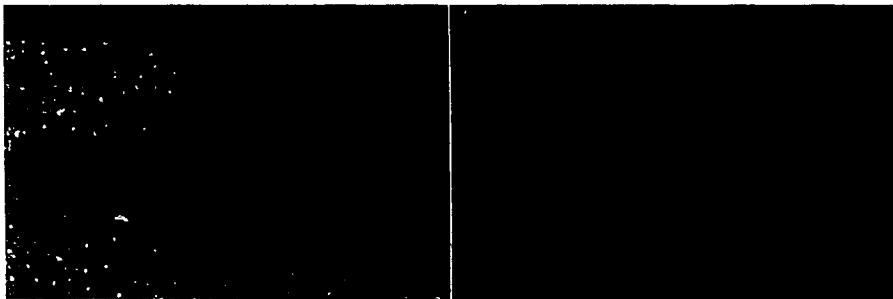
Figura 13. Expresión de las construcciones 35S::N-FLOR1-GFP (#1 y #4) en Cotiledón y la Raíz.

(A) Corte longitudinal del cotiledón de una planta transformada con la construcción #1 en donde se observa claramente la localización subcelular de la proteína. En esta imagen se muestra a la proteína intracelular en el citoplasma y en el núcleo de las células de la epidermis del cotiledón, así como en la periferia de la misma. (B) Aumento de la imagen anterior. Aquí se muestra que la proteína no está homogéneamente distribuida dentro del núcleo celular (célula de epidermis), además se ve a la proteína rodeando al núcleo y a las células guarda del estoma. (C) Corte longitudinal de raíz. Expresión de la proteína quimérica en la planta transgénica 35S::N-FLOR1-GFP donde se muestra el patrón de expresión de la construcción #1. (D) Corte longitudinal de la parte media de la raíz. Aquí se ve a la proteína dentro de las células de la punta de la raíz compartimentalizada en unos organelos y en la región perinuclear dentro del citoplasma.

(Abreviaturas; *N*, Núcleo, *CG*, Células guarda, *PS*, Papila Estigmática, *Ov*, Óvulo, *Pl*, Placenta, *Es*, Estomas).

A) 35S::N-FLOR1-GFP (construcción #1) parte media del carpelo.

Control.



B) 35S::N-FLOR1-GFP (construcción #4), parte apical del carpelo.

Control.

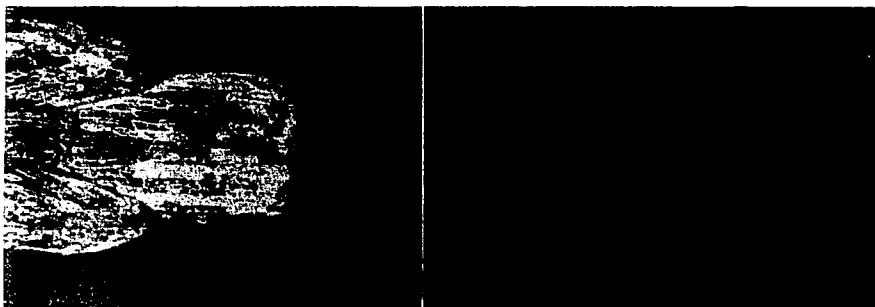


Figura 14 . Controles. A) Control de la construcción #1 en el panel derecho y B) Control de la construcción #4 en el panel derecho.

Discusión

Los factores de transcripción se han descrito como proteínas modulares que contienen una variedad de dominios de unión al DNA, activación, represión e interacción con otras proteínas (Schwechheimer *et al.*, 1998). Estos funcionan como centros de la integración de señales, las cuales pueden ser adquiridas por diferentes vías de señalización celular (extra o intracelular). El conocer como se llevan a cabo y como se regulan estas vías de señalización celular es de suma importancia en el estudio del desarrollo vegetal (Doebley and Lukens, 1998).

Se ha comprobado que dos proteínas que no pertenecen a la familia MADS interactúan *in vitro* con AGAMOUS. Estas proteínas son una proteína fosfatasa de 29kDa (VSP1), la cual ya había sido descrita con el nombre "vegetative storage protein" (VSP1, GenBank número de acceso AB006777) y otra rica en leucinas de 36kDa a la cual se le denominó FLOR1 (GenBank número de acceso AC069472) (Gamboa *et al.*, 2001).

Las proteínas con dominios repetidos ricos en leucina se encuentran presentes en todos los eucariontes y se han localizado tanto en el espacio extracelular como en el citoplasma (Kajava, 1998), por lo que la localización celular de FLOR1 es de gran importancia.

