



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**“Papel de la proteína de unión a Cap,
nCBP, en la floración de *Arabidopsis
thaliana*”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

P R E S E N T A

Q.F.B. Susana De la Torre Díaz



MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. Patricia Leon
VOCAL: Dra. Martha Patricia Coello Coutiño
SECRETARIO: Dr. Jose Luis Reyes Taboada
SUPLENTE: Dr. Rogelio Rodrigues Sotres
SUPLENTE: Dr. Francisco Javier Plascencia

SITIO EN DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

LABORATORIO 103, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

ASESORA

SUSTENTANTE

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

César Aguirre Martinez

INDICE

1. Resumen	1
2. Antecedentes	2
2.1 Mecanismos de inicio de la traducción	2
2.1.1 Iniciación de la traducción en procariontes	2
2.1.2 Iniciación de la traducción en eucariontes	5
2.2 El factor de inicio de la traducción eIF4E	9
2.3 Regulación de la traducción por miembros de la Clase II	11
2.4 nCBP de plantas	12
2.5 <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo de estudio	14
2.6 Floración en <i>Arabidopsis thaliana</i>	15
2.7 Regulación de la floración en <i>Arabidopsis thaliana</i>	16
2.7.1 Vía del fotoperiodo	17
2.7.2 Vía de las giberelinas	18
2.7.3 Vía de vernalización	19
2.7.4 Vía autónoma	20
2.7.5 Integración de las vías de floración	23
3. Antecedentes directos	25
3.1 Expresión del transcrito de nCBP a lo largo del desarrollo de <i>A. thaliana</i>	25
3.2 Caracterización genotípica y fenotípica de la mutante <i>ncbp-1</i>	25
4. Hipótesis	27
5. Objetivo general	28
6. Objetivos particulares	28
7. Material y Métodos	29
7.1 Material Biológico	29
7.2 Obtención de ácidos nucleídos	29
7.2.1 Extracción de RNA total	29
7.2.2 Extracción de DNA genómico	30
7.2.3 Purificación de DNA plasmídico	31
7.2.4 Purificación de DNA a partir de gel de agarosa	32
7.2.5 Cuantificación de ácidos nucleídos	32
7.3 RT-PCR	33
7.4 Digestión con enzimas de restricción	34
7.5 Clonación de DNA	34
7.5.1 Clonación de fragmentos de DNA en el vector pGEM-Teasy	34
7.5.2 Clonación de fragmentos de DNA en el vector pBIN(35S)GUS	36
7.5.3 Clonación de la región codificante de un gen en el vector de entrada pENTR/D-TOPO	36
7.5.4 Clonación del inserto del vector de entrada al Vector de salida pEarleyGate 103	37
7.5.5 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	37
7.6 Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> por Floral Dip.	38
7.7 Microscopia confocal	40
7.8 Evaluación del tiempo de floración	40
8. Resultados	42
8.1 nCBP participa en la regulación de la vía autónoma	

de floración	42
8.2 nCBP está involucrado en la regulación de la expresión de genes de la vía autónoma de floración	44
8.3 nCBP podría regular la expresión de genes involucrados en la embriogénesis	47
8.4 La sobreexpresión de nCBP-GFP no produce alteración en la floración ni en la embriogénesis de la planta	48
8.4.1 Obtención de plantas transgénicas que sobre-expresan la proteína nCBP-GFP en <i>Arabidopsis thaliana</i>	48
8.4.2 La sobre-expresión de nCBP-GFP no produce alteración en la floración.	52
8.5 nCBP es una proteína citoplasmática	52
8.6 Obtención de plantas mutantes <i>pnCBP::GUS</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i>	53
9. Discusión	56
10. Conclusiones	65
11. Perspectivas	66
12. Bibliografía	67
13. Apéndice	71

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general del inicio de la traducción en procariontes	5
Figura 2. Esquema general del inicio de la traducción en eucariontes	7
Figura 3. Esquema del inicio de la traducción en plantas	8
Figura 4. Miembros de la familia eIF4E de la clase II en diferentes organismos	9
Figura 5. Inhibición de la traducción de mensajeros específicos por d4E-HP	12
Figura 6. Perfil de expresión de la proteína nCBP en <i>A. thaliana</i> en diferentes tejidos	13
Figura 7. Patrón de expresión de los principales genes de identidad del meristemo floral en Arabidopsis	16
Figura 8. Vías de floración de <i>A. thaliana</i>	17
Figura 9. Vía del fotoperiodo	18
Figura 10. Mecanismo de silenciamiento de <i>FLC</i> mediado por la vernalización	20
Figura 11. Transcritos de <i>FCA</i>	21
Figura 12. Esquema general de genes y sus productos involucrados en la floración de <i>A. thaliana</i>	24
Figura 13. Perfil de expresión de <i>nCBP</i> en <i>A. thaliana</i>	25
Figura 14. Caracterización genotípica de la mutante <i>ncbp-1</i> (SALK_131503.32.70.x)	26
Figura 15. Caracterización fenotípica de la floración para la mutante <i>ncbp-1</i>	43
Figura 16. Análisis por RT-PCR de los niveles de mRNA de distintos genes de floración en diferentes días del desarrollo en plantas silvestres y <i>ncbp-1</i> .	45
Figura 17. Nivel de expresión de genes de floración en la mutante <i>ncbp-1</i>	46
Figura 18. Análisis por RT-PCR de distintos genes de la vía autónoma en diferentes días del desarrollo en plantas silvestres y <i>ncbp-1</i>	47
Figura 19. Frecuencia de semillas abortadas en la mutante <i>ncbp-1</i>	48
Figura 20. Clonación del ORF nCBP en el vector pENTR/D-TOPO	49
Figura 21. Clonación de <i>ncbp</i> en el vector pEarleyGate103	49
Figura 22. Secuenciación de <i>nCBP</i> fusionado a <i>GFP</i>	50
Figura 23. Caracterización molecular de las plantas transgénicas	50
Figura 24. Expresión de la proteína de fusión nCBP-GFP en tres líneas independientes de plantas transgénicas	51
Figura 25. Caracterización de plantas transgénicas.	52
Figura 26. Localización subcelular de nCBP-GFP en protoplastos de <i>A. thaliana</i>	53
Figura 27. Región 5' de <i>nCBP</i>	54
Figura 28. Clonación de la región 5' de <i>nCBP</i>	55
Figura 29. Alineamiento del fragmento de <i>pnCBP</i> secuenciado a partir de <i>pnCBP</i> en pGEM-Teasy con la región 5' reportada en bases de datos (RSA-tools)	55
Figura 30. Localización citoplasmática de SGs, PBs y HSGs.	56
Figura 31. Esquema de las alteraciones en la expresión de genes de la vía autónoma presentadas en la mutante <i>ncbp-1</i> .	59
Figura 32. Genes de la vía autónoma de floración y la regulación de <i>FLC</i>	60
Figura 33. Modelos de la posible regulación traduccional mediada por nCBP	64

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de diversas proteínas de la familia eIF4E de clase II	11
Tabla 2. Análisis fenotípico de dobles mutantes de genes involucrados en la vía autónoma de floración	22

ABREVIATURAS

DNA	Acido desoxiribonucleico
eIF	Factores de iniciación eucarioticos
mRNA	RNA mensajero
nt	Pares de bases
ORF	Región codificadora del mRNA
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNA	Acido ribonucleico
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcriptasa reversa
UTR	Región no traducible del mRNA
µL	microlitro
µg	microgramo
mL	mililitro
mg	miligramos
L	litro

1. RESUMEN

nCBP (novel CAP Binding Protein) es una de las proteínas que se unen a la estructura CAP presente en el extremo 5' de los mRNAs eucarióticos y pertenece a la clase II de la familia eIF4E. Los estudios con proteínas ortólogas de nCBP en otros organismos sugieren que miembros de la clase II regulan la traducción de mRNAs específicos durante el desarrollo. En *A. thaliana* se ha caracterizado a nCBP como una proteína de 24 kDa capaz de llevar a cabo la traducción *in vitro*, de interactuar con los factores de inicio de la traducción eIF4G y eIFiso4G y de mostrar una mayor afinidad por la estructura CAP que los otros dos miembros de esta familia pertenecientes a la clase I: eIF4E y eIFiso4E.

Estudios fenotípicos de la mutante *ncbp-1* en *A. thaliana* muestran que la ausencia de esta proteína conduce a un retraso en el tiempo de floración. La floración representa la transición de la fase vegetativa a la fase reproductiva de la planta. Este proceso se ve afectado por factores ambientales como el fotoperíodo y la temperatura, factores hormonales como presencia de giberelinas así como por señales endógenas (vía autónoma). El objetivo principal de este trabajo fue dilucidar la participación de nCBP en la regulación de la floración e identificar qué gen o genes de las vías de floración alteraban su expresión en la mutante *ncbp-1* de *A. thaliana*.

Para analizar el retraso de floración presente en la mutante *ncbp-1* se analizó el fenotipo en condiciones de día corto (DC), de día largo (DL), de tratamiento con ácido giberélico (GA) y bajo vernalización. Los resultados mostraron que la mutante mantuvo un retraso en el tiempo de floración bajo DL, DC y GA y que este fenotipo se revirtió cuando se sometió a la planta a vernalización. Esto sugiere que nCBP participa en la vía autónoma que regula la floración. Para comprobar estos resultados se evaluaron los niveles de expresión de genes representativos de las cuatro vías de floración y de la mayoría de los genes de la vía autónoma. Se observó que la mutante *ncbp-1* presentó alteración en los niveles de expresión de los genes *AGL28*, *FCA* y *FLC* (genes de la vía autónoma) y no de los demás genes evaluados. Debido a antecedentes bibliográficos en los que se reporta que mutantes en genes de la vía autónoma presentan letalidad embriogénica se evaluó la aborción de embriones en la mutante *ncbp-1* y se encontró letalidad embriogénica en un 13%.

En conjunto, se concluyó que la ausencia de nCBP produce letalidad embriogénica parcial y conduce a un retraso en el tiempo de floración al alterar la expresión de genes de la vía autónoma en *Arabidopsis thaliana*.

2. ANTECEDENTES

Una de las áreas de mayor importancia para comprender el funcionamiento de los seres vivos es la regulación de la expresión de sus genes. El DNA es la molécula que contiene la información genética en los organismos y su expresión implica la transcripción de esta información a moléculas de RNA mensajero (mRNA). Posteriormente, esta información es decodificada a moléculas de polipéptidos, las cuales llevan a cabo la función del gen correspondiente.

La traducción de mRNA a proteína se puede dividir en tres distintas fases; iniciación, elongación y terminación. El paso más complejo es la fase de iniciación e involucra un gran número de factores reguladores. Este evento ocurre tanto en procariontes como en eucariontes y entre estos organismos existen variaciones importantes en este mecanismo dadas, en parte, por la separación espacio-temporal de la transcripción y la traducción en los eucariontes.

2. 1. MECANISMOS DE INICIO DE LA TRADUCCIÓN

2.1.1 Iniciación de la traducción en procariontes

El proceso de inicio de la traducción fue elucidado durante los años 1960 y 1970 mediante estudios bioquímicos que utilizaban aminoácidos marcados radioactivamente y lisados fraccionados derivados de células de bacterias y de mamíferos.

En procariontes, la traducción está acoplada temporal y espacialmente a la transcripción, permitiendo el inicio de la síntesis de proteínas a partir de un mRNA que aún está siendo transcrito. Estos mRNA son usualmente policistrónicos, es decir, poseen múltiples genes y por lo tanto el mensajero codifica para múltiples proteínas. El reconocimiento del mRNA por el ribosoma ocurre mediante la

secuencia Shine-Dalgarno ubicada, en general, 10 bases río arriba del codón de inicio. Esta secuencia es complementaria a una secuencia en el extremo 3' del RNA ribosomal 16S, que forma parte de la subunidad pequeña 30S del ribosoma. El inicio de la traducción en procariontes requiere de tres factores de inicio de la traducción; IF1, IF2 e IF3 (Choi *et al*, 2000).

La síntesis de proteínas ocurre en los ribosomas que consisten en dos subunidades, una grande y una pequeña, cada una formada por rRNA y proteínas específicas. El ribosoma consta de tres sitios: el sitio A, el sitio P y el sitio E. El sitio A es el punto de entrada para el aminoacil-tRNA (excepto para el primer aminoacil-tRNA, fmet-tRNA, que entra en el sitio P). El sitio P es donde se forma el peptidil-ARNt. Y el sitio E es el sitio de salida del tRNA una vez descargado tras ofrecer su aminoácido a la cadena peptídica en crecimiento. Para la síntesis de proteínas, también se requiere de moléculas de tRNA, que están plegadas en una estructura secundaria con forma de hoja de trébol. Estas moléculas pequeñas pueden llevar un aminoácido en un extremo y tienen un triplete de bases, el anticodón, en un asa central, en el extremo opuesto de la molécula. La molécula de tRNA es el adaptador que aparea el aminoácido correcto con cada codón de mRNA durante la síntesis de proteínas. Hay al menos un tipo de molécula de tRNA para cada tipo de aminoácido presente en las células. Las enzimas conocidas como aminoacil-tRNA sintetasas catalizan la unión de cada aminoácido a su molécula de tRNA específica.

El mecanismo de inicio de la traducción en procariontes comienza con la disociación de la subunidad 70S, la cual está formada por las subunidades 30S y 50S en un equilibrio dinámico y con el fMet-tRNA (N-formil-metionil-tRNA), éste es el tRNA iniciador que es generado por la formilación del metionil-tRNA. El factor de inicio IF2, unido a GTP, detecta el único grupo formilmetionil del tRNA iniciador; de esta manera, sólo se une a fMet-tRNA y no a los tRNA aminoacilados implicados en la elongación. Posterior a esto, se une el fMet-tRNA-IF2-GTP al mRNA y esta unión no es específica de la unión codón-anticodón del codón de

inicio de la traducción (Figura 1). El factor IF3 se une establemente a la subunidad ribosomal 30S y previene su re-asociación con la subunidad 50S. La subunidad 30S unida a IF3 se une subsecuentemente a IF1. IF1 evita la unión prematura del fMet-tRNA al sitio A de la subunidad ribosomal 30S ya que IF1 se coloca directamente en el sitio A. Éste complejo ternario (30S-IF3-IF1) sufre un cambio conformacional que genera un complejo más estable.

El complejo 30S-IF3-IF1 se une al complejo fMet-tRNA-IF2-GTP-mRNA para formar el complejo de preiniciación 30S (Figura 1. Laursen *et al.*, 2005). Posterior a este evento, existe una interacción codón-anticodón de codón de inicio de la traducción entre el tRNA de inicio y el mRNA, mediante el apareamiento del codón de inicio presente en el mRNA y su anticodón presente en el fMet-tRNA. Este evento forma el complejo de iniciación 30S (Figura 1). Una vez formado este complejo, se liberan los factores IF3 e IF1, mientras que IF2 estimula la asociación con la subunidad 50S al complejo. Una vez ajustado correctamente el codón de inicio en el sitio P, IF2 se libera del complejo y durante este proceso el GTP unido a IF2 se hidroliza a GDP y Pi. El complejo de iniciación 70S resultante es competente para entrar a la fase de elongación (Figura 1. Laursen *et al.*, 2005).

Cerca de 90% de los mRNA bacterianos inician la síntesis de proteínas en el codón AUG; otros en los codones GUG (8%) y UUG (1%). Estos tres codones son llamados canónicos, basándose en la no discriminación entre ellos por IF3. Otros codones como AUU son llamados no canónicos, ya que los discrimina IF3 y son utilizados mucho menos frecuentemente. Una vez reconocido el codón de inicio se da paso a la elongación y terminación de la síntesis de proteínas (Choi *et al.*, 2000).

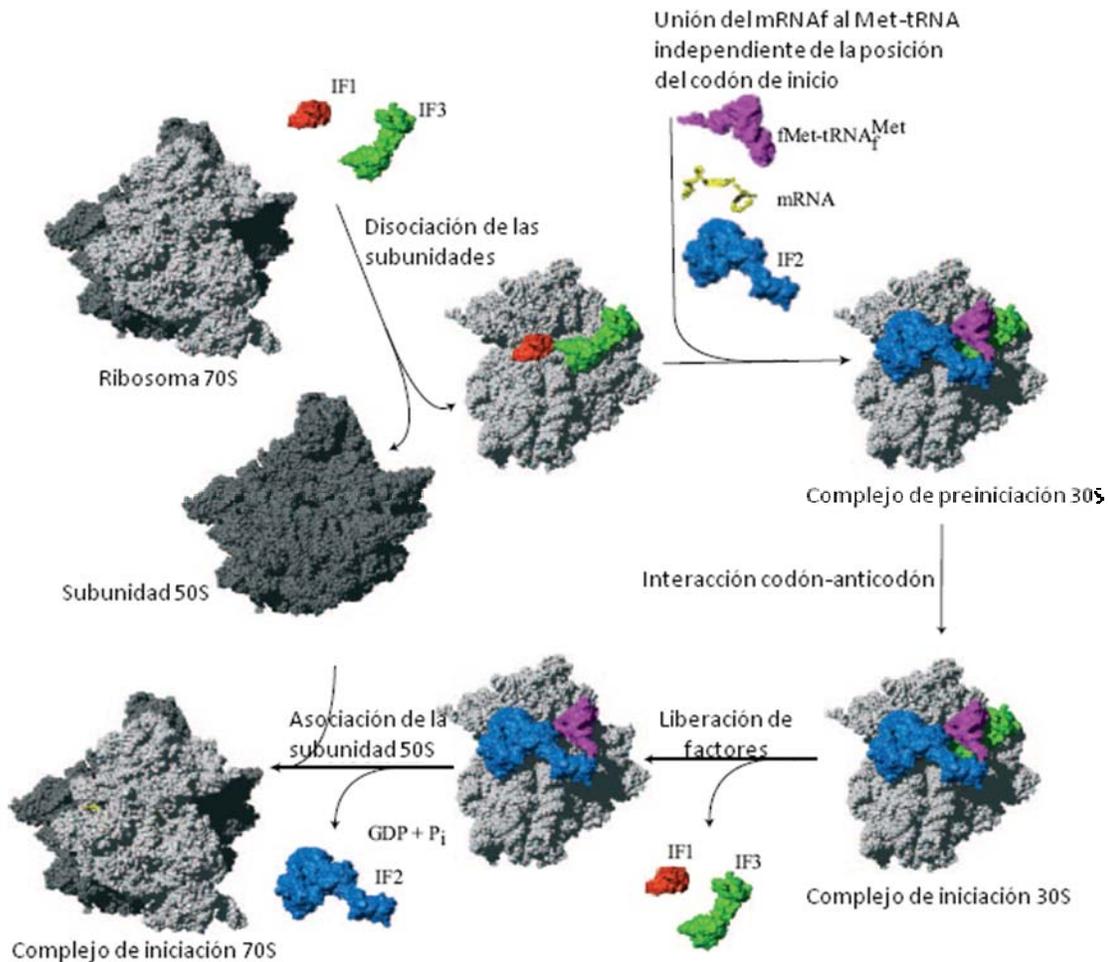


Figura 1. Esquema general del inicio de la traducción en procariontes.

2.1.2 Iniciación de la traducción en eucariontes

A diferencia de los procariontes, el mRNA de eucariontes debe sufrir procesamientos post-transcripcionales como son la adición del CAP en el extremo 5': CAP (m7GpppX, donde X es cualquier nucleótido); la adición de una cola de poliadeninas en el extremo 3': poly(A); y la remoción de intrones. El mRNA maduro es monocistrónico, contiene dos regiones importantes que no son traducibles (UTR) y que están en cada extremo de la molécula: 5'UTR y 3'UTR, flanqueando la región codificadora del mRNA (ORF).

Todos los mRNA eucarióticos (excepto aquéllos presentes en organelos) tienen en su extremo 5' el CAP y no contienen una secuencia Shine-Dalgarno. En la mayoría de los eucariontes (pero no en plantas y hongos) la penúltima base (X) es también metilada en el hidroxilo 2' de la ribosa y la estructura de CAP resultante es llamada CAP 1; cuando la posición no está metilada se llama CAP 0. El CAP facilita la traducción del mRNA y es importante para otros procesos incluyendo la remoción de intrones y la estabilidad del propio mRNA. La cola de poli(A) en el extremo 3', varía en longitud desde 50 bases de largo en levaduras a más de 200 bases de largo en eucariontes superiores. Este elemento juega un papel importante en la estabilidad del mRNA y en la eficiencia de la traducción (Gingras *et al*, 1999). El inicio de la síntesis de proteínas en todos los organismos empieza con las subunidades ribosomales separadas (Figura 2A).

Durante la etapa de iniciación de la traducción en eucariontes, el reclutamiento de un mRNA hacia el ribosoma es mediado por al menos 10 factores de iniciación (eIF). Este grado de complejidad refleja los múltiples pasos en el proceso y los mecanismos elaborados para su regulación. El tRNA iniciador aminoacilado forma un complejo ternario con el factor eIF2 y GTP que se une a la subunidad 40S (Figura 2A. Gingras *et al*, 1999).

El mRNA, por lo general, es reconocido por la maquinaria de traducción mediante el factor eIF4E que se une a la región 5' CAP. El eIF4E forma el complejo eIF4F mediante su interacción con la molécula de anclaje, el factor eIF4G y la helicasa eIF4A (Figura 2B).

Posteriormente, eIF4G es capaz de reclutar a eIF3, que se encuentra unido a la subunidad ribosomal pequeña 40S y a la helicasa eIF4B (Figura 2C). El factor eIF3 forma un complejo multimérico con eIF4G, eIF1A, eIF2-tRNA^{met} y eIF5 para el escaneo de la región 5'UTR del mRNA hasta encontrar un codón de inicio AUG en el contexto adecuado (Figura 2C y D). Una vez encontrado el codón de inicio de la traducción AUG, el complejo de iniciación activado permite la interacción del

factor eIF5 con el factor eIF2 y se activa la hidrólisis de GTP unido a este factor (Figura 2E). La hidrólisis de GTP promueve la liberación de algunos factores de iniciación y permite la unión de la subunidad 60S para formar el ribosoma 80S (Figura 2F. Gingras *et al*, 1999).

