



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**SILENCIAMIENTO GÉNICO
POSTRANSCRIPCIONAL MEDIANTE microRNAs
ARTIFICIALES DIRIGIDOS CONTRA LA FAMILIA 6
DE PROTEÍNAS LEA EN *ARABIDOPSIS THALIANA*.**

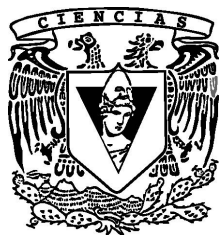
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

VÍCTOR MIGUEL PALOMAR OLGUÍN



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ALEJANDRA A. COVARRUBIAS ROBLES**

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Silenciamiento génico postranscripcional mediante microRNAs artificiales
dirigidos contra la familia 6 de proteínas LEA en *Arabidopsis thaliana*

VICTOR MIGUEL PALOMAR OLGUIN

JURADO:

DR. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO
DR. JOSÉ LUIS REYES TABOADA
DRA. ALEJANDRA ALICIA COVARRUBIAS ROBLES
DR. MIGUEL ÁNGEL ROSALES VILLEGAS
BIÓL. RODOLFO SALAS LIZANA

A la UNAM

.....

A mi familia

.....

Al laboratorio

.....

A mis amigos

.....

A quien es

.....

A quien fue

.....

A quien será.

➤ Índice	
➤ Resumen.....	1
➤ Introducción general.	
- Condiciones de estrés en plantas	
- Estrés por deficiencia de agua.....	4
- El ajuste osmótico: una estrategia de resistencia.....	6
- Participación de hormonas vegetales en la respuesta al déficit hídrico.....	7
- Respuesta dependiente de ABA.....	10
- Respuesta independiente de ABA.....	11
- Respuestas moleculares al estrés hídrico.....	12
- Proteínas LEA.....	13
- Clasificación de las proteínas LEA	
♦ Grupo 1 (D-19).....	17
♦ Grupo 2 o dehidrinas (D-11).....	18
♦ Grupo 3 (D-7 y D-29).....	20
♦ Grupo 4 (D-113).....	21
♦ Grupo 5, LEAs atípicas	
♦ Grupo 7 (ASR 1).....	22
♦ Grupo 6 (PvLEA-18).....	23
➤ Introducción metodológica	
- RNA de interferencia.....	28
- microRNAs y microRNAs artificiales ²⁹	
- Arabidopsis thaliana como modelo in vivo	
➤ Justificación.....	31
➤ Objetivos	
- Objetivo General	
- Objetivos particulares	
- Hipótesis.....	32
➤ Materiales y métodos.....	33
➤ Resultados	
- Objetivo 1	
♦ Búsqueda de mutantes para los genes AtLEA18-1, AtLEA18-2 y AtLEA18-3.....	41
♦ Caracterización de las líneas mutantes.....	42
• Confirmación de la inserción en las líneas mutantes.....	43
• Confirmación de la ausencia de transcrito correspondiente.....	45
- Objetivo 2	
♦ Diseño ad hoc de microRNAs artificiales.....	47
♦ Introducción de precursores modificados en vectores binarios.....	51
♦ Confirmación del procesamiento de los amiRNAs en el sistema heterólogo <i>Nicotiana benthamiana</i>	54
♦ Generación de plantas transgénicas.....	56
- Objetivo 3	
♦ Caracterización de las líneas transgénicas.....	57
♦ Comprobación del silenciamiento de los RNA mensajeros "blanco".....	60
➤ Discusión	
- Ortólogos de PvLEA-18 en A. thaliana.....	64
- Selección y caracterización de las líneas mutantes para los genes de LEA18.....	65
♦ Verificando las inserciones.....	66
♦ Confirmación de ausencia de transcritos	
- Diseño bioinformático y procesamiento de microRNAs artificiales, y silenciamiento de sus blancos.....	67
- Caracterización de plantas transgénicas.....	72
➤ Conclusiones	
➤ Perspectivas.....	75
➤ Referencias.....	77

RESUMEN

La dinámica del ambiente en el planeta subyuga a los organismos bajo diferentes tipos de estrés ya sean bióticos (provocados por otros organismos) o abióticos, tales como la sequía, las altas o bajas temperaturas, el exceso en la salinidad del suelo, la toxicidad química y el estrés oxidativo. Estos diferentes estreses provocan la pérdida de cultivos reduciendo drásticamente la productividad agronómica mundial (Boyer, 1982; Bray, 1993). Como resultado de una condición de estrés abiótico, las plantas tienen modificaciones morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y moleculares producto de una alteración en su homeostasis y por tanto provocan un cambio en su metabolismo con el fin de resistir o tolerar la condición impuesta por el medio (Ingram y Bartels, 1996)

A pesar de que cuando se presenta una condición de estrés, como primer efecto se reduce significativamente la síntesis de proteínas, algunos genes adquieren una mayor expresión, los cuales son generalmente catalogados como genes de resistencia (Ingram y Bartels, 1996), tal es el caso de proteínas de choque térmico, chaperonas de macromoléculas, genes encargados de la síntesis de osmolitos compatibles, así como aquellos genes que codifican para proteínas abundantes de la embriogénesis tardía (LEA: Late Embryogenesis Abundant). En particular, estas proteínas se acumulan en altos niveles durante la etapa de desecación de las semillas, proceso en el cual, esta estructura está sometida durante su desarrollo normal a una condición de limitación de agua. Por lo anterior se ha propuesto que las proteínas LEA están involucradas en la respuesta a déficit hídrico (Galau et al., 1988; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Esta característica es consistente con el hecho de que la expresión de algunos genes *LEA* es regulada por la fitohormona ácido abscísico (ABA; Leung y Giraudat, 1998, Battaglia et al., 2008), la cual se acumula y/o libera en las plantas sometidas a diversos estreses abióticos. Las proteínas LEA pertenecen a un grupo más amplio conocido como “hidrofilinas” que se caracterizan por ser altamente hidrofílicas (índice de hidrofiliencia >1), tienen alto contenido de aminoácidos cargados y una proporción de glicinas mayor al 6% (Battaglia et al., 2008). Estas proteínas carecen o presentan porcentajes muy bajos de cisteínas y triptofanos y no poseen una estructura globular, por lo que se les ha considerado como proteínas intrínsecamente no estructuradas (IUPs). Sin embargo, recientes hallazgos de nuestro grupo y de otros indican que algunas de estas “hidrofilinas” pueden adquirir una estructuración determinada al presentarse condición de estrés cuando están en solución acuosa, en tanto que en condiciones óptimas presentan estructuración flexible (Dure, 1993; Lucero Rivera, comunicación personal).

Se ha sugerido que las proteínas LEA pueden jugar un papel protector al mantener la integridad de macromoléculas y algunas estructuras celulares específicas, o bien, al disminuir los

efectos del estrés hídrico al mantener un requerimiento celular mínimo de agua (Dure, 1993), característica por la cual se les ha catalogado como chaperonas moleculares (Ismail et al., 1999); sin embargo, las funciones de las proteínas LEA durante el estrés abiótico aparentemente pueden ser muy diversas; así se ha propuesto que son capaces de secuestrar iones (Roberts, 1993), de prevenir la pérdida de función de enzimas y proteínas diversas (Garay-Arroyo et al., 2000; Battaglia et al., 2008), de transportar proteínas nucleares durante estrés (Godoy et al., 1994), entre otras.

A finales del siglo XX, en nuestro laboratorio se descubrió una proteína en frijol común (*Phaseolus vulgaris*) que presenta características similares a las de otras proteínas del tipo LEA, a la que se ha denominado como PvLEA-18. Esta proteína posee una masa molecular aparente de 14kDa (kiloDaltones), y, en conjunto con su transcrito, se acumula durante los últimos estadios de la embiogénesis (deseccación de la semilla), en semilla seca, en tejidos vegetativos sometidos a estrés hídrico y en presencia de ABA. De manera sorprendente, esta proteína también se acumula en tejido vegetativo en crecimiento bajo condiciones favorables de irrigación, particularmente en la región de elongación del hipocotilo (característica ausente en otras proteínas LEA). Por estas razones, y debido a motivos conservados en su secuencia, se ha clasificado a la PvLEA-18 dentro de una nueva familia de LEAs, el grupo 6 (Colmenero-Flores et al., 1999, Battaglia et al., 2008).

Análisis posteriores evidenciaron la participación de las regiones no traducidas (UTR: Untranslated) del gen *PvLEA-18*, en su eficiencia traduccional. Mediante experimentos de fusión del gen reportero codificante de la b-glucoronidasa (GUS) con estas regiones y el promotor endógeno de la PvLEA-18, en diferentes condiciones: durante el desarrollo, en respuesta a déficit hídrico, y por aplicación de ABA, utilizando plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*, se observó que los patrones de acumulación de GUS en las plantas sometidas a estrés hídrico o en condiciones de buena irrigación son semejantes a los observados en plántulas de frijol durante su desarrollo; sin embargo, cuando la región 3' UTR del gen *PvLEA-18* estaba ausente, se observaba una menor inducción de GUS durante el desarrollo y en respuesta a ABA, y este efecto se veía acentuado bajo deficiencia hídrica. Se ha demostrado, también, que esta región es indispensable para una traducción eficiente de PvLEA-18 (Moreno-Fonseca y Covarrubias, 2001; Battaglia et al., sometido).

Se ha propuesto que la proteína PvLEA-18 podría funcionar como un osmoprotector de las regiones maduras del hipocotilo o como una molécula atrapadora de agua durante la expansión celular (Colmenero-Flores et al., 1999); sin embargo su función celular no ha sido dilucidada

Recientemente, en el laboratorio, se ha investigado la posible función de la proteína PvLEA-18 mediante ensayos *in vitro* (principalmente mediante la técnica de dicroísmo circular), mismos que han

arrojado sugerentemente que esta proteína en condiciones normales tiene una estructuración flexible, sin embargo, en condiciones que simulan la deficiencia intracelular de agua, la proteína puede conformar una estructuración determinada dada por la predominante presencia de estructuras helices poli-L-prolina tipo II (Lucero Rivera, tesis de maestría).

En otros intentos por dilucidar la función de PvLEA-18 en el laboratorio se propuso que la proteína podría estar funcionando como chaperona molecular, debido a que se ha demostrado que algunas proteínas LEA, dado a su estructura flexible, tienen este tipo de funciones en la célula (Kovacs et al., 2008); sin embargo, PvLEA-18, es incapaz de evitar la pérdida de función de macromoléculas esenciales en condiciones simuladas de déficit hídrico (Reyes, et al., 2005), sin embargo se sugiere que es capaz de unirse a RNA (Battaglia, investigación de doctorado). Ensayos posteriores demostraron que la expresión ectópica de PvLEA-18 en *Escherichia coli* puede complementar la ausencia de hfq, una proteína que se ha demostrado como chaperona de RNA y que participa en la regulación de la expresión génica por RNAs no codificantes en bacterias (revisado en Aiba, 2007)

Por los datos anteriores y con el fin de establecer la participación *in vivo* de esta proteína durante el déficit hídrico, se planteó la mutación de esta familia en el sistema heterólogo *Arabidopsis thaliana* mediante el uso de microRNAs artificiales.

El reciente descubrimiento del sistema de RNA de interferencia, ha provisto de estrategias útiles para el silenciamiento de genes en un sinnúmero de organismos. Una metodología de silenciamiento muy útil es el uso de microRNAs artificiales (amiRNAs), los cuales pueden diseñarse de una manera *ad hoc* con el fin de interferir, con una sola construcción, la expresión de una o más proteínas, ya sea a través del corte de un RNA mensajero blanco mediante una complementariedad exhaustiva de bases entre éste y el amiRNA, o posiblemente provocando la inhibición traduccional del RNA mensajero si esta complementariedad no es total (Bartel, 2004; Niu et al., 2006). Esta estrategia fue elegida entre algunas otras de mutagénesis dirigida, debido a que no fue posible detectar mutantes nulas (por inserción de transposones o de T-DNA) en las bibliotecas de mutantes existentes y, por experiencias previas en el laboratorio. Así mismo, se consideraron las ventajas sobre otras estrategias de silenciamiento como el RNA de interferencia tradicional o el uso de RNAs antisentido; entre las que resaltan una heredabilidad más estable y una mayor especificidad, respectivamente, así mismo se discuten las desventajas de esta estrategia con respecto a las anteriores y a la mutagénesis tradicional.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Condiciones de estrés en plantas

Partiendo de la premisa de que las plantas están sometidas a diversos tipos de estrés, en los últimos años se han realizado grandes avances en el entendimiento de los mecanismos mediante los cuales algunas plantas pueden tolerar una condición extrema, mientras que otras son más sensibles a ella. Producto de ésto ha sido la identificación y caracterización de un cierto número de respuestas que afectan diferentes procesos celulares y del organismo completo (fisiológicos, metabólicos, morfológicos). En algunos casos se ha estudiado los efectos de estas respuesta a diferentes niveles de regulación, siendo las respuestas mejor caracterizadas aquéllas involucradas en la regulación a nivel transcripcional, en particular la regulación mediada por factores de transcripción (FT); en tanto, que la regulación de la respuesta a nivel postraducciona, traduccional y epigenético ha sido poco estudiada por lo que a la fecha se desconocen muchos de los elementos y los mecanismos implicados en ellas.

Un estrés es definido como aquella condición que afecta desfavorablemente el crecimiento, desarrollo y productividad de los diferentes organismos. Esta condición desfavorable puede ser biótica, cuando es originada por la interacción con otros organismos, o abiótica debido a condiciones ambientales adversas como el exceso o la deficiencia de agua, las altas o bajas temperaturas, cambios en la salinidad, cambios en el estímulo luminoso, falta de oxígeno, o la abundancia dinámica de nutrientes minerales, entre otros (Bray et al., 2000).

En general, los mecanismos que se modifican para permitirle a una planta sobrevivir al estrés – de cualquier tipo – son llamados mecanismos de resistencia, los cuales brindan estrategias como la tolerancia o el escape al estímulo estresante. La severidad y duración del estrés, el estadio de desarrollo de la planta, el tipo de tejido y las interacciones entre las diferentes condiciones en el ambiente, determinan la respuesta con la cual la planta tolerará, o escapará al estrés (Ingram y Bartels, 1996).

Estrés por deficiencia de agua.

A pesar de que las plantas están expuestas a una parafernalia de condiciones ambientales estresantes, desde el punto de vista agronómico, una de las más adversas es la sequía, condición debida principalmente a una disminución en la cantidad de agua disponible en el ambiente, o que también se puede generar por otros factores, como el congelamiento y un exceso en la salinidad del

suelo (Bray et al., 2000; Levitt, 1986).

En una condición de deficiencia hídrica la tasa de transpiración de la parte aérea de la planta, excede a la toma de agua por la raíz (Bray, 1996). Esta deficiencia puede ser moderada, cuando la planta está sometida a falta de agua y, sin embargo, sus funciones celulares permanecen esencialmente intactas; o severa, cuando se pierde la mayoría del agua libre y la célula vegetal sobrevive sólo con el agua asociada a macromoléculas o estructuras celulares (deseccación) (Mouillon et al., 2008).

Canónicamente, cuando se presenta una condición de déficit hídrico, la planta tiene mecanismos que le permiten percibir esta condición y, por medio de una vía de transducción de señales, generar una respuesta que modifica su metabolismo, de manera que pueda readaptarse fisiológicamente para así lograr tolerar el estímulo adverso, mismos que pueden eventualmente dar lugar a una estrategia de adaptación característica (Figura 1; Buchanan, et al., 2004)

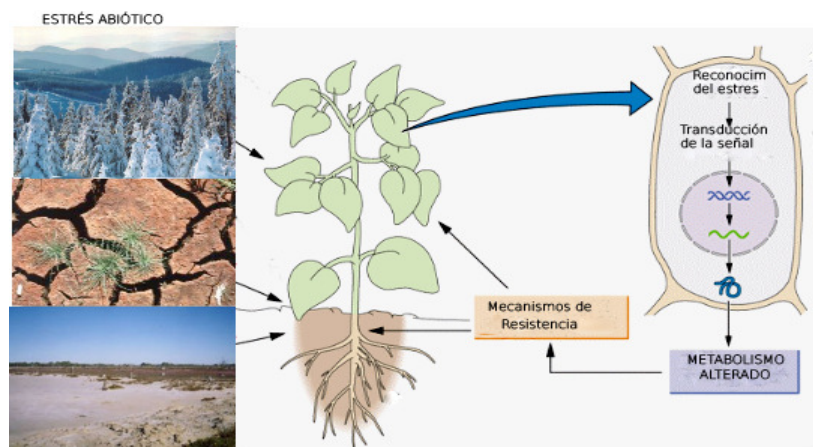


Figura 1. Esquema de las condiciones ambientales (izquierda) a las que está sometida la planta, y que pueden provocar un estrés. Percepción, respuesta celular, y cambios en la planta que permiten tolerar una condición de estrés (derecha). Modificado de Buchanan et al. 2004.