FLOR1 es una proteína nueva y en el laboratorio se ha demostrado que la expresión del gen que codifica para esta proteína es específica de los meristemos de inflorescencia y floral (Gamboa *et al.*, 2001), así como de estambres y carpelos (Acevedo *et al.* enviado). También se demostró *in vitro* que existe un complejo formado por las proteínas VSP1, FLOR1 y AGAMOUS, que hay una interacción directa entre el VSP1-FLOR1 con AGAMOUS y además una interacción *in vitro* entre FLOR1 y AGAMOUS (Gamboa *et al.*, 2001). Estos resultados aunados a que a nivel celular la expresión de FLOR1 coincide espacio-temporalmente con los patrones de expresión de AGAMOUS (Acevedo *et al.* enviado), sugieren que la proteína rica en leucina FLOR1 es una proteína que pudiera estar involucrada en un sistema de transducción de señales con el factor de transcripción AGAMOUS (Gamboa *et al.*, 2001). De ser así FLOR1 sería la primera proteína del tipo no-MADS reportada como interactivo de proteínas MADS. Hasta ahora sólo se han identificado

a las proteínas con dominio MADS como proteínas que interactúan con las proteínas MADS (Hua-Ying, *et al.*, 1997; Yong-Hwan *et al.*, 1999). Por lo tanto, su caracterización es de suma importancia ya que puede convertirse en una herramienta útil para entender como se integran las señales de los factores de transcripción entre las células durante el desarrollo floral.

Para corroborar que FLOR1 y AGAMOUS pueden interactuar *in vivo*, era imprescindible que coincidieran tanto en tiempo como en espacio y además que se localizaran en los mismos compartimentos celulares en algún momento del desarrollo floral. Por ello el conocer la localización subcelular de la proteína rica en leucina utilizando técnicas moleculares (GFP-Microscopia Confocal) que permitan la visualización directa de la proteína en la planta *in vivo* fue imprescindible en este proyecto.

Simultáneamente con este trabajo se llevó a cabo la inmunolocalización de FLOR1 con anticuerpos policlonales, estos datos revelaron que los patrones de expresión de FLOR1 se localizaban dentro de las células de los diferentes tejidos observados (Acevedo *et al.* enviado). Así mismo al realizar la localización subcelular de la proteína rica en leucina pudimos probar que FLOR1 y AG coinciden en espacio y tiempo en algunos compartimentos celulares, además de que se corroboraron los datos anteriores utilizando una metodología distinta con la que fue posible analizar el tejido *in vivo*.

La utilización de la proteína verde fluorescente (GFP) como marcador molecular en este proyecto nos dio varias ventajas con respecto a otros tipos de marcadores. Los tejidos que expresan ésta proteína (GFP) son monitoreados principalmente *in vivo*, usando técnicas que dañan menos al tejido como la fluorescencia. Con este marcador se pueden seguir las líneas transgénicas, además de que las transformantes se rescatan directamente plantando las semillas. A diferencia de los marcadores enzimáticos la GFP se puede visualizar con gran resolución en tejidos vivos utilizando microscopia confocal, las imágenes no contienen artefactos causados por la fijación o tinción (inmunocitoquímicas β -glucuronidasa). Así mismo, durante las observaciones se puede analizar la dinámica celular *in vivo* tomando en cuenta que es posible la combinación de diferentes tipos de fluorocromos. En conjunto

todas estas características hicieron a la proteína verde fluorescente una herramienta ideal en este proyecto, además de que tiene un potencial enorme en el estudio de la biología celular y del desarrollo de *A. thaliana* y otros organismos modelo (Haseloff, 1999a).

La localización subcelular de las diferentes construcciones de FLOR1 en las cuales se expresó la proteína completa (construcción #1) y gran parte de la región amino terminal (construcción #4) presentaron un fenotipo muy similar siendo mucho mas fuerte la expresión en la construcción #4. Esto corroboró nuestra hipótesis inicial ya que la expresión de la proteína se localizó dentro de las células del gineceo, específicamente dentro del núcleo y citoplasma de la mayoría de las células de los tejidos analizados. En estos tejidos también se había descrito antes la presencia de AGAMOUS. Estos resultados difieren con lo reportado en la literatura anteriormente, en donde Kajava señala que las proteínas pertenecientes a la subfamilia PS (Plant Specific) con características similares a FLOR1 son proteínas que se encontraban en el espacio extracelular funcionando posiblemente como receptores celulares (Kajava, 1998). Aunque FLOR1 cuenta con dominios de aminoácidos hidrofóbicos los cuales podrían hallarse en esta zona, parece que las señales de localización celular que posee esta proteína en su región amino terminal juegan un papel decisivo en la localización subcelular de la proteína (Tao *et al.*, 2000). Al mismo tiempo, las proteínas de esta familia presentan una estructura general que les confiere la capacidad de interactuar de manera "específica" con otras proteínas (Kajava, 1998), esta característica esta dada por la exposición de las regiones hipervariables de aminoácidos hidrofílicos; esta especificidad podría ubicar a FLOR1 como otro tipo de LRR dentro de la misma familia (PS).