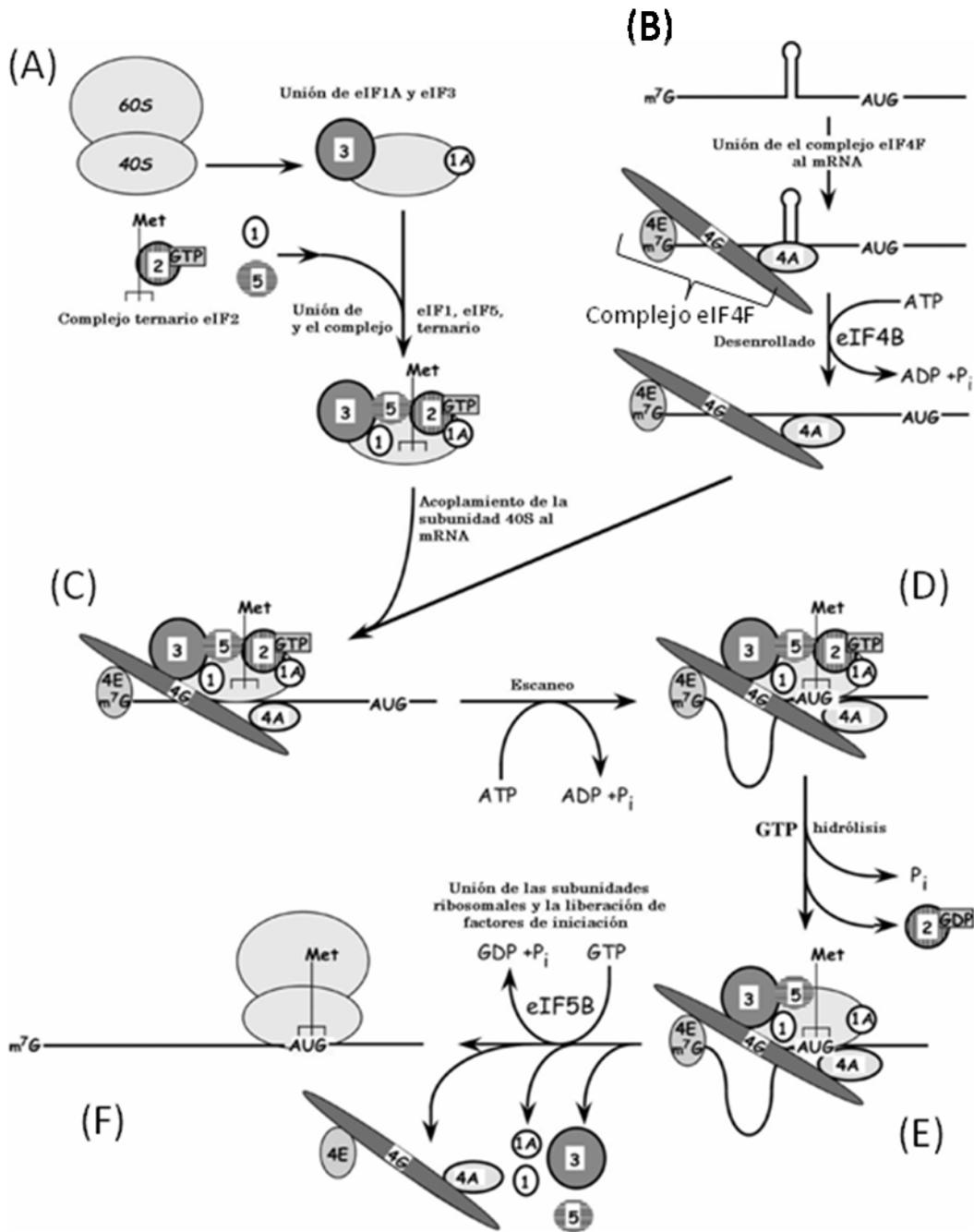


Figura 2. Esquema general del inicio de la traducción en eucariotes.

La presencia de otros eIF como eIF1 y eIF5 facilitan la unión del tRNA iniciador al sitio P y es excluido del sitio A ribosomal. Además, el tRNA iniciador tiene una secuencia y estructura únicas que no se encuentran en los tRNA de elongación, éstas propiedades permiten que interaccione con el factor eIF2. Finalmente, la interacción del mRNA con el complejo eIF4F también contribuye a su estabilidad, a través de la interacción entre eIF4G y la proteína de unión a poli(A) (PABP), garantizando la circularización del mRNA e incrementando su eficiencia de traducción. (Figura 3; Robaglia y Caranta, 2006). Aun no se sabe si esta circularización estimula la traducción directamente o es el resultado de un aumento de la afinidad de los factores de inicio de la traducción por el mRNA (Kahvejian *et al.*, 2005)

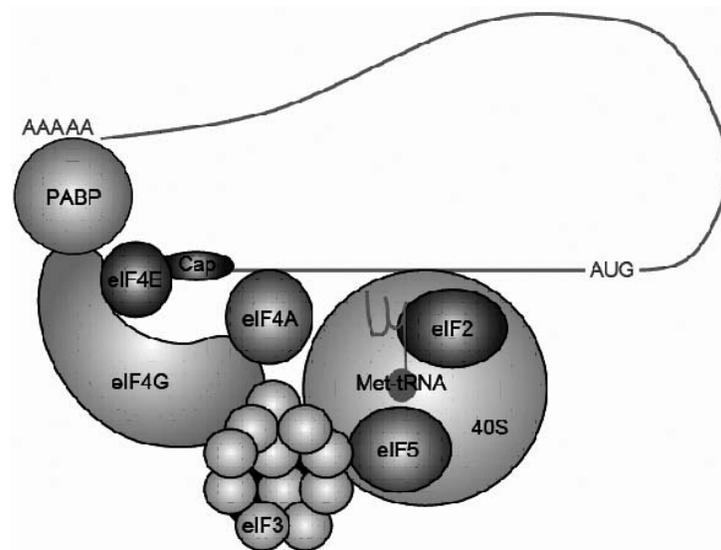


Figura 3. **Esquema del inicio de la traducción en plantas.** Se reclutan los factores de inicio de la traducción gracias al factor eIF4G que sirve como molécula de anclaje para la proteína PABP y de eIF4E, promoviendo la circularización del mRNA, incrementando la eficiencia de la traducción. Este mismo factor sirve de anclaje para el complejo eIF3, de tal forma que se reclutan todos los factores de inicio de la traducción y así poder iniciar la síntesis de proteínas. (Modificado de Robaglia *et al.*, 2006)

2.2 EL FACTOR DE INICIO DE LA TRADUCCION eIF4E

El complejo eIF4F es un complejo de unión al CAP que consiste de eIF4E, eIF4G y eIF4A. De estos factores, sólo eIF4E reconoce el CAP. La gran mayoría de los organismos eucariontes, a excepción de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, tienen múltiples miembros de la familia eIF4E que están altamente conservadas: existen tres miembros en mamíferos, llamadas eIF4E-1, 4EHP y eIF4E-3; tres en plantas, eIF4E, eIFiso4E, nCBP; cinco en *C. elegans*; dos en *Dario renio*; dos en *Xenopus*; dos en *Schizosaccharomyces pombe*; dos en *Leishmania* y ocho en *Drosophila* (Joshi. *et al*, 2005). Algunas isoformas de eIF4E están restringidas a ciertos grupos filogenéticos, por ejemplo eIFiso4E que sólo se encuentra en plantas (Browning *et al*, 1992; Browning, 1996). En todos los organismos que presentan varios miembros de la familia eIF4E, sólo un miembro es expresado constitutivamente y parece ser el responsable del papel general dentro de la traducción. Este miembro es nombrado eIF4E-1 en *Drosophila*, eIF4E-1 en mamíferos, eIF4E en plantas, IFE-3 en *C. elegans* (Hernández *et al.*, 2005).

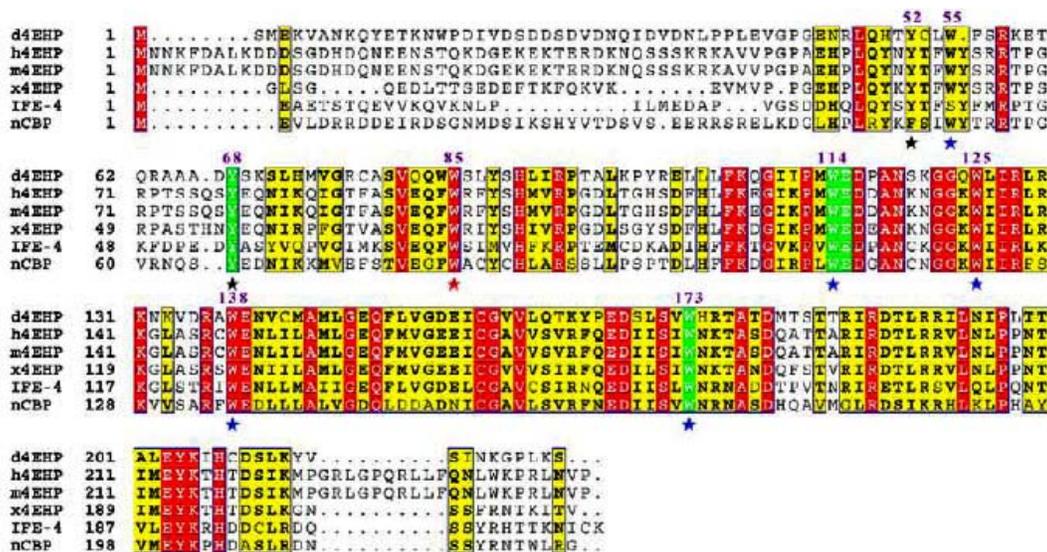


Figura 4. Miembros de la familia eIF4E de la clase II en diferentes organismos. Alineamiento de la secuencia de miembros de la clase II en *D. melanogaster* (d4EHP), *H. sapiens* (h4EHP), *M.musculus* (m4EHP), *X. laevis* (x4EHP), *C. elegans* (IFE-4), y *A. thaliana* (nCBP). Aminoácidos idénticos marcados en rojo y los aminoácidos conservados en amarillo.

Los miembros de la familia eIF4E se han agrupado en 3 clases. Los de la clase I contienen un residuo de Trp equivalente al Trp-43 y Trp-56 del factor eIF4E-1 de *H. sapiens* y parecen estar presentes en todos los eucariontes. Los miembros de la clase II poseen un Tyr o Phe o Leu en la posición correspondiente al Trp-43 y Tyr o Phe en la posición correspondiente al Trp-56 de eIF4E-1 de *H. sapiens* y están presentes en animales, plantas y hongos. Los miembros de la clase III poseen un Trp equivalente al Trp-43 pero con una Cys o Tyr en la posición correspondiente al Trp-56 de eIF4E-1 de *H. sapiens* y se han identificado en cordados y mamíferos (Joshi *et al.*, 2005).

Los miembros de la Clase II comparten aproximadamente el 50% de identidad y un 70 - 80% de similitud con otros miembros de la misma clase (Figura 4). También tienen aproximadamente 30-35% de identidad y un 60-65% de similitud con miembros de la clase I (Joshi *et al.*, 2005).

Una forma de regulación que se ha observado para eIF4E es la fosforilación. Se propone que esta modificación estabiliza la interacción entre eIF4E, eIF4G y su unión al mRNA (Pestova *et al.*, 2000; Gingras *et al.*, 1999). En organismos eucariontes diferentes a las plantas, además de eIF4G, existen otras proteínas que interaccionan con eIF4E y regulan su actividad. Entre éstas se encuentra el factor 4E-BP (proteína de unión a 4E). La interacción del 4E-BP con eIF4E ocurre en el mismo sitio donde lo hace eIF4G. Por lo tanto, eIF4E es secuestrado por 4E-BP afectando la formación de complejos de iniciación y por ende la traducción. Cuando la célula requiere elevar los niveles de traducción, por ejemplo durante el crecimiento y división celular, 4E-BP es fosforilada por una vía de transducción de señales que responde a insulina y a factores de crecimiento. La proteína fosforilada pierde afinidad por eIF4E, liberándolo para el inicio de la traducción (Gingras *et al.*, 1999).

2.3 REGULACION DE LA TRADUCCION POR MIEMBROS DE LA CLASE II

Se ha propuesto que miembros de clase II de la familia eIF4E juegan un papel muy importante en la regulación de la traducción. En las especies donde se han estudiado este tipo de proteínas se ha visto una expresión ubicua pero con mayores niveles de expresión en ciertos tejidos (Tabla 1).

Tabla 1. Características de diversas proteínas de la familia eIF4E de clase II

Organismo	Proteína	Expresión	Interacciones
<i>D. melanogaster</i>	d4E-HP	Embriogénesis temprana	No interacciona con eIF4G, si con Bicoide
<i>C. elegans</i>	IFE-4	Expresado en neuronas de la cola y faringeas, músculos de la pared de cuerpo, espermateca y vulva.	Presente en complejos de inicio de la traducción
<i>H. sapiens</i> y <i>M. musculus</i>	h4E-HP	Ubicuo y con niveles altos en testículos	No interacciona con eIF4G, si con 4E-BP

En *C. elegans* la ausencia de IFE-4, miembro de la clase II, produce un defecto en la deposición de los huevos y afecta la eficiencia de traducción de un pequeño grupo de mRNA, sugiriendo que IFE-4 traduce selectivamente ciertos transcritos (Dinkova *et al*, 2005). En *D. melanogaster* la ausencia de la proteína d4E-HP produce defectos en la formación del eje antero-posterior durante la embriogénesis temprana. d4E-HP además de unirse al CAP se une a bicoide, una proteína de unión a una secuencia específica en el 3'UTR del transcrito de *Cad*, formando un círculo cerrado que impide el anclaje de los demás factores de inicio de la traducción, reprimiendo así la traducción de CAD (Figura 5. Cho *et al.*, 2005; Hernandez *et al*, 2005).

En *H. sapiens* y en *M. musculus* la proteína 4E-HP interacciona con 4E-BP (4E-binding protein), pero no con eIF4G, lo que sugiere que 4E-HP podría jugar un papel en el mecanismo de regulación de la traducción en estas dos especies (Rom *et al.*, 1998; Joshi *et al.*, 2004).

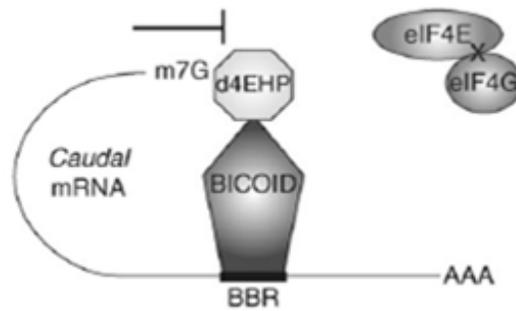


Figura 5. **Inhibición de la traducción de mensajeros específicos por d4E-HP.** d4E-HP se une al CAP del mensajero de Cad y a Bicoide, el cual se une específicamente a una región del 3'UTR del mismo mensajero. Esto forma un círculo cerrado que impide el anclaje de los demás factores de inicio de la traducción Tomado de Vardy et al., 2008

2.4 nCBP DE PLANTAS

Las plantas poseen al menos tres proteínas de unión a CAP: eIF4E, eIFiso4E y nCBP. Tanto eIF4E como eIFiso4E son miembros de la clase I y nCBP es el único miembro de la clase II. En *A. thaliana*, eIF4E pesa aproximadamente 26 kDa y eIFiso4E aproximadamente 28 kDa (Browning *et al.*, 1992). eIF4E y eIFiso4E tienen la misma actividad durante la traducción *in vitro* aunque un gran número de estudios sugieren que los dos complejos podrían tener diferente función *in vivo*. Primero, eIFiso4E tiene menor afinidad por análogos de CAP monometilados que por los análogos dimetilados, mientras que la preferencia de afinidad para eIF4E es el opuesto (Carberry y Goss, 1991).

Segundo, eIFiso4E tiene preferencia de unión a RNA con estructura lineal cerca del CAP, mientras que la unión por eIF4E es sensible a la posición y secuencia de estructuras tipo tallo-asa cerca del CAP.

Tercero, eIFiso4E tiene un pH óptimo (7.6) estrecho de unión a m7GpppG, mientras que eIF4E no tiene diferencia en el rango fisiológico de pH (6.8-7.6) (Carberry *et al.*, 1991).

Cuarto, se ha observado que eIFiso4E traduce preferencialmente mRNA que no tienen en el extremo 5' una región UTR larga y estructurada. Por último, los factores eIF4E y eIFiso4E de diferentes especies de plantas son expresados diferencialmente en tejidos y/o en diferente estado del desarrollo, lo que sugiere un grado de diversidad funcional (Rodríguez *et al.*, 1998; Gallie *et al.*, 1998; Manjunath *et al.*, 1999.)

En 1998 en *A. thaliana* se identificó la proteína de unión a CAP: nCBP (*novel CAP Binding Protein*). El gen *nCBP* (At5g18110) contiene 6 exones y 5 intrones y codifica para una proteína de 24 kDa (Ruud *et al.*, 1998).

nCBP es una proteína perteneciente a la clase II y tiene un residuo de Phe que corresponde al Trp-43 y un residuo de Tyr que corresponde al Trp-56 de eIF4E de *H. sapiens* (Figura 3). Esta proteína tiene una similitud del 58% e identidad del 33% a nivel de aminoácidos con el eIF4E de *A. thaliana* (Ruud *et al.*, 1998). Estudios de proteómica en *A. thaliana* sugieren que nCBP se expresa principalmente en botones florales (Figura 6), lo cual podría sugerir una función específica en este tejido.

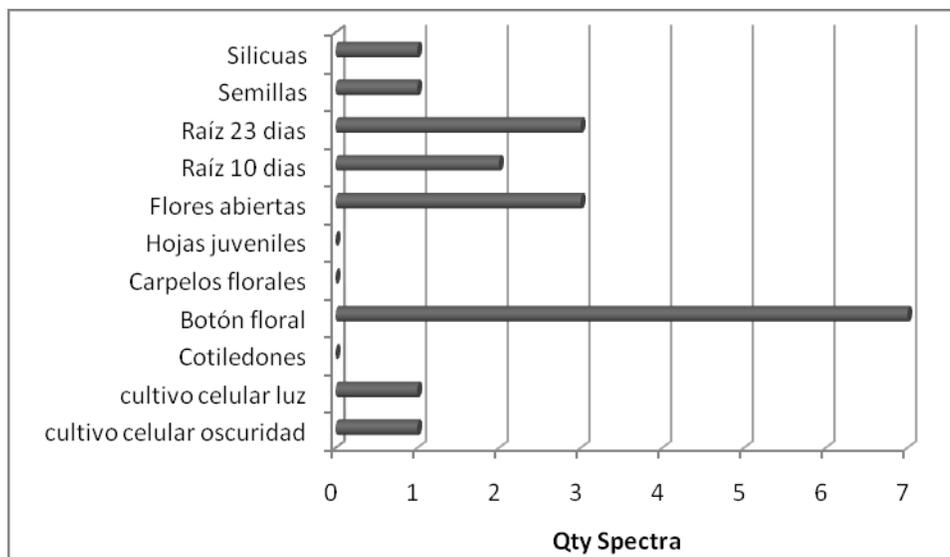


Figura 6. Perfil de expresión de la proteína nCBP en *A. thaliana* en diferentes tejidos. Tomado Stajich *et al.*, 2002.

nCBP interactúa *in vitro* tanto con eIFiso4G como con eIF4G, formando un complejo funcional que permite la traducción de mRNAs de manera CAP dependiente (aunque con menor eficiencia que eIF4E y eIFiso4E). nCBP tiene una muy alta afinidad por CAP, lo que sugiere que puede participar en el secuestro de mRNAs para así impedir su traducción (Ruud *et al.*, 1998).

Desde hace tiempo se ha planteado que los diferentes miembros de la familia eIF4E podrían participar en mecanismos de regulación traduccional específicos dependiendo del momento de desarrollo, tipo de tejido, y/o respuesta a un estímulo externo del organismo. Algunos estudios recientes han abierto nuevas perspectivas sobre esta hipótesis al encontrar funciones particulares para algunos de estos miembros en la regulación de la traducción de algunos mRNA específicos (Dinkova *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2005).

2.5 *Arabidopsis thaliana* COMO MODELO DE ESTUDIO

Arabidopsis thaliana ha llegado a ser uno de los sistemas biológicos más importantes para el estudio de muchos aspectos de la biología de las plantas. Es una planta dicotiledónea y desde el punto de vista del tiempo de floración es una planta facultativa de día largo; es decir, que puede florecer en un régimen de días cortos (unas 8-10 h de luz diarias equivalente a los días de otoño/invierno), pero en días largos (unas 16 h de luz diarias equivalente a los días de primavera/verano) se promueve una floración mucho más temprana, aproximadamente tres semanas después de la germinación de las semillas en comparación a dos meses en días cortos (Blázquez *et al.*, 2000). Estas características la convierten en un excelente sistema de estudio para el proceso de floración.

2.6 FLORACIÓN EN *Arabidopsis thaliana*

Con el nombre de floración se designa a la etapa del desarrollo con la que se inicia la fase reproductiva de la planta. La falta de movilidad de las plantas y sus características particulares de desarrollo han propiciado el establecimiento de mecanismos especializados de control del tiempo de floración que aseguren el éxito reproductivo y la permanencia de la especie.

Tras la germinación de la semilla, el meristemo apical inicia el desarrollo de la parte aérea de la planta. Este desarrollo es consecuencia de la producción repetitiva de primordios de órganos y células de tallo. Como consecuencia, se repiten estructuras similares que se han denominado fitómeros. Durante el desarrollo vegetativo las plantas están compuestas por un segmento del tallo y un nudo en el que se inserta una hoja con un meristemo axilar (Azcón-Bieto *et al.*, 2003). La floración puede considerarse como un cambio en este patrón básico de desarrollo donde como consecuencia se altera la estructura del fitómero, el desarrollo de la hoja se inhibe y el meristemo axilar se transforma en meristemo floral que se diferencia en una flor en lugar de una rama lateral. Esta transición es abrupta e irreversible, regulada por medio de una red de genes capaces de controlar estas transiciones espacial y temporalmente (Azcón-Bieto *et al.*, 2003; Parcy, 2005). Los genes directamente responsables de este cambio en la expresión genética del meristemo apical son los genes de identidad del meristemo floral (FMI por sus iniciales en inglés). Entre los genes FMI se encuentran *LFY*, *AP1*, *FUL*, *TF1*, *AGL24* y *FD*. Estos genes muestran un perfil de expresión específico en el meristemo antes y después de la transición floral (Figura 7. Blázquez *et al.*, 2006. Hempel *et al.*, 2000).