Los efectos fisiológicos asociados a una condición de déficit hídrico van desde un metabolismo alterado producto de una disminución en la tasa fotosintética provocada por el cierre de los estomas (estructuras asociadas al intercambio gaseoso); hasta la síntesis de osmolitos compatibles, moléculas de bajo peso molecular, como aminoácidos o azúcares e iones, principalmente potasio (K^+ ; Bohnert y Sheveleva, 1998) con la finalidad aumentar el potencial hídrico de manera que este sea más negativo que el existente en el suelo para aumentar la captación de agua, Esta medida de resistencia es conocida como ajuste osmótico (Bray, 1997; Bohnert y Sheveleva, 1998).

Algunas de las respuestas fisiológicas a una condición de estrés por sequía, son las siguientes

(otras estrategias de respuesta al estrés por sequía son mostradas en la Figura 2):

- Cierre de los estomas
- Síntesis de osmolitos compatibles (estaquiosa, sacarosa, glicin-betaína, etc)
- Síntesis de sistemas de transporte para desintoxicación de iones
- Síntesis de chaperonas
- Síntesis de proteínas LEA.

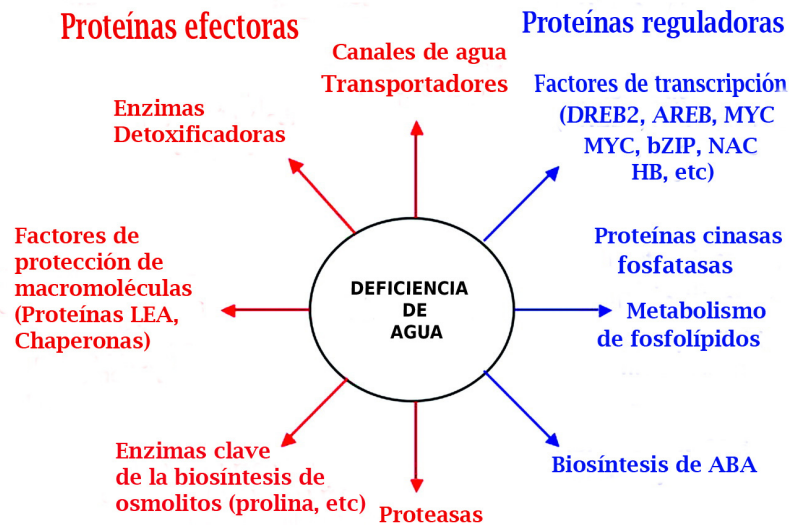


Figura 2. Moléculas reguladoras (azul) y efectoras (rojo) que se acumulan en respuesta a un estrés por deficiencia de hídrica, las flechas indican activación (Modificado de Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007)

Es importante destacar que una condición de estrés por sequía difiere en gran medida a un estrés osmótico.

El ajuste osmótico: una estrategia de resistencia.

El estrés osmótico a diferencia de un estrés por sequía, puede ser provocado mediante diferentes factores ambientales, incluyendo la sequía, salinidad, y temperaturas muy bajas, condiciones que modifican disponibilidad de agua en el ambiente. El estrés osmótico afecta diferencialmente tanto a los órganos vegetales, como a los tejidos un mismo órgano (Vierling y Kimpel, 1992).

El ajuste osmótico, como se mencionó en la sección anterior, consiste en un aumento del potencial hídrico celular, particularmente en tejidos como la raíz; lo que consecuentemente, provoca la entrada de agua a la célula para recuperar el turgor y la estructura celular. El ajuste osmótico se presenta principalmente en el citoplasma mediante la acumulación de solutos compatibles, aunque algunos iones que participan en este ajuste pueden acumularse también en estructuras de reserva

como la vacuola (Yancey et al., 1982). La capacidad osmoprotectora de los solutos compatibles y sus características físico-químicas permiten la protección de macromoléculas sin la alteración de su estructura, así como el mantenimiento de estructuras celulares como membranas. Este fenómeno es denominado “Osmoprotección” (Voetberg y Sharp, 1991).

Participación de las hormonas vegetales en la respuesta a déficit hídrico

El ácido abscísico (ABA) es la principal hormona que se acumula en condiciones de estrés (Bray et al., 2000). Esta fitohormona es un derivado isoprenoide de 15 carbonos producido a partir del ácido mevalónico y sus modificaciones durante la vía de síntesis de terpenos (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2005). ABA fue descrita primariamente como la hormona reguladora de la abscisión de las hojas; sin embargo, en estudios posteriores se observó que tenía efectos sobre la acumulación de etileno (la hormona encargada de la abscisión), por lo que se estableció que el ABA tenía más bien un efecto sobre la dormancia de las yemas (característica por la cual, fue también denominada como “Dormina”) y que además es capaz de regular la acumulación de otras hormonas (Bray et al., 2000). Adicionalmente a su papel como molécula señalizadora de una condición de limitación de agua, el ABA participa en el proceso de adaptación de tejidos vegetativos a estas condiciones de estrés; así como en la regulación del desarrollo y germinación de la semilla, (Giraudat, 1995). La acumulación del ABA también ha sido observada en condiciones de alta salinidad y bajas temperaturas, seguramente porque los efectos de ambas condiciones desencadenan un fenómeno de déficit hídrico (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997).

La señalización del estrés mediada por ABA se da a diferentes niveles, uno de ellos ocurre a través de la regulación de distintos factores transcripcionales. Sin embargo, no todos los genes que responden a esta condición ambiental adversa lo hacen a través de la intervención del ABA, de ahí que exista cierta diversidad en los mecanismos regulatorios que modulan la expresión de los genes y/o proteínas implicadas. Por tanto se ha establecido la existencia de dos vías de regulación génica inducida por esta condición estresante: una vía dependiente del ABA, y otra independiente de esta hormona (Figura 3).

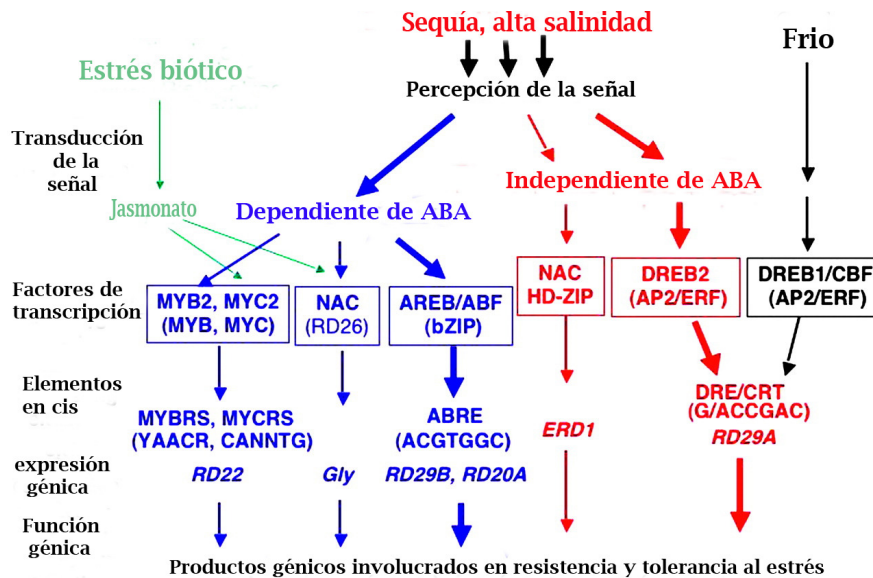


Figura 3. Vías de regulación de genes reguladas por factores transcripcionales que son activados por una vía dependiente de la biosíntesis de ácido abscísico (azul), o independiente de ABA (rojo), en respuesta a déficit hídrico provocado por sequía, alta salinidad, o frío (negro). El apartado en verde indica una intercomunicación entre ácido abscísico y ácido jasmónico en respuesta a un estrés biótico. (Modificado de Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007)

Recientemente se reportó la participación de otras hormonas vegetales como mediadores de esta respuesta, tal es el caso del ácido jasmónico (AJ) o jasmonato (considerado un señalizador del estrés por patógenos), del etileno, y de las auxinas (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Se ha observado que la modulación por estas hormonas se da mayoritariamente a través de un intercambio de comunicación entre sus vías de señalización y las del ABA, de tal forma que en algunos casos comparten elementos comunes (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007), indicando que el ABA juega un papel central como reclutador de estímulos y mediador de la respuesta en diferentes procesos de desarrollo de la planta.

Durante las condiciones de estrés, el aumento en los niveles del ABA reduce la pérdida de agua ocasionada por la transpiración al inhibir la apertura y/o promover el cierre estomático (MacRobbie, 1993). La señalización del ABA hacia las células guarda (células encargadas de la regulación de la apertura estomática) se puede dar desde la raíz hacia las hojas, lo que supone evidencia de que esta fitohormona puede ser transportada vascularmente – principalmente por xilema; sin embargo, las células guarda también tienen la maquinaria de biosíntesis de ABA y, posiblemente, al percibir una condición de limitación de agua, que no necesariamente proviene del suelo, estas células estarían sintetizando ABA o liberándolo de compartimentos intracelulares para generar una respuesta de resistencia que involucra cambios en el potencial de membrana y en el transporte de iones y algunos osmolitos (Schroeder et al., 2001). Al percibir un aumento en el ABA, se

activa una cascada de señalización en las células guarda, lo que inhibe canales de salida de potasio (K^+) a través de la membrana plasmática y, de la misma manera, inhibe canales de entrada de calcio (Ca^{2+}), tanto a través de la membrana plasmática como de la vacuolar. Una disminución en el calcio intracelular está relacionada con la hiperpolarización de la membrana, efecto que fomenta la salida de agua para el restablecimiento del equilibrio electroquímico celular, lo que disminuye el turgor, provocando así el cierre estomático (Schroeder et al. 2001). Aunque la mayoría de los eventos que suceden en este proceso de apertura y cerrado de los estomas implican cambios a nivel postraduccional, también se dan cambios que ocurren a un plazo de tiempo mayor que implican una regulación de la expresión genética a nivel transcripcional (Taylor et al., 1995).

Hasta la fecha se han descrito múltiples candidatos como receptores del ABA, sin embargo, solamente un par de ellos (Pyr1 y Pyl2) se ha comprobado que se unen físicamente a esta fitohormona (determinado por experimentos de calorimetría y análisis de estructura de proteína en presencia de ABA por difracción de rayos X, respectivamente) por lo que se asegura son los receptores de ABA. Pyr1 se encuentra ubicado en la membrana plasmática y está asociado a una proteína fosfatasa de localización también membranal, PP2C. La hipótesis señala que, en ausencia de un estrés abiótico – niveles basales de ABA – la interacción de Pyr1 con PP2C se ve subrepresentada por lo que esta fosfatasa mantiene los factores de transcripción (FT) de la vía de respuesta al ABA en estado “apagado”. Cuando hay mayores concentraciones de ABA presentes, este es sentido por Pyr1, mismo que se dimeriza e interacciona con PP2C inhibiendo su actividad de fosfatasa, por lo que los FT dependientes del ABA pueden ser activados, regulando así la expresión de genes de respuesta a estrés (Figura 4, Ver “Respuesta dependiente de ABA”) (Melcher et al., 2009). En el caso de Pyl2, se ha demostrado una estequiometría de interacción con ABA de 1:1; ABA se posiciona en un sitio de unión hidrofóbico de Pyl2 interaccionando con él mediante su cadena de hidrocarburo y el anillo ciclohexeno por medio de puentes de hidrógeno, por lo que, mutaciones en el sitio de unión de Pyl2, inhiben la respuesta a ABA. De manera, por demás, interesante, la unión de ABA con Pyl2 desencadena un cambio conformacional de este último a manera de llave-cerradura; es decir, cuando existe ABA en Pyl2 el cambio conformacional permite el cerrado de la estructura, y cuando la fitohormona no está presente Pyl2 presenta una estructuración abierta dejando expuesto el sitio de unión hidrofóbico (Melcher et al., 2009).

Señalización de ABA dependiente de PYR1 y PP2C

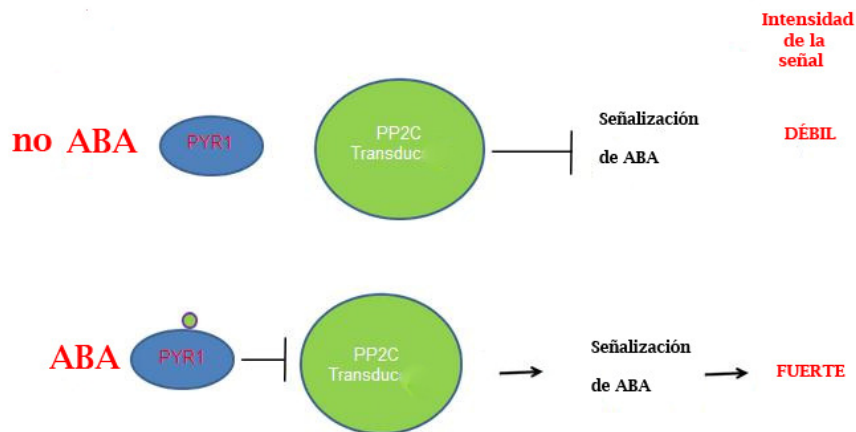


Figura 4. Hipótesis del mecanismo de acción mediado por Pyr (receptor de ABA, azul) en respuesta a la presencia o ausencia de ABA, la fosfatasa PP2C es mostrada en verde. (Modificado del modelo propuesto por el laboratorio del Dr. Cutler: cutlerlab.blogspot.com)

Existen diferentes mutantes que afectan la vía de señalización mediada por el ABA, como las mutantes tipo *aba* (con niveles de ABA endógeno reducidos) y *abi* (insensibles a ABA). Estas mutantes han sido de gran utilidad para la identificación de los factores involucrados en las vías de señalización mediadas por esta hormona y en la identificación de genes regulados por la misma en respuesta a un estímulo estresante (Chandler y Robertson, 1994)..

Respuesta dependiente de ABA

Tomando en cuenta que ya se conoce parte de la vía de señalización que desencadena el ABA en la célula, es menester mencionar que existen genes que contienen secuencias en su región promotora que dirigen una respuesta al tratamiento con ABA; estos elementos – principalmente ABRE (ABA-Responsive Element) – son importantes para la regulación de la transcripción de estos genes. La secuencia de un elemento ABRE está conformada de 6 a 10 pares de bases con la secuencia central ACGT, siendo la secuencia consenso asignada a este elemento la siguiente: (C/T)**ACGTGGC** (Figura 3, Busk et al., 1997; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997). Otro ejemplo es la secuencia **CACGTG**, conocida como la caja “G” que además de mediar respuestas al ABA, responde también a estímulos mediados por AJ, demostrando así la intercomunicación existente entre distintas hormonas en respuesta al estrés (Lee et al., 2006).

Existen genes que se ha demostrado experimentalmente son activados por una condición de sequía, y, de manera interesante, pueden estar controlados tanto por una vía dependiente como por una independiente de ABA; este es el caso de *rd29A* que, en su región promotora contiene tanto elementos DRE (Dehydration-Responsive Element, involucrados en una vía independiente de ABA), como también un elemento ABRE, por lo que este gen está controlado por dos sistemas independientes de regulación; mientras que otro gen relacionado, *rd29B*, sólo posee un elemento *cis* ABRE por lo que su respuesta solamente depende del ABA (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994).

Los factores de transcripción (FT) que pueden unirse a un motivo ACGT contienen un motivo protéico básico de “cierre de leucinas” en su extremo amino terminal (N-ter) y se conocen como factores de transcripción del tipo bZIP. Los principales FTs del tipo bZIP que se unen a un elemento ABRE son denominados AREB (ABA-Responsive Element Binding factor) o ABF (ABRE Binding Factor) y, entre ellos se encuentran AREB1/ABF2, AREB2/ABF4, AREB3, ABF1 y ABF3 (Uno et al., 2000; Choi et al., 2000). Estos FTs se regulan por fosforilación dependiente de cinasas y desfosforilación probablemente dependiente de la fosfatasa PP2C (Fujita et al., 2005; Melcher et al., 2009).