La concentración y actividad de los factores de transcripción está regulada a nivel post-transcripcional (degradación del mRNA, splicing, splicing alternativo etc) y post-traducciona (unión a un ligando, fosforilación, desfosforilación, dimerización, interacción proteína-proteína) (Calkhoven, 1996; Schwechheimer *et al.*, 1998). Estudios previos con LRR y proteínas similares muestran que estas proteínas podrían jugar un papel muy importante en la regulación en las modificaciones post-transcripcionales y post-traduccionales de los factores de transcripción (Kobe, 1994; 1995).

La actividad de los factores de transcripción y en especial la de las proteínas tipo MADS, se modifica fuertemente por las interacciones con otras proteínas influenciando positiva o negativamente las características de unión, potencial de activación, localización subcelular (nuclear) o en el tráfico a diferentes organelos dentro de la célula. Ejemplo de esto son otras proteínas tipo MADS, APETALA1 y PISTILLATA, en donde estudios *in vitro* revelan que es necesaria la interacción de las dos proteínas como heterodímero para que estas se transloquen del citoplasma al núcleo celular y así iniciar la formación de pétalos y pistilos (McGonigle *et al.*, 1996); también se ha reportado que se pueden llegar a unir como tetrámeros (Honma and Coto, 2001; Theissen and Saedler, 2001), lo que sugiere que las actividades de las proteínas MADS están influenciadas por la interacción directa con diferentes familias de cofactores a través del dominio MADS, por lo que existe la posibilidad de que FLOR1 funcione como regulador de AGAMOUS modificando las características de unión de esta u otras proteínas es viable.

Durante las observaciones en el microscopio confocal fue sencillo discernir la arquitectura de los tejidos intactos y la ultraestructura celular, así como el arreglo de los diferentes tipos celulares en las distintas secciones ópticas de la punta de la raíz y los cotiledones. Por ejemplo, dentro de las células de la epidermis del cotiledón se encontraban contenidos algunos cloroplastos, así como las filas de células periféricas (epidermis) de la raíz. Las células de cotiledón fueron fácilmente distinguibles debido a que la expresión de la proteína se encuentra pegada a la membrana y/o pared celular. Por otro lado, los estomas resaltaron a la vista ya que las células guardas y sus núcleos se encontraron fuertemente marcadas por la señal de las proteínas. En el carpelo de las plantas que expresaron la construcción #1, las valvas del ovario presentaron un patrón de expresión predominantemente nuclear, mostrando estomas bien definidos a lo largo del estilo. En la papila estigmática la señal de la construcción #1 se observó con mayor intensidad que en el estilo y el estigma. En el ovario propiamente dicho, la señal de la construcción #4 se encontró principalmente en el citoplasma aunque algunas células del estilo presentaron señal nuclear.

En las células del meristemo radicular la señal de la GFP se acumuló fuera del núcleo, mientras que en el citoplasma resaltaron varios compartimentos endomembranosos de forma ahusada que se encontraron tanto en cúmulos como dispersos.

Debido a que la localización subcelular de FLOR1 fue distinta en los tejidos observados, la ubicación de FLOR1 no parece depender solamente de su secuencia sino que probablemente depende de señales particulares o exclusivas de cada tejido, las cuales pueden ser generadas por fitoreguladores *in situ*. Estas señales seguramente varían dependiendo del estado de desarrollo de la planta así como de la localización de la señal dentro del sistema celular, de esta manera, FLOR1 podría estar llevando a cabo alguna función bioquímica que propicie la formación de otros complejos protéicos entre AG, VSPI, otros AGL's ó con de proteínas cercanamente relacionadas con AG (Fan, *et al.* 1997; Álvarez-Buylla, *et al.* 2000; Gamboa, *et al.* 2001).

AG, SHATTERPROOF1 (SHP1), SHATTERPROOF2 (SHP2) Y AGL11 se encuentran dentro de la familia tipo II (Álvarez-Buylla, *et al.* 2000), son factores de transcripción tipo MADS, son proteínas específicas de la flor, también se encuentran en el carpelo (Theissen, 2000) y además estas proteínas comparten el decapeptido que se utilizó como sustrato en la columna de afinidad con la que se aisló a FLOR1. Esto abriría la posibilidad de que FLOR1 pueda interactuar y/o reclutar a alguna de estas proteínas modificando sus propiedades bioquímicas en algún momento en el desarrollo.