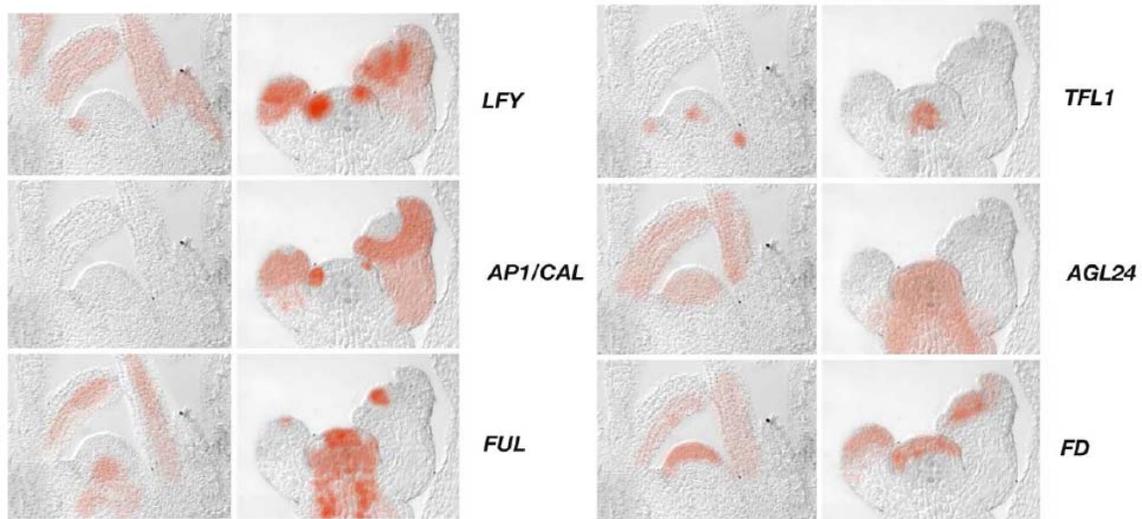


Figura 7. Patrón de expresión de los principales genes de identidad del meristemo floral en *Arabidopsis*. Expresión de mRNA de los genes FMI mostrados en color rojo en cortes longitudinales del meristemo apical antes (columna izquierda) y después (columna derecha) de la transición floral. Tomada de Blázquez *et al.*, 2006.

2.7 REGULACIÓN DE LA FLORACIÓN EN *Arabidopsis thaliana*

Los mecanismos moleculares responsables de la transición de la fase vegetativa a la fase reproductiva, que conllevan la adquisición de la madurez para florecer, aun no están descritos en su totalidad. El momento en que dicha transición ocurre está determinado por una complejidad de señales ambientales y/o endógenas. *Arabidopsis* es una planta facultativa de día largo y algunos ecotipos, como el ecotipo *Columbia* (Col-0), florecen tempranamente después de una exposición a un periodo de frío, tratamiento llamado vernalización (Azcón-Bieto *et al.*, 2003).

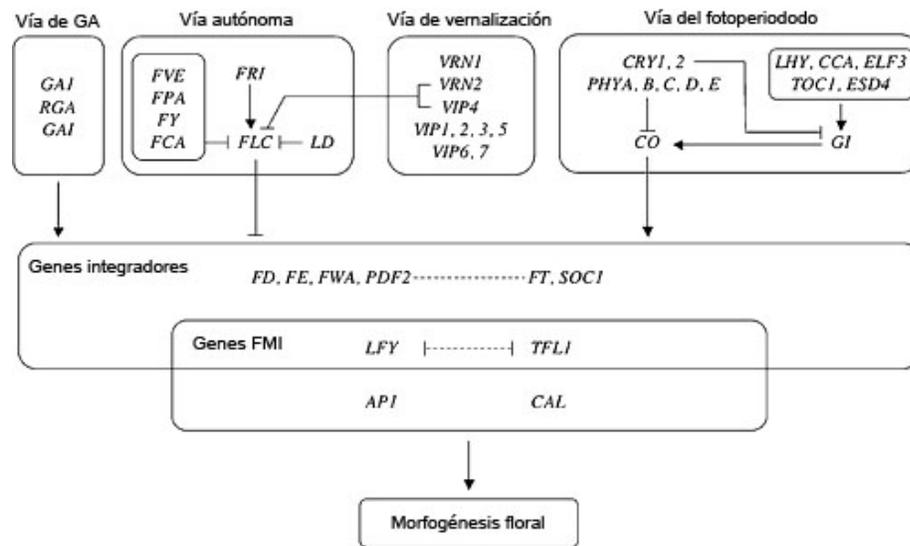


Figura 8. **Vías de floración en *A. thaliana***. La vía de Vernalización y la vía Autónoma convergen en la represión del gen *FLC*, el cual reprime a *FT*. La vía del fotoperíodo tiene dos genes principales: *GI* y *CO*; *GI* activa *CO*, el cual a su vez activa a *FT*. La vía de las giberelinas activa al gen *SOC1*. Tanto *FT* como *SOC1* son genes integradores de las cuatro vías y activan a los genes FMI los cuales son los encargados de la identidad del meristemo floral. Modificada de Parcy, 2005.

Análisis genéticos han identificado un grupo de mutantes con alteraciones en el tiempo de floración que permitieron identificar diferentes vías de floración de acuerdo a la respuesta frente a la vernalización o al fotoperíodo. A la fecha se han descrito cuatro vías interconectadas que rigen el tiempo de floración (Figura 8); vía del fotoperíodo, vía de las giberelinas (GA), vía de vernalización y vía autónoma.

2.7.1 Vía del fotoperíodo

La vía del fotoperíodo implica la regulación de tiempo de floración mediada por la luz y el ritmo del ciclo circadiano. *CO* (*CONSTANS*) es probablemente el actor principal de la vía del fotoperíodo (Imaizumi *et al.*, 2006) junto con *FT* (*FLOWERING LOCUS T*). *CO* es regulado positivamente por *GI* (*GIGANTEA*) y por las señales lumínicas percibidas a través de los fitocromos presentes en la hoja (Thomas, 2006). *CO* a su vez regula positivamente a *FT*, la cual viaja desde

las hojas a través del floema hacia el meristemo apical donde activa a los genes integradores y de esta manera promueve la floración (Figura 9).

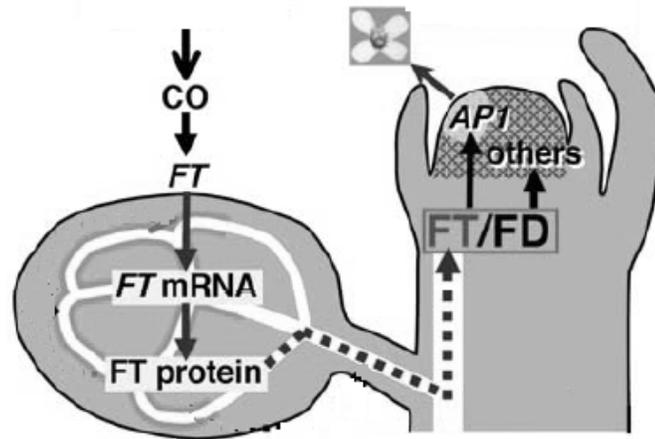


Figura 9. **Vía del fotoperíodo.** La luz es captada por diferentes fitocromos que activan la expresión de TOC1 el cual activa a CO que a su vez es regulado por otros fitocromos. CO activa a FT el cual viaja a través del floema hacia el meristemo apical. Modificada de Thomas 2006.

2.7.2 Vía de las giberelinas

Las giberelinas son ácidos carboxílicos diterpenoides tetracíclicos y se las representa como GAs, distinguiéndose una de otra por un subíndice: GA_{13} , GA_{20} , GA_{52} , etc. Una planta puede producir varias giberelinas, aunque no todas ellas sean activas. Se forman en ápices de tallos y raíces, en hojas jóvenes, partes florales, semillas inmaduras, embriones en germinación. En general las partes vegetativas contienen menos GA que las partes reproductivas, así las semillas inmaduras son ricas en GAs, aunque dichos niveles disminuyen a medida que éstas maduran. Algunas GAs son consideradas hormonas y estudios genéticos han confirmado que las giberelinas (GAs) aceleran la floración en *A. thaliana*. La vía de giberelinas está menos influenciada por los días cortos que por los días largos. Algunos estudios sugieren que en algunas especies vegetales la vernalización actúa por la vía de GA y en algunas especies la aplicación de ácido giberélico sustituye a la vernalización. Este no es el caso para *A. thaliana*, ya que la vía de vernalización y la de GA son independientes, lo que se ha demostrado

con mutantes que no pueden sintetizar GA las cuales aun responden a la vernalización (Chandler *et al.*, 2000). Los blancos de la vía de GA son los genes integradores *LFY* (*LEAFY*), *SOC1* (*SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS*) y *FT* (Boss *et al.*, 2004).

2.7.3 Vía de la vernalización

Las plantas anuales de invierno requieren de exposiciones prolongadas de frío para florecer rápido en el verano. Este proceso en el cual la floración es promovida por una exposición al frío se conoce como vernalización. Como ya se había mencionado, *A. thaliana* es una planta anual de invierno y esto se debe a que la proteína *FRI* (*FRIGIDA*) promueve altos niveles de expresión de represor de la floración *FLC* (*FLOWERING LOCUS C*). *FLC* es un factor de transcripción tipo MADS box que reprime a los genes integradores y por ende la floración. En *A. thaliana* la vernalización resulta en el silenciamiento mitótico de *FLC* de manera estable, es decir por modificaciones epigenéticas (Schmitz *et al.*, 2007). El estado reprimido de *FLC* “off” se acompaña de la presencia de heterocromatina facultativa y cuando hay un cambio de generación este estado se cambia a “on” y se activa la transcripción de *FLC*. Los genes que regulan este proceso epigenético se pueden dividir en cuatro complejos, cada uno con proteínas específicas (Figura 10): el complejo *FRI*, el complejo *SWR1*, el complejo *PAF* y el complejo *PRC2-like*. En el otoño los componentes de los complejos *FRI*, *PAF* y *SWR1* se requieren para mantener la cromatina de *FLC* en un estado activo. La actividad de estos complejos resulta en la expresión de altos niveles del mRNA de *FLC* bloqueando de esta manera la floración antes del invierno.

Más aún, el complejo *FRI* supera los efectos represivos de la vía autónoma de la floración y promueve un aumento del mensajero de *FLC*. Durante el invierno prolongado se induce la expresión de la proteína *VIN3* (*VERNALIZATION INSENSITIVE 3*) que interacciona con el complejo *PRC2-like* y silencia epigenéticamente a *FLC*. Este silenciamiento se mantiene gracias a las proteínas

VRN1 (VERNALIZATION 1) y LHP1 (LIKE-HETEROCHROMATIN PROTEIN 1) junto con el complejo PRC2-like (Schmitz *et al.*, 2007).

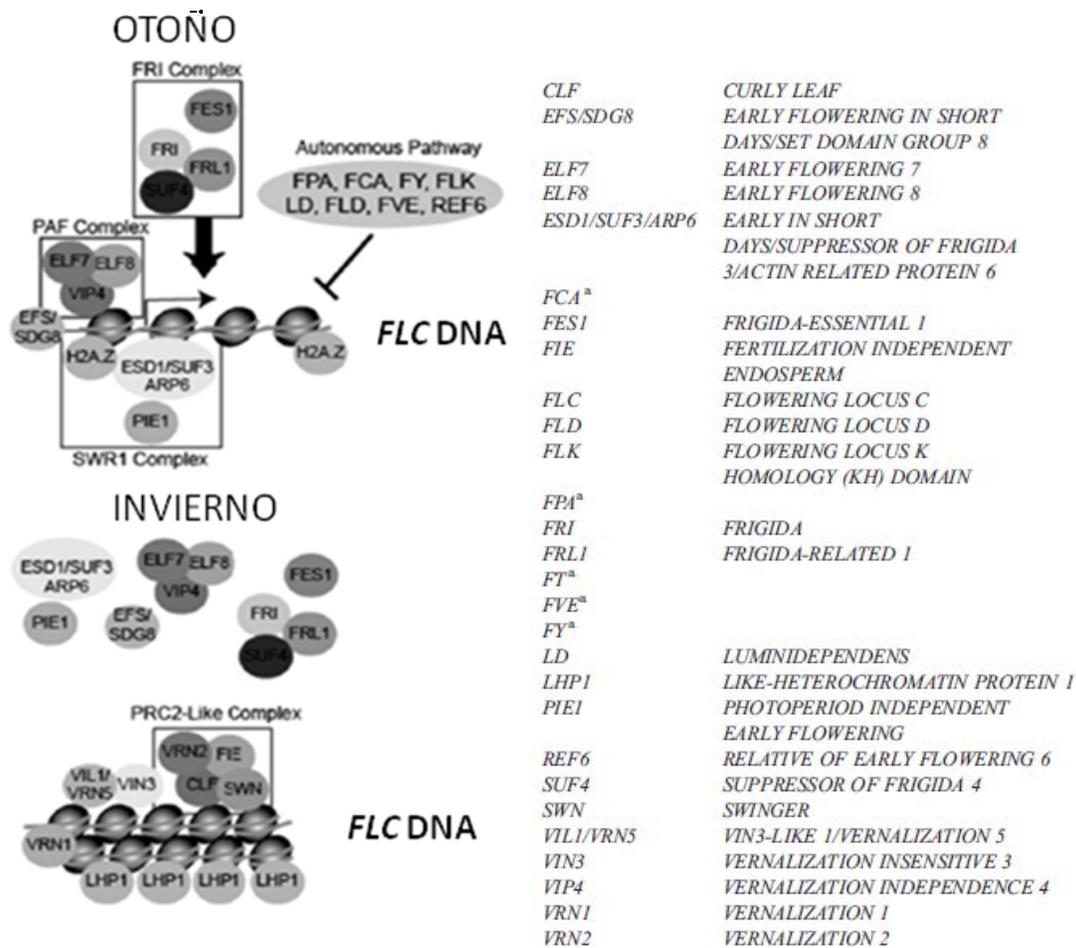


Figura 10. Mecanismo de silenciamiento de *FLC* mediado por la vernalización. Tomado de Schmitz *et al.*, 2007

2.7.4 Vía autónoma

La vía autónoma de floración regula negativamente a *FLC*. Se han identificado diversos miembros de la vía autónoma, entre ellos: *FCA*, *FY*, *FLD* (*FLOWERING LOCUS D*), *FPA*, *FVE*, *LD* (*LUMINIDEPENDENS*) y *FLK* (*FLOWERING LATE KH MOTIF*). Mutaciones en estos genes causan un retraso en el tiempo de floración. *FVE* y *FLD* están implicados en complejos de deacetilación de histonas. *FCA*,

FPA y *FLK* son proteínas que contienen elementos de unión a RNA. *FY* es un homólogo de *Pfs2p*, un factor de poliadenilación y del procesamiento en el extremo 3' de los mensajeros esencial en levadura. *LD* codifica para una proteína homeodominio con una función desconocida. Análisis genéticos y bioquímicos indican que *FCA* y *FY* forman una sub-vía y *FPA* y *FVE* otra (Quesada *et al.*, 2005).

FCA es el componente de la vía autónoma mejor caracterizado, es una proteína nuclear que contiene dos motivos de reconocimiento de RNA (tipo RRM) y un dominio de interacción proteína-proteína WW. La expresión de *FCA* es compleja ya que en las células existen cuatro transcritos de *FCA* (α , β , γ y δ) que son producidos como resultado del splicing alternativo y de eventos de poliadenilación alternativa, que tienen lugar en dos diferentes sitios en el pre-mRNA de *FCA* (Figura 9).

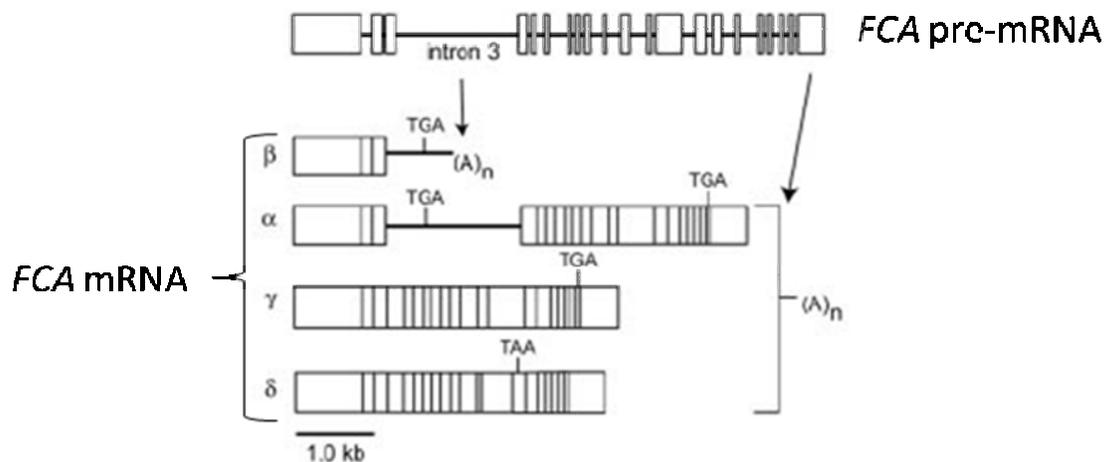


Figura 11. **Transcritos de *FCA***. En la célula existen cuatro transcritos de *FCA* generados mediante sitios de poliadenilación temprana y splicing alternativo, solo el transcrito gamma da origen a la proteína. Tomada de Quesada *et al.*, 2005.

En el transcrito alfa todos los intrones son removidos con excepción del intrón 3. El transcrito beta resulta de la falta de remoción del intrón 3 que genera un codón de paro y un sitio de poliadenilación temprano. Este intrón 3 es inusualmente largo (3 kb) en comparación con el promedio de intrones en *Arabidopsis thaliana*. Los

transcritos gamma y delta son diferentes por un evento de splicing alternativo en el intrón 13 que introduce un codón de paro prematuro en *FCA* delta. Solamente el transcrito gamma da lugar a la proteína FCA funcional (Figura 11. Quesada *et al.*, 2005).

FCA interacciona físicamente con FY mediante el dominio WW en la parte carboxilo terminal de FY. La interacción FCA/FY se requiere para el reconocimiento y poliadenilación temprana del mensajero de *FCA* y por lo tanto existe un autoregulación negativa. Mutantes simples y dobles de genes de la vía autónoma presentan efectos pleiotrópicos además del retraso en el tiempo de floración, uno de ellos es letalidad embriogénica, sugiriendo que estos genes no sólo juegan un papel importante en la regulación del tiempo de floración sino en diferentes procesos fisiológicos de la planta como lo es la embriogénesis (Tabla 2. Marquard *et al.*, 2006. Henderson *et al.*, 2005).

Tabla 2. Análisis fenotípico de dobles mutantes de genes involucrados en la vía autónoma de floración.

Genotipo	Fenotipo
<i>fy-1, fpa</i> doble mutante	Nunca se ha recuperado, sugiriendo letalidad
<i>fy-4</i> homocigotas	Letalidad embriogénica
<i>fy-4</i> heterócigotas	Retraso en floración
<i>fca fy-1</i> doble mutante	Retraso en floración
<i>fca fpa</i> doble mutante	Retraso en floración
<i>fy-1</i> heterócigas <i>fpa</i> homócigas	Alta incidencia de semillas abortadas
<i>fy-1</i>	Semillas abortadas
<i>fpa-1</i>	Semillas abortadas
<i>fpa-2</i>	Semillas abortadas
<i>fca-1</i>	Retraso en floración
<i>fy-4/FY</i>	Alta incidencia de semillas abortadas

2.7.5 Integración de las vías de floración

Las vías anteriormente descritas convergen en genes integradores (*FD*, *LFY*, *FT*, *SOC1* entre otros; Parcy, 2005; Jaeger *et al.*, 2006), los cuales perciben el estado fisiológico de la planta y activan genes del meristemo floral (FMI: Floral Meristem Identity) induciendo la floración. Los genes FMI incluyen a *LEAFY (LFY)*, *APETALA1 (AP1)* y *CAULIFLOWER (CAL)* entre otros (Corbesier *et al.*, 2006) y sus productos son los responsables directamente de cambiar los patrones de expresión de genes que convierten un meristemo apical a uno floral. El proceso se ilustra de manera general en la figura 10.

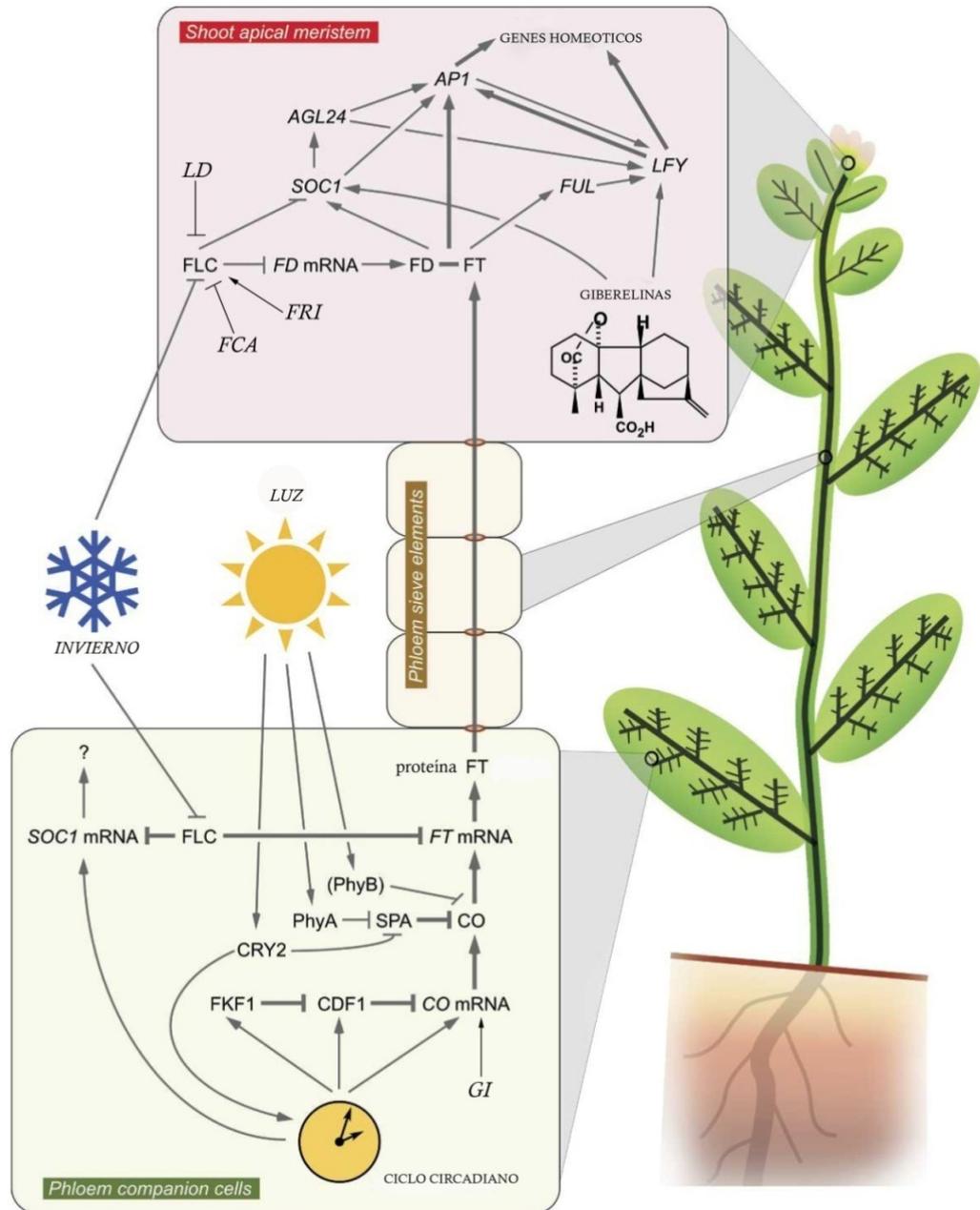


Figura 12. **Esquema general de genes y sus productos involucrados en la floración de *A. thaliana*.** En el proceso de floración están involucradas señales endógenas y ambientales como la temperatura, el ciclo circadiano, el fotoperíodo y las señales hormonales como las de Gas. Todas estas señales activan o reprimen genes de diferentes partes de la planta. En el meristemo apical es donde se lleva a cabo la transición floral que permite el cambio de un meristemo apical a uno floral iniciando así la etapa reproductiva de la planta. Modificado de Kobayashi y Weigel, 2007.