Existen otro tipo de FTs que también son inducidos en condiciones de estrés cuyas secuencias de reconocimiento están involucradas en la vía de respuesta mediada por ABA, como los factores tipo MYC (con un dominio de hélice-giro-hélice básico (bHLH)), que reconocen secuencias CANNTG, y tipo MYB que reconocen TAACNA/G (N = cualquier nucleótido) (Abe et al., 1997, Tuteja, 2005; Yadav et al., 2005), como por ejemplo el factor AtMYC2 y el factor AtMYB2, que se unen a elementos *cis* en el promotor del gen *RD22* y lo activan en forma cooperativa (Figura 3).

Por otro lado también se ha descrito un factor de transcripción (FT) de tipo NAC codificado por el gen *RD26* en *Arabidopsis*. Se sabe que este FT regula la expresión del gen *GLY*, de manera dependiente de ABA (Figura 3, Fujita et al., 2004; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki et al., 2007).

Respuesta independiente de ABA

Existen genes que son inducidos por sequía y frío pero que no responden a la aplicación de ABA *RD29A*, *lti78*, *COR78*, *COR47*, y *KIN1*. Estos genes, en particular el caso de *RD29A*, han permitido la identificación de un elemento *cis* en la región promotora que posee una secuencia conservada de nueve pares de bases con la secuencia central CCGAC que se ha denominado DRE: **TACCGACAT** (del inglés **D**rought **R**esponse **E**lement) (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994). Este elemento es esencial y actúa en *cis* para la regulación de la respuesta a deshidratación independiente

de la acumulación del ABA (Figura 3). También se han identificado motivos similares entre estos genes denominados CRT (C-repetidos) y otros elementos que responden a bajas temperaturas (LTRE, **L**ow **T**emperature **R**esponsive **E**lement), los cuales incluyen el motivo central CCGAC que también forma el núcleo de la secuencia DRE.

Los FTs que tienen la capacidad de unirse a DNA en las regiones DRE/CRT son denominados DREB/CBF (DRE-Binding, C-Repeat Binding Factor). Estos factores pertenecen a la familia ERF/AP2 (Ethylene Responsive Factor y Apetala 2) que contienen el dominio AP2; y fueron identificados mediante experimentos de doble híbrido en levaduras. La vía DREB1/CBF tiene un papel clave en la regulación de la expresión genética independiente de ABA en respuesta a sequía y frío demostrado por la inducción del promotor RD29A, un promotor ya caracterizado de respuesta a estrés abiótico, principalmente sequía (Figura 3; Liu, et al., 1998; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2000).

Respuestas moleculares al estrés hídrico.

Una manera de clasificar a las proteínas que participan en las respuestas al estrés por déficit hídrico es como proteínas reguladoras y proteínas efectoras (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1997) (Figura 2).

- En el primer grupo se encuentran:
 - Proteínas involucradas en la regulación de la expresión génica (factores de transcripción)
 - Proteínas involucradas en las vías de transducción de señales como proteínas cinasas y fosfatasa
 - Proteínas que intervienen en la vía del metabolismo de los fosfolípidos y tienen funciones señalizadoras, como PLC (Fosfolipasa C) y proteínas 14-3-3 y, de manera no menos significativa,
 - la vía de isoprenoides de donde deriva el ABA.

- Dentro del segundo grupo se encuentran aquellas proteínas que probablemente funcionan en el efecto directo de la tolerancia a estrés como
 - Proteínas que forman canales de agua (acuaporinas) involucradas en el movimiento de agua a través de las membranas
 - Enzimas involucradas en la desintoxicación de iones (debido a una acumulación de

solutos que muchas veces puede ser tóxico para la planta, como por ejemplo la acumulación de iones sodio (Na^+)

- Enzimas involucradas en la desintoxicación de especies de oxígeno reactivas como la catalasa, la ascorbato peroxidasa y la superóxido dismutasa.
- Enzimas clave para la biosíntesis de varios osmolitos compatibles como prolina y glicin-betaínao algunos azúcares (cuya acumulación es específica de la especie vegetal),
- Proteasas requeridas para el recambio de otras proteínas (proteasa Clp, desintoxicadoras de iones y enzimas clave en la degradación proteosomal como ligasas E3 y ubiquitina), entre otras .
- Proteínas protectoras como las chaperonas moleculares, y las
- proteínas abundantes de la embriogenesis tardía (LEA, del inglés **L**ate **E**mbyrogenesis **A**bundant) que son capaces de proteger otras macromoléculas y estructuras celulares, incluyendo proteínas, ácidos nucleicos o membranas. En una de las familias de estas proteínas en donde se enfoca la presente tesis.

Los cambios en la expresión genética son fundamentales en las respuestas que ocurren durante el déficit hídrico y controlan algunas de las respuestas a corto y largo plazo. Algunos de los genes expresados durante el estrés hídrico pueden promover la tolerancia celular a deshidratación; ya sea, a través de funciones protectoras en el citoplasma u organelos, alteración del potencial hídrico celular para promover la captación de agua, control de la acumulación de iones, etc. (Bray et al., 2000; Bray, 1993).

Proteínas LEA

Las proteínas abundantes de la embriogénesis tardía fueron descritas primeramente en algodón por Leon Dure III en 1981 (Dure y Chlan., 1981). Las proteínas LEA se han agrupado en varias familias y la caracterización de los diferentes cDNAs (DNAs complementarios) representativos de muchas de estas familias ha mostrado que poseen características estructurales, muchas de las cuales fueron identificadas por Dure y sus colegas. Estas características incluyen un muy alto índice de hidrofiliidad, la baja proporción o total carencia de residuos de cisteínas (Cys) y de triptofanos (Trp); y una abundancia considerable de residuos de aminoácidos pequeños como glicina (Gly), alanina (Ala), y de aminoácidos cargados como ácido glutámico (Glu), lisina (Lys), arginina (Arg) y treonina (Thr). Estas características permitieron que, posteriormente, las LEA fueran consideradas como parte de un grupo más amplio de proteínas denominadas "*Hidrofilinas*" (Figura 5), las cuales se caracterizan por un índice de hidrofiliidad mayor a 1, y un contenido de glicina mayor al 6% (Garay-

Arroyo et al., 2000, Battaglia et al., 2008). Se ha propuesto que algunas *hidrofilinas* podrían haber sido seleccionadas como parte de un mecanismo adaptativo que ayuda a mantener una maquinaria funcional en un medio limitado de agua (Garay-Arroyo et al., 2000).

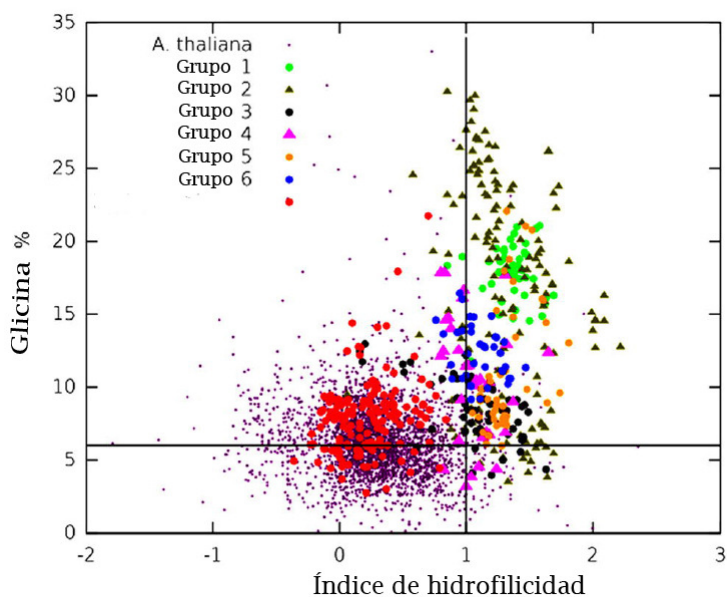


Figura 5. Grafica de representativa de los diferentes grupos de proteínas LEA comparando su índice de hidrofiliidad y contenido de glicinas (parámetros que definen “hidrofilinas”) con las demás proteínas en *Arabidopsis thaliana* (puntos morados). Nótese su sesgo a un índice de hidrofiliidad mayor a 1 y su contenido de glicinas mayor al 6%. (Modificado de Battaglia et al., 2008)

Las proteínas LEA se acumulan durante el desarrollo de la semilla pero más abundantemente durante la fase de desecación. Algunas proteínas LEA también se acumulan en tejidos vegetativos en respuesta a estrés osmótico, provocado por diversos factores ambientales (Bray, 1993; Galau et al., 1986). Existen muchos reportes acerca de proteínas de embriogénesis tardía, donde su expresión se correlaciona con el aumento en los niveles del ABA, cuya acumulación se ve aumentada no sólo durante la embriogénesis tardía promoviendo la tolerancia de embriones a la desecación, sino también durante el crecimiento vegetativo bajo condiciones de déficit hídrico (Busk y Pagés, 1998; Leung y Girandat, 1998). ABA es, pues, capaz de inducir la expresión de genes en embriones inmaduros o en tejidos vegetativos no estresados cuando se aplica exógenamente (revisado en Dure, 1993).

De acuerdo a sus características de alta hidrofiliidad, se propone que la mayoría de las proteínas LEA no poseen una estructura globular, esta predicción es consistente con el que este tipo de proteínas sean resistentes a la coagulación después de tratamientos por altas temperaturas en presencia de baja sal, por ello y por las predicciones realizadas a partir de análisis informáticos se les consideró como parte de las proteínas denominadas como proteínas intrínsecamente no estructuradas (IUPs) o proteínas desordenadas o desplegadas; sin embargo, análisis recientes

señalan que, al menos, algunas proteínas LEA poseen una estructura más bien flexible, es decir, que puede cambiar dependiendo de las condiciones en las que se encuentra la célula (Lucero Rivera, comunicación personal y otras referencias). De igual manera, existe una correlación entre el tamaño de las proteínas LEA y su índice de no estructuración, la mayoría de las proteínas LEA tienen un índice alto de no estructuración (>0.2) y poseen menos de 200 aminoácidos de longitud (Figura 6 Battaglia et al., 2008). Se ha propuesto que muchas de ellas se localizan en el citoplasma, localización en la cual estarían actuando como moléculas captadoras de agua, propiciando así un ambiente hidrofílico a otras macromoléculas para realizar sus funciones, también se propone que estabilizan estructuras celulares como membranas, y que podrían actuar como secuestradoras de iones (Dure, 1993; Ingram y Bartels, 1996; Tomashow, 1999; Reyes et al., 2008; Battaglia et al., 2008)

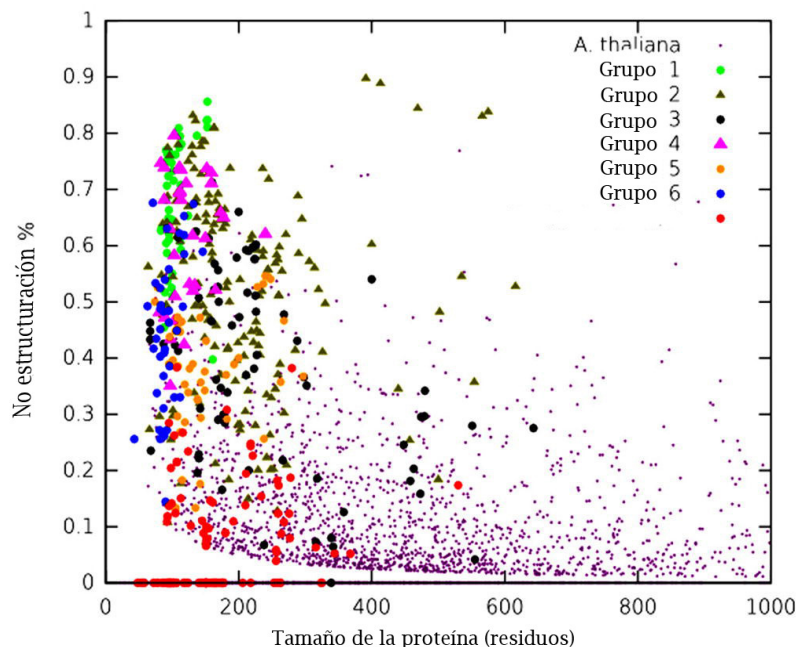


Figura 6. Gráfica de los diferentes grupos de proteínas LEA, comparando su tamaño y porcentaje de no estructuración, con las demás proteínas de Arabidopsis (puntos morados). Nótese su sesgo hacia un tamaño pequeño y un porcentaje de no estructuración mayor de 0.2. (modificado de Battaglia et al., 2008)

De manera interesante, se demostró que la expresión ectópica de algunas proteínas LEA en plantas y levaduras confiere tolerancia a condiciones de limitación de agua, y su presencia se ha asociado de igual manera a tolerancia a congelamiento (Battaglia et al., 2008); sin embargo, aún conocemos muy poco sobre su función *in vivo*. Se han establecido análisis *in vitro* para estudiar su función y, se ha observado que algunas proteínas LEA pueden proteger la actividad de dos enzimas importantes para el metabolismo celular – malato deshidrogenasa (MDH) y lactato deshidrogenasa (LDH)– en condiciones de deshidratación parcial en concentraciones 1000 veces menores en comparación con osmolitos compatibles como la trehalosa (Reyes et al., 2005). Se propone entonces que, para al menos el grupo de proteínas LEA analizadas mediante ensayos *in vitro*, la característica

hidrofílica de las LEA propicia un ambiente hídrico adecuado a la proteína que estuviese regulando, brindando así protección a la actividad enzimática en condiciones de deshidratación intracelular (Reyes et al, 2005). En estos mismos ensayos, de manera interesante, se demostró que algunas proteínas LEA no son capaces de proteger proteínas y por ende conservar su función; este es el caso de PvLEA-18, un miembro del grupo LEA 6 (ver clasificación abajo), el cuál, a pesar de no poseer un efecto de protección de la actividad enzimática, parece más bien tener una asociación con RNA, siendo así que se propone que podría estar actuando como una chaperona de RNA (Lucero Rivera, tesis de doctorado).

Cabe señalar que, como fue explicado anteriormente, las proteínas LEA no poseen una única función dentro de la célula bajo condiciones de déficit hídrico; este es el caso de *Atem6*, uno de los dos miembros descritos en *Arabidopsis* para la familia LEA 1. *Atem6* se expresa abundantemente en la etapa de desecación de la semilla, en la cuál el ambiente acuoso del citoplasma celular tiende a ser reducido, dando lugar al fenómeno de agregación proteica o amontonamiento molecular, por lo que, se propone que esta *hidrofilina* estaría participando como amortiguadora de este fenómeno, propiciando así la conservación estructural de macromoléculas y compartimentos celulares en condiciones de deshidratación (Manfre et al., 2009).

Por otro lado, se demostró que COR85, una proteína LEA del grupo dos, está involucrada en crioprotección (Kazuoka et al., 2000) y COR15am, el polipéptido maduro de COR15a, actúa directamente como una proteína crioprotectora al inhibir la formación de lípidos de fase hexagonal II, el tipo principal de lesión membranal inducida por congelamiento en plantas no aclimatadas (Steponkus et al., 1998). La expresión ectópica en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* y de otras especies vegetales de estas proteínas LEA correlaciona con la tolerancia a estrés por sequía, salinidad y/o congelamiento (Jaglo-Ottosen et al., 2001; Battaglia et al., 2008).

La expresión de los genes *LEA* está regulada tanto por factores de transcripción dependientes de ABA como por factores independientes de ABA, algunos genes *LEA* también se regulan por ambas vías y responden a diferentes condiciones de estrés por limitación de agua, y algunos incluso responden a otras condiciones de estrés como altas temperaturas o condiciones hiperoxidantes (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

Otras funciones predichas y validadas de las proteínas LEA son mencionadas en la siguiente sección (ver Clasificación de las proteínas LEA).

Clasificación de las proteínas LEA.