Conclusiones

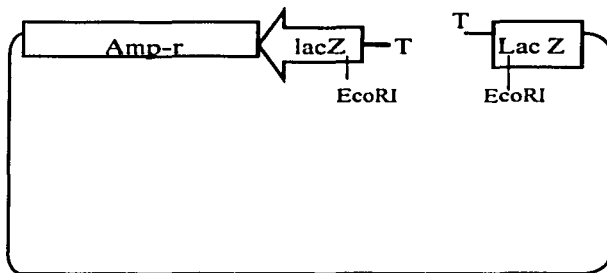
En este trabajo demostró que las proteínas quiméricas FLOR1-GFP bajo el control del promotor CaM35S se localizaron intracelularmente en las plantas transgénicas de *A.thaliana*, además utilizando una metodología distinta, fué posible analizar el tejido *in vivo*, sin ningún tipo de fijación, con lo que se reforzaron y corroboraron los datos obtenidos previamente en el laboratorio.

Aunque FLOR1 se encontró dentro del citoplasma, su localización subcelular fue diferente en los tejidos observados: en el carpelo la señal se observó tanto en citoplasma como en el núcleo de las células del estilo y las valvas. En las células de la epidermis del cotiledón la fluorescencia se observó en el núcleo y en la membrana citoplasmática. En la raíz la expresión fue solamente citoplasmática y en algunos la proteína se encontró compartimentalizada en cuerpos de forma ovoide.

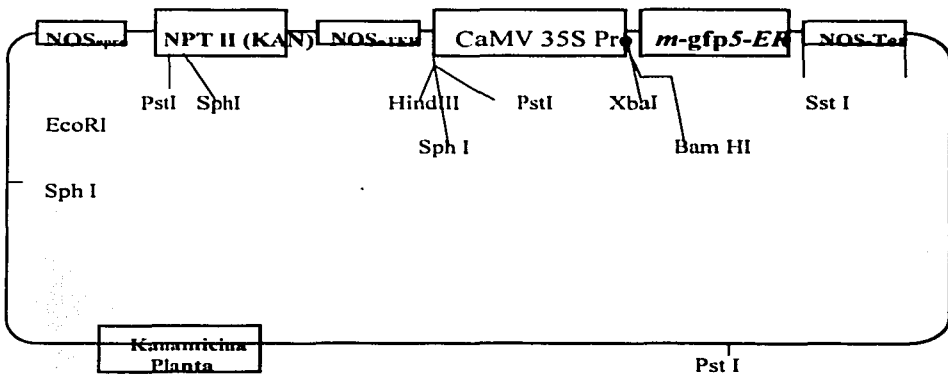
Con la localización subcelular de la proteína rica en leucina pudimos probar que FLOR1 y AG coinciden en espacio y tiempo en algunos compartimentos celulares. El que FLOR1 interactúe con AGAMOUS y otras proteínas de la familia MADS pondría de manifiesto a la primer interacción entre proteínas de tipo MADS con proteínas externas a esta familia.

Los resultados que se obtuvieron en esta tesis, así como los obtenidos en el laboratorio indican que pudiera existir una interacción *in vivo* entre FLOR1 y AGAMOUS, por lo que continuar con su caracterización es muy importante ya que puede convertirse en una herramienta útil para entender como se integran las señales de los factores de transcripción entre células durante el proceso de desarrollo.

APENDICE I. *Vectores*



pGEMTeasy 3015pb.



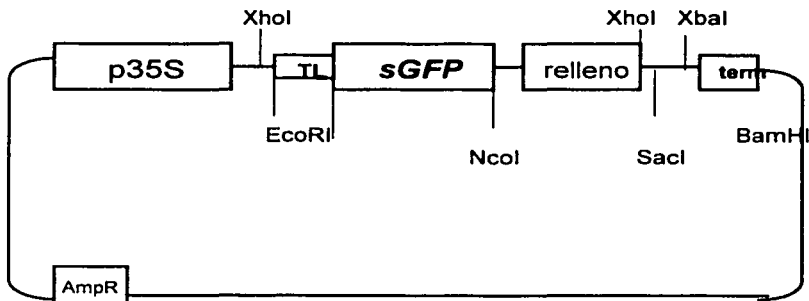
pBin m-gfp-ER (16 kb)

750

150

720

550



pGFP-MRCp (5kb)

Apéndice II. *Protocolos y Medios*

Reacción de PCR:

ddH ₂ O	Xµl (para completar volúmen)
Buffer 10X	5µl
MgCl ₂ (25mM)	3µl
dNTP's (10mM-2.5nm c/u)	1µl
Primer Forward/5' (10µM)	1µl
Primer Reverse/3' (10µM)	1µl
Templado (1:10)	Xµl
Enzima taq / pfu (10:1)	<u>0.5µl</u>
Vol.Final	50µl

Reacción de ligación:

Buffer ligación 10X	2µl
Vector pGEMTeasy	1µl
DNA (inserto)	6µl
Ligasa T4	<u>1µl</u>
Vol. Total	20µl

Incubación a 4°C durante toda la noche.