3. ANTECEDENTES DIRECTOS

3.1 EXPRESIÓN DEL TRANSCRITO DE *nCBP* A LO LARGO DEL DESARROLLO DE *A. thaliana*

Los resultados preliminares en el laboratorio indican que a nivel de mRNA la expresión de *nCBP* es ubicua a lo largo del desarrollo de la planta presentando mayores niveles de expresión en raíz (Figura 13). Este patrón de expresión difiere de lo que se ha reportado para *eIF4E* y *eIFiso4E*. *eIFiso4E* se expresa mayoritariamente en raíz de de 15 días y en flor abierta (Rodríguez et al, 1998).

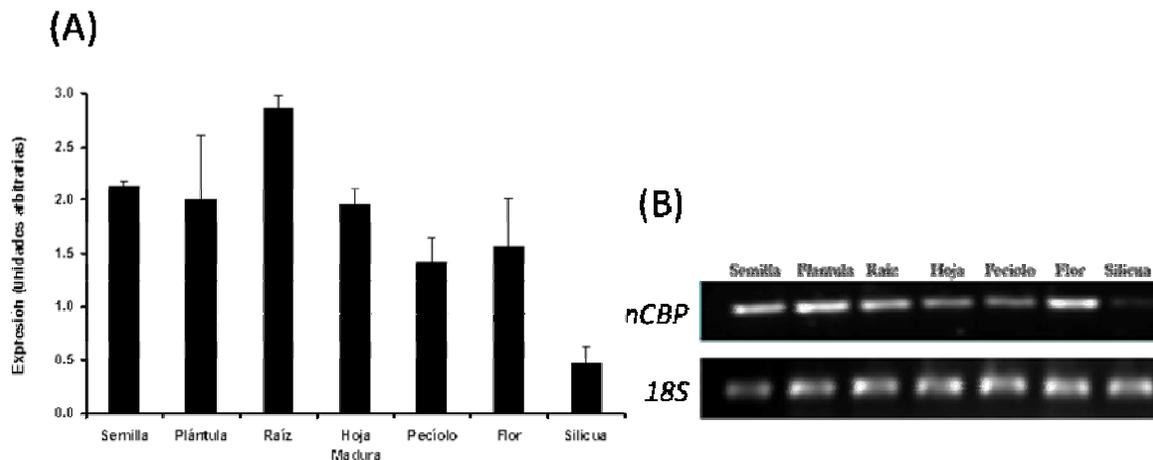


Figura 13. **Perfil de expresión de *nCBP* en *A. thaliana*.** (A) Los niveles de RNA mensajero de *nCBP* se analizaron por densitometría de RT-PCR semicuantitativo en diferentes tejidos de la planta a lo largo de su desarrollo (B) Análisis de nivel de expresión de *nCBP* por RT-PCR semicuantitativo en diferentes tejidos. (Tomada de Hidalgo,2007).

3.2 Caracterización genotípica y fenotípica de la mutante *ncbp-1*

En *A. thaliana* se han estudiado distintas mutantes de los miembros de la familia eIF4E. Una mutante nula para el factor eIFiso4E, miembro de la clase I, presenta una morfología y desarrollo similar a la planta silvestre bajo condiciones de crecimiento normales (Duprat *et al.*, 2002). No obstante datos obtenidos en nuestro laboratorio sugieren que esta mutante presenta un mayor número de raíces secundarias respecto a las plantas silvestres. Para el caso de mutantes del

factor eIF4E, también miembro de la clase I, no se han podido obtener mutantes homocigotas nulas, posiblemente debido a que la ausencia de eIF4E es letal. El interés de nuestro laboratorio es elucidar la función de los distintos miembros de la familia eIF4E en la planta *Arabidopsis thaliana*. Este trabajo particular aborda el estudio de la función de la proteína nCBP durante la floración de *A. thaliana* y su posible papel en el control traduccional. Para ello, se obtuvo una mutante que llamamos *ncbp-1* (SALK_131503.32.70.x), la cual tiene insertado un T-DNA en el tercer exón y de la cual no se ha reportado ningún fenotipo. Primeramente, se comprobó la presencia del T-DNA en el gen *nCBP* mediante estudios de Southern blot. También se evaluó la ausencia del mRNA correspondiente a *nCBP* en estas mediante RT-PCR semicuantitativo. También se verificó en la mutante la expresión a nivel de transcrito de los otros miembros de la familia eIF4E (Figura 14; Hidalgo, 2007). Esta mutante presenta los mismos niveles de expresión a nivel de transcrito tanto de eIF4E como de eIFiso4E.

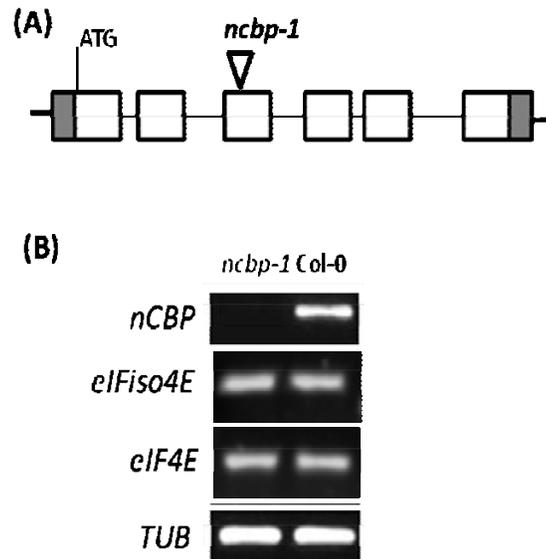


Figura 14. **Caracterización genotípica de la mutante *ncbp-1* (SALK_131503.32.70.x).** (A) Esquema del gen *nCBP* mostrando la inserción del T-DNA en el tercer exón. (B) Nivel de expresión a nivel de transcrito de *eIFiso4E* y *eIF4E* en la mutante. Ausencia del transcrito de *nCBP* en la mutante.

En esta mutante estudios iniciales mostraron un retraso en el tiempo de floración y en la senescencia de la planta mutante, lo que sugirió que nCBP podría participar

en la regulación de la expresión genética durante el proceso de floración (Hidalgo, 2007).

4. HIPÓTESIS

En *Arabidopsis thaliana* nCBP tiene un papel en el proceso de floración, entonces en mutantes de esta proteína, la expresión de algunos genes relacionados a las vías de floración estarán modificados.

5. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el retraso en el tiempo de floración en la mutante *ncbp-1* de *Arabidopsis thaliana* e identificar cual o cuales genes de las vías de floración presentan alguna alteración en esta mutante.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Caracterizar el fenotipo de retraso de floración en la mutante *ncbp-1*.
2. Obtener plantas mutantes que sobreexpresen la proteína de fusión nCBP-GFP y analizar su fenotipo con respecto al tiempo de floración.
3. Estudiar cambios en la expresión de algunos genes de las diferentes vías de floración.

7. MATERIAL Y METODOS

7.1 MATERIAL BIOLÓGICO

La mutante *ncbp-1* fue obtenida de la colección de mutantes por inserción de T-DNA de SALK (SALK_131503.32.70) y se trabajó únicamente con las mutantes homocigóticas nulas.

7.2 OBTENCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

7.2.1 Extracción de RNA TOTAL

La extracción de RNA total se realizó a partir de diferentes tejidos de *Arabidopsis thaliana* según el caso. Se siguió la técnica recomendada por el fabricante del reactivo de Trizol (Invitrogen Carlsbad CA, USA). Brevemente, se pesaron 100 mg de tejido de eje embrionario de maíz y se pulverizaron en un mortero, previamente lavado, esterilizado y enfriado a -20 °C; la pulverización se facilitó adicionando nitrógeno líquido. Una vez pulverizado hasta lograr un polvo muy fino, se colocó el tejido en un tubo eppendorff de 1.5 mL y se le agregó 1 mL de Trizol (reactivo monofásico de fenol e isotiocianato de guanidina). La mezcla se agitó con vórtex hasta la total resuspensión. Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 12 000 x g durante 10 minutos a 4 °C y se colectó la fase acuosa cuidando de no tomar la capa superior que contenía restos lipídicos. Se adicionaron 0.2 mL de cloroformo y se agitó vigorosamente por 15 segundos, posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 2 o 3 minutos. Se centrifugó a 12 000 x g por 15 minutos a 4°C, se colectó la fase acuosa (incolora y superior que contiene el RNA) y se transfirió a un tubo nuevo. Esta extracción con cloroformo se llevó a cabo para eliminar proteínas y DNA. Se precipitó el RNA adicionando 0.5 mL de alcohol isopropílico y se dejó incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.

Se centrifugó a 12 000 x g durante 10 minutos a 4°C, el RNA forma un precipitado gelatinoso. Se removió el sobrenadante y se lavó el precipitado una vez con 1 mL de etanol al 75%. Se centrifugó a 7 500 x g durante 5 minutos a 4°C, se decantó y se dejó secar al aire. Se resuspendió el RNA en agua con DEPC (Dietil pirocarbonato).

Finalmente, se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X (Tris-base 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 2 mM) con bromuro de etidio, para observar la integridad y pureza del RNA. El RNA se almacenó a -70 °C hasta su uso.

7.2.2 Extracción de DNA genómico

Para el aislamiento de DNA genómico se utilizó la técnica de CTAB (Ausubel *et al*, 2000). Antes de comenzar el procedimiento, se añadió 2-mercaptoetanol a la solución de extracción CTAB (Ver apéndice 1) para una concentración final de 2% (v/v). Se calentó esta solución y la de CTAB/NaCl a 65°C. Se requieren 400 µL de solución de extracción y 50 µL de CTAB/NaCl para 100 mg de tejido fresco. Se homogeneizó con N₂ líquido y se colocó en un tubo resistente a solventes. Se añadieron la solución de extracción y la de CTAB/NaCl caliente al tejido pulverizado y se agitó fuertemente. Se incubó por 60 minutos, a 64°C, con agitación ocasional. Se extrajo con un volumen igual de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) mezclando bien por inversión. Se centrifugó por 5 minutos a 7500 g y a 4°C y se recuperó la fase superior. Se añadieron 1/10 de volumen de la solución CTAB/NaCl a 65 °C a la fase superior y se mezcló bien por inversión. Nuevamente, se extrajo con un volumen igual de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se centrifugó a 7500 x g por 5 minutos.

A la fase superior se le añadió 1 volumen de la solución de precipitación CTAB, se mezcló bien por inversión. Se centrifugó a 500 x g a 4°C por cinco minutos. Se colectó el sobrenadante y se precipitó el ácido nucleico añadiendo 300 µL de

isopropanol frío; se mezcló bien y se dejó incubar 2 horas a -20°C . Posterior a esta incubación se centrifugó la muestra a $7500 \times g$ por 15 minutos a 4°C . Se lavó el precipitado con etanol al 70%, centrifugando a $7500 \times g$ por 15 minutos, y se dejó secar al aire. Una vez completamente seco resuspendió en agua desionizada a una concentración final de $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

7.2.3 Purificación de DNA plasmídico

Se dejó crecer cada una de las clonas seleccionadas en cajas con antibiótico en 5 mL de medio LB con el antibiótico de selección durante toda la noche en agitación. Se colocó la solución III (Ver Apéndice) en hielo y se preparó la solución II y fenol-cloroformo-isoamílico (24:24:1). Se centrifugó la suspensión celular a $3000 \times g$ durante 5 minutos. Se resuspendió el precipitado en $100 \mu\text{L}$ de la solución I (con vórtex hasta su total resuspensión) y se transfirió a un tubo eppendorff. Se agregó $200 \mu\text{L}$ de la solución II fresca, se mezcló perfectamente por inversión y se dejó reposar 5 minutos en hielo. Se agregó $150 \mu\text{L}$ de la solución III fría, se mezcló por inversión y se dejó 10 minutos en hielo. Se centrifugó a $14\ 000 \times g$ 10 minutos a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Se agregó $40 \mu\text{L}$ de Tris-HCl 1M (pH 8.0) y $400 \mu\text{L}$ de fenol-cloroformo-isoamílico, se agitó en vórtex por 15 segundos.

Se centrifugó a $14\ 000 \times g$ por 2 minutos y se recuperó la fase superior. Se agregó 1 mL de etanol al 100% frío, se mezcló por inversión y se incubó 1 hora a -20°C ; en este paso se precipita el DNA. Se centrifugó a $14\ 000 \times g$ a 4°C por 10 minutos, se decantó y se lavó con $400 \mu\text{L}$ de etanol al 70%. Se decantó el etanol y se dejó secar el precipitado por aproximadamente una hora y se resuspendió en agua desionizada a una concentración final de $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

7.2.4 Purificación de DNA a partir de gel de agarosa

La extracción de DNA a partir del gel de agarosa se realizó siguiendo la metodología recomendada para el sistema QIAquick Gel Extraction (QIAGEN USA) que se describe a continuación: se extrajo el fragmento de DNA visualizado por tinción con bromuro de etidio del gel con una navaja limpia, se colocó en un tubo eppendorff y se pesó (el peso no debe ser mayor de 400 mg por columna). Se agregaron 300 μL de Amortiguador QG por cada 100 mg de gel y se incubó a 50°C por aproximadamente 10 min o hasta que estuvo perfectamente disuelto el gel, agitando de vez en cuando para homogenizar la suspensión. Una vez que se disolvió completamente, se agregaron 100 μL de iospropanol por cada 100 mg de gel, se mezcló perfectamente y se colocó en una columna previamente insertada al tubo colector. Se centrifugó a 12 000 x *g* durante 1 minuto y se descartó el eluato. Se colocó la columna en el tubo colector, se lavó adicionando 0.75 mL de Amortiguador PE y se centrifugó por 1 minuto a 12 000 *g*. Se colocó la columna en un tubo nuevo y se eluyó el DNA en 100 μL de agua estéril, dejando reposar 5 minutos antes de centrifugar 2 minutos a 12000 x *g*.

Para concentrar el DNA, se colocó el tubo en un concentrador a vacío marca SpeedVac y se dejó secar. Posterior a esto, se resuspendió en agua desionizada a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

7.2.5 Cuantificación de ácidos nucleicos

Se usó una alícuota de la solución de DNA o RNA en una celda de cuarzo y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 y 280 nm. A 260 nm el DNA o RNA presente en la muestra absorbe, mientras que a 280 nm absorben las proteínas, por lo cual la relación 260/280 es un indicativo de la pureza de la muestra (1.9-2.0 es una relación de pureza aceptable).

El cálculo de la concentración se realizó a partir de la relación: 1 de absorbancia a 260 nm equivale a 50 µg/mL de DNA o 40 µg/mL de RNA.

7.3 RT-PCR

Para la transcripción-reversa del RNA (RT) y la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se siguió el protocolo de dos pasos. El primero con la enzima M-MLV RT de Invitrogen Carlsbad CA. Esta reacción se realizó según el siguiente protocolo:

- 1 µL oligo dT
- 2 µL RNA total
- 1 µL 10 mM dNTPs
- 8 µL de agua

Dejar a 65° C por 5 min y agregar en hielo:

- 4 µL 5X First-Strand Buffer
- 2 µL 0.1 M DTT
- 1 µL de agua

Mezclar suavemente y dejar a 37°C por 2 min. Agregar:

- 1 µL de enzima M-MLV RT

Incubar 50 min a 37°C. Posteriormente, incubar a 70°C por 15 minutos.

Las distintas reacciones de PCR se realizaron USA utilizando un termociclador marca Eppendorff, modelo Master Cycler de la siguiente manera:

Se agregó:

- 2 µL cDNA
- 0.4 µL dNTPs 10 mM
- 0.2 µL Cebador 10 mM
- 1 µL Buffer de PCR(Invitrogen)
- 0.6 µL MgCl₂ 50 mM (Invitrogen)
- 5.56 µL Agua

Las condiciones de PCR fueron las siguientes, el número de ciclos varió según el gen que se amplificó.

A:pre-desnaturalización	B: Amplificación por PCR	C: Extensión final
1 ciclo de: 94°C por 2 minutos	36 ciclos de: Desnaturalización, 94°C 1 min Alineamiento, 60 °C 30 seg Extensión, 72°C por 2 min	1 ciclo de: 72°C por 7 min

7.4 DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Se realizaron las digestiones enzimáticas de DNA plasmídico en 20 µl de volumen final utilizando 5-10 µg de DNA plasmídico. A un tubo eppendorff se agregaron los siguientes reactivos:

Componente	Cantidad
DNA plasmídico	5-10 µg
10X amortiguador de reacción	1X
Agua estéril c.b.p.	20 µL
Enzima de restricción	0.13 unidades
Volumen total	20 µL

El orden de adición fué el siguiente: agua estéril, amortiguador de reacción, DNA y por último se adicionó la enzima de restricción. Todo esto se adicionó en frío y una vez adicionada la enzima de restricción se incubó al menos 16 hrs a 37°C. Una vez transcurrido ese tiempo se corrió una muestra del DNA digerido en un gel de agarosa para comprobar la digestión.

7.5 CLONACIÓN DE DNA

7.5.1 Clonación de fragmentos de DNA en el vector pGEM-Teasy.

La clonación de fragmentos de DNA (insertos) se obtuvo por PCR a partir de DNA extraído de plantas silvestres, este fragmento se insertó en el vector pGEM-Teasy (Promega: ver apéndice).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se agregaron colas de adenina en ambos extremos del inserto purificado a partir del gel de agarosa mediante el procedimiento descrito para el sistema pGEM-Teasy Vector de Promega (Apéndice 1), el cual se describe a continuación. Una vez purificado el inserto, se tomaron 2 μL de éste y se adicionó 1 μL de Amortiguador de reacción 10 X para Taq DNA Polimerasa junto con 1 μL de MgCl_2 25 mM y 5 unidades de la enzima Taq DNA polimerasa. Se agregó agua desionizada hasta un volumen final de 10 μL . Se incubó a 70°C por 30 minutos. Posteriormente, se procedió a la ligación recomendada para el sistema pGEM-Teasy Vector (Promega) preparando la siguiente reacción:

	Reacción de ligación
Amortiguador de ligación rápida 2X	5 μL
pGEM-Teasy vector (50 ng)	1 μL
Inserto <i>pncbp</i>	2 μL
T4 DNA ligasa (3 unidades/ μL)	1 μL
Agua desionizada c.b.p.	10 μL

Se mezclaron los componentes de reacción y se incubó dos horas a temperatura ambiente. Con la reacción se transformaron células de *E.coli* (DH5 α) mediante el procedimiento descrito para el sistema pGEM-Teasy (Promega). Para ello se prepararon cajas con medio LB/ampicilina/IPTG/ X-Gal (Apéndice). Se añadieron 5 μL de la reacción de ligación a un tubo eppendorff estéril de 1.5 mL en hielo. Se añadieron 100 μL de células competentes, se mezcló suavemente y se colocó en hielo por 20 minutos. Posterior a esto, se colocó en un baño de agua a 42°C por 50 segundos e inmediatamente se colocó en hielo por dos minutos. Se adicionó 950 μL de medio LB a los tubos y se dejó incubar a 37°C en agitación por 1.5 hrs. Se centrifugó la suspensión celular a 3000 x g por dos minutos y se resuspendió el botón en 100 μL . Se sembraron los 100 μL en una caja con medio LB/ampicilina/IPTG/ X-Gal y se dejó incubar por 24 horas. Las colonias que crecieron fueron las transformadas. Las que contenían el vector con el inserto fueron blancas, mientras que las que no lo contenían fueron azules.

7.5.2 Clonación de fragmentos de DNA en el vector pBIN(35S)GUS

Una vez clonado el inserto en el vector pGEM-T easy se digirió con las enzimas de restricción *HindIII* y *BamHI*. Purificado este inserto se ligó en el vector pBIN(35S)GUS (Ver apéndice) al cual previamente se había digerido con las mismas dos enzimas para liberar el promotor 35S. Se llevó a cabo la reacción de ligación en la cual se agregaron los siguientes reactivos:

	Reacción de ligación
Amortiguador de ligación	10 μ L
DNA vector (50 ng)	6 μ L
DNA Inserto <i>pncbp</i>	0.5 μ L
T4 DNA ligasa (3 unidades/ μ L)	1 μ L
Agua desionizada c.b.p.	20 μ L

Se dejó incubar esta mezcla a temperatura ambiente por 2 horas y se hizo la transformación de igual manera que la descrita para la clonación en el vector pGEM-T.

7.5.3 Clonación de la región codificante de un gen en el vector de entrada pENTR/D-TOPO

La tecnología Gateway® es un método universal de clonación que aprovecha las propiedades de la recombinación sitio-específica del bacteriófago λ para transferir una secuencia entre vectores Gateway rápida y eficientemente. Consta de tres pasos principales: 1) Generar una clona entrante con el vector pENTR/D-TOPO®; 2) Realizar una recombinación LR entre la clona entrante y el vector destino (pEarleyGate 103); y 3) la introducción de la construcción en el hospedero apropiado (*Agrobacterium tumefaciens* para los intereses de este proyecto).

La preparación de la clona entrante se realizó clonando la región codificante del gen *nCBP* excepto el codon de paro en el vector pENTR TOPO® de Invitrogen® (ver Apéndice). Previamente, se amplificó esta región por PCR utilizando una *Taq*

polimerasa de alta fidelidad. La concentración se ajustó a una concentración final de 1-5ng/ μ L.

Por cada reacción, se colocaron de 1 a 5 ng de producto de PCR purificado fresco, 1 μ L de la disolución de sal (Invitrogen®), 1 μ L de vector TOPO® y 3 μ L de agua destilada estéril. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos, luego se colocó en hielo y se transformaron células competentes TOP10 (Invitrogen) de acuerdo con el método descrito anteriormente. Se seleccionaron las clonas positivas mediante resistencia a kanamicina (50 μ g/mL).