Las proteínas LEA se clasifican en 7 grupos de acuerdo a la similitud en su secuencia de aminoácidos y a la presencia de motivos conservados que las distinguen (1, 2, 3, 4, atípicas, 6 y ASR1. Battaglia et al., 2008):

Grupo 1 (D-19, por su clasificación en algodón)

Son proteínas pequeñas (90-110 aminoácidos) y de bajo peso molecular, altamente homólogas entre sí (65% de identidad y 80% de similitud entre mono y dicotiledóneas). Contienen una gran proporción de residuos cargados (~18%); son muy ricas en glicina (16-21%), las cuales se encuentran dispersas a lo largo de toda la proteína, lo que le confiere gran flexibilidad y favorece que no adopten estructuras secundarias en solución acuosa (Dure, 1993). Son característicamente reconocidas por un 20-ámero de aminoácidos: TRKEQ[L/M]G[T/E]EGY[Q/K]E,GRKGG[L/E], que puede estar repetido más de cuatro veces con un arreglo en tándem (Galau et al., 1992), aunque la mayoría de los genes contienen sólo uno de estos motivos. Experimentos de dicroísmo circular confirma que los miembros del grupo 1 tienen alrededor de un 80% de estructuración aleatoria ("random coil") y sólo una pequeña proporción exhibe una estructuración tipo poli-L prolina de tipo II (hélices alfa laxas con giro hacia la izquierda; Soulages et al., 2002). Recientemente se han sugerido dos motivos adicionales representativos de esta familia: uno presente en el extremo amino terminal (N-ter) con la configuración TVVPGGTGGKSLEAQE[H/N]LAE hacia arriba del 20-ámero antes mencionado, y un segundo motivo en el extremo carboxilo terminal (C-ter) con la secuencia (D[K/E]SGGERA[A/E][E/R]EGI[E/D]IDESK[F/Y] (Figura 7; Battaglia et al., 2008). Se ha sugerido que las proteínas del grupo 1 son altamente hidratables, creando un medio acuoso protector, como en el caso de la proteína Em de trigo (Espelund et al., 1992). Otra evidencia que apoya el que estas proteínas juegan un rol en la adaptación a la falta de agua en diferentes organismos, viene del análisis de la acumulación de transcritos de proteínas ortólogas presentes en algunas bacterias y en algunos artrópodos (*Artemia*) que muestran que se acumulan durante condiciones estresantes (Stacy y Aalen, 1998) y durante el desarrollo embrionario en el caso de *Artemia*, el cual pasa por un estado de deshidratación severa (Campos F, no publicado).

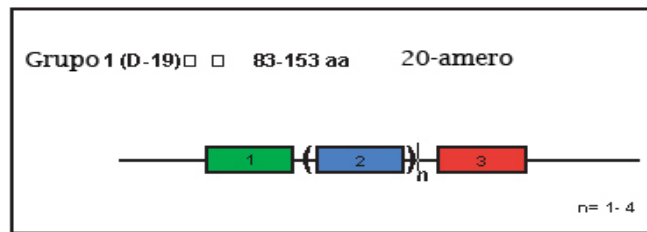


Figura 7. Esquema del grupo 1 de proteínas LEA, se observa su rango de tamaño y motivos conservados (en colores verde, azul y rojo, Modificado de Battaglia et al., 2008)

Grupo 2 o dehidrinas (D-11)

Son proteínas altamente hidrofílicas, y su tamaño es variable (14-150 kDa); son de las mejor caracterizadas y de las más numerosas dentro de la familia LEA. Las dehidrinas, como también se les llama a las proteínas de este grupo, carecen de triptofanos y contienen una gran proporción de aminoácidos cargados y polares (Garay-Arroyo et al., 2000). Poseen diversos motivos característicos representados diferencialmente entre las distintas proteínas de la familia: pueden tener un segmento de 15 aminoácidos rico en lisina, llamado el segmento K, cuya secuencia consenso es EKKGIMDKIKELPG (Ismail et al., 1999). La región rica en lisinas KIKEKLPS puede estar repetida hasta once veces y está localizada en el extremo carboxilo terminal (C-ter). Adyacentemente al segmento K, se ubica otro segmento de 6-9 serinas fosforilables (segmento S). Cabe resaltar que las proteínas que sólo tienen el segmento K se categorizan en el subgrupo K, aquéllas que tienen tanto segmento S como el segmento K, son parte del subgrupo SK, y aquellas proteínas que además de los segmentos S y K, tienen una secuencia característica en el N-Ter llamado el segmento Y (DEVGNP), se subcategorizan en el grupo YSK. (Godoy et al., 1994; Battaglia et al., 2008); sin embargo, hay dehidrinas que entran en otro subgrupo como el YK, KS, y el subgrupo K de proteínas que no poseen los otros motivos (Figura 8; Battaglia et al., 2008). La región de serinas fosforilables (segmento S) se trata de un motivo presente en proteínas que se unen a otras proteínas para acarrearlas al núcleo y probablemente ese motivo sirve como señalizador para aquellas dehidrinas que se localizan en el núcleo, a pesar de que la mayoría tiene localización citoplásmica predicha (Plana et al., 1991). Se ha predicho que el segmento K de las dehidrinas puede formar estructuras de hélices alfa, mismas que, se ha supuesto tienen la función de proteger membranas debido a que tienen la capacidad de interactuar con fosfolípidos (Soulages et al., 2002)

Al igual que las proteínas del grupo 1, a las dehidrinas se les ha asignado algunas posibles funciones en condiciones de falta de agua – debido a que se acumulan en los últimos estadios del desarrollo de la semilla – como la función de chaperonas de macromoléculas, y la posible unión a iones (particularmente azufre y fósforo; Kaye y Guy, 1995; Ismail, 1999).

Se han encontrado miembros de este grupo en monocotiledóneas, dicotiledóneas y en la cianobacteria *Anabaena* sp. (Close y Lammers, 1993), además se ha descubierto que las proteínas LEA de este grupo se acumulan en respuesta a congelamiento en botones florales en plantas de mora azul, y algunos árboles perennes. También existen evidencias que sugieren que estas proteínas se unen a cierto tipo de lípidos (Ismail et al., 1999). Estas proteínas, también llamadas rab (por Respuesta a ABA), también se han descrito como proteínas COR (Cold Responsive) porque se notaba su acumulación en condiciones de frío (Gilmour et al., 1992; Guo et al., 1992). De la misma manera, algunas proteínas LEA del grupo 2 se acumulan por aplicación de ABA, por lo que posiblemente, sus genes estén regulados por la vía dependiente de ABA (Welling et al., 2004)

Se ha demostrado que muchas proteínas de este grupo tienen una actividad relacionada con un fenotipo crioprotector ésto debido a que su expresión se correlaciona con una presencia aumentada de solutos compatibles (Bravo et al., 2003), y, mediante análisis *in vitro*, se ha demostrado que estas proteínas pueden prevenir la pérdida de actividad de otras proteínas involucradas en el metabolismo celular, después de varios ciclos de congelamiento y descongelamiento (Reyes et al., 2008); sin embargo posiblemente el fenotipo crioprotector esté dado por otras enzimas rio abajo de la vía donde participan las dehidrinas.

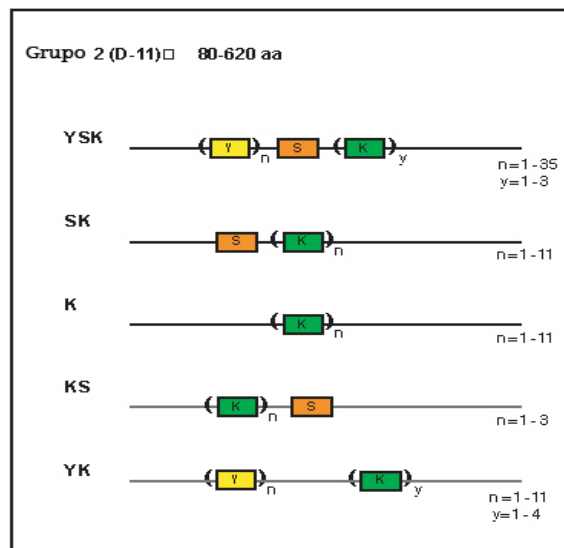


Figura 8. Esquema del grupo 2 de proteínas LEA (dehidrinas), se indica el rango de tamaños de los miembros, así como los subgrupos dependiendo de la presencia o ausencia de motivos conservados (colores amarillo, naranja y verde), Modificado de Battaglia et al., 2008)

Grupo 3 (D-7 y D29)

Se caracterizan principalmente por la presencia de motivos repetidos, de 5 a 13 veces en tándem, compuestos por 11 aminoácidos con la secuencia medianamente conservada FF[E/Q]XFK[E/Q]KFX[E/D/Q] lo que hace que los miembros de esta familia sean de tamaños muy diversos. Se han identificado recientemente otras regiones conservadas en estas proteínas, lo que determina la división de este grupo en LEAs del grupo 3A y LEAs del grupo 3B. Las primeras contienen los motivos 1, 2 y 7 y están asociadas principalmente al grupo D-7 (en algodón) y las proteínas del grupo LEA 3B (D29) se definen por la presencia del motivo 5 (Figura 9; Battaglia et al., 2008). Se predice que el 11-ámero característico del grupo 3 puede estructurarse formando alfa-hélices anfifílicas, lo que generaría una superficie hidrofóbica que puede ser importante para la formación de un homodímero; y también una superficie cargada que pudiera estar involucrada en el secuestro de iones (Dure , 1993). Por otro lado, se ha propuesto que algunas proteínas de esta familia regulan la estructuración de azúcares no reductores para la formación de “bio-vidrios” citoplásmicos, cuando se encuentran en condiciones de deficiencia de agua muy severa (como en semillas maduras y en polen) estabilizando así las estructuras celulares y previniendo la falta de viabilidad por desecación. (Wolkers et al., 2001). Además de estar presentes en todo el reino vegetal, de manera interesante, se ha identificado un gen tipo LEA3 (*AavLEA1*) en el nemátodo anhidrobiótico *Aphelenchus avenae* (la anhidrobiosis es un estado de latencia que presentan algunos organismos cuando están sujetos a condiciones de desecación; Browne et al., 2004), en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, y recientemente se ha encontrado en el crustáceo *Artemia franciscana*, en el cual, posiblemente esté involucrado en la protección de organelos mitocondriales (Hand et al., 2007).

El hecho de que algunas LEA 3 se encuentren en organismos sometidos al fenómeno de anhidrobiosis, supone que éstas contribuyen a contrarrestar el daño producido por la limitación de agua (Wolkers et al., 2001). También, se ha observado que algunos transcritos correspondientes a proteínas de este grupo se acumulan en condiciones de bajas temperaturas y salinidad; y se ha demostrado que algunas de estas proteínas, se acumulan incluso en condiciones donde el crecimiento está arrestado y también después del sometimiento a una condición de sequía así como en la desecación de la semilla (Ried y Walker-Simmons, 1993). De igual manera que las dehidrinas, las proteínas LEA del grupo 3 han sido sometidas a ensayos *in vitro* (en particular ArLEA76 y COR15am (el péptido maduro de COR15)), y se ha observado que estas proteínas son efectivas en la protección de la actividad de LDH y MDH ante condiciones de deshidratación parcial (Reyes et al., 2008).

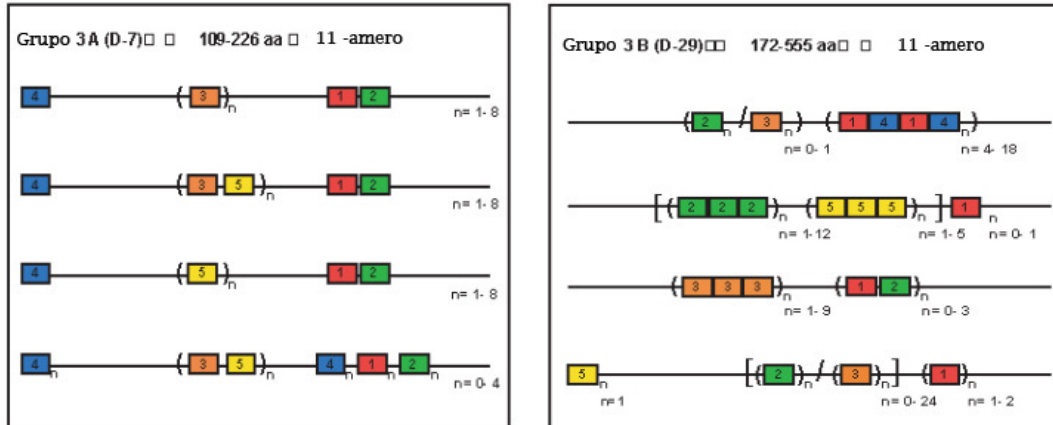


Figura 9. Esquema del grupo 3 de proteínas LEA, se observa la clasificación en subgrupos 3A y 3B, así como el tamaño y los motivos conservados en cada bloque de los subgrupos (colores azul, amarillo, naranja, rojo y verde, Modificado de Battaglia et al., 2008)

Grupo 4 (D-113)

Estas hidrofílicas de tamaño muy variable (88-175 aminoácidos), están distribuidas ampliamente en el reino vegetal, desde plantas no vasculares (briofitas) hasta angiospermas. Son proteínas ricas en glicinas, treoninas y alaninas (11-20%), y tienen una secuencia característica conservada de 60 a 80 aminoácidos, con una estructuración ininterrumpida de alfa-hélice anfipáticas en el extremo N-terminal. Se puede definir un motivo en el extremo N-terminal – motivo 1 – con la secuencia AQEKA EKMTA[R/H]DPXKEMAH ERK[E/K][A/E][K/R]. Sin embargo, otros motivos son distintivos del grupo 4. La presencia o ausencia del motivo 4 y el motivo 5 define dos subgrupos dentro de la misma familia: el subgrupo 4A que consiste en un set de proteínas pequeñas (80 – 124 aminoácidos) con los motivos 2 y/o 3 flanqueando al motivo 1; y el subgrupo 4A que consta de proteínas más grande (108 – 180 residuos) que, además de tener los otros motivos de la familia, puede contener a los motivos 4 y 5 en el extremo C-ter (Figura 10; Battaglia et al., 2008). En embriones de algodón esta proteína se ha encontrado en una concentración de 0.3 mM en todo tipo de células, y se cree que pueden proveer de ambientes hidrofílicos para preservar estructuras membranales (Dure, 1993).

Las proteínas del grupo 4 tienen una estructura flexible en solución acuosa, aunque se pueden observar algunas estructuraciones tipo alfa-hélices. Existe muy poca información de este grupo en comparación con las otras LEA; sin embargo se sabe que en distintas plantas los transcritos correspondientes a LEA 4 se acumulan mayoritariamente en las etapas de desecación de la semilla, y

en semilla seca (Delseny et al., 2001). Algunas proteínas dentro de este grupo responden al ABA; ya sea de vía endógena, acumulado durante el desarrollo o por algún estímulo estresante; o bien por tratamientos exógenos (revisado en Battaglia et al., 2008).

Análisis tanto *in vitro* como *in vivo*, señalan que proteínas que forman parte de esta familia pueden conferir protección a macromoléculas y, además, contribuyen a la habilidad de las plantas de resistir la falta de agua, respectivamente (Reyes et al., 2008; Olvera-Carrillo, sometido 2009)

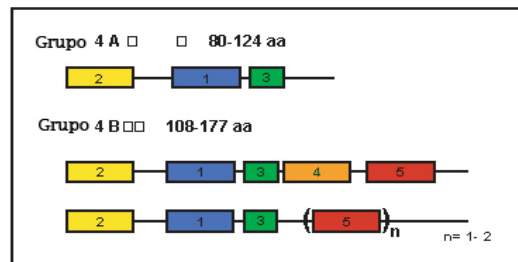


Figura 10. Esquema del grupo 4 de proteínas LEA, se observa la división en subgrupo 4A y subgrupo 4B, así como los motivos conservados en cada subgrupo (colores amarillo, azul, verde, naranja y rojo, Modificado de Battaglia et al., 2008)

Grupo 5 o LEAs atípicas.

Son llamadas proteínas LEA atípicas porque no pertenecen a ninguna de las familias descritas y no presentan el grado de hidrofiliidad ni la composición general de aminoácidos que caracteriza a las LEAs (Galau et al., 1993) por tanto, no pertenecen al grupo de las hidrofílinas pero su abundante acumulación en los estadios tardíos de la embriogénesis, permite catalogarlas como LEA (Maskin et al., 2007). En este grupo se encuentran proteínas no homólogas, por lo que es complicado asignarles motivos conservados; sin embargo, debido a la similitud en secuencia de algunas de estas proteínas y a que algunas proteínas de este grupo se habían descrito anteriormente, se han podido definir 3 grupos: LEA 5A, 5B y 5C correspondientes a la clasificación D-34, D-73 y D-95 respectivamente, sugerida por Leon Dure III (Battaglia, et al., 2008)

Grupo 7 (ASR 1)

Las ASR (**A**bscísic acid **S**tress **R**ipening) son proteínas pequeñas, estables al calor e intrínsecamente flexibles. Estas proteínas también tienen el patrón de expresión distintivo de las LEA, se acumulan en los últimos estadios de desarrollo de la semilla. Un ejemplo de esta familia es la

proteína LEA14 de algodón que, en general es moderadamente hidrofóbica y carece en glicinas (Galau et al, 1993). Las proteínas ASR poseen dominios conservados: motivos 1, 2, 3, 4 y 5; el motivo 3 parece tener funcionalidad como péptido señal para localización nuclear, el motivo 5 se encuentra en el extremo N-ter y al igual que los motivos 1 y 2; es rico en histidinas. Por otra parte el motivo 4 se encuentra en el extremo C-ter (Figura 11; Yang et al., 2005; Battaglia et al., 2008). Existen genes homólogos a los genes *LEA* del grupo 5 inducidos por auxinas, por ácido giberélico en hojas, por choque térmico y por metales pesados; en este último caso, se propone que esta proteína ASR mantiene una estructura flexible en estado acuoso, y cuando se asocia a iones, adquiere una estructura estable, transición que también puede ser inducida por limitación de agua (Goldgur et al., 2007).