Reacción klenow

8µl DNA pBin (-GFP)/XbaI- SstI
1µl c/dNTP's (10mM-2.5nm c/u)
0.5µl Klenow (2.5 U/µl)
11.5µl ddH₂O
1hora a 37°C y 10'
a 70°C para desactivar

Reacción de desfosforilación

Fosfatasa alcalina (Boehringer) 1µl
DNA 2.0µl
Buffer 2.5µl
ddH₂O 1.5µl
60 minutos a 37°C

Transformación E.coli por choque térmico

- Añadir 50µl de células competentes TOP10 a cada de ligación.
- Incubar en hielo 20 minutos.
- Incubar las células a 42°C de 45-50 segundos y regresar al hielo.
- Añadir 950µl de medio LB líquido a cada tubo.
- Incubar 1h30minutos a 37°C en agitación.
- Centrifugar un minuto a 6000rpm.
- Retirar parte del sobrenadante y resuspender el pellet en los 100µl restantes y plaquear 50µl por cada caja de petri en medio LB.
- Incubar o/n a 37°C.

Protocolo de miniprep

- Poner 1.5ml de cultivo en un tubo Eppendorf.
- Centrifugar un minuto a 8000rpm y eliminar sobrenadante.
- Resuspender el pellet en 150µl STET.
- Añadir 10µl de lisozima (10mg/ml).
- Incubar durante 40sec en agua hirviendo.
- Centrifugar 10' a 1000rpm.
- Quitar pellet con palillo.
- Añadir 150µl de isopropanol frío, a el sobrenadante obtenido y mezclar.
- Centrifugar 10minutos a 12500rpm a 4°C, quitar sobrenadante.
- Lavar el preparado con 200-300µl ETOH 70%.
- Centrifugar 5minutos a 12500rpm. Quitar sobrenadante y dejar que seque el pellet.
- Resuspender en 20µl de agua destilada.
- Añadir 1µl de RNasa (10mg/ml).

Protocolo de Transformación por Electroporación

- Descongelar las células (AGL0) en hielo.
- Pre-enfriar la celda de electroporación.
- Mezclar 10ng de plasmido con las células (40ml) y transferir a la celda.
- Aplicar un pulso de 2.5kV, 25 mf, 200°12.5kv/cm con k=4.7ms.
- Añadir 1ml de LB, incubar por 1hr a 30°C con agitación ocasional.
- Plaquear una alicuota de las células en cajas de LB con el antibiótico respectivo, incubar por 2 días a 30°C.

Medio LB(líquido)

Caseína/triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.5% y antibiótico 1µl/ml (50µl/ml)

Medio LB(sólido)

Caseína/triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.5%, Agar 1.5% y antibiótico 1µl/ml (50µl/ml).

Buffer 10X

100mMKCl, 60mM (NH₄)₂SO₄, 200mM tris-Hcl (pH 8.0), 20mM MgSO₄,
1% Triton X-100 y 1mg/ml BSA

Protocolo de Transformación por infiltración de *A.thaliana*.

Preparación de las plantas

1.- Preparar macetas de 2 1/4 pulg. (blancas) cón metromix y se cubren con malla-tul (pastelitos). Tratar de que la malla cuede lo mas pegada al suelo para que las plántulas puedan emerger más rápido.

2.- Sembrado de semillas: Resuspender unas 300 semillas en TC agar 0.1 % por cada charola con 36 macetas. Plantar dos semillas en cinco puntos de cada maceta. Vernalizar las semillas guardando las macetas sembradas por al menos dos días a 4°C. Después pasar las macetas a cámaras de 22°C. Una semana después de la germinación retirar una de las plátulas y dejar la más sana.

3.- Crecer las plantas ha.-ta un estado en el que el tallo pase por lo menos 1-5 cm arriba (de la roseta). Decapitación: Cortar la punta del tallo donde están emergiendo la inflorescencia para inducir la floración de inflorescencias secundarias. No cortar todo el tallo, hacerlo unicamente arriba de la hoja caulina.

La infiltración debe hacerse después de 4 días de la decapitación. Eliminar vainas y flores fertilizadas.