7.5.4 Clonación del inserto del vector de entrada al vector de salida pEarleyGate 103

Una vez conseguida la clona entrante, se realizó la recombinación LR con el vector destino pEarleyGate 103 (ver Apéndice). Por cada mezcla de reacción, en un tubo Eppendorf de 1.5mL se colocan 3 μ L de la clona entrante AteIF(iso)4E-TOPO (50ng/ μ L), 1 μ L vector destino pEarleyGate 103 (150ng/ μ L) y 4 μ L de buffer TE pH 8.0. Por otro lado, la LR Clonase II enzyme Mix (Invitrogen®) se descongeló en hielo, se mezcló en vortex por 2 segundos y se agregaron 2 μ L a la mezcla de reacción, se mezcló perfectamente y se centrifugó por 10 segundos en una picofuga. Se incubó la reacción a 25° C por una hora y luego se agregó 1 μ L de la Proteinasa K (Invitrogen®). Se incubó por 10 minutos a 37° C para inactivar la reacción. Finalmente, se colocó en hielo y se transformaron con la construcción células competentes TOP10. El marcador de selección fue nuevamente kanamicina (50 μ g/mL).

7.5.5 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Primero se creció una colonia de *Agrobacterium tumefaciens* en medio YM líquido a 28° C toda la noche con agitación constante. Con 2 mL del cultivo anterior, se inoculó 50mL de medio YM fresco y se incubó con agitación

Se descongelaron las células competentes en hielo y se les agregó 1 μ L del plásmido con el que se deseaba transformar. Se congelaron las células con el plásmido en nitrógeno líquido, por 5 minutos, y se incubaron a 37° C por 25 minutos. Se agregó 1 mL de medio YM sin marcador de selección y se incubó por 3 horas a 28° C con agitación constante (200rpm). Las células se centrifugaron a 13000 rpm por 30 segundos y se resuspendió el botón bacteriano en 100 μ L de medio YM. Se plaquearon las células en medio YM sólido con los marcadores de selección adecuados y las cajas se incubaron a 28° C, por 2 ó 3 días, para obtener colonias transformantes.

7.6 TRANSFORMACION DE *Arabidopsis thaliana* POR FLORAL DIP (Modificado de Clough, 2005).

Esta transformación únicamente tiene éxito si se lleva a cabo cuando el botón floral aún es verde. Una vez que las plantas han desarrollado inflorescencia, ésta debe cortarse para que, aproximadamente una semana después, se generen ramificaciones con más botones florales y la cantidad de semillas transformadas sea así más elevada. Se inocularon 10 mL de medio LB + kanamicina (50 μ g/mL) con una colonia de *Agrobacterium tumefaciens* (transformada con la construcción deseada) y se incubó a 28° C por 24 horas con agitación constante (200rpm). Luego se tomó 2.5mL de éste inóculo y se colocó en 250mL de medio LB + kanamicina (50 μ g/mL) y se incubó el medio a 28° C por 48 horas a 200 rpm. Se centrifugó los cultivos bacterianos por 20 minutos a 5000 x g y se resuspendió el

MATERIAL Y MÉTODOS

botón bacteriano en 50 mL de una disolución de sacarosa al 5% (no estéril) y se agregó el volumen necesario de ésta disolución hasta alcanzar un valor de densidad óptica (600 nm) de 0.8. Se agregó el surfactante Silwet 77 a la suspensión bacteriana a una concentración final de 0.01%.

Posteriormente, se introdujo la planta (de forma invertida y sujetando la maceta firmemente) en la suspensión de *Agrobacterium tumefaciens* por 1 minuto. Luego, la maceta se colocó de manera lateral sobre papel absorbente en una charola. Una vez tratadas todas las plantas, se cubrieron con un domo de plástico y se dejaron en oscuridad por toda la noche, terminado este tiempo, se llevaron al invernadero bajo fotoperiodo de día largo.

La selección de semillas transformantes positivas producto de Floral dip en tierra es un proceso que tiene una duración aproximada de 3 semanas. Primero en un salero se colocaron aproximadamente 200 semillas candidatas y se mezclaron con 2g de arena fina, con la finalidad de que dichas semillas quedaran uniformemente esparcidas. Las semillas se colocaron sobre una superficie de aproximadamente 10x10cm con mezcla de sustratos Sunshine®-Agrolite®-Vermiculite® en proporción 3:1:1, humedecida con agua destilada. Se cubrió el recipiente con papel aluminio y se guardaron en oscuridad a 4° C por 48 horas, proceso llamado estratificación. Transcurrido este tiempo, se llevaron las semillas al invernadero bajo un fotoperiodo de día largo y se permitió el desarrollo de las plántulas por 5 días. Concluido este tiempo, se asperjaron las semillas con una disolución de glufosinato de amonio BASTA® en una concentración de 30 mg/L, utilizando un atomizador de velo fino. Se asperjó un total de 4 ó 5 veces a intervalos de 2 días, o hasta que las plántulas verdes y saludables fueron perfectamente distinguibles de plántulas moribundas. Las plántulas resistentes al herbicida fueron transplantadas a macetas con sustrato MetroMix200.

7.7 MICROSCOPIA CONFOCAL

Con ayuda de una aguja de disección, unas pinzas y un estereoscopio, se extrajeron cuidadosamente los embriones de las semillas colocadas en agua sujetando con unas pinzas de puntas finas uno de los extremos y raspando en el otro extremo la cubierta con la punta de la aguja de disección; el embrión saldrá presionando suavemente con las pinzas. Una vez fuera cada embrión, se colocó en 1mL de la solución fijadora fresca (4% p/v paraformaldehído, 1.37mM NaCl, 0.27mM KCl, 0.43mM Na₂HPO₄·7H₂O, 0.14mM NaH₂PO₄·H₂O, 15% v/v DMSO, 0.1% v/v Tween 20) y se incubó por 12 horas a 4° C. Con mucho cuidado, se eliminó la solución fijadora y se hicieron tres lavados de 15 minutos cada uno con 1mL de glicerol al 70%. Se eliminó del tubo 900µL del glicerol y se resuspendieron los embriones en los 100µL restantes. Se tomaron 20µL de la suspensión, procurando llevar consigo aproximadamente 20 embriones, y se colocaron en el centro de un portaobjetos distribuyéndolos lo más uniformemente posible. Se les colocó encima un cubreobjetos. Para finalizar, se aplicaron 3 ó 4 capas de barniz incoloro de uñas comercial en los bordes del cubreobjetos para sellar.

Estas preparaciones se llevaron al microscopio confocal y se observaron a 488 nm de excitación y 515-565 nm de emisión para observar la fluorescencia de GFP.

7.8 EVALUACIÓN DEL TIEMPO DE FLORACIÓN

Se analizó el tiempo de floración evaluando: (a) Número de días después de la germinación (DAG) en el que se presenta la transición floral. (b) Número de hojas de roseta en el día del bolting (inflorescencia primaria de 6 cm de alto) bajo las condiciones de (1) día largo (8 hrs oscuridad/16 hrs luz), (2) día corto (16 hrs oscuridad/ 8 hrs luz) (Thomas, 2006). (3) Después de un período de vernalización que consistió en crecer las plántulas bajo condiciones de día largo a 4°C por seis semanas, transcurrido ese tiempo de trasladaron a una cámara a 23°C. (Schmitz *et al.*, 2007) y (4) el efecto de giberelinas en día largo, donde se asperjó GA₃ a una

MATERIAL Y MÉTODOS

concentración de 20 μM dos días a la semana hasta la floración (Pigliucci *et al.*, 2000).

8. RESULTADOS

8.1 *nCBP* PARTICIPA EN LA REGULACIÓN DE LA VÍA AUTÓNOMA DE FLORACIÓN

Debido a los antecedentes donde se mostraba que la mutante *ncbp-1* presenta un retraso en el tiempo de floración se evaluó con mayor detalle este fenómeno. Para el estudio de la floración se evaluaron dos tipos de parámetros, el primero de ellos fue el tiempo de floración, medido en días después de la germinación que tarda la planta en presentar el primer botón floral. El segundo fue el número de hojas de roseta en el estadio de transición floral.

Estos parámetros se evaluaron bajo distintas condiciones de crecimiento que influyen en el tiempo de floración, con el fin de buscar si bajo cierta condición se ya no se presenta el retraso en el tiempo de floración. Las condiciones estudiadas fueron: (1) por fotoperíodo: día largo (DL: 16 hrs luz por 8 hrs oscuridad) y día corto (DC: 8hrs luz por 16 hrs oscuridad); (2) la adición de la hormona: ácido giberélico (GA: se realizó bajo condiciones de DL y se asperjó una solución 20 μ M de GA dos veces a la semana hasta la floración); (3) después de vernalización: germinación y crecimiento a 4°C por 6 semanas bajo condiciones de día largo y posterior a este tiempo se transfirieron a una cámara de crecimiento a temperatura ambiente bajo las mismas condiciones de fotoperíodo.

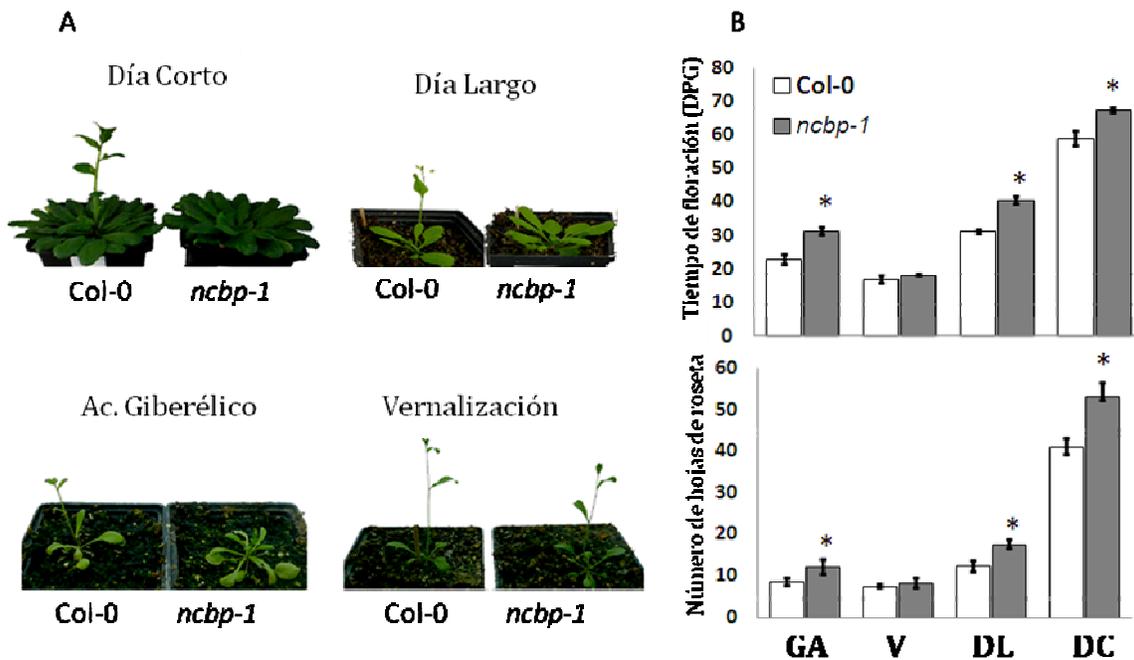


Figura 15. **Caracterización fenotípica de la floración para la mutante *ncbp-1*.** (A) Plantas silvestres de *A. thaliana* y *ncbp-1* al bolting de la planta silvestre, bajo diferentes condiciones de floración. (B) Tiempo de floración medido como el número de días después de la germinación en que apareció el primer botón floral y como el número de hojas de roseta al bolting. GA: tratamiento con Acido Giberélico, V: vernalización, DL: día largo y DC: día corto. El análisis estadístico fue realizado utilizando *t* Student (*) $p \leq 0.01$, donde solo bajo GA, DL y DC se muestran diferencias estadísticamente significativas en el tiempo de floración entre las plantas mutantes y la silvestres.

Los resultados mostraron que la mutante *ncbp-1* presenta un retraso en el tiempo de floración de aproximadamente 10 días respecto a plantas silvestres bajo las condiciones de día largo (DL). Este retraso se mantiene bajo las condiciones de DC y tratamiento con GA, mientras que para las plantas que se sometieron a las condiciones de vernalización no se observó diferencia en el tiempo de floración entre las plantas mutantes y las silvestres (Figura 15A). Los resultados de retraso en floración presente en las mutantes también son apreciables cuando se evalúa el número de hojas de roseta al bolting bajo las cuatro condiciones evaluadas. La mutante *ncbp-1* presenta un retraso en el tiempo de floración de 5 hojas bajo condiciones de DL, DC y tratamiento con GA y se revierte bajo vernalización (Figura 15B y C).

El hecho de que el fenotipo de retraso en la floración en la mutante *ncbp-1* se viera revertido bajo las condiciones de vernalización sugiere que la función de nCBP podría estar involucrada en la vía autónoma de floración, ya que mutantes en esta vía presentan el mismo fenotipo. Aunado a esto, en estudios hechos por microarreglos se ha observado que bajo condiciones de vernalización se induce la expresión del transcrito de *nCBP* y el análisis de su promotor teórico muestra un elemento de respuesta al frío (Figura 18; <http://www.arabidopsis.org>, <http://affymetrix.arabidopsis.info>).

8.2 nCBP ESTÁ INVOLUCRADO EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE LA VÍA AUTÓNOMA DE LA FLORACIÓN

Dado que cada una de las vías de floración depende de la expresión de genes específicos, para apoyar el papel de nCBP en alguna de estas vías se analizaron los niveles de mRNA de algunos genes representativos de cada una de estas vías en plantas silvestres y mutante *ncbp-1* bajo las condiciones de día largo. Se realizó este análisis a los días 15, 18, 21 y 23 después de la germinación, en los cuales se inicia la señalización para la floración.

Como se observa en la figura 16 en ausencia de nCBP hay menores niveles del transcrito de *FCA* y mayores niveles de *FLC* a partir del día 18 post-germinación, día en que la planta silvestre presenta el fenómeno de floración. Estos resultados se corroboraron haciendo por triplicado el análisis y cuantificando por densitometría (Figura 17).

En la misma figura se observa una disminución en el nivel de un gen integrador *SOC1* y un gen de identidad del meristemo floral *AP1*. En concordancia con el análisis fenotípico no se observaron cambios significativos en los genes de las vías de fotoperiodo o giberelinas (Figura 16 y 17).

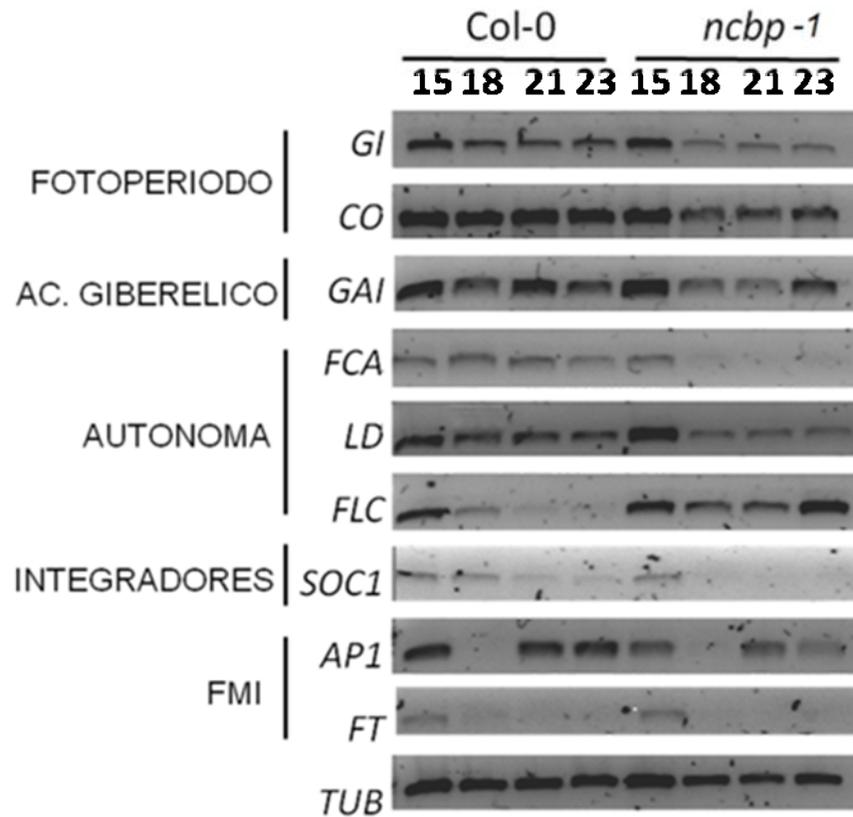


Figura 16. Análisis por RT-PCR de los niveles de mRNA de distintos genes de floración en diferentes días del desarrollo en plantas silvestres y *ncbp-1*.

Estos resultados sugieren que la ausencia de nCBP altera la expresión de al menos un gen de la vía autónoma de floración, lo que condujo a evaluar otros genes de la vía autónoma.

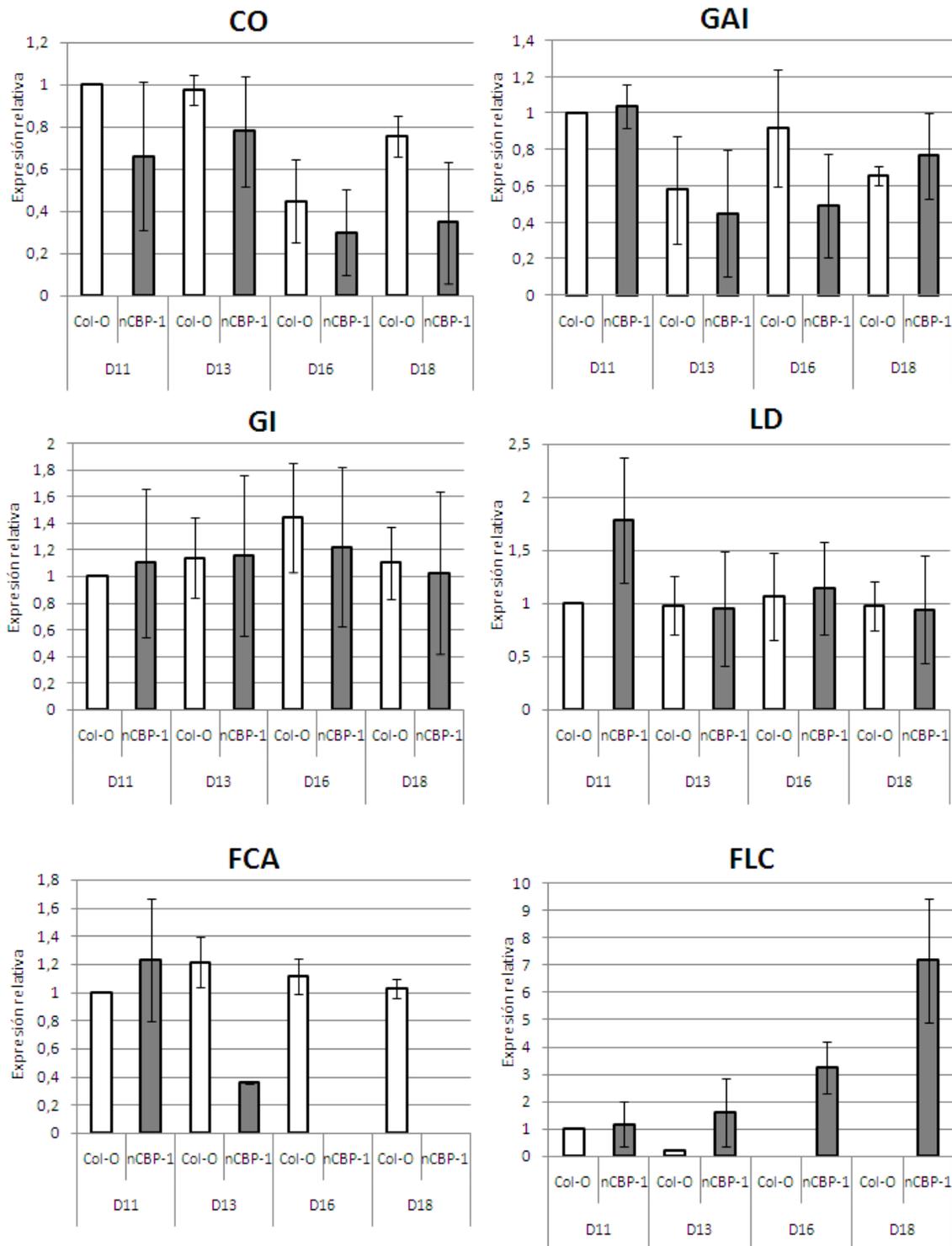


Figura 17. Nivel de expresión de genes de floración en la mutante *ncbp-1*. Análisis densitométrico de tres experimentos independientes del análisis de expresión por RT-PCR semicuantitativo de los niveles de mRNA de distintos genes de floración en diferentes días del desarrollo en plantas silvestres y *ncbp-1*.

Con el fin de evaluar si el efecto de retraso en el tiempo de floración se debía exclusivamente a *FCA* o a otros genes de la vía autónoma, se evaluaron los niveles de transcrito de: *LD*, *FY*, *FLD*, *FVE* y *FLK* así como de *FRI* y de *AGL28*. *FRI* se ha propuesto como un estimulador de *FLC* y *AGL28* como estimulador de la transcripción de *FCA* y otros genes de la vía autónoma. La figura 18 muestra que los niveles de expresión de *FRI*, *FVE*, *FY*, *FLD* y *FLK* son similares para la mutante *ncbp-1* y las plantas silvestres, no así *AGL28*, que presentó niveles muy bajos en *ncbp-1* desde el día 15 post-germinación y casi inexistentes en el día 18.

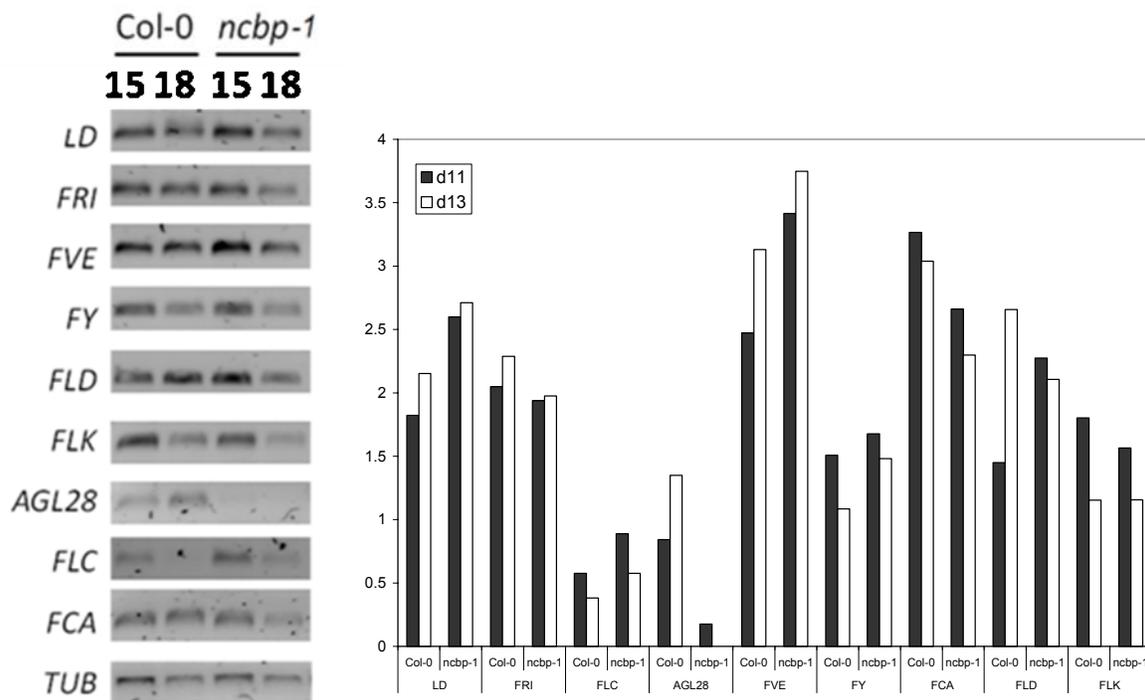


Figura 18. Análisis por RT-PCR de distintos genes de la vía autónoma en diferentes días del desarrollo en plantas silvestres y *ncbp-1*.