Hasta el momento no se han identificado proteínas homólogas de este grupo en *Arabidopsis*, sin embargo se encuentran en una gran variedad de especies como papa, durazno, uva y maíz, en las que tienen distinto patrón de expresión y puede predecirse que tienen distintas actividades (revisado en Battaglia et al., 2008). Experimentos de sobreexpresión de una proteína ASR en *Arabidopsis* han arrojado fenotipos de tolerancia a sal y sequía, lo cuál refuerza su participación como proteínas de respuesta a condiciones de estrés abiótico (Yang et al., 2005).



Figura 11. Esquema del grupo 7 de proteínas LEA, o proteínas ASR, se muestra el rango de tamaño de sus miembros, así como los motivos conservados (colores azul, verde, lila, amarillo y rojo; Modificado de Battaglia et al., 2008)

Grupo 6 (*PvLEA-18*)

La proteína *PvLEA-18* de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) fue caracterizada en 1997 por Colmenero-Flores y colaboradores; esta proteína, con una masa molecular aparente de 14 kDa, es altamente hidrofílica y presenta una estructura mayoritariamente tipo “random coil”. El transcrito y la proteína del gen *PvLEA-18* se acumulan en semilla seca, en tejidos vegetativos sometidos a estrés hídrico y en respuesta a la aplicación de ABA (Colmenero-Flores et al., 1997). Hasta la fecha se han identificado más de 36 miembros de esta familia en otras plantas vasculares. Este grupo está caracterizado por 4 motivos, 2 de ellos (1 y 2) están altamente conservados, en particular la secuencia LEDYK en el motivo 1, así como la prolina y treonina en las posiciones 5 y 6,

respectivamente, en el motivo 2, las cuales tienen el 100% de conservación (Figura 12; Battaglia et al., 2008). La proteína PvLEA-18, la cual carece de cisteínas y triptofanos, de la que se predice una masa molecular de 9 kDa, presenta una masa molecular aparente de 14 kDa cuando se separa en un gel desnaturizante tipo PAGE (**P**oly **A**crylamide **G**el **E**lectrophoresis), posiblemente debido a la exposición de residuos que interactúan con el SDS (Dodecil sulfato de sodio). además, posee una estructura predicha como desordenada (Colmenero-Flores, et al., 1999; Battaglia, et al., 2008)

PvLEA-18 posee en su región 5' no traducida varias regiones de regulación en *cis* reconocidas por experimentos de extensión del cebador: una región de reconocimiento tipo ABRE así como 3 cajas G con el motivo de reconocimiento ACGT; también posee dos sitios de unión a factores de transcripción de tipo MYB y dos más para tipo MYC así como secuencias propias de promotores en eucariones, una caja TATA y dos cajas CAAT putativas (Moreno-Fonseca y Covarrubias, 2001). Sin embargo una gran parte de la regulación ocurre en la región 3' no traducida: al modificar esta región que posee 2 señales de poliadenilación, ya sea acortando su longitud o modificandola por la región 3' de otra proteína, la acumulación de un reportero fusionado a esta región se ve comprometida (ver abajo).

Se ha encontrado que la proteína PvLEA-18 no solo se acumula en tejido vegetativo en condiciones de limitación de agua sino también en regiones de crecimiento (por ejemplo, la zona de elongación del hipocotilo) bajo condiciones óptimas de irrigación. Esta acumulación se explica ya que las zonas de crecimiento del hipocotilo son sitios donde los potenciales hídrico y osmótico son más negativos en relación a las regiones maduras del mismo; acumulación que no había sido descrita para ninguna proteína LEA conocida. Mediante experimentos de inmunohistoquímica se demostró que PvLEA-18 está presente en el núcleo y el citoplasma de todo tipo de células, con una mayor acumulación en la epidermis y en los tejidos del cilindro vascular, particularmente en células de protoxilema y tejidos meristemáticos de raíces, aunque la mayor acumulación se ha detectado en la semilla seca y bajo condiciones de limitación hídrica en tejidos vegetativos. Por todas estas razones se ha clasificado a la PvLEA-18 dentro de una nueva familia de proteínas LEA, el grupo 6 (Colmenero-Flores et al., 1999).

Como fue mencionado anteriormente, análisis mediante fusiones del promotor y las regiones UTR del gen *Pvlea-18* con el gen reportero *GUS*, muestran que los patrones de GUS en las plantas transgénicas, sometidas a déficit hídrico, tratamiento con ABA o en condiciones de irrigación óptima, son similares a los observados en plántulas de frijol en condiciones normales, sin embargo, cuando la región 3' del gen *Pvlea-18* es sustituida por la región 3' no traducida (UTR) del gen para la nopalina sintasa (*3' nos*) disminuye la acumulación GUS en respuesta a ABA, y se nota también una pequeña

disminución en eventos en el desarrollo y en la deshidratación (Figura 12). Por otro lado también la región promotora de 2058 pb, usada en las plantas transgénicas de *A. thaliana*, permite la expresión del gen durante desarrollo, en respuesta a deshidratación y en respuesta a ABA (Moreno-Fonseca y Covarrubias, 2001). Recientemente se demostró que la región 3' no traducida (3' UTR) del gen *PvLEA-18* es fundamental en la regulación traduccional de la proteína debido a que, si esta región se trunca o se sustituye por el 3' nos, la eficiencia traduccional disminuye (Battaglia et al, 2009). A pesar de que se conocen los miembros de esta familia en frijol, arroz, *Arabidopsis*, entre otros, no se sabe el rol funcional que tengan durante condiciones de falta de agua, ni la posible actividad que tengan debido a su acumulación en condiciones de irrigación óptima.

Análisis estructurales recientes mediante la técnica de dicroísmo circular han demostrado que la proteína PvLEA-18 posee una estructura flexible en medio acuoso representada por la formación de hélices poli-L- prolina de tipo II, sin embargo, cuando se modifican las condiciones con TFE (utilizado para desplazar las moléculas de agua de las proteínas), se observa que esta proteína tiende a adquirir otra estructura determinada por la presencia de α -hélices. También se ha visto que PvLEA-18 tiende a estructurarse diferencialmente en respuesta a altas temperaturas: mediante dicroísmo circular se ha observado que aumentando la temperatura de la proteína, esta parece estar formando hojas beta extendidas, posiblemente modificando el equilibrio entre la estructura poli-L-prolina tipo II y las hojas beta extendidas (Lucero Rivera, tesis de maestría y comunicación personal).

También en nuestro grupo, se ha postulado que, en el caso particular de PvLEA-18, ésta podría estar participando como una chaperona de RNA, característica novedosa dentro de las proteínas LEA y, al parecer, la única en la que se ha observado esta cualidad (ver sección Proteínas LEA) de acuerdo a los antecedentes de no brindar protección a macromoléculas *in vitro* (ver Proteínas LEA) y a que puede unirse al extremo 3' no traducido de un RNA mensajero (Marina Battaglia, tesis de doctorado). Esta característica está en proceso de demostrarse en el laboratorio (Reyes et al., 2005; Lucero Rivera, tesis de doctorado)

Recientemente, y debido a la evidencia de una fusión transcripcional en las bases de datos, se ha propuesto que la proteína LEA18 encontrada en arroz (OsLEA6) se encuentra fusionada a una versión truncada de la proteína de respuesta por choque térmico HSP90. La fusión se ha observado a nivel de posición genómica, debido a que la región codificante para ambas proteínas está escasamente separada; se ha encontrado también a nivel de RNA mensajero y resultados preliminares señalan que posiblemente se observa la proteína fusionada (Francisco Campos, et al. En proceso). El hecho de que una proteína altamente hidrofílica y con posible función de chaperoneo de RNA como LEA18 se encuentre fusionada con una proteína de estructuración definida y que actúa

como chaperona de proteínas en condiciones de estrés, permite la especulación de que – en el caso de que sea funcional – tendría la función de estructurar proteínas blanco que poseen asociación con RNA.

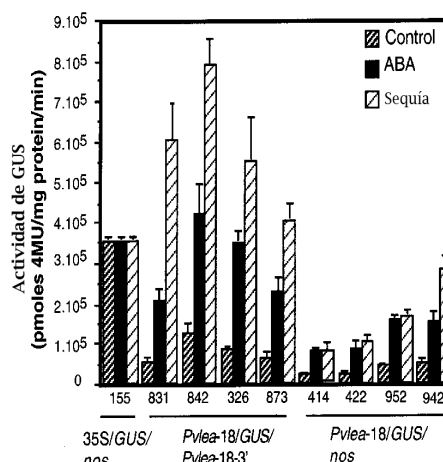
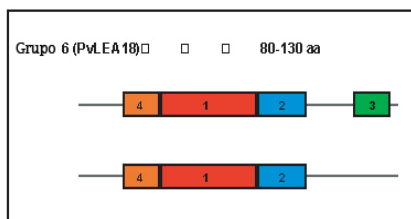


Figura 12. Esquema de la familia 6 de proteínas LEA (definidas por el descubrimiento de PvLEA-18), se observa el rango de tamaño de sus miembros y los motivos conservados entre ellos (colores naranja, rojo, azul y verde, izquierda). Patrones de actividad de “GUS” en distintas fusiones con regiones de PvLEA18 para demostrar la participación de la región 3’UTR (derecha). Cabe señalar que este trabajo está centrado en generar mutantes para estudiar la participación de esta familia en Arabidopsis. (Modificado de Battaglia et al., 2008)

Como antecedente directo de este trabajo se analizaron previamente en el laboratorio diferentes líneas transgénicas de Arabidopsis las cuáles sobreexpresaban al gen *PvLEA-18*; como resultados preliminares de este trabajo, se observó que la sobreexpresión tenía un efecto positivo sobre la germinación de las semillas sometidas a condiciones de estrés osmótico (manitol y NaCl); de la misma manera, las plantas adultas sobreexpresando el gen *PvLEA-18*, tenían una mayor producción de botones florales comparados con las plantas silvestres, en condiciones de sequía. Estos datos sugieren que, al analizar las plantas que carezcan de los miembros de esta familia, existe una alta probabilidad de que observemos un fenotipo contrario .

Para identificar los genes codificantes para proteínas similares a PvLEA-18 en *Arabidopsis thaliana*, en análisis recientes en el laboratorio se sometió a la secuencia de DNA carente de regiones no transcritas del gen PvLEA-18 (U72764) de *Phaseolus vulgaris*, depositada en la base de datos de NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov>), a la herramienta TAIR TBLASTX (TAIR 9 Transcripts) versión 2.2.17 (www.arabidopsis.org) siguiendo los parámetros de comparación “nucleótido – nucleótido” y contrastando con el genoma de Arabidopsis conteniendo secuencias no traducidas (UTR) y carente de intrones. Este análisis reveló tres secuencias con un valor E significativamente cercano a cero: $6e^{-16}$, $3e^{-15}$ y $6e^{-11}$, correspondientes a los *loci* representativos At2g23110, At2g33690 y At2g23120, denominados AtLEA18-1, AtLEA18-3 y AtLEA18-2 respectivamente (Wendy, tesis de maestría). Este hallazgo concuerda con lo descrito en la literatura para esta familia de genes (Battaglia et al., 2008;

Hundermatmark y Hinchá, 2008; Bies-Ethève et al., 2008). Además, se encontró que estos tres loci se localizan en el cromosoma 2 de Arabidopsis, en el cual existe gran abundancia de genes que codifican proteínas LEA, y que los loci At2g23110 y At2g23120 se encuentran en un arreglo en *tandem*, posiblemente producto de una duplicación genómica de esta región (Wendy, tesis de maestría, Hundermatmark y Hinchá, 2008).

En este trabajo y con el fin de obtener más información acerca de los genes que codifican para LEA18 en Arabidopsis, se analizaron los perfiles de expresión de cada uno de estos en la base de datos de microarreglos obtenidos del programa Genevestigator (www.genevestigator.ethz.ch) y comparados con otras bases de datos de microarreglos como el BAR (The Bio-Array Resource for Arabidopsis Functional Genomics, www.bar.utoronto.ca) encontrándose patrones similares. En estos datos se encontró una expresión de los 3 genes en distintos tejidos de la planta: el gen AtLEA18-1 se expresa principalmente en los últimos estadios de desarrollo de la semilla, así como en semilla seca y posee pocos niveles de acumulación en tejido vegetativo bajo condiciones de limitación de agua y bajo aplicación de ABA (Wendy, tesis de maestría), de manera interesante, este transcrito no se acumula en condiciones de irrigación óptima; el gen AtLEA18-2 tiene una expresión casi global en los tejidos de la planta, teniendo mayor acumulación tanto en silicuas como en semilla y una acumulación mediana en hojas de la roseta, este gen también responde a condiciones de estrés por frío, estrés osmótico y aplicación de ABA (Wendy, tesis de maestría; genecat.mpg.de/); mientras que el gen AtLEA18-3 se acumula exclusivamente en polen maduro (detectado también en flores, posiblemente debido a que el análisis de las flores, no excluye el polen, (genecat.mpg.de/; Figura 13). Los datos encontrados en las bases de datos sobre los patrones de acumulación de los transcritos de AtLEA18-1 y AtLEA18-2, concuerdan con análisis anteriores en el laboratorio (Wendy, tesis de maestría).

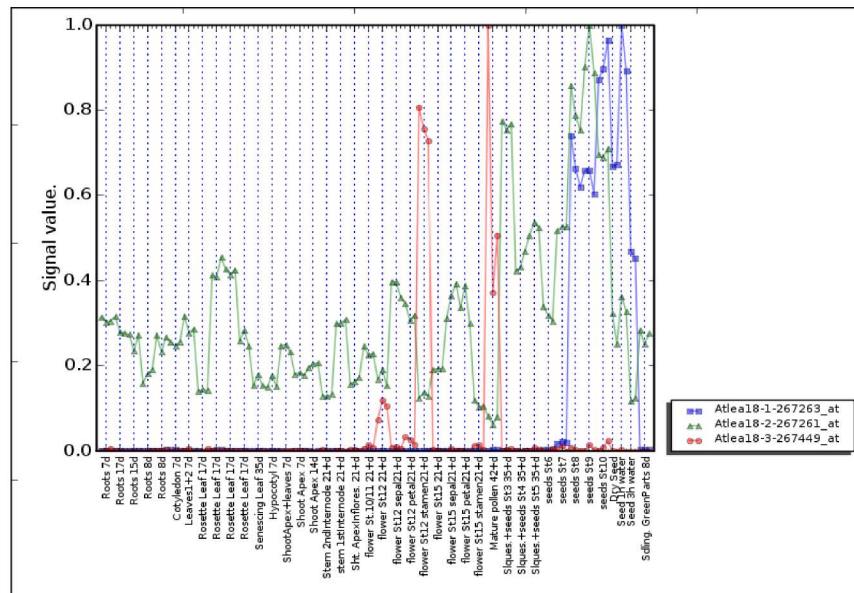


Figura 13: Perfil de expresión para los genes AtLEA18-1 (At2g23110), AtLEA18-2 (At2g23120) y AtLEA18-3 (At2g33690) mediante la base de datos de microarreglos GeneCAT (Gene Coexpression Analysis Tool, genecat.mpg.de/). Solo se muestran los análisis de expresión por tejido.

INTRODUCCIÓN METODOLÓGICA

RNA de interferencia

El RNA de interferencia (RNAi) es una respuesta biológica conservada al RNA de doble hebra (dsRNA), la cual media la resistencia a ácidos nucleicos exógenos y regula la expresión de genes (Hannon, 2002). El mecanismo pudo haber evolucionado para interferir con la replicación viral o la actividad de transposones o para responder a otras formas inapropiadas de expresión génica (Moss, 2001). Debido a que es un mecanismo biológico presente en las células de muchos organismos, incluidas las plantas, representa una estrategia novedosa y altamente específica para la inhibición fisiológica de la expresión de un gen en particular.