Una noche antes de la infiltración debe regarse con bastante agua las charolas. (esto es para que no se absorba mucho de la suspensión de Agrobacterium).

Infiltracion.

4.-Cultivo para transformar. Preparar un precultivo de 10 ml de LB.+ el antibióhco (kanamicina), crecer un día completo a 30 °C. Inocular aprox. 1.5 lt de medio con antibiótico l y crecer al menos toda la noche.

5.- Medir la OD-600 del cultivo. Esta debe ser de 1.2-1.6. Colectar las células centrifugando (6000 rpm por 15 mm). Resuspender las bacterias en el medio de infiltración (ver receta al final del protocolo) hasta tenerlas a una OD600 de aprox. 0.8.

6.- Poner en el recipiente adecuado la suspensión de Agrobacterias y colocar las macetas invertidas sobre el recipiente para que las plantas estén en contacto con las suspensión de Agrobacteria. Las plantas deben estar totalmente sumergidas, incluyendo las rosetas. Mantenerlas así por 15 mm. La suspensión de bacterias puede usarse unas 3 veces.

7.- Quitar las macetas del dispositivo y dejarlas escurrir de lado en una charola. Cubrirlas con un domo y dejarlas en esta posición por 1 día incubandolas a 19 °C. Al día siguiente se quita el domo y se paran las macetas y se mantienen a la misma temperatura por dos semanas más.

8.- No regar por una semana o según que tan secas se vean las macetas.

9.-Al inicio de la tercera semana después de la transformación pasar las macetas a cámaras de 22 °C y mantenerlas ahí hasta que las vainas estén a punto de abrirse.

10.- Embolsar las plantas (puede ir más de una planta por bolsa), Colectar semillas cuando ya estén maduras.

Selección de transformantes

11.- Preparar las placas de selección (ver la receta del medio al final del protocolo). Cajas de Petri grandes son las más convenientes. Las cajas deben ser secadas perfectamente antes de usarse en la campana de flujo laminar.

12.- Esterilizar las semillas. Poner en un tubo falcon aprox. 800 μ l de semillas (volumen seco). Tratarlas como sigue, todo en condiciones estériles, es decir en campana de flujo laminar:

-10 min. en agua estéril.

-2 min. en Etanol 70 %.

-15 min en una solución de cloro 5% + 1 % SDS o Triton X100 0.1%)

-Lavar con agua estéril 5 veces

-Resuspender las semillas en TC agar 0.1 %.

-Guardar a 4°C por al menos 2 días.

13-Sembrar las semillas en las cajas de selección, poniendo gotas de aprox. 200 μ l. Dejar secar por lo menos media hora con la tapa de la caja Petri abierta en la campana de flujo laminar. Sellar las cajas con Micropore.

14- Incubar las cajas a 22 °C por al menos 10 días hasta que pueden distinguirse perfectamente las transgénicas de las que no llevan la construcción. Estas se miran como plántulas de color verde intenso y que pueden formar por lo menos el primer par de hojas verdaderas y tienen raíces robustas.

15- Tranplantar a suelo las plantas seleccionadas y mantenerlas cubiertas con domo hasta que se establezcan bien en las macetas.

Medios de Transformación.

Medio de Infiltración:

Para 1 lt.

1/2 X de Sales de Murashige-Skoog (2.2 g)

1/2Xde Vitaminas B5 (0.5-1 ml)

Sacarosa 5% (50g)

MES 0.5g

ajustar pH 5.7 con KOH

0.44uM de benzylaminopurina (10ml de un stock 1 mg/ml en DMSO por Lt)

0.02% Silwet L-77.

TC Agar:

0.1 % de Tissue Culture Agar (0.1g/100 ml)

Esterilizar por autoclave.

Medio de Selección de Transformantes (MS):

Para 1 lt.

1 X de Sales de Murshige-Skoog (4.4g)

1x de Vitaminas B-5

Sacarosa 1% (10 g/lt)

MESO.5g

ajustar pH 5.7 con KOH

Agar 0.8 % (8 g/ lt)

Antibiótico respectivo

Para la selección con Kanamicina 50 $\mu\text{g/ml}$ funciona bien para Columbia. Para Landsberg 30 mg/lt

Referencias

Acevedo, G. F., Gamboa, A. Paez-Valencia, J., Izaguirre Sierra, M., and Alvarez-Buylla, R. E. FLOR1, a putative interaction partner of the floral homeotic protein AGAMOUS, is a plant-specific intracellular LRR. Enviado a *Biochemical Journal* .

Alberts B., Bray, D., Lewis., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. 1994. Molecular Biology of the Cell. Cap. IV, V. Garland publishers. NY. USA.