8.3 nCBP PODRÍA REGULAR LA EXPRESIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN LA EMBRIOGÉNESIS

Mutantes de genes de la vía autónoma presentan letalidad embriogénica (Marquard *et al.*, 2006). Dado que *ncbp-1* muestra alteraciones en la expresión de estos genes, se decidió, como parte de la caracterización fenotípica, buscar la

letalidad embriogénica en esta mutante. El análisis de embriones en silicuas mostró una frecuencia de 292 embriones abortados de un total de 1845 embriones analizados, lo que indica un porcentaje de absorción de aproximadamente de 13% (Figura 19). En una planta silvestre, el porcentaje de absorción es de alrededor de un 0.5%. Este fenotipo sugiere que nCBP podría regular la expresión de proteínas involucradas en la embriogénesis de *A. thaliana*.

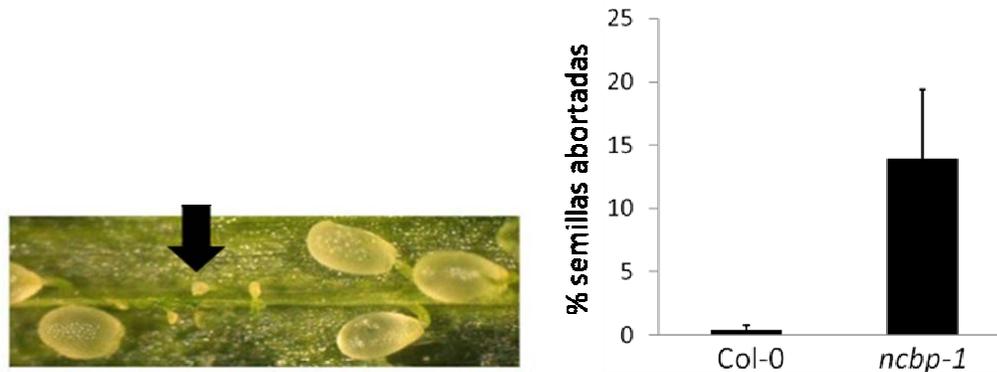


Figura 19. **Frecuencia de semillas abortadas en la mutante *ncbp-1***. Semillas abortadas en la mutante *ncbp-1* indicadas con flecha negra. Fotos y datos tomados por el Dr. Arturo Guevara. IBT. UNAM

8.4 LA SOBRE-EXPRESIÓN DE nCBP-GFP NO PRODUCE ALTERACIÓN EN LA FLORACIÓN DE LA PLANTA OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS

8.4.1 Obtención de plantas transgénicas que sobre-expresan la proteína nCBP-GFP en *Arabidopsis thaliana*

Para obtener plantas que sobre-expresaran nCBP-GFP se generó un vector que contiene la región codificante del gen *nCBP* fusionada a *GFP* bajo el promotor constitutivo CaMV35S (*35S::nCBP::GFP*). Para generar la construcción, se diseñaron cebadores que permitieron amplificar la región codificante de *nCBP* mediante RT-PCR (Figura 20A) y su posterior inserción de esta región en el vector pENTR/D-TOPO (Figura 20B y Apéndice).

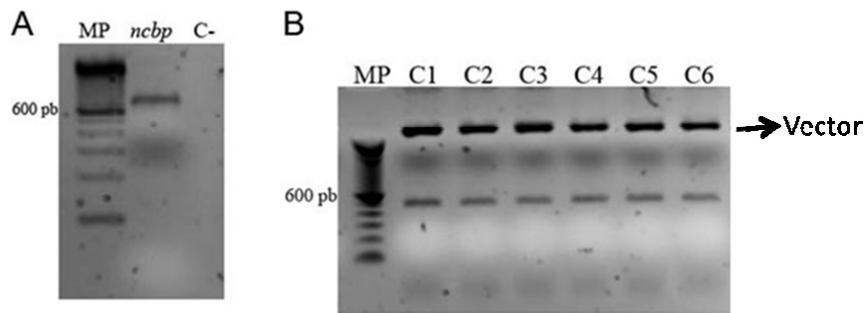


Figura 20. **Clonación del ORF *nCBP* en el vector pENTR/D-TOPO.** (A) Amplificación de *nCBP* mediante RT-PCR. (B) Digestión de DNA plasmídico de las clonas positivas con las enzimas *EcoRI* y *AscI*. En el caso del inserto *nCBP* clonado en sentido correcto, la banda esperada es de 500 pb. MP: marcador de peso molecular.

Una vez obtenido este vector, se clonó *nCBP* en el vector pEarleyGate103 mediante la técnica de Gateway (Figura 21 y Apéndice). Este último contiene el promotor CaMV35S y permite la expresión de *nCBP* fusionada a la proteína GFP. Para comprobar la fusión se realizó PCR amplificando la región codificante de *nCBP* y *GFP*, la clona positiva se mandó secuenciar para saber si entre *nCBP* y *GFP* no existía codón de paro y si *GFP* estaba en marco de lectura correcto (Figura 22).

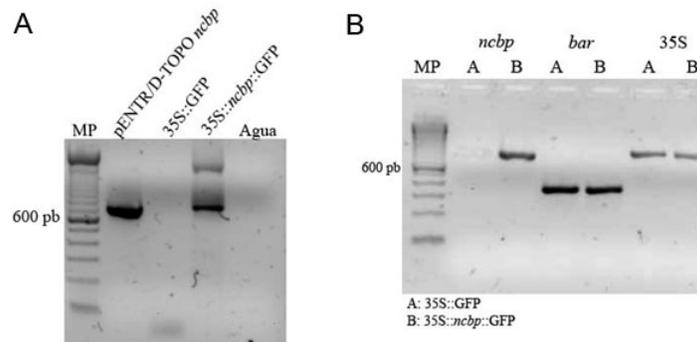


Figura 21. **Clonación de *nCBP* en el vector pEarleyGate103.** (A) Amplificación del inserto *nCBP* fusionado a GFP (35S::*nCBP*::*GFP*). Como control negativo se utilizó la construcción 35S::*GFP* y como control positivo la construcción pENTR/D-TOPO *nCBP*. (B) Amplificación de *nCBP*, *BAR* y el promotor 35S en las construcciones 35S::*GFP* y 35S::*nCBP*::*GFP*. MP marcador de peso molecular.

RESULTADOS

```

nCBP__GFP      MEVLDRRDDEIRDSEGNMDSIKSHYVTDVSEERRSRELKGDGHDPLRYKFSIWYTRRTPGV 60
nCBP           MEVLDRRDDEIRDSEGNMDSIKSHYVTDVSEERRSRELKGDGHDPLRYKFSIWYTRRTPGV 60
GFP            -----

nCBP__GFP      RNQSYEDNIKKMVEFSTVEGFWACYCHLARSSLLPSPTDLHFFKDGIRPLWEDGANCNGG 120
nCBP           RNQSYEDNIKKMVEFSTVEGFWACYCHLARSSLLPSPTDLHFFKDGIRPLWEDGANCNGG 120
GFP            -----

nCBP__GFP      KWIIRFSKVVSARFWEDLLLALVGDQLDDADNICGAVLSVRFNEDIISVWNRNASDHQAV 180
nCBP           KWIIRFSKVVSARFWEDLLLALVGDQLDDADNICGAVLSVRFNEDIISVWNRNASDHQAV 180
GFP            -----

nCBP__GFP      MGLRDSIKRHLKLP HAYVMEYKPHDASLRDNSSYRNTWLRGKGGAADPAFLYKVVLEMVD 240
nCBP           MGLRDSIKRHLKLP HAYVMEYKPHDASLRDNSSYRNTWLRG----- 221
GFP            -----

nCBP__GFP      LTSKGELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTTLKF 286
nCBP           -----
GFP            -----ELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTTLKF 41
  
```

Figura 22. **Secuenciación de nCBP fusionado a GFP.** Se observa que el gen clonado de *ncbp* es 100% idéntico al reportado en bases de datos y no existe codón de paro entre nCBP y GFP.

Con esta construcción se transformó la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* y con esta cepa se transformaron plantas silvestres ecotipo Col-0 mediante la técnica de floral dip. Una vez transformadas las plantas y obtenidas las semillas (F0) se seleccionaron las plantas transgénicas por su resistencia al herbicida BASTA. De esta selección se obtuvieron tres líneas independientes (S2, S3 y S6) en la generación F1. Para plántulas de estas líneas se comprobó la sobre-expresión de *nCBP* mediante RT-PCR (Figura 23).

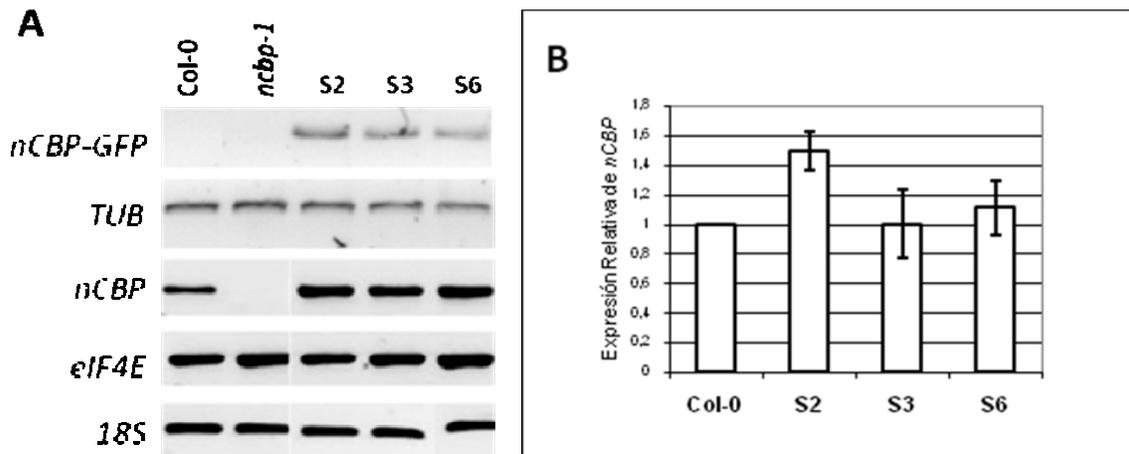


Figura 23. **Caracterización molecular de las plantas transgénicas.** (A) Análisis de expresión de los transcritos *nCBP*, *GFP*, *eIF4E* y *18S* de las plantas transgénicas mediante RT-PCR semicuantitativo. (B) Análisis estadístico mediante densitometría de RT-PCR del nivel de expresión

de *nCBP* en las líneas transgénicas. S2, S3 y S6 representan tres líneas distintas de sobreexpresión de *nCBP* fusionado a GFP.

Los resultados mostraron que las tres líneas de sobre-expresión (S2, S3 y S6) expresan *nCBP-GFP* y muestran un aumento en los niveles de *nCBP*, no así para el factor de inicio de la traducción *eIF4E* (Figura 23).

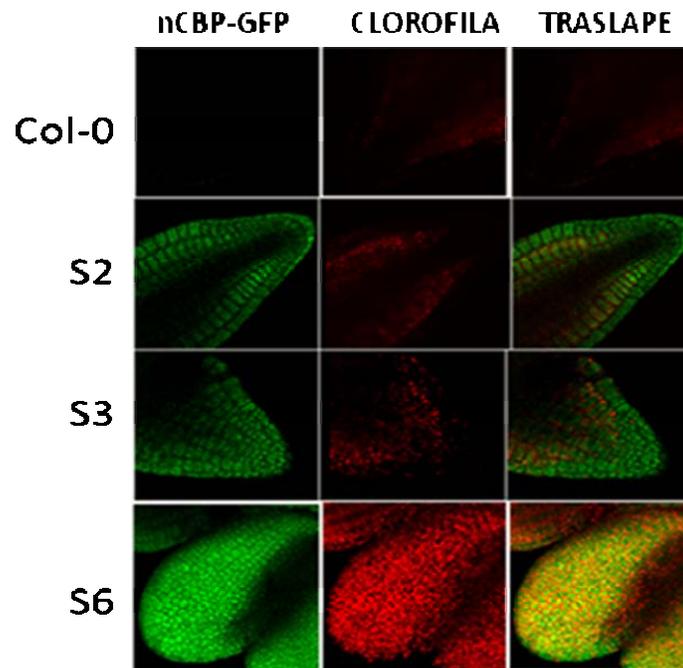


Figura 24. **Expresión de la proteína de fusión *nCBP-GFP* en tres líneas independientes de plantas transgénicas.** Fotos de microscopía confocal tomadas a embriones de las distintas plantas transgénicas.

También se buscó en estas líneas la expresión de la proteína de fusión *nCBP-GFP* por microscopía confocal observando fluorescencia a nivel de embriones a diferencia de una planta silvestre y se pudo concluir que dichas líneas expresan la proteína de fusión (Figura 24).

8.4.2 La sobre-expresión de nCBP-GFP no produce alteración en la floración.

Una vez obtenidas las tres líneas independientes *nCBP-GFP* se les caracterizó fenotípicamente midiendo el tiempo de floración bajo la condición de DL para evaluar si la sobreexpresión de nCBP inducía el efecto contrario a su ausencia, es decir un adelanto en el tiempo de floración. Se observó que las tres líneas de sobre-expresión no presentan alteración fenotípica apreciable en el tiempo de floración (Figura 25A). Como plantas *ncbp-1* presentan cierta letalidad embriogénica se evaluaron silicuas de las transgénicas *ncbp-GFP*. Los resultados que se muestran en la figura 25B indican que no hay alteración en la embriogénesis de estas plantas.

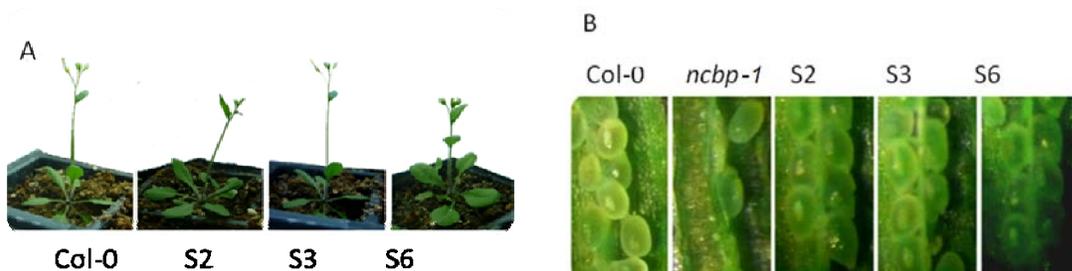


Figura 25. **Caracterización de plantas transgénicas.** S2, S3 y S6 son líneas independientes de sobre-expresión de la proteína de fusión nCBP-GFP. A) Análisis de tiempo de floración bajo condiciones de DL. B) Análisis de letalidad embriogénica en las plantas mutantes.

8.5 nCBP ES UNA PROTEÍNA CITOPLASMÁTICA

Con el vector que permite expresar nCBP fusionado a GFP de manera constitutiva se transformaron transitoriamente protoplastos de *Arabidopsis thaliana* y mediante microscopía confocal se obtuvieron imágenes que muestran que nCBP es mayoritariamente una proteína citoplasmática, acumulada en regiones específicas en todo el citoplasma, sugiriendo una localización en gránulos de estrés y/o cuerpos P (Figura 26).

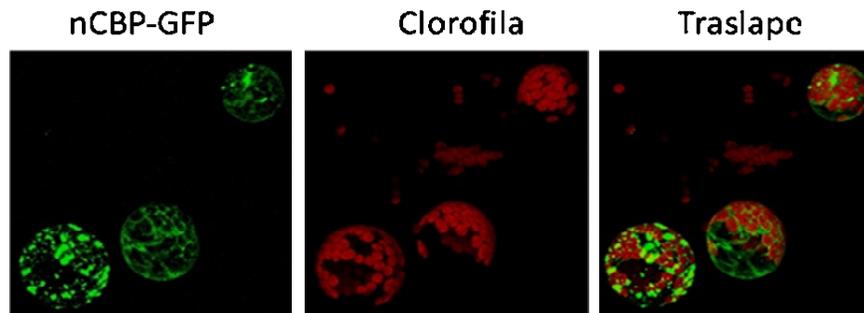


Figura 26. Localización subcelular de nCBP-GFP en protoplastos de *A. thaliana*. La transformación e imágenes fueron obtenidas en el IBT, UNAM

8.6 OBTENCION DE PLANTAS TRANSGÉNICAS *pnCBP::GUS* EN *Arabidopsis thaliana*.

Para poder evaluar la expresión espacio temporal de nCBP se construyó un vector que permitiera expresar el gen reportero de la β -glucoronidasa (GUS) bajo el promotor de *nCBP* (*pnCBP*. Figura 27).

Para realizar esto se buscó la región 5' del gen nCBP, que contiene los elementos regulatorios y su promotor, en el programa bioinformático "Regulatory Sequence Analysis Tools" (<http://embnet.ccg.unam.mx/rsa-tools>), este programa nos permite saber la secuencia río arriba del inicio de la traducción estableciendo el número de pares de bases que se desea o bien indica la secuencia antes de que se encuentre otro ORF. En el caso de *nCBP* existen 796 pb río arriba del codón de inicio de la traducción sin que se traslape con otro ORF y esta fue la secuencia que decidimos utilizar como 5' de *nCBP* (Figura 27). Esta secuencia fue analizada bioinformáticamente, mediante el programa PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/index.html>) para determinar los posibles elementos *cis*, así como la caja TATA teórica. A partir de este análisis se clonaron aproximadamente 780 pares de bases río arriba del codón de inicio. La región 5' de *nCBP* contiene la caja TATA y varias posibles secuencias regulatorias que

podrían unir a factores de transcripción específicos. El fragmento correspondiente a la región 5' de *nCBP* se obtuvo mediante PCR a partir de una planta de *A. thaliana* silvestre y se clonó en el vector pGEM-Teasy (Figura 28A y B)

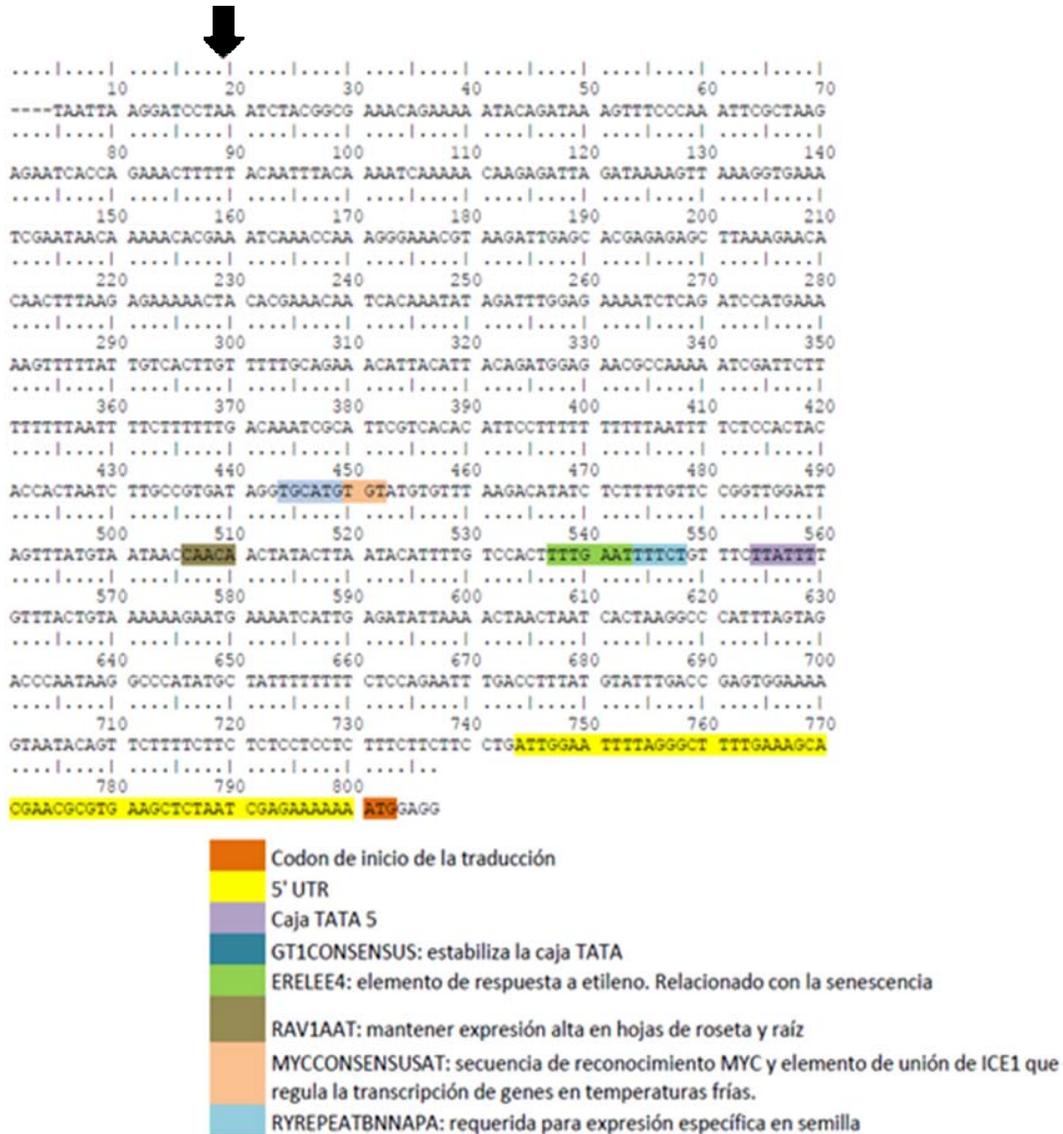


Figura 27. Promotor teórico de *nCBP*; 796 pb rio arriba del codón de inicio de la traducción. Codón de inicio ATG marcado con rojo, el extremo 5'UTR con letras naranjas y la caja TATA con letras moradas.