El fenómeno del RNAi fue observado por primera vez en el gusano nemátodo *Caenorhabditis elegans* como una respuesta a RNA de doble cadena; en donde se encontró que la introducción de dsRNA resultó en una reducción efectiva y específica del gen *unc-22* que codifica para una proteína del miofilamento del nemátodo, lo cual resultó en el silenciamiento génico de una secuencia específica (Fire et al., 1998); sin embargo, años atrás el fenómeno de inhibición génica mediado por dsRNA ya había sido observado por el grupo de Richard Jorgensen en estudios con petunias (Napoli et al., 1990). El RNA de interferencia es un mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional que inicia con la presencia de siRNAs. La maquinaria del RNAi opera a distintos niveles:

remodelación de la cromatina, inhibición de la traducción y, el más conocido, inhibición y degradación del mRNA específico de un gen. Cabe señalar que en el 2006 Andrew Z. Fire y Craig Mello fueron galardonados con el Premio Nobel de Medicina por sus descubrimientos en torno al RNAi en células de animales, aunque el mecanismo, como se mencionó anteriormente, ya se conocía en plantas.

microRNAs y microRNAs artificiales.

Existe un tipo especial de RNAs pequeños dentro de la célula, los cuales se describieron primariamente como controladores del desarrollo larvario en *C. elegans*. Los productos de los genes *lin-4* y *let-7*, los cuales codifican para RNAs de 22 y 21 nucleótidos, respectivamente, fueron denominados microRNAs (miRNAs). Estos genes se expresan en tiempos específicos y reprimen la expresión de proteínas que controlan diversas etapas y eventos del desarrollo larval (Heidel et al., 2004). Sin embargo, la presencia y actividad de los microRNAs no se restringe a células animales, sino que se han descrito una gran cantidad de microRNAs a los que se les ha adjudicado funciones reguladoras a nivel postranscripcional en plantas y en otros organismos, excepto en bacterias y en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Bartel, 2004). Entre los microRNAs descritos en plantas se encuentran miRNAs cuya expresión se induce por condiciones de limitación de agua y por salinidad; éstos, al igual que los demás miRNAs encontrados en plantas, se transcriben en el núcleo principalmente por la RNA polimerasa II usando como templados regiones que constituyen intrones o exones de genes, o bien, secuencias intergénicas no codificantes, para así dar lugar a un RNA que tiene la capacidad de autoplegarse y formar una estructura tallo-asa, denominado pre-pri-microRNA. Los pre-microRNAs primarios, que tienen una longitud variable, son sometidos posteriormente dentro del núcleo a una reacción de corte por un complejo proteico que contiene RNAsa de tipo III denominada DCL1 (Dicer-like 1), y otras proteínas (Hyl1, Serrate), con el fin de estabilizar al RNA en una estructura tipo tallo-asa, para dar posteriormente lugar al pri-microRNA. Este pri-microRNA es sometido a una segunda ronda de procesamiento por el mismo complejo para generar un dúplex de RNA de aproximadamente 21 – 22 nucleótidos que posee un extremo 5' fosfato (marca de corte por una RNAsa III) y dos nucleótidos colgantes en los extremos 3' de cada cadena. Posteriormente este dsRNA es sometido a una reacción de metilación (dependiente de Hen1) en los extremos 3', que, se supone, le dan mayor estabilidad durante el transporte a citoplasma – siguiente paso en la vía de microRNAs mediado por la proteína Hasty mediante la hidrólisis de GTP, permitiendo así su asociación al complejo RISC (Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA), el cual favorecerá su apareamiento con su RNA mensajero blanco, para provocar posteriormente su silenciamiento a través de la inhibición traduccional (si el apareamiento entre el microRNA y el mRNA mensajero es incompleto) o para promover su corte (a través de Argonauta 1, si el apareamiento es extensivo) y posterior degradación. Este mecanismo proporciona una vía adicional por la cual la célula es capaz

de modular finamente su respuesta a diversos estímulos tanto internos como externos para lograr así un desarrollo y crecimiento normal y una adaptación eficiente a una condición determinada (Figura 14; revisado en Covarrubias y Reyes, 2009).

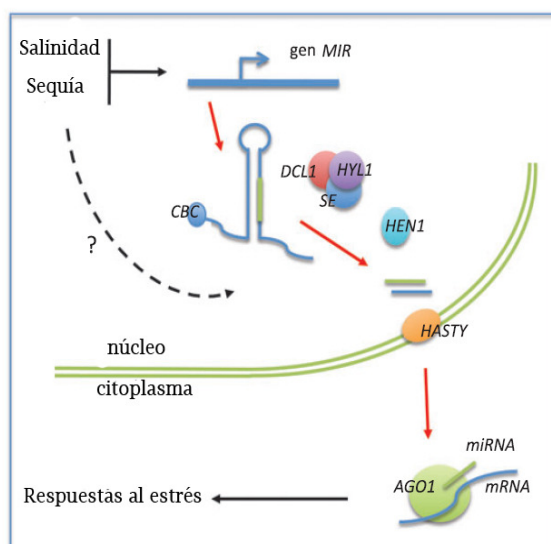


Figura 14. Biogénesis y mecanismo de acción propuesto para microRNAs endógenos en plantas, desde la perspectiva de la respuesta a estrés por deficiencia de agua, provocado por condiciones de sequía o salinidad, y que derivan en una respuesta al estrés. Las flechas rojas indican pasos en el proceso, mientras que la flecha negra indica estimulación. La línea interrumpida indica que existe una vía de inducción de microRNAs independiente de la transcripción del gen MIR. (Modificado de Covarrubias y Reyes, 2009)

Recientemente se ha reportado el diseño de precursores que poseen microRNAs diseñados *ad hoc*, para silenciar mensajeros de interés como una estrategia para generar mutaciones dirigidas. La premisa de esta estrategia es la modificación del precursor del microRNA en el sitio donde se ubica el apareamiento (debido a la estructuración secundaria) entre el microRNA y su secuencia complementaria (microRNA*); la substitución de esta región da como resultado, posterior al procesamiento del precursor, a la producción de miRNAs con la secuencia complementaria a los genes de interés, provocando el sometimiento de sus mensajeros a silenciamiento postranscripcional. Este mecanismo ha sido comprobado utilizando microRNAs artificiales (amiRNAs) que poseen como blanco secuencias encontradas en virus y que, al ser introducidos en las plantas, pueden conferir resistencia a la infección; y también han sido utilizados previamente en el laboratorio para generar plantas transgénicas capaces de silenciar la producción de las proteínas que constituyen el grupo LEA 4 en *Arabidopsis* (Niu et al., 2006; Olvera-Carrillo, 2010). Estas características presentan a esta estrategia como una alternativa para disminuir o anular los niveles de alguna proteína de interés de manera específica y rápida, en particular en aquellos casos en los que no se disponga de mutantes nulas para el gen de interés.

***Arabidopsis thaliana* como modelo *in vivo*.**

Arabidopsis es una hierba que pertenece a la familia de las *Brassicaceae*, la cual es de fácil manutención en el laboratorio bajo condiciones controladas debido a su tamaño pequeño y a que su ciclo de vida es relativamente corto (es posible cosechar semilla madura en cinco semanas). Sus flores son dioicas, y en condiciones naturales se autopolinizan, por lo que se pueden obtener plantas homocigotas en pocas generaciones por la reducción de la polinización cruzada. Una sola silicua (vaina) de *Arabidopsis* puede producir de 30 a 50 semillas y se pueden obtener miles de ellas en una planta en condiciones normales. Estas características la convierten en la planta ideal para el aislamiento y la caracterización genética de mutantes.

Es una planta diploide, posee 5 cromosomas y su genoma es relativamente pequeño, aproximadamente 125×10^6 pb (pares de bases). Los ecotipos son líneas de laboratorio que han sido obtenidas de diferentes sitios geográficos. Sólo algunos de los 300 ecotipos son usados rutinariamente para mutagénesis y mapeo molecular, entre los que se encuentran Landsberg erecta (Ler), Columbia (Col), Niederzens (Nd) y Wassilewskija (Ws). *A. thaliana* tiene la capacidad de ser infectada por *Agrobacterium tumefaciens* y fácilmente pueden producirse plantas transgénicas (revisado en Ditt et al., 2006), sin embargo también puede ser sometida a otras formas de transformación estable o transitoria, como la biobalística y la agroinfiltración, respectivamente. Debido a las facilidades anteriores, y considerando que los ensayos de limitación de agua están bien establecidos para realizarse en *Arabidopsis*, se eligió esta planta para analizar la participación de las proteínas de la familia 6 en la adaptación de las plantas a condiciones de limitación de agua.

JUSTIFICACIÓN

Se desconoce aún la participación de la familia LEA18 en la resistencia a déficit hídrico, por tanto, son necesarios análisis de pérdida de función de esta familia, así como análisis de sobreexpresión para dilucidar la función que tienen *in vivo*. El presente trabajo está diseñado con el fin de la generación de mutantes para esta familia en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, y, en consecuencia, poder analizar el fenotipo de las plantas que carezcan de LEA18. Estos datos aunados a los obtenidos de plantas sobreexpresoras del gen *pvlea-18*, permitirán definir la participación de esta familia a condiciones de limitación de agua, y así poder asignarle – si la tuviese – una importancia agronómica ya sea como marcador molecular de plantas resistentes, o con la finalidad de producir plantas transgénicas agronómicamente más productivas.

Por lo dicho arriba nos planteamos la siguiente hipótesis:

HIPÓTESIS

Las proteínas LEA de la familia 6 de *Arabidopsis thaliana* participan en la adaptación de las plantas a condiciones con baja disponibilidad de agua.

OBJETIVOS

Objetivo General

Generación y caracterización de un set de mutantes (sencillas, dobles o triples) para los genes que codifican a proteínas pertenecientes a la familia 6 (LEA18 de proteínas LEA en *Arabidopsis thaliana*).

Objetivos particulares:

- I. Búsqueda de mutantes que afecten la producción de las proteínas de la familia 6 en *Arabidopsis*, en colecciones de mutantes disponibles. En caso de existir las mutantes en los genes de interés se caracterizarán para:
 - Ia. confirmar la presencia de la inserción;
 - Ib. determinar los niveles de los transcritos correspondientes .

- II. Generación de mutantes en los genes en donde no se hayan detectado mutantes por inserción o donde estas inserciones no interrumpan la producción del transcrito.

Ila. Generación de mutantes mediante la estrategia de silenciamiento génico por microRNAs artificiales .

Ilb. Diseño *ad hoc* de microRNAs artificiales que tengan como blanco genes para la familia 6 de proteínas LEA en *A. thaliana*

Ilc. Introducción de los precursores de los microRNAs artificiales en vectores binarios para transformación de plantas.

Ild. Comprobación del procesamiento de los microRNAs artificiales.

Ila4. Generación de plantas transgénicas conteniendo los precursores de los miRNAs artificiales.

III. Caracterización de las plantas transgénicas generadas

IIIa. Procesamiento de microRNAs artificiales.

IIIb. Silenciamiento de los genes endógenos, blanco de amiRNAs.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y condiciones de crecimiento

Todas las plantas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas en este trabajo pertenecen al ecotipo Columbia (Col-0). Las semillas de plantas silvestres utilizadas fueron colectadas en diciembre del 2007, por lo que se analizó su viabilidad en medio Murashige & Skoog (MS, que contiene mezcla de sales MS 0.43%, sacarosa 1%, MES (ácido 2-(N-morfolino)etanesulfónico) 0.5% y agar al 0.65% (medio sólido), Toshio et al., 1962), sin antibiótico. Todas las semillas fueron esterilizadas con solución de etanol al 100% por dos minutos, en seguida con una solución de cloro 40%, tritón 0.02% por 10 minutos, y finalmente, seis lavados subsecuentes con agua milliQ® estéril; después de este tratamiento, las semillas se resuspenden en una solución estéril de agarosa 0.1% para su sembrado. Las semillas sembradas (de 25 a 100 por caja) se incubaron por 2 – 2.5 semanas en un cuarto de crecimiento en condiciones constantes de temperatura (24°C), fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad, con una intensidad luminosa de 68-78 mmol·m⁻²·s⁻¹ y un 30% de humedad. Las plántulas de dos semanas de edad se transplantaron a sustrato Metromix® y se incubaron bajo condiciones ambientales controladas (fotoperiodo 16 horas luz, 8 oscuridad, temperatura media 25°C, 35% humedad y con intensidad luminosa variable 50 mmol·m⁻²·s⁻¹); y se regaron tres días a la semana (dos veces con agua estéril, y una vez con solución nutritiva (KNO₃ 0.005 M, KH₂PO₄ 0.0025 M pH 5.6, MgSO₄ 0.002 M, Ca(NO₃)₂ 0.002 M, Fe.EDTA 2x10⁻⁵ M, y micronutrientes H₄BO₃, CuSO₄, NaMoO₄, CoCl₂, MnCl₂, ZnSO₄, NaCl)). Cuando llegaron a una edad determinada (de acuerdo al tipo de experimento) se colectó tejido y se congeló en N₂ líquido y se almacenó a -70°C hasta su posterior procesamiento; o bien, se recolectó semilla para mantener las líneas.

Extracción de DNA genómico.

Con el fin de identificar la presencia de las inserciones en las posibles líneas mutantes obtenidas de los bancos de mutantes, se extrajo DNA genómico utilizando el protocolo de extracción rápida como se describe en seguida. El tejido almacenado (50 – 500 mg) a -70°C, se pulverizó en presencia de nitrógeno líquido y se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml en donde se añadieron 200 – 500 µl de buffer de extracción (Tris-HCl 200 mM pH7.5, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS 0.5%), para homogeneizar el tejido. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 13000 rpm por 1 minuto y se recuperó el sobrenadante el cual se mezcló con un volumen igual de isopropanol absoluto, y se dejó a temperatura ambiente por 10 minutos para precipitar el DNA; después se centrifugó 5 minutos y la pastilla de DNA se lavó dos veces con etanol al 75%, para después dejarse secar y resuspenderse en buffer TE (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM) 1X. Este método permite

de una manera rápida obtener DNA con suficiente calidad para reacciones en cadena de la polimerasa.

Análisis bioinformáticos

Para los diferentes análisis, se consultaron las bases de datos citadas en la sección de RESULTADOS, y en cada caso se siguieron las instrucciones correspondientes para la aplicación de cada uno de los algoritmos.

Amplificaciones por PCR

Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se llevaron a cabo utilizando el buffer: Tris 200 mM pH 8.4, KCl 500 mM), MgCl₂ 20 mM, una mezcla 10 mM de dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 25 mM de oligonucleótidos sentido (F) y antisentido (R), la enzima Taq polimerasa (10% por reacción), la cual fue purificada en el laboratorio y, el templado que se indique para cada experimento. Los termocicladores usados: Mastercycler personal, Eppendorf ® para las reacciones a una sola temperatura de hibridación, y PTC-200 Peltier Thermal Cycler, Alpha Unit ® en el caso de análisis en gradiente. El programa utilizado fue: 1. 94°C x 2 min, 2. 94°C x 30s, 3. la T_m y el tiempo se ajustó de acuerdo a la T_m de los oligonucleótidos usados y al tamaño del fragmento a amplificar (Tabla 1), 4. 72°C x 30s, y 5. 72°C x 2 min; del paso 2 al paso 4 se llevaron a cabo múltiples ciclos para amplificación, que fueron desde 20 hasta 34 (dependiendo del experimento). Los fragmentos obtenidos se verificaron por electroforesis en geles de agarosa (1.5 – 2%) utilizando como buffer de corrida al buffer TAE 1% (Tris base 24%, ácido acético 5.7%, EDTA 0.8 M pH 8.0) y una corriente de 100 V por 30min; al final de la corrida los geles se tiñeron con 10 mM de bromuro de etidio. Las fotografías de los geles fueron tomadas con una cámara GE® ImageQuant 300 y procesadas por el programa del fabricante ImageQuant para la cuantificación de bandas en una computadora Dell con Windows XP profesional.