Alonso-Blanco, C. and Koornneef, M. 2000. Naturally occurring variation in Arabidopsis: an underexploited resource for plant genetics. *Trends in Plant Science*. Vol 5. No.1 : 22-29

Alvarez-Buylla, R. E., Paez, S., Liljgren, S. J., Gold, SE., Burgeff, C., Ditta, G. S. Ribas de Pouplana, L., Martinez-Castilla, L. And Yanofsky, M. F. 2000. An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol 97: 5328-5333.

Bowman, J. 1994. Arabidopsis: An Atlas of Morphology and Development. Ed. Springer-Verlag Press, New York. USA.

Bowman, J., Baum, S., Eshed, Y., Putterill. And Alvarez J. 1999. Molecular Genetics of Gynoecium Development in *Arabidopsis*. *Current Topics in Developmental Biology*, Vol. 45 155-205.

Bowman, J and Yuval E. 2000. Formation and maintenance of the shoot apical meristem. *Trends in Plant Sciences* 5: 110-115.

Buchanan. B., Wilhelm. G., Russell, L. 2000. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. Cap. I. Ed. ASPP. USA

Calkhoven, C.F., Geert, A.B. 1996. Multiple Steps in the Regulation of Transcription Factor Level and Activity. *Biochemical. Journal*. 317: 329-342

Chiu, Wan-ling., Niwa, Y., Weiike, Z., Hirano, T., Kobayashi, H. and Sheen, J. 1996. Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Current Biology* , Vol.6 No 3: 325-330.

Coen, E. S. and Meyerowitz, E. M. 1991. The war of the whorls: Genetic interactions controlling Flower development. *Nature* 353, 31-37.

Doebley, and Lukens, L. 1998. transcriptional regulators and the evolution fo plant form. *Plant Cell*, 10, 1075-1082.

Gamboa, A., Paez, J., Acevedo, F., Vazquez-Moreno, L. and Alvarez-Buylla, E.. 2001. Floral Transcription Factor AGAMOUS interacts in vitro with a Leucine-Rich Repeat and an Acid Phosphatase Complex. *Biochem. Biophysics Res. Comm.* 288: 1018-1026.

Gerhart, J., Kirschner, M. 1997. Cells, Embryos and Evolution. Blackwell Science Publishers. USA.

Haseloff, J. Siemering, K. R. 1998. The Uses of GFP in Plants. GFP: Green Fluorescent Protein Strategies and Applications. In Applications and Protocols Chalfie, M. and Kain, S. Eds. John Wiley. MRC Laboratory of Molecular Biology. Cambridge, UK.

Haseloff, J. 1999a. GFP variants for multispectral imaging of living cells. In Methods in Cell Biology Vol. 58 Editors: Kevin Sullivan & Steve Kay. 1999. MRC Laboratory of Molecular Biology- Cambridge. UK

Haseloff, J., Dormand, E and Brand, A. 1999b. Methods in Molecular Biology: Protocols in Confocal microscopy in Chapter 17. Live imaging of green fluorescent protein. In Methods in Molecular Biology, Vol. 122: Confocal Microscopy Methods and Protocols. Paddock, S. Ed. Humana Press. MRC Laboratory of Molecular Biology- Cambridge, UK.

Honma, T., and Goto, K. 2001. Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature* **409**, 525-529.

Hua-Ying, F., Yi Hu, Matthew, T and Hong Ma. 1997. Specific interactions between the K domains of AG and AGL's, members of the MADS domain family of DNA binding proteins. *Plant Journal* Vol 12 (5): 999-1010.

Jackson, D and Hake S. 1997. Morphogenesis on the move: cell-to-cell trafficking of plant regulatory proteins. *Current Opinion in Genetics and Development*. **7**: 495-500.

Kajava, A.B. 1998. Structural Diversity of Leucine-rich Repeat Proteins. *Journal of Molecular Biology* (1998) **277**, 519-527.

Kobe, B., Deisenhofer, J. 1994. The leucine-rich repeat : a versatile binding motif. *Trends Biochemical Science* **19**:415-421.

Kobe, B., Deisenhofer, J. 1995. A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands. *Nature*. Vol **374**. 183-186.

Leffel, S. M.; Mabon, A. and Stewart N. 1997. Applications of Green Fluorescent Protein in Plants. *BioTechniques* **23**: 912-918.

McGonigle, B., Bouhidel, K., and Irish, V.F. 1996. Nuclear Localization of the Arabidopsis APETALA3 and PISTILLATA homeotic gene products depends on their simultaneous expression. *Genes and Development* Vol **10**: 1812-1821.