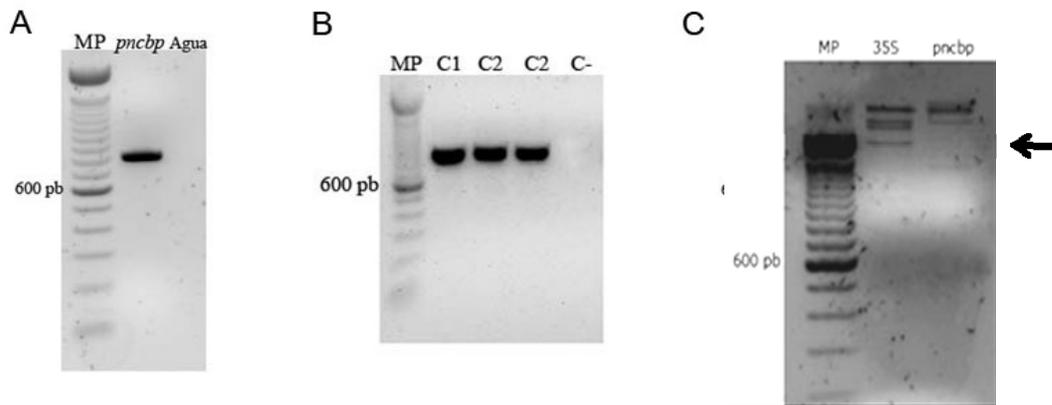


Figura 28. **Clonación de la región 5' de *nCBP*.** (A) Amplificación de *pnCBP* por PCR. (B), Amplificación de *pnCBP* en cada clona positiva después de la clonación en el vector pGEM-T easy, C- control negativo. (C) Digestión con la enzima *EcoRV* de la clona que contiene la construcción *pnCBP::GUS* (*pnCBP*) y digestión de la clona que contiene la construcción *35S::GUS* (35S) como control.

Una vez clonado la región 5' de *nCBP* en este vector se secuenció para verificar que no presentara cambios respecto a la secuencia reportada (Figura 29). Posteriormente, se quitó el fragmento que codifica para 35S en el vector pBIN35SGUS utilizando enzimas de restricción apropiadas y se insertó en su lugar *pnCBP*, mediante las mismas enzimas (Ver Apéndice). *Agrobacterium tumefaciens* se transformó con ambos vectores, *35S::GUS* y *pnCBP::GUS*, y se verificó mediante cortes con la enzima de restricción *EcoRV* que el vector *pnCBP::GUS* contenía a *pnCBP* y no a 35S (Figura 19C). Con las clonas de *Agrobacterium* que contenían el vector *pnCBP::GUS* y *35S::GUS* respectivamente se transformaron plantas silvestres mediante floral dip.

Referencia	----TAATTAAGGATCCTAAATCTACGGCGAAACAGAAAAATACAGATAAAAGTTTCCCAAATTCGCTAAGAGAATCACCAGAAACTTTTACAAATTTACA
Clonado	AATTCGATTAAGCTTCCTAAATCTACGGCGAAACAGAAAAATACAGATAAAAGTTTCCCAAATTCGCTAAGAGAATCACCAGAAACTTTTACAAATTTACA
Referencia	AAATCAAAAACAAAGAGATTAGATAAAAAGTTAAAGGTGAAATCGAATAACAAAAACACGAAATCAAACCAAAGGGAAACGTAAGATTGAGCACGAGAGAGC
Clonado	AAATCAAAAACAAAGAGATTAGATAAAAAGTTAAAGGTGAAATCGAATAACAAAAACACGAAATCAAACCAAAGGGAAACGTAAGATTGAGCACGAGAGAGC
Referencia	TTAAAGAACACAACCTTTAAGAGAAAACTACACGAAACAATCACAATAATAGATTGGAGAAAAATCTCAGATCCATGAAAAAGTTTTATTGTCACTTGT
Clonado	TTAAAGAACACAACCTTTAAGAGAAAACTACACGAAACAATCACAATAATAGATTGGAGAAAAATCTCAGATCCATGAAAAAGTTTTATTGTCACTTGT
Referencia	TTTTGCAGAAACATTACATTACAGATGGAGAACGCCAAAAATCGATTCTTTTTTTTAAATTTCTTTTTTTGACAAAATCGCATTTCGTCACACATTCTTTTT
Clonado	TTTTGCAGAAACATTACATTACAGATGGAGAAATGCCAAAAATCGATTCTTTTTTTTAAATTTCTTTTTTTGACAAAATCGCATTTCGTCACACATTCTTTTT
Referencia	TTTTTAATTTTCTCCACTACACCCTAATCTTGCCGATAGGTGCATGTGTATGTGTTTAAAGACATATCTCTTTTGTTCGGTTGGATTAGTTTATGTA
Clonado	TTTTTAATTTTCTCCACTACACCCTAATCTTGCCGATAGGTGCATGTGTATGTGTTTAAAGACATATCTCTTTTGTTCGGTTGGATTAGTTTATGTA
Referencia	ATAACCAACAACTATACTTAATACATTTTGTCCACTTTTGAATTTTCTGTCTTTATTTTGTCTTACTGTAAAAAAGAAATGAAAAATCATTGAGATATTTAA
Clonado	ATAACCAACAACTATACTTAATACATTTTGTCCACTTTTGAATTTTCTGTCTTTATTTTGTCTTACTGTAAAAAAGAAATGAAAAATCATTGAGATATTTAA

Figura 29. **Alineamiento del fragmento de *pnCBP* secuenciado a partir de *pnCBP* en pGEM-Teasy con la región 5' de *nCBP* reportado en bases de datos (RSA-tools).**

9. DISCUSIÓN

La proteína de unión a CAP nCBP es una proteína citoplasmática, cuya expresión es ubicua durante el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*, como lo demostraron estudios de expresión de la proteína de fusión nCBP-GFP en protoplastos y los análisis de RT-PCR semicuantitativos realizados en diferentes tejidos de la planta (Figura 11 y 21).

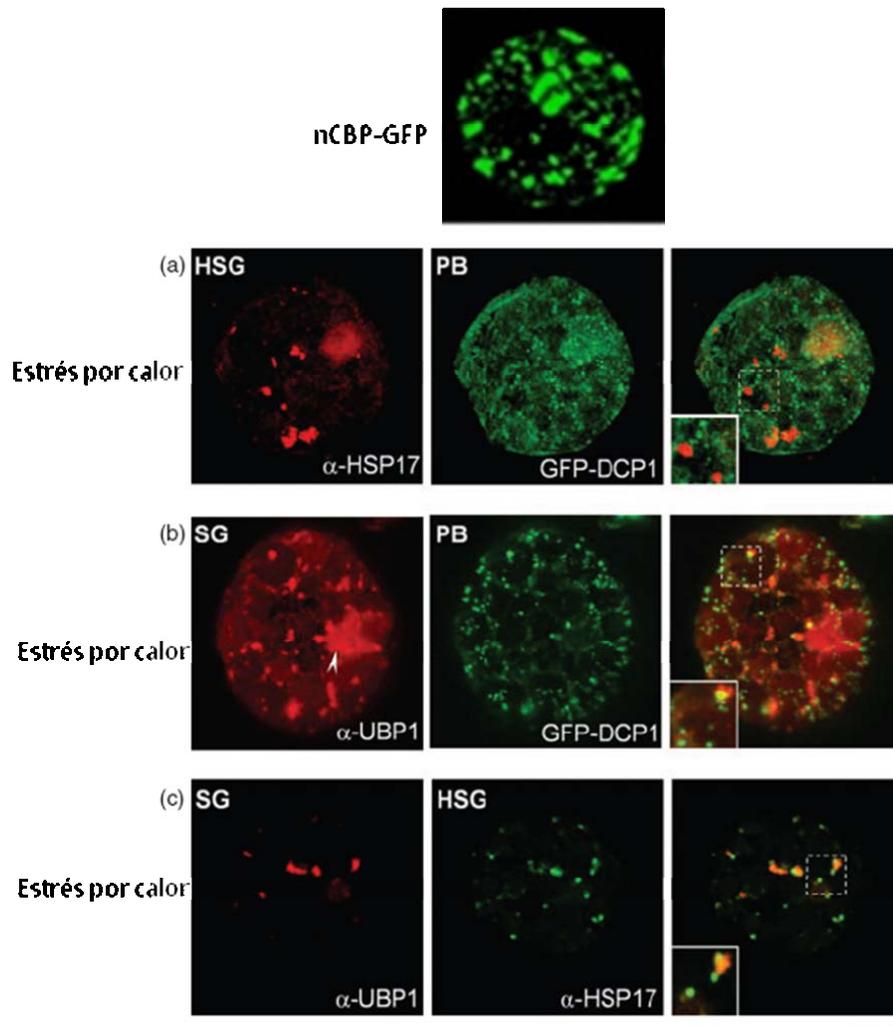


Figura 30. **Localización citoplasmática de SGs, PBs y HSGs.** Los cuerpos P (PBs), los gránulos de estrés (SGs) y los gránulos de estrés por calor (HSGs) se observan en protoplastos de tabaco. Para la detección de PBs los protoplastos fueron transformados con un vector que codifica GFP-DCP1. Los HSGs y SGs se detectaron por inmunofluorescencia. Se utilizó el marcador HSP17-CI como marcador de HSGs y UBP1 como marcador SGs.

Como se observa en la figura 26 nCBP-GFP se presenta en cúmulos que podrían corresponder a gránulos de estrés. La similitud de morfología y distribución de estos agregados que contienen nCBP-GFP y los que se presentan cuando se utilizan marcadores de gránulos de estrés sugieren que nCBP podría estar presente en estos gránulos (Figura 30 Weber *et al.*, 2008).

Los gránulos de estrés (SGs) son agregados citoplasmáticos que ante un estrés se producen rápidamente y almacenan mRNA. Durante condiciones de estrés los mRNAs que codifican para proteínas de mantenimiento celular se dirigen de los ribosomas a los gránulos de estrés en sincronía con la baja de traducción producida por el estrés. Los mRNAs reclutados en los gránulos de estrés no son degradados y están disponibles para una rápida re-iniciación de la traducción después de que pase el estrés (Collins y Penny, 2009. Anderson y Kedersha, 2007). Los gránulos de estrés pueden interactuar con los cuerpos P (PBs), los cuales son agregados citoplasmáticos en forma de partículas esféricas que incrementan su tamaño y número en presencia de estrés. En los cuerpos P se almacenan y degradan mRNAs (Collins y Penny, 2009). En plantas se han descrito SGs, PBs y gránulos de estrés por calor llamados HSGs (Weber *et al.*, 2008). Como marcadores de estos gránulos se utilizan las proteínas DCP1 (decapping enzyme 1), para PBs, HSP17-Cl (class I small heat shock protein) para HSGs y UBP1 (ubiquitin-specific protease 1) para SGs. Para poder saber si nCBP se encuentra en alguno de estos gránulos se podrían hacer estudios de colocalización con los diferentes marcadores para HSGs, SGs y PBs en protoplastos transformados transitoriamente con el vector que codifica para nCBP-GFP.

Estudios previos en el laboratorio indicaron que las mutantes homocigas nulas para esta proteína (*ncbp-1*) presentan un fenotipo de retraso en el tiempo de floración, por lo cual en esta trabajo se abordó el papel de nCBP en el fenómeno de floración utilizando la mutante *ncbp-1*.

La floración es un proceso altamente regulado y complejo que percibe, mediante diversas vías, las señales endógenas y ambientales que indican el tiempo adecuado para la reproducción. El hecho de que las plantas florezcan en un tiempo determinado y adecuado permite el éxito reproductivo de la especie. Las señales externas percibidas por la planta generan una cascada de expresión y activación de elementos inductores y represores que tienen como objetivo final modificar el programa de expresión genética de un meristemo apical o axial para transformarlo en un meristemo floral capaz de producir el órgano reproductor de la planta, la flor. Las cuatro vías hasta ahora descritas que regulan el tiempo de floración son: vía de fotoperiodo, vía de giberelinas, vía autónoma y vía de vernalización (Parcy, 2005).

Para conocer en cuál o cuáles de estas vías podría participar nCBP, se estudió el tiempo de floración bajo cuatro condiciones que representan la señalización de las diferentes vías de floración. La ausencia de nCBP al parecer afecta solamente la expresión de genes de la vía autónoma mientras que genes del fotoperiodo o giberelinas no muestran diferencias entre las plantas silvestres y mutantes *ncbp-1* (Figura 16). Estos resultados concuerdan con el fenotipo de retraso en el tiempo de floración observado, el cual sólo es revertido bajo la condición de vernalización (Figura 15). Los resultados obtenidos para la mutante *ncbp-1* coinciden con fenotipos observados en otras mutantes de genes de la vía autónoma (Marquard *et al.*, 2006).

En particular, se observó que en ausencia de nCBP disminuye el nivel del transcrito de *FCA* y aumenta el de *FLC* a partir del día 18 post-germinación, en comparación con los niveles de expresión de estos mismos transcritos en plantas silvestres (Figura 17 y 31).

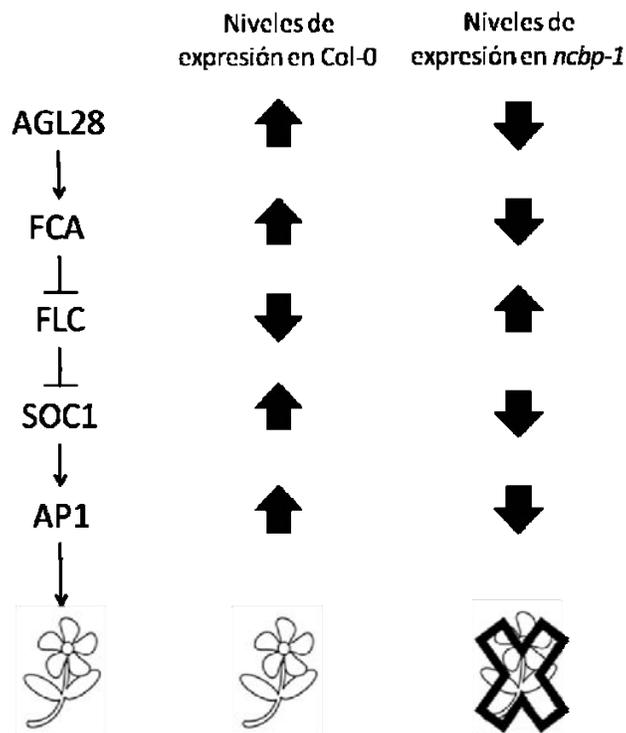


Figura 31. Esquema de las alteraciones en la expresión de genes de la vía autónoma presentadas en la mutante *ncbp-1*.

FLC es considerado como el represor general de la floración. Su expresión está regulada positivamente por *FRI* y negativamente tanto por la vía de vernalización como por la vía autónoma (Marquard *et al.*, 2006). Los genes de la vía autónoma que reprimen a *FLC* conocidos hasta ahora son: *FVE*, *FPA*, *FY*, *FCA*, *REF6* (*RELATIVE OF EARLY FLOWERING 6*), *CBP* (*CREB-binding protein*), *FLD* y *FLK* (Figura 32).

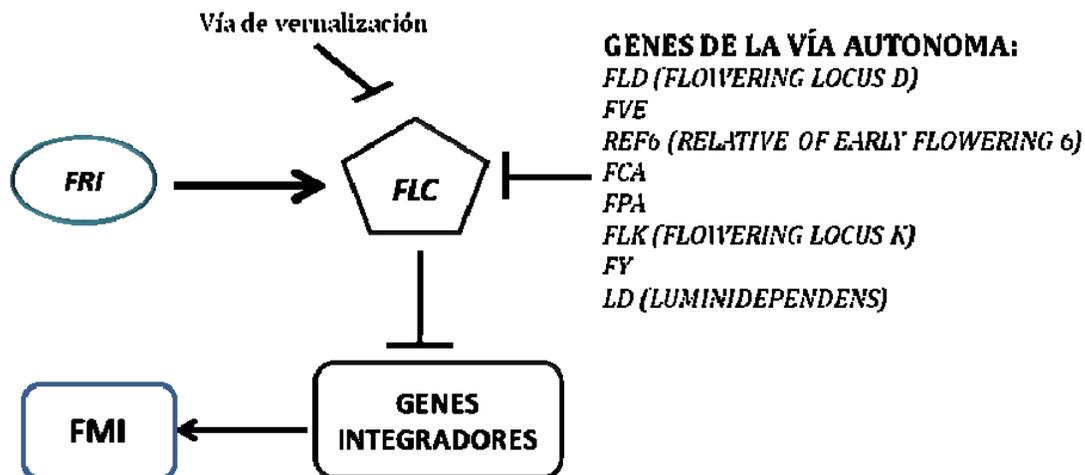


Figura 32. Genes de la vía autónoma de floración y la regulación de *FLC*.

La manera en cómo estos actúan para promover la floración aún no se ha descrito totalmente pero estudios recientes sugieren que *FPA* actúa parcialmente a través de la demetilasa *FLD*, independientemente de *FY*, para reprimir a *FLC*. *FCA* actúa a través de *FY* y *FLD*. *FVE* actúa independientemente de *FCA*. Estas interacciones demuestran que la vía autónoma no actúa de una manera simple sino como un módulo de proteínas cuya función es unirse a las regiones regulatorias de *FLC* y de esta manera reducir la transcripción del loci correspondiente (vía remodeladores de cromatina). Se sugiere que estos módulos también podrían interactuar con la maquinaria de transcripción y de maduración de RNAs mensajeros (Baurle *et al.*, 2008).

En una planta silvestre, cuando es tiempo de florecer, la expresión de los genes de la vía autónoma reprimen la expresión de *FLC*. Esta represión conlleva a la des represión de los genes integradores, mediada por *FLC*, los cuales activan a los genes de identidad del meristemo floral (*FMI*). Los genes *FMI* son los responsables directos del cambio en la expresión genética que da origen a un meristemo floral (Figura 32. Corbesier *et al.*, 2006. Jaeger *et al.*, 2006. Parcy 2005).

En la mutante *ncbp-1*, los niveles del transcrito de *FLC* se mantienen altos en los días que corresponderían al cambio hacia la floración en plantas silvestres (Figura 16). Esta desregulación podría deberse a los bajos niveles de uno de sus represores, *FCA*. La presencia de *FLC* correlaciona con niveles menores de expresión de genes integradores y FMI, representados por *SOC1* y de *AP1*, respectivamente (Figura 16 y 31). Estos genes muestran cierto nivel de expresión y no ausencia total porque son regulados por otras vías de floración además de la autónoma las cuales no están afectadas en la mutante *ncbp-1*.

Dado que *FCA* funciona río arriba de *FLC* en la vía autónoma, era importante saber si *nCBP* tenía un papel en la regulación de otros genes de la vía autónoma. El análisis de RT-PCR semicuantitativo indicó que la expresión de los genes *FVE*, *FPA*, *FY*, *FLD* y *FLK* de la vía autónoma así como *FRI* no cambian en *ncbp-1* respecto a los de la planta silvestre en los días donde se observaron los cambios en *FCA* y *FLC* (Figura 17).

A la fecha, se han descrito dos formas de regulación de *FCA*; su autorregulación mediada por splicing alternativo y por sitios de poliadenilación tempranos (Quesada *et al.*, 2005. Quesada *et al.*, 2003) y una regulación transcripcional mediada por *AGL28*. Estudios de sobreexpresión de *AGL28*, una proteína de tipo MADS box 1, indicaron que ésta activa a *FCA*, *LD* y *FY*, todos genes de la vía autónoma (Yoo *et al.*, 2006). Debido a estos antecedentes se evaluó el nivel de expresión de *AGL28* de igual manera que el de los genes de la vía autónoma y se encontró que en la mutante *ncbp-1* se encuentra disminuida la expresión de *AGL28* a los días 16 y 18 post-germinación en comparación con las plantas silvestres (Figura 17).

Con estos resultados cabe considerar que los niveles de *FCA* podrían deber su disminución a los bajos niveles de *AGL28* y esto originar el retraso en el tiempo de floración observado (Figura 31). Sin embargo, una observación interesante es que a pesar de que los niveles de *ALG28* son muy bajos sólo se observa

desregulación en los niveles de *FCA* y no de *LD* y *FY*, los cuales se han propuesto también como blancos de *AGL28* (Yoo *et al.*, 2006). Cabe mencionar que no se ha realizado un análisis de expresión de estos genes para mutantes nulas de *AGL28*.

La regulación de *AGL28* aún se desconoce. Mediante redes de interactomas de proteínas tipo MADS box se presume que *PHE1* (*PHERES1*) interactúa con *AGL28*, *AGL40* y *AGL62* (Folter *et al.*, 2005). De estas proteínas se conoce que *MEDEA* reprime la expresión de *PHE1* y este fenómeno está involucrado en la embriogénesis al igual que la regulación de la expresión genética mediada por *AGL62* (la mutante *agl62* presenta embriones abortados).

El fenotipo de letalidad embriogénica es frecuente en mutantes de algunos genes de la vía autónoma de floración; Mutantes dobles o simples de genes de la vía autónoma como *FVE*, *FY*, *FLD*, *FLK*, *FPA*, entre otros, presentan letalidad embriogénica con una frecuencia de 20 a 50% (Tabla 2. Marquard *et al.*, 2006. Quesada *et al.*, 2005). Debido a que nCBP pareciera regular la vía autónoma, se evaluó si la mutante *ncbp-1* presentaba letalidad embriogénica y encontrándose un promedio de 13% de embriones abortados por planta (Figura 19). Es interesante señalar que el ortólogo de nCBP en *Drosophila*, d4E-HP, también presenta letalidad embriogénica cuando se muta dicho gen (Cho *et al.*, 2005; Hernandez *et al.*, 2005), lo que podría indicar una función conservada para los miembros de clase II de la familia de eIF4E.

Estos resultados sugieren que nCBP podría participar en la regulación de la traducción durante la embriogénesis. Esta regulación podría ser sobre genes exclusivos de la embriogénesis o bien genes que su ausencia provoque letalidad embriogénica. Se ha encontrado que mutantes en *FPA* y *FY* presentan tanto retraso en el tiempo de floración como letalidad embriogénica (Marquard *et al.*, 2006). Sin embargo, en la mutante *ncbp-1* no está afectada la expresión de *FY* (Figura 16) y no se evaluó la expresión de *FPA*. Por lo tanto, *FPA* puede ser otro candidato cuya expresión debe ser evaluada en la mutante *ncbp-1*. Por otro lado,

la disminución de los niveles de *AGL28* también pudiera afectar la regulación de la embriogénesis mediada por proteínas tipo MADS box y el tiempo de floración mediado por *FCA*. En cualquiera de estos casos se requiere demostrar el mecanismo por el cual nCBP regula su expresión.