Número de oligo	Clave	Secuencia	TM	USO
4044	MIR110-120A-F	GAT AGA TCT TGA TCT GAC GAT GGA AGC CCA AGG CGT CCA AGA GCC TAC ATG	78.3	Genera amiRLEA18a junto con 4045
4045	MIR110-120A-R	TGA CCC GGG ATG CCC AAG GCC ACC AAG AGC CTA GAA GAG TAA AAG CC	78.63	Genera amiRLEA18a junto con 4044
4046	MIR110-120B-F	GAT AGA TCT TGA TCT GAC GAT GGA AGC ACC GAT GCA CCC ACT CCT TCC ATG	78.3	Genera amiRLEA18b junto con 4047
4047	MIR110-120B-R	TGA CCC GGG ATG CAC CGA TGG TCC CAC TCC TTC GAA GAG TAA AAG CC	78.63	Genera amiRLEA18b junto con 4046
6007	miRLEA183F	GAT AGA TCT TGA TCT GAC GAT GGA AGG CGG CAC AAC CCT CGC ACC GAC ATG	79.42	Genera amiRLEA183 junto con 6008
6008	miRLEA183R	TGA CCC GGG ATG GCG GCA CAA CCG ACG CAC CGA GAA GAG TAA AAG CC	80.07	Genera amiRLEA183 junto con 6007
4038	AtLEA181F+	GCA AGT GTA AAC CTC TCA CGG GCA AGC	71.76	Amplifica el gen AtLEA18-1 junto con 4039
4039	AtLEA181R-	CGC ATC GGT AGA AGA AAG ATC CGT GC	70.62	Amplifica el gen AtLEA18-1 junto con 4038
4040	AtLEA182F+	CAA CGA CGG AGA AGA AAA CGG AGC AAG	70.5	Amplifica el gen AtLEA18-2 junto con 4041
4041	AtLEA182R-	GGG TTT GTT TTC CGA CGA TCC ACA AAA CCC	71.33	Amplifica el gen AtLEA18-2 junto con 4040
4042	AtLEA183F+	CCC TCC GCC ATA GAT TCC GCT AAC C	72.1	Amplifica el gen AtLEA18-3 junto con 4043
4043	AtLEA183R-	GTT GCA AGA TGG CCA AAA TCC CTT GC	69.31	Amplifica el gen AtLEA18-3 junto con 4042
1471	SALK-LBb1F	AGT TGC AGC AAG CGG TCC ACG C	71.18	Amplifica parte del extremo izquierdo de T-DNA
1048	SALK_LBb1R	GCG TGG ACC CGT TGC TGC AAC T	71.18	Amplifica parte del extremo izquierdo de T-DNA
1281	miR159a*as	TGT TTG AAC TTT AAG GAG CTC	61.64	Sonda para detectar a miR159*
1282	miRL18A*as	TGT AGG CTC TTG GAC GCC TTG	68.12	Sonda para detectar a miRLEA18a*
1283	miRL18B*as	TGG AAG GAG TGG GTG CAT CGG	59.74	Sonda para detectar a miRLEA18b*

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo. En esta tabla se indica el nombre, la secuencia, la temperatura media de hibridación, el uso que se le dió, y el número como aparece en la base de datos de oligonucleótidos del IBt- UNAM.

Experimentos de restricción, ligación, recombinación.

Tanto los experimentos de restricción como de ligación, se llevaron a cabo en un volumen final de 10 ul. En los experimentos de restricción se utilizó buffer universal TA de restricción (Tris-acetato 220 mM pH7.8, acetato de potasio 660 mM, acetato de magnesio 100 mM y 5 mM del agente reductor DTT (ditiotreitoll)) diluido al 1x por cada volumen de enzima utilizada, es decir 1x por 1 ul de enzima, 2x por 2 ul de enzima (en el caso de que se requiriera hacer una digestión doble), y una concentración de templado entre 100 y 200 ng para hacer digestión de vectores. Las reacciones de restricción se llevaron a cabo a 37°C durante 1 hora, y posteriormente se observó la digestión en un gel de agarosa-TAE, 1.5%. Las enzimas de restricción utilizadas en este trabajo fueron *XmaI*, *BglII*, *SacI*, *BstB1* y *XhoI*. Posterior a la reacción se limpiaron los ácidos nucleicos resultantes mediante el método de fenol-cloroformo.

En el caso de las reacciones de ligamiento, se llevaron a cabo en un volumen de 10 ml, se utilizó 1 ul de la enzima T4 DNA ligasa, 1 ul de buffer T4 (Fermentas) que contiene ATP, y con una concentración del fragmento a insertar + vector cortado, de acuerdo a la siguiente formula:

$$\frac{\text{ng de vector} \times \text{tamaño inserto en kb}}{\text{tamaño vector en kb}} \times \begin{matrix} \text{proporción} \\ \text{inserto:vector} \\ \text{en radio molar:} \\ \text{3:1 en todas} \end{matrix} = \text{ng de inserto}$$

La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 2 horas, posteriormente se transformaron 50 ul de bacterias electrocompetentes de la cepa DH5α mediante electroporación (1 pulso de 2500 V con un electroporador Gene Pulser II de BioRad® durante 8-10 mseg) con 1 ul de

la reacción de ligación. Las colonias transformadas se recuperaron en 200 ul de medio SOC (Bacto-triptona 20 g/l, extracto de bacto-levadura 5 g/l, NaCl 0.5 g/l, KCl 1 M, 2.5 ml/l) durante 1 hora a 37°C con agitación constante. Posteriormente, las bacterias se sembraron en cajas Petri conteniendo medio LB sólido (Bacto-triptona 10 g/l, extracto de bacto-levadura 5 g/l, NaCl 5 g/l, NaOH 1 M 0.5 ml/l y agar 15 g/l) con el antibiótico de selección (kanamicina o espectinomicina a 50 mg/ml) y se crecieron durante 24 horas a 37°C para analizar el número y la viabilidad de las colonias formadas. Para verificar la construcción se llevó a cabo una reacción de PCR, como se mencionó en la sección anterior, utilizando directamente colonias bacterianas recuperadas tras la transformación. Las colonias sometidas a PCR se resembraron con los residuos que quedan en el asa bacteriológica en una nueva caja Petri para conservar la colonia.

Clonación por recombinación

En estos casos la reacción se llevó a cabo en un volumen total de 5 ul, con 1 ul de la enzima LR clonasa II, 1 ul del buffer LR clonasa (Fermentas) y el volumen restante con una relación 3:1 del vector de origen: vector de destino (100 ng pENTR: 30 ng pBA o 100 ng pENTR : 20 ng pK2). La reacción se incubó a 37°C durante 1 hora. Posteriormente, se transformaron bacterias quimiocompetentes TopTen Invitrogen® mediante el método de transformación química (200 ul de bacterias TopTen® se colocaron en presencia de 1 ul de reacción de recombinación y posteriormente se colocaron en hielo durante 30 min, pasado este tiempo se les dio un choque térmico a 42°C de 30 segundos y se dejaron recuperar en medio SOC durante 1 hora a 37°C con agitación, finalmente fueron sembradas en cajas Petri conteniendo medio LB sólido y los antibióticos de selección. Se incubaron durante 24 horas después de lo cual se analizaron por PCR para verificar la reacción de recombinación.

*Transformación transitoria en *Nicotiana benthamiana*.*

Los vectores se purificaron mediante el Kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit de Fermentas® utilizando las recomendaciones del proveedor. El vector resultante fue cuantificado utilizando un espectrofotómetro ND-1000 de NanoDrop® y se enviaron 70 a 100 ng totales a la unidad de secuenciación del IBt para su verificación.

Una vez verificados los productos de la recombinación, se transformaron bacterias electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* cepa C58 mediante el protocolo descrito anteriormente. La recuperación de las bacterias se llevó a cabo durante 2 horas a temperatura ambiente sin agitación, se sembraron en medio LB con rifampicina + antibiótico de selección y se

crecieron durante 2 días a 28°C. Posteriormente se analizaron las colonias mediante PCR a partir de colonias aisladas; de los candidatos positivos se extrajo plásmido para verificarlo por secuencia.

Una vez comprobada la inserción, se procedió a la agroinfiltración. La colonia seleccionada se inoculó en 50ml LB líquido conteniendo los antibióticos de selección, y se incubó a 28°C con agitación, durante 2 días, o hasta que la densidad óptica (OD) tuviera un valor entre 1.2 y 1.5. Las bacterias crecidas fueron resuspendidas en una solución 10 mM MgCl₂ y 75 ml de acetosiringona 100 mM en un volumen de 50 ml. Las plantas de *N. benthamiana* de 4 semanas de edad se sacaron del cuarto de crecimiento, se dejaron 3 horas a luz baja y, posteriormente, y se infiltraron las superficies abaxiales de 5 hojas con la solución de bacterias conteniendo cada una de las construcciones de interés. Este procedimiento se llevó a cabo utilizando una jeringa de 3ml hasta observar la hoja completamente humedecida y sin dañarla demasiado; al finalizar, las plantas se incubaron en el cuarto de crecimiento durante dos días, después de lo cual se tomaron las hojas infiltradas (que estaban marcadas), así como hojas donde no se realizó la infiltración (como control) y se extrajo RNA con el método de Trizol® siguiendo las instrucciones del proveedor.

Experimentos tipo Northern para detectar microRNAs.

Con el RNA obtenido se procedió a la realización de un experimento tipo Northern para detectar los microRNAs; para ello se tomaron 5 mg de RNA total, y se separaron en un gel de 15% poliacrilamida (acrilamida 16:2 bis-acrilamida), 8M urea y TBE 1% a 20 mA durante 45 minutos usando TBE 1% como buffer de corrida y un buffer de muestra que contiene 1% bromofenol, 1% xilencianol, 5% EDTA 0.5M y 93% formamida. Al término de la electroforesis, el RNA se transfirió a una membrana de nylon cargada positivamente (Hybond-N⁺ Amersham Biosciences®) utilizando un aparato para transferencia en semiseco (Owl®) durante 35min a 100mA utilizando 0.5x TBE como buffer de transferencia. El RNA se fijó a la membrana mediante pulsos de luz ultravioleta, 3 pulsos automáticos de entrecruzamiento (UV stratalinker 1800, Stratagene®) y, posteriormente, se pre-hibridó durante 30 minutos en 10 ml de solución de hibidación (Ambion, Ultrahyb-Oligo®), después de lo cual se hibridó con oligonucleótidos marcados en el extremo 5' con fósforo radioactivo (ver abajo) durante toda la noche a 42°C en un horno de hibridación Techne Hibridiser HD-10®. Al día siguiente, la membrana se lavó 2 veces con una solución 0.1% SDS / SSC 2X (NaCl, citrato de sodio, y HCl para ajustar a pH 7), y se expuso en una película sensible a isótopos inestables de fósforo (Phosphorimager Amersham Biosciences®) durante 24 horas, después se reveló en un scanner (Typhoon, GE Healthcare®) para detectar los productos de la hibridación. Después de revelar, la sonda unida al RNA fue removida mediante 2 lavados con solución 0.1X SSC / 0.1% SDS durante 1 minuto en horno de microondas a máxima potencia y 15 min en agitación, posteriormente se acercó

un contador de centelleo (Geiger) para asegurarse que no hubiera sonda unida. En algunos casos se expuso de nuevo la membrana para asegurarse que no hubiese sonda unida; sin embargo, en algunas membranas, la señal fue tan intensa, que no se pudo eliminar la sonda. Las membranas en las que se logró eliminar la marca radioactiva se reutilizaron para hibridar con alguna otra sonda.

Marcaje de oligonucleótidos con γP^{32} -ATP

Las sondas anteriormente mencionadas se prepararon utilizando oligonucleótidos complementarios a la secuencia de interés (Ver tabla 1 de oligonucleótidos) marcados en su extremo 5' con 3 ul de γP^{32} -ATP utilizando la enzima cinasa de polinucleótidos T4 1 ul de la reacción, su buffer 1 ul, y 10 pmol del oligonucleótido en un volumen final de 10 ml, durante 1 hora a 37°C, al final se eliminó el ATP no unido a DNA mediante columnas de purificación de ácidos nucleicos marcados *mini Quick Spin Oligo Columns* (Roche Applied Science ®) siguiendo las instrucciones del proveedor. La efectividad del intercambio por el fosfato radioactivo se determinó utilizando un contador de centelleo (CountProbe) midiendo la cantidad de radioactividad (cuentas por minuto) incorporadas a los ácidos nucleicos (después de la purificación por columna), restada por la cantidad de cuentas por minuto totales agregadas; solamente se aceptaron incorporaciones de P^{32} mayores al 30%.

Transformación estable de Arabidopsis thaliana.

El método de transformación de *A. thaliana* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Clough y Bent (1998); sin embargo, debido a que la eficiencia de transformación obtenida fue muy baja, se decidió modificar los siguientes parámetros:

- El contenido del detergente Silwet-L77 en la solución donde se resuspende *Agrobacterium* que inicialmente fue de 500 ml, se modificó a 200 ml.
- Las plantas a transformar se podaron 4 días antes de la transformación de tal forma que así se obtuvieron plantas con flores abiertas y muchos botones florales, en lugar de podar con 2 días de anticipación, lo que producía pocos botones florales.
- El tiempo de exposición de las plantas a las bacterias se cambió de 10 min y 5 min en vacío – como fijaba el protocolo – a 15 seg y se eliminó la aplicación de vacío.

Con excepción de lo anterior, los demás parámetros permanecieron iguales, y con ello se obtuvieron buenas eficiencias de transformación (ver resultados). Después del proceso de transformación, las plantas se dejaron horizontalmente durante 2 días en oscuridad y, posteriormente, se regresaron a su posición original y se incubaron en cuartos de crecimiento con ambientes

controlado y bajo un riego óptimo (ver arriba). Dos semanas después se colectó la primer cosecha y de allí se seleccionaron las semillas transformantes.

Experimentos de PCR acoplados a una reacción de síntesis de cDNA con transcriptasa reversa (RT-PCR)

Para los experimentos de RT-PCR se utilizó 1 ug de RNA total de las líneas a analizar y se sometió a una reacción de amplificación utilizando SuperScript Reverse Transcriptase III (Invitrogen ®) para obtener el DNA complementario (cDNA) utilizando un oligonucleótido de timinas (oligo dT) para amplificar los transcritos que poseyeran poli-A en su extremo 3'; a la reacción se le añadieron dNTPs, buffer "First strand" (Invitrogen ®), DTT y el inhibidor de RNAsas *RNAseOUT* (Invitrogen ®). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10 ul y, después de desnaturalizar el RNA en presencia del oligo dT y de los dNTPs a 65°C, se añadieron los demás componentes y se incubó durante 1 hora a 50°C, el cDNA producido se analizó mediante PCR, ya sea en forma estándar o semi-cuantitativa (utilizando 0.5 y 1 mg de RNA total, y amplificando la reacción de PCR a 20, 25 y 30 ciclos).

Experimentos tipo Northern

El RNA total de las líneas a analizar se obtuvo por el método de Trizol ® y se separó por electroforesis en gel de agarosa 1.5%, disuelta en buffer MAE (MOPS (ácido 1-(N-morfolino)propanesulfónico) 0.2 M, acetado de sodio 50 mM, EDTA-NaOH al 1%, 10 mM pH 7) y 6% v/v de formaldehído 12.3M. Antes de cargarlo en el gel, el RNA se desnaturalizó a 65°C por 5 min; se cargaron 10-15 mg de RNA total disuelto en el "buffer de muestra" 1.25X (55%, formamida desionizada 20% formaldehído, 12.5% MAE 10X, 10% glicerol 80% y 4% de azul de bromofenol. La electroforesis se llevó a cabo durante 2 horas a 70 V en buffer de corrida MAE 1X. Posterior a la electroforesis, el RNA fue transferido a una membrana de nylon cargada positivamente (Amersham biosciences ®) mediante el método de transferencia estándar por capilaridad. Para ello se colocó el gel encima de papeles filtro Whatman 3MM ®, los cuales estaban comunicados con solución de transferencia (SSC 10X), arriba del gel se colocó la membrana de nylon y, arriba de ella, 3 trozos del mismo tamaño de papel filtro 3MM, seguidos de una torre de papel de ~10 cm, sobre lo cual se colocó un peso aproximado de 300 g. La transferencia se llevó a cabo toda la noche y al día siguiente, el RNA se fijó a la membrana por entrecruzamiento mediante pulsos de luz ultravioleta, para posteriormente envolverlo en papel y reforzar la fijación durante 30 min a 80°C. Así la membrana está lista para someterla al proceso de hibridación con sondas complementarias a las secuencias de interés, en las que las citosinas están marcadas radioactivamente con ³²P(ver abajo). Para ello, la

membrana se pre-hibridó durante 30 min bajo condiciones de alta severidad con solución PSE (3ml fosfato sódico pH7.2 1M, 7ml SDS 10%, 20ul EDTA 0.5M) 1X y, posteriormente, se añadió la sonda radioactiva la cual se incubó con el RNA transferido y fijado en la membrana a 65°C durante 12 horas a 65°C en un horno de hibridación Techne Hibridiser HD-10 ®. Al día siguiente, la membrana se lavó 2 veces con una solución 0.1% SDS / SSC 2X (NaCl, citrato de sodio, y HCl para ajustar a pH 7), y se expuso en una película sensible a isótopos inestables de fósforo (Phosphorimager Amersham Biosciences ®) durante 24 horas, después se reveló en un escanner (Typhoon, GE Healthcare ®) para detectar los productos de la hibridación.