Meinke, D., Cherry, M., Dean, C., Rounsley, S., Koorneef, M. 1998. *Arabidopsis thaliana* : A model Plant for Genome Analysis. *Science*. Vol **282** 662-682

- Meyerowitz, E. 1989. Arabidopsis, a Useful Weed. *Cell*, vol. 56: 263-269.
- Meyerowitz, E. 1999a. Today we have naming of parts. *Nature*, 402: 731-732.
- Meyerowitz, Et. 1999b. Plants, animals and the logic of development. *Millenium issue TCB, TIBS, TIG*. M65-M68.
- Meyerowitz, Elliot. 2001. Prehistory of Arabidopsis Research. *Plant Physiology*, 125: 15-19.
- Moon, Yong-Hwan, Hong-Gyu K, Ji-Young, J, Jong-Seong, J, Soon-Kee and Gynheung An. 1999. Determination of the Motif Responsible for interaction between the Rice APETALA/AGAMOUS-LIKE9 Family Proteins Using a Yeast Two-Hybrid System. *Plant Physiology* Vol 120: 1193-1203.
- Old, R.W., Primrose, S.B. 1994. Principles of Gene Manipulation. 5th Ed. Blackwell Science, MA, USA.
- Potrykus, I., Spangenberg, G. 1995. Gene Transfer to Plants. Ed. Springer, Lab Manuals. NY.
- Reichmann, J. and Meyerowitz, E. 1997. MADS domain proteins in plant development. *Journal .Biological Chemistry*, 378, 1079-1101.
- Rodríguez-Concepción, M., Yalovsky, S., et al. 1999. The prenylation status of a novel plant calmodulin directs plasma membrane or nuclear localization of the protein. *The EMBO Journal* Vol. 18 No. 7 pp. 1996-2007
- Rounsley, S., Ditta, G., Yanofsky, M. 1995. Diverse Roles for MADS Box Genes in Arabidopsis Development. *The Plant Cell* Vol 7, 1259-1269.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular Cloning a Laboratory Manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Stephen Howell. 1998. Molecular Genetics of Plant Development. Ed. Cambridge University Press, New York.
- Sharbel, T., Haubold, B., Mitchell-Olds, T. 2000. Genetic isolation by distance in *A.thaliana*: biogeographic and postglacial colonization of Europe. *Molecular Ecology*, 9: 2109-2118.
- Shore, P. and Sharrocks, D. 1995. The MADS-box family of transcription factors. *Eur. J. Biochem*, 229: 1-13.

Schwechheimer, C., Zourelidou, M., Bevan, M. 1998. Plant Transcription Factors Studies. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 127-50.

Schwechheimer, C., Bevan, M. 1998. The Regulation of Transcription Factor Activity in Plants. *Trends in Plant Science*. Vol3. No. 10 pàg. 378-383.

Suzuki, N., Choe, H., Nishida, Y., Yamawaki-Kataoka, Y., Ohnishi, S., Tamaoki, T. and Kataoka, T.. 1990. Leucine-rich repeats and carboxyl terminus are required for interaction of yeast adenylate cyclase with RAS proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol 87. pp8711-8715.

Tao, Y., Yang, F., Leister, R. 2000. Mutational analysis of the Arabidopsis nucleotide binding site-leucine-rich repeat resistance gene RPS2. *Plant Cell* 12: 2541-2554.

Theissen Gunter, Becker, A., Di Rosa, A., Kanno, A., Kim, J., Munster, T., Winter, K and Saedler, H. 2000. A Short History of MADS-box genes in Plants. *Plant Molecular Biology*, 42: 115-149.

Theissen Gunter and Heinz Saedler. 2001. Floral quartets. *Nature*. Vol 409: 469-471.

The Arabidopsis Genome initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815.

Thomas, Jack. 2001. Plant Development going MADS. *Plant Molecular Biology*, 46: 515-520.

Torii, U., K. 2000. Receptor kinase activation and signal transduction in plants: an emerging picture. *Current Opinion in Plant Biology*, 3: 361-367.

Tsien, R. Y. 1998. The Green Fluorescent Protein. *Annual. Review. Biochemistry*. 1998. 67: 509-44.

Turner, P.C., McLennan, A.G. and White, M. 1997. Instant Notes in Molecular Biology. Bios. Scientific Publishers. Springer-Verlag, N.Y., USA.

Xiaorong Zhang, 1998. Leucine-rich Repeat Receptor-like Kinases in Plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 16: 301-311.

Zambryski, P and Crawford, C. 2000. Plasmodesmata: Gatekeepers for Cell-to-Cell Transport of Developmental Signals in Plants. *Annal. Review of Cell Developmental Biology*. 16: 393-421.