Los resultados obtenidos con plantas que sobreexpresan nCBP-GFP no muestran un fenotipo contrario al observado para la mutante *ncbp-1* y son similares a las plantas silvestres en cuanto a floración y embriogénesis (Figura 25). Esto podría indicar que nCBP no actúa sola en el mecanismo de regulación sobre sus genes blanco. Es muy probable que una o varias proteínas interaccionan con nCBP y a través de estos complejos se regula el destino de los mensajeros blanco. De esta manera, no sería suficiente sobreexpresar a nCBP para observar el efecto contrario a su ausencia. Otra de las razones por las que no se observó fenotipo podría ser debida a que la proteína de fusión nCBP-GFP no sea funcional, tanto su unión con CAP y/o su unión a otras proteínas que le permitan llevar a cabo su función. De esta manera no importa la cantidad de nCBP-GFP presente en la célula no se observaría un fenotipo. Debido a esto, uno de los experimentos que faltan por realizarse es evaluar la funcionalidad de la proteína de fusión nCBP-GFP, esto se podría hacer mediante la complementación de la mutante *ncbp-1* con la proteína nCBP-GFP. Si las plantas complementadas con esta proteína florecen al igual que la silvestre y no presentan letalidad embriogénica querrá decir que la proteína nCBP-GFP es funcional. Otro experimento sería el de complementar la mutante *ncbp-1* con nCBP y si estas plantas transgénicas florecen al igual que la silvestre y no presentan letalidad embriogénica diría que todos los efectos observados en la mutante *ncbp-1* son debidos a la ausencia de nCBP en la mutante.

Existen diversos modelos que podrían explicar el papel de nCBP en los procesos fisiológicos de la planta. Uno de estos modelos es aquel en el que nCBP podría regular traduccionalmente uno o varios genes. El modelo de regulación traduccional mediado por nCBP que se propone es en base a la función de su

ortólogo en *Drosophila* d4E-HP. d4E-HP inhibe selectivamente la traducción del mensajero *caudal* (*CAD*) uniéndose al CAP de este mensajero y a una proteína denominada BICOIDE, la cual interacciona específicamente con una secuencia en el extremo 3' UTR del mensajero de *CAD*. Estas interacciones permiten que se circularice el mensajero y se impida el reclutamiento de los factores de inicio de la traducción, como eIF4F, y de esta manera se reprime su traducción (Figura 5. Cho *et al.*, 2005; Hernandez *et al.*, 2005). Bajo este modelo, nCBP podría circularizar al mRNA él mismo o mediado por otra proteína, como BICOIDE en el modelo de *Drosophila*. nCBP podría tener una función similar a 4E-HP, en la que se une al CAP de un mRNA específico y a otra proteína la cual se une específicamente a una secuencia en el 3'UTR de este mensajero, permitiendo la circularización y finalmente la represión traduccional de dicho mensajero (Figura 33A). Otro posible modelo es el de la traducción selectiva de mensajeros; En este modelo nCBP recluta a la maquinaria de inicio de la traducción junto con otras proteínas que se unen a un mensajero específico y este complejo promueve o favorece la traducción de este mensajero (Figura 33B). En ambos modelos se propone que nCBP interacciona directa o indirectamente con otra proteína la cual se une selectivamente a determinado mensajero brindando especificidad a este tipo de regulación. De otra manera la función de nCBP podría ser compensada por otro miembro de la familia eIF4E de *Arabidopsis*, ya que todas estas proteínas son capaces de unir el 5'CAP presente en los mensajeros.

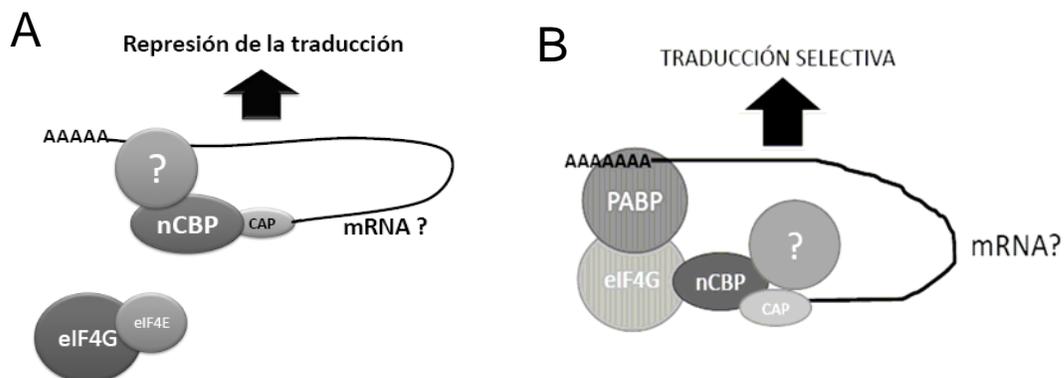


Figura 33. Modelos de la posible regulación traduccional mediada por nCBP

10. CONCLUSIONES

- En *Arabidopsis thaliana* nCBP participa en la regulación del tiempo de floración, específicamente de la vía autónoma. La ausencia de esta proteína cambia los niveles de expresión de genes de la vía autónoma de floración, específicamente *AGL28*, *FCA* y *FLC*. La ausencia de nCBP produce un retraso en el tiempo de floración de 10 días bajo condiciones de día largo, de día corto y con aplicación de ácido giberélico y este retraso no se presenta después de un período vernalización.
- En *Arabidopsis thaliana* la ausencia de nCBP produce un 13% de letalidad embriogénica lo cual indica que el efecto de la mutación es pleiotrópico. La proporción de letalidad observada coincide con un efecto indirecto de nCBP en la embriogénesis de esta planta.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, P. y Kedersha, N.** (2008) Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends Biochem Sci*, **33**, 141-150.
- Asano, K., Clayton, J., Shalev, A. y Hinnebusch, A.G.** (2000) A multifactor complex of eukaryotic initiation factors, eIF1, eIF2, eIF3, eIF5, and initiator tRNA(Met) is an important translation initiation intermediate in vivo. *Genes Dev*, **14**, 2534-2546.
- Ausubel, F.M.** (2000) Arabidopsis genome. A milestone in plant biology. *Plant Physiol*, **124**, 1451-1454.
- Azcon, J. y Talon, M.** (2003) Fundamentos de fisiología vegetal. Ed. McGraw-Hill, 25, 403-417
- Baurle, I. y Dean, C.** (2008) Differential interactions of the autonomous pathway RRM proteins and chromatin regulators in the silencing of Arabidopsis targets. *PLoS ONE*, **3**, e2733.
- Blazquez, M.** (2000) Flower development pathways. *J Cell Sci*, **113 (Pt 20)**, 3547-3548.
- Blazquez, M.A., Ferrandiz, C., Madueno, F. y Parcy, F.** (2006) How floral meristems are built. *Plant Mol Biol*, **60**, 855-870.
- Boss, P.K., Bastow, R.M., Mylne, J.S. y Dean, C.** (2004) Multiple pathways in the decision to flower: enabling, promoting, and resetting. *Plant Cell*, **16 Suppl**, S18-31.
- Browning, K.S.** (1996) The plant translational apparatus. *Plant Mol Biol*, **32**, 107-144.
- Browning, K.S., Webster, C., Roberts, J.K. y Ravel, J.M.** (1992) Identification of an isozyme form of protein synthesis initiation factor 4F in plants. *J Biol Chem*, **267**, 10096-10100.
- Carberry, S.E., Darzynkiewicz, E. y Goss, D.J.** (1991) A comparison of the binding of methylated cap analogues to wheat germ protein synthesis initiation factors 4F and (iso)4F. *Biochemistry*, **30**, 1624-1627.
- Carberry, S.E. y Goss, D.J.** (1991) Wheat germ initiation factors 4F and (iso)4F interact differently with oligoribonucleotide analogues of rabbit alpha-globin mRNA. *Biochemistry*, **30**, 4542-4545.
- Clough, S.J.** (2005) Floral dip: agrobacterium-mediated germ line transformation. *Methods Mol Biol*, **286**, 91-102.
- Collins, L.J. y Penny, D.** (2009) The RNA infrastructure: dark matter of the eukaryotic cell? *Trends Genet*, **25**, 120-128.
- Corbesier, L. y Coupland, G.** (2006) The quest for florigen: a review of recent progress. *J Exp Bot*, **57**, 3395-3403.
- Chandler, J., Martinez-Zapater, J.M. y Dean, C.** (2000) Mutations causing defects in the biosynthesis and response to gibberellins, abscisic acid and phytochrome B do not inhibit vernalization in Arabidopsis fca-1. *Planta*, **210**, 677-682.
- Cho, P.F., Poulin, F., Cho-Park, Y.A., Cho-Park, I.B., Chicoine, J.D., Lasko, P. y Sonenberg, N.** (2005) A new paradigm for translational control: inhibition via 5'-3' mRNA tethering by Bicoid and the eIF4E cognate 4EHP. *Cell*, **121**, 411-423.
- Choi, S.K., Olsen, D.S., Roll-Mecak, A., Martung, A., Remo, K.L., Burley, S.K., Hinnebusch, A.G. y Dever, T.E.** (2000) Physical and functional interaction between the

- eukaryotic orthologs of prokaryotic translation initiation factors IF1 and IF2. *Mol Cell Biol*, **20**, 7183-7191.
- de Folter, S., Immink, R.G., Kieffer, M., Parenicova, L., Henz, S.R., Weigel, D., Busscher, M., Kooiker, M., Colombo, L., Kater, M.M., Davies, B. y Angenent, G.C.** (2005) Comprehensive interaction map of the Arabidopsis MADS Box transcription factors. *Plant Cell*, **17**, 1424-1433.
- Dinkova, T.D., Keiper, B.D., Korneeva, N.L., Aamodt, E.J. y Rhoads, R.E.** (2005) Translation of a small subset of *Caenorhabditis elegans* mRNAs is dependent on a specific eukaryotic translation initiation factor 4E isoform. *Mol Cell Biol*, **25**, 100-113.
- Duprat, A., Caranta, C., Revers, F., Menand, B., Browning, K.S. y Robaglia, C.** (2002) The Arabidopsis eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. *Plant J*, **32**, 927-934.
- Gallie, D.R.** (1998) A tale of two termini: a functional interaction between the termini of an mRNA is a prerequisite for efficient translation initiation. *Gene*, **216**, 1-11.
- Gingras, A.C., Raught, B. y Sonenberg, N.** (1999) eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem*, **68**, 913-963.
- Hempel, F.D., Welch, D.R. y Feldman, L.J.** (2000) Floral induction and determination: where is flowering controlled? *Trends Plant Sci*, **5**, 17-21.
- Henderson, I.R., Liu, F., Drea, S., Simpson, G.G. y Dean, C.** (2005) An allelic series reveals essential roles for FY in plant development in addition to flowering-time control. *Development*, **132**, 3597-3607.
- Hernandez, G., Altmann, M., Sierra, J.M., Urlaub, H., Diez del Corral, R., Schwartz, P. y Rivera-Pomar, R.** (2005) Functional analysis of seven genes encoding eight translation initiation factor 4E (eIF4E) isoforms in *Drosophila*. *Mech Dev*, **122**, 529-543.
- Hidalgo, A.** (2007) Obtención y caracterización de mutantes homocigas de un miembro de la familia eIF4E: nCBP (novel Cap-Binding Protein) en *Arabidopsis thaliana*. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- Imaizumi, T. y Kay, S.A.** (2006) Photoperiodic control of flowering: not only by coincidence. *Trends Plant Sci*, **11**, 550-558.
- Jaeger, K.E., Graf, A. y Wigge, P.A.** (2006) The control of flowering in time and space. *J Exp Bot*, **57**, 3415-3418.
- Joshi, B., Cameron, A. y Jagus, R.** (2004) Characterization of mammalian eIF4E-family members. *Eur J Biochem*, **271**, 2189-2203.
- Joshi, B., Lee, K., Maeder, D.L. y Jagus, R.** (2005) Phylogenetic analysis of eIF4E-family members. *BMC Evol Biol*, **5**, 48.
- Kahvejian, A., Svitkin, Y.V., Sukarieh, R., M'Boutchou, M.N. y Sonenberg, N.** (2005) Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes Dev*, **19**, 104-113.
- Kawaguchi, R. y Bailey-Serres, J.** (2002) Regulation of translational initiation in plants. *Curr Opin Plant Biol*, **5**, 460-465.

- Kobayashi, Y. y Weigel, D.** (2007) Move on up, it's time for change--mobile signals controlling photoperiod-dependent flowering. *Genes Dev*, **21**, 2371-2384.
- Laursen, B.S., Sorensen, H.P., Mortensen, K.K. y Sperling-Petersen, H.U.** (2005) Initiation of protein synthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, **69**, 101-123.
- Manjunath, S., Williams, A.J. y Bailey-Serres, J.** (1999) Oxygen deprivation stimulates Ca²⁺-mediated phosphorylation of mRNA cap-binding protein eIF4E in maize roots. *Plant J*, **19**, 21-30.
- Marquardt, S., Boss, P.K., Hadfield, J. y Dean, C.** (2006) Additional targets of the Arabidopsis autonomous pathway members, FCA and FY. *J Exp Bot*, **57**, 3379-3386.
- Parcy, F.** (2005) Flowering: a time for integration. *Int J Dev Biol*, **49**, 585-593.
- Pestova, T.V., Lomakin, I.B., Lee, J.H., Choi, S.K., Dever, T.E. y Hellen, C.U.** (2000) The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature*, **403**, 332-335.
- Quesada, V., Dean, C. y Simpson, G.G.** (2005) Regulated RNA processing in the control of Arabidopsis flowering. *Int J Dev Biol*, **49**, 773-780.
- Quesada, V., Macknight, R., Dean, C. y Simpson, G.G.** (2003) Autoregulation of FCA pre-mRNA processing controls Arabidopsis flowering time. *EMBO J*, **22**, 3142-3152.
- Robaglia, C. y Caranta, C.** (2006) Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Trends Plant Sci*, **11**, 40-45.
- Rodriguez, C.M., Freire, M.A., Camilleri, C. y Robaglia, C.** (1998) The Arabidopsis thaliana cDNAs coding for eIF4E and eIF(iso)4E are not functionally equivalent for yeast complementation and are differentially expressed during plant development. *Plant J*, **13**, 465-473.
- Rom, E., Kim, H.C., Gingras, A.C., Marcotrigiano, J., Favre, D., Olsen, H., Burley, S.K. y Sonenberg, N.** (1998) Cloning and characterization of 4EHP, a novel mammalian eIF4E-related cap-binding protein. *J Biol Chem*, **273**, 13104-13109.
- Ruud, K.A., Kuhlman, C., Goss, D.J. y Browning, K.S.** (1998) Identification and characterization of a novel cap-binding protein from Arabidopsis thaliana. *J Biol Chem*, **273**, 10325-10330.
- Schmitz, R.J. y Amasino, R.M.** (2007) Vernalization: a model for investigating epigenetics and eukaryotic gene regulation in plants. *Biochim Biophys Acta*, **1769**, 269-275.
- Stajich, J.E., Block, D., Boulez, K., Brenner, S.E., Chervitz, S.A., Dagdigan, C., Fuellen, G., Gilbert, J.G., Korf, I., Lapp, H., Lehvaslaiho, H., Matsalla, C., Mungall, C.J., Osborne, B.I., Pocock, M.R., Schattner, P., Senger, M., Stein, L.D., Stupka, E., Wilkinson, M.D. y Birney, E.** (2002) The Bioperl toolkit: Perl modules for the life sciences. *Genome Res*, **12**, 1611-1618.
- Takase, T., Yasuhara, M., Geekiyana, S., Ogura, Y. y Kiyosue, T.** (2007) Overexpression of the chimeric gene of the floral regulator CONSTANS and the EAR motif repressor causes late flowering in Arabidopsis. *Plant Cell Rep*, **26**, 815-821.
- Thomas, B.** (2006) Light signals and flowering. *J Exp Bot*, **57**, 3387-3393.
- Vardy, L. y Orr-Weaver, T.L.** (2007) Regulating translation of maternal messages: multiple repression mechanisms. *Trends Cell Biol*, **17**, 547-554.
- Wang, C., Tian, Q., Hou, Z., Mucha, M., Aukerman, M. y Olsen, O.A.** (2007) The Arabidopsis thaliana AT PRP39-1 gene, encoding a tetratricopeptide repeat protein

with similarity to the yeast pre-mRNA processing protein PRP39, affects flowering time. *Plant Cell Rep*, **26**, 1357-1366.

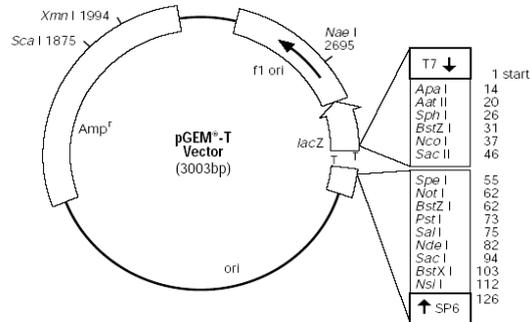
Weber, C., Nover, L. y Fauth, M. (2008) Plant stress granules and mRNA processing bodies are distinct from heat stress granules. *Plant J*, **56**, 517-530.

Yoo, S.K., Lee, J.S. y Ahn, J.H. (2006) Overexpression of AGAMOUS-LIKE 28 (AGL28) promotes flowering by upregulating expression of floral promoters within the autonomous pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, **348**, 929-936.

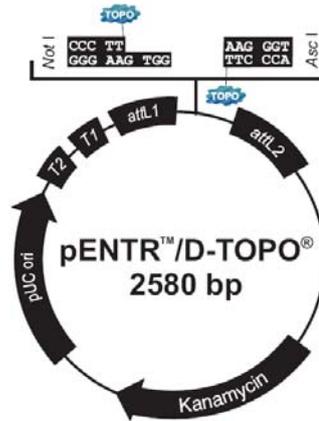
12. APENDICE

1. Mapas de vectores utilizados

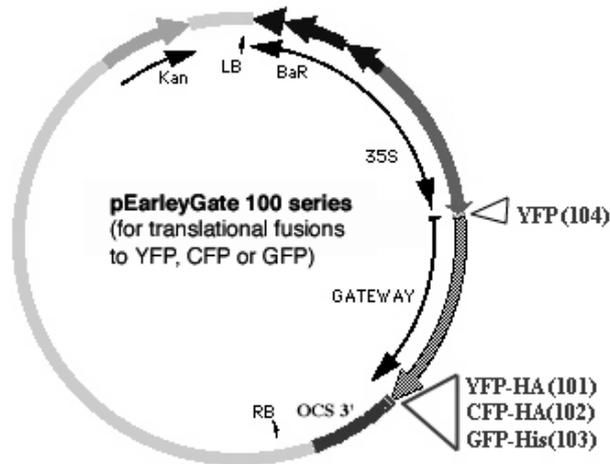
Vector pGEM-T



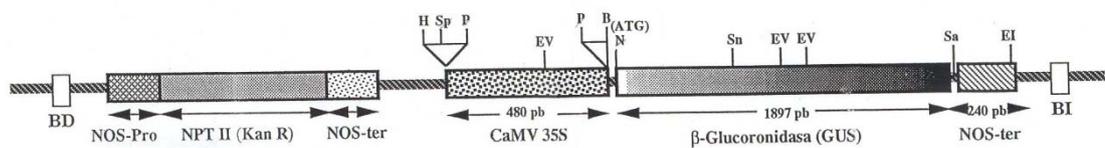
Vector pENTR/D-TOPO



Vector pEarleyGate103



Vector pBIN35SGUS



2. Tabla de cebadores utilizados

18S F	GGAAACTTACCAGGTCCAGACATAG
18S R	GTGGCCTAAACGGCCATAGTCCCTC
35S F	CCGGAGTTGCGCATAAGAAGTTTG
35S R	GAACTGTTGCCAGTCTTCACG
AGL28-F	AATTTCCGCGTCACATAAGG
AGL28-R	TTGTGGATATCCTTCCCATATTTT
AP1-F	TTGAACGCTATGAGAGGTAC
AP1-R	TTTTCCCTCTCCTGATCTG
bar F	ACAGCGACCACGCTCTTGAA
bar R	TGCACCATCGTCAACCACTA
CO-F	ATCAGCGAGTTCCAATTCTA
CO-R	GGAACCATTGTCGTTGTAGT
eIF4E F	CCTGTGAGCTTCTTCGCATCCTCATGG
eIF4E R	GCGGTTAGAAGACACTCCCAAATCTGTTG
FCA-F	GTTTCATCTTCTGCCACATT
FCA-R	TAAATTTTGGTTTGGTTGCT
FLC-F	AAGCGAATTGAGAACAAAAG
FLC-R	GCTCCACATGATGATTATT
FLD-F	TGTGGTGCCTATTGTTGGAGGCA
FLD-R	TCTCGAGTGTGCCCAAGGGA
FLK-F	ACCAGTTGCAGGACCAGGCTA
FLK-R	TTCCAGCCTGAGATGCTGGGACTA
FPA-F	ATGGGCGTTATCCTATGAAGCCATTCAGAGCC
FPA-R	TCAAGGCCCTGTCCAGCCGGAGTACC
FRI-F	TGTTATCGCCTCCGCGAACAA
FRI-R	CCTCAAGCAACAGCAGCCGTC

FT-F	AGACGTTCTTGATCCGTTTA
FT-R	GTAGATCTCAGCAAACCTCGC
FVE-F	TCCGAGCTTGAGCAAGCAACC
FVE-R	TGTGCACTCGTCGGGCTGAA
FY-F	GGCCAGCAGCAAGGGTATCA
FY-R	GGCTGCTGCTGCTGTTGGAA
GAI-F	CTCCGATACTCTCAGATGC
GAI-R	CACCACACCAAGAACCTTAT
GFP F	CTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTT
GFP R	GTAAGGACAGGGCCATCGCC
GI-F	CTTTGTCTCCATGGATCAGT
GI-R	AAGGAGTTCACAAAGCTGTA
LD-F	GTTTATGCACTAACTTCGGG
LD-R	GTTCCCTAACTGCATACGAG
LP-Atncbp	GGTTTTGCGAATTTGTTTAGATG
ncbp F	CAGGGACTCGGAAACATGGACAGC
ncbp R	GCCGCTTGATTGAGTCTCTCAAACCCATCAC
pENTR-ncbp-F	CACCATGGCGAGGTTTTGGATAGG
pENTR-ncbp-R	TCCTCTCAGCCATGTGTTTCTGTAGG
pncbp F	AAGCTTCTAAATCTACGGCGAAACAG
pncbp R	GGATCCCTCCATTAGAGCTTCACGCGT
RP-Atncbp	TCTCACCTGATGGTCAAGAAGC
SOC1-F	CTGAGGCATACTAAGGATCG
SOC1-R	GAACAAGGTAACCCAATGAA
TUB-F	CTCAAGAGGTTCTCAGCAGTA
TUB-R	TCACCTTCTTCATCCGCGT