Marcaje de las sondas con [α P³²]dCTP

El fragmento de DNA a marcar (50-100 ng) se mezcló con 2 ml de una mezcla de hexanucleótidos con secuencias al azar, 0.5 ml de los oligonucleótidos usados en la PCR, y se desnaturaliza por hervor. Después de ello se lleva a cabo la reacción de polimerización utilizando 1 ml del fragmento Klenow de la Polimerasa I (Fermentas ®), más 25 ml de buffer de reacción, 2.5 ml dNTPs sin dCTP, 2.5 ml de albúmina sérica bovina (BSA), y 3 ml de [α P³²]dCTP, en un volumen final de 25 ml, lo cual se incubó a 37°C durante 1 hora. Pasado este tiempo se añadieron 2 ml de glucógeno, 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M, y 2.5 volúmenes de etanol absoluto con el fin de precipitar el DNA y eliminar los deoxinucleótidos marcados libres; al día siguiente se centrifugó y la pastilla se lavó 2 veces con etanol 75% y se resuspendió en agua milliQ. Se midió la incorporación de nucleótidos radioactivos mediante contador de centelleo (como se describió anteriormente) y solamente se aceptaron incorporaciones mayores al 30%. La sonda marcada fue agregada a la solución PSE 1X y se llevó a cabo el experimento de hibridación.

RESULTADOS

Objetivo I

Búsqueda de mutantes para los genes *AtLEA18-1*, *AtLEA18-2* y *AtLEA18-3*

Con la finalidad de conseguir mutantes que estuvieran afectadas en los diferentes genes de la familia 6 de Arabidopsis se procedió a la búsqueda de mutaciones puntuales (polimorfismos) y de mutantes por inserción para cada uno en las bases de datos de colecciones públicas de Arabidopsis en TAIR (www.arabidopsis.org). Preferencialmente, se seleccionaron aquellas líneas que tuvieran alguna mutación por inserción de T-DNA (DNA Transferido) en los exones de alguno de los genes de interés – que estuviera interrumpiendo su transcripción – considerando también su disponibilidad. Así las líneas seleccionadas fueron las siguientes:

- GK-018H10.01, proveniente del Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC), identificada por la localización de la inserción cercana al exón del gen *AtLEA18-1*
- FLAG_211E07, de la Station de Génétique et Amélioration des Plantes del Institut Jean-Pierre Bourgin, identificada por su localización cercana al exón del gen *AtLEA18-2*; y
- SALK_018685C, del Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC), por su localización dentro del exón del gen *AtLEA18-3*.

Posteriormente se realizó un análisis bioinformático en la base de datos de TAIR para localizar el sitio exacto de las diferentes inserciones en cada una de las líneas seleccionadas con los siguientes resultados (Figura 15):

- La línea GK_018H10.01 tiene una inserción de T-DNA dentro de la región 5' UTR del *locus* At2g23110, orientada de forma tal que el “Left Border” (LB) del T-DNA se encuentra hacia el extremo 5' del gen.
- La inserción del T-DNA en la línea FLAG_211E07 se encuentra en la región 3' UTR del *locus* At2g23120 con el LB hacia el extremo 5'.
- La línea SALK_018685C posee una inserción de T-DNA que se ubica cerca de la región

central del exón del *locus* At2g33690 con la región LB hacia el extremo 3' del gen, por lo que, a diferencia de las otras mutantes, en ésta es altamente probable que no se produzca la proteína.

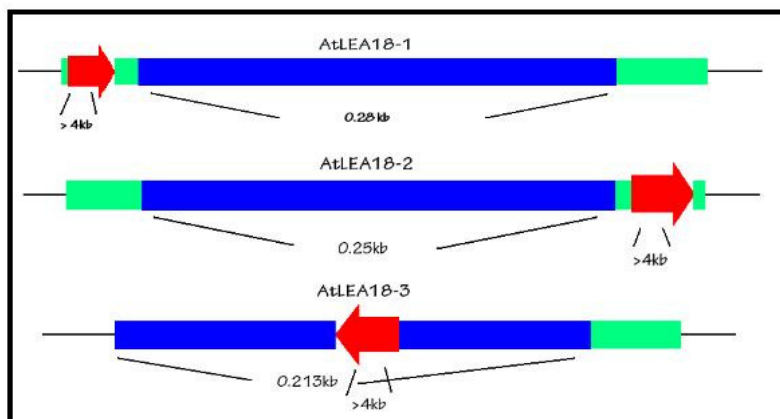


Figura 15: Mapa de las posibles inserciones para los tres genes pertenecientes a LEA18 en Arabidopsis. En líneas rojas se representa la inserción de aproximadamente 4 kilopares de bases (Kb) así como su orientación de inserción (borde izquierdo: base de flecha, borde derecho: punta de flecha); el marco abierto de lectura está representado en azul y en verde se representan las zonas 5' y 3' no traducidas. Se añade el tamaño aproximado de la zona codificante y la inserción.

Cabe mencionar que durante el análisis de los sitios de inserción del T-DNA se encontró que existía un *locus* predicho (At2g23118) que poseía su exón a escasos 17 nucleótidos río arriba de la región 5' UTR del gen *AtLEA18-2*; sin embargo, no se consideró puesto que es probable que sea producto de un error de predicción de genes (Ver discusión).

Caracterización de las líneas mutantes

Siguiente a la llegada de las líneas ordenadas, y con la finalidad de analizar su viabilidad y reproducir las semillas, se sembraron las semillas en medio MS sólido sin antibiótico, en cantidades dependientes del número de las semillas recibidas (aproximadamente 100 para la línea FLAG_211E07, 50 para GK_018H10 y 16 SALK_018685C). Las líneas FLAG_211E07 y GK_018H10 presentaron una elevada viabilidad determinada por el porcentaje de germinación de la semilla (alrededor del 80%); en tanto que la línea SALK_018685C presentó un bajo porcentaje de germinación (31%). En el caso de la línea FLAG_211E07 se detectó una alta supervivencia de la plántula al trasplante (100%) con resultados similares para el caso de GK_018H10; no así con la línea SALK_018685C que presentó una supervivencia durante el trasplante de, aproximadamente, 50%

Posteriormente se analizó la resistencia al antibiótico conferida por la introducción de un gen para selección que está contenido dentro del fragmento del T-DNA que es el que se inserta en el

genoma de la planta. En el caso de las semillas derivadas de las líneas FLAG_211E07 y SALK_018685C, éstas debieran presentar resistencia a kanamicina, mientras que en el caso de la línea GK_018H10 la inserción contiene el gen de resistencia a sulfadiazina. Las semillas provenientes de las líneas resistentes a kanamicina fueron sembradas en cajas Petri con medio MS sólido conteniendo este antibiótico en una concentración estandarizada para la selección de estas plantas (50 mg/ml), la cual permite la selección de las plántulas resistentes sin que se observe algún efecto adverso aparente sobre el crecimiento de éstas. Este antibiótico – miembro de la familia de aminoglucósidos – afecta la subunidad ribosomal 40S, lo que induce errores de lectura por parte del aminoacil-tRNA, de tal manera que, en lugar de reconocer a un codón primario (que generalmente es CUA) como tal, lo reconoce como codón de término y, de esta manera, provoca la generación de proteínas truncadas. En tanto que, la línea GK_018H10 fue sembrada en medio MS a distintas concentraciones de sulfadiazina, la cual afecta la síntesis de ácido fólico. La concentración utilizada también fue de 50 mg/ml. El análisis de supervivencia en presencia de los antibióticos de selección mostró que la línea SALK_018685C no era resistente a kanamicina, lo cual sugirió la pérdida de una forma funcional de este gen, aunque no necesariamente implicaba que esta línea careciera de la inserción del T-DNA (Ver discusión).

Confirmación de la inserción en las líneas mutantes.

Puesto que sólo para la línea mutante SALK_018685C, en donde presuntamente el gen *AtLEA18-3* estaba interrumpido, se contaba con la información completa sobre la localización de la inserción del T-DNA, se decidió caracterizar a esta línea por PCR con el fin de amplificar la región comprendida entre uno de los extremos de la inserción del T-DNA y uno de los extremos del gen, y con ello determinar si la inserción realmente estaba interrumpiendo el gen de interés. Para este fin, se diseñaron los oligonucleótidos correspondientes que permitieran amplificar un fragmento conteniendo el sitio de la inserción del T-DNA (ver figura 15), el cual a su vez contendría un fragmento del T-DNA unido a una región del gen. Los oligonucleótidos fueron diseñados utilizando el programa de libre acceso “Primer-BLAST” (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) que, como su nombre lo indica, es un programa que combina el programa comparador de secuencias “BLAST” con el programa para diseño de “iniciadores” (de *primer* en inglés) “Primer 3”. Este programa permite diseñar oligonucleótidos de diversas longitudes manteniendo una relación óptima de guaninas y citosinas de tal manera que las temperaturas de fusión (T_m) entre ellos no varíe más de 5°C para que ello permita realizar el experimento bajo temperaturas de hibridación óptimas para ambos oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos fueron sintetizados en la unidad de síntesis de oligonucleótidos del Instituto de Biotecnología (UNAM), e inmediatamente a su recepción fueron separados y conservados

en alícuotas. La PCR se llevó a cabo utilizando DNA obtenido de la línea mutante SALK_018685C con los oligonucleótidos respectivos como se describe en Materiales y métodos. Como resultado de esta reacción se obtuvo un fragmento de aproximadamente 700 pb (Figura 16), el cual no corresponde al tamaño esperado de acuerdo al análisis informático que predecía un fragmento de 300 nucleótidos, lo que sugiere que aunque la inserción no se encuentra en el sitio previamente localizado por SALK (Figura 16), así es posible concluir que posiblemente está afectando la expresión del gen *AtLEA18-3* pues de acuerdo a la localización de los oligonucleótidos utilizados en esta amplificación la inserción estaría localizada en la región promotora.

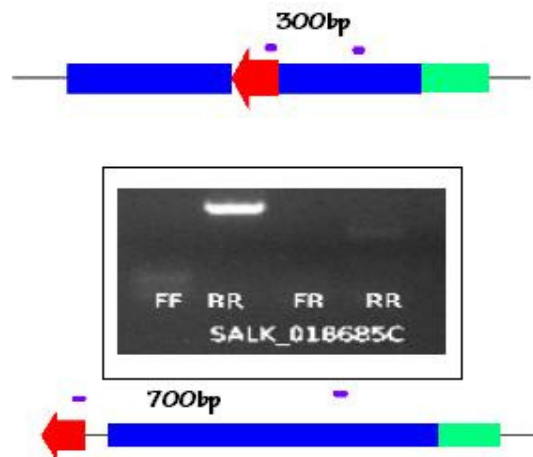


Figura 16. Prueba de amplificación de regiones genómicas con el fin de identificar inserciones en la línea SALK_018685C. F y R indican el uso de oligonucleótidos sentido (F) y antisentido (R) para determinar la dirección de la inserción (oligo del gen – oligo de la inserción). Se observa la amplificación de un fragmento de aproximadamente 700 nucleótidos, tamaño diferente al esperado con esa combinación de oligonucleótidos. De igual manera se incluye el esquema de la zona afectada por la inserción predicha (parte superior) y la posible predicción después del experimento (inferior); las pequeñas líneas moradas indican la localización de los oligonucleótidos y también se indica el tamaño esperado.

En el caso de las otras dos líneas supuestamente mutantes (para los genes *AtLEA18-1* y *AtLEA18-2*, para las cuáles no se poseía la secuencia de la inserción, no se pudo realizar el mismo experimento; por otro lado, se podía observar indirectamente la presencia de la inserción en la zona predicha por las bases de datos mediante la amplificación utilizando oligonucleótidos diseñados para la zona del gen, y que flanquearan el posible sitio de inserción, es decir si la inserción queda en medio de las regiones de apareamiento de los dos oligonucleótidos, la amplificación se verá afectada debido al tamaño de la inserción, esto de acuerdo a la lógica de que el tiempo utilizado para la amplificación de un fragmento de 1000 pares de bases por la enzima Taq polimerasa es de 30 segundos (Ver materiales y métodos), y si la inserción está presente, sus más de 4000 pares de bases impiden que en 30 segundos de reacción enzimática sea posible observar un producto de amplificación; en cambio, si la inserción está ausente, amplificaremos la región comprendida entre ambos oligonucleótidos del gen, en un tamaño esperado. Estos resultados son mostrados en la figura 17, en los cuáles se confirma que la inserción está presente para la mutante correspondiente a

AtLEA18-1, y no así para AtLEA18-2. Consistente con los datos presentados en la sección *Caracterización de las mutantes*, se descarta que el producto de amplificación observado en AtLEA18-2 (Figura 17) sea consecuencia de que las líneas no sean homocigas debido a que las semillas respondieron positivamente a la selección por antibiótico (Ver discusión). Por último, para el caso de AtLEA18-3, la amplificación de la región del gen confirma los datos obtenidos en el experimento anterior que sugerían que la inserción se encuentra fuera del sitio predicho (comparar figura 16 y 17).

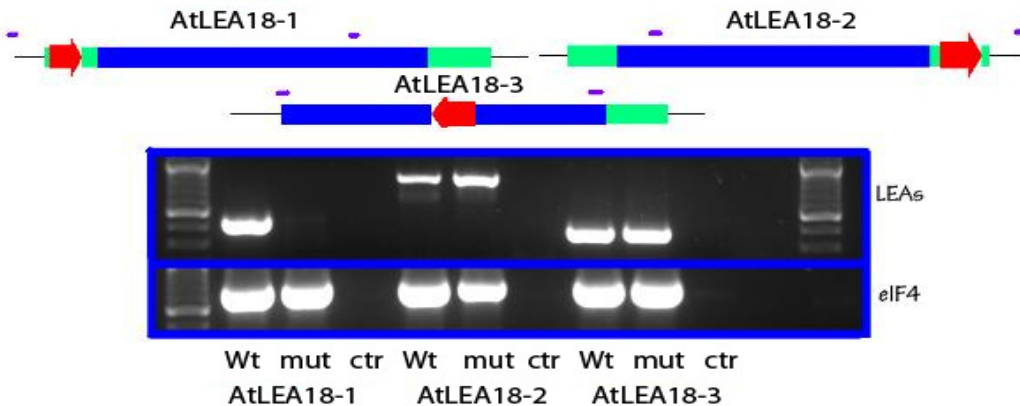


Figura 17. Amplificación las regiones genómicas para los 3 genes de la familia. En la parte superior se observan los mapas de las inserciones de esta región y las líneas moradas representan los sitios de apareamiento de los oligonucleótidos usados en este experimento. En la parte inferior se presentan los resultados de la amplificación de los genes y el control de muestra (eIF4A). Se observa que la amplificación en AtLEA18-1 está ausente debido a la presencia de la inserción, y no así en las otras líneas (ver resultados).

Confirmación de la ausencia de transcrito correspondiente

Para confirmar los datos descritos arriba se decidió determinar si los transcritos correspondientes a los genes de interés estaban presentes o no en estas líneas mutantes. Para ello se realizaron experimentos de RT-PCR. como se describe en la sección de Materiales y métodos.

Para obtener el RNA que se usaría en los experimentos tipo Northern, se recolectó tejido de cada mutante en condiciones de irrigación óptima y/o de déficit hídrico, así como de plantas silvestres. Para la detección del transcrito del gen *AtLEA18-1* se obtuvo RNA total de hojas a partir de plantas sometidas a deshidratación por medio de cámara húmeda hasta que perdieran entre el 40 y 50% de agua; para la del transcrito del gen *AtLEA18-2*, el RNA se obtuvo de plántulas de 3 semanas de edad; y para la detección del transcrito del gen *AtLEA18-3* se purificó RNA de flores (ver antecedentes). Estos tejidos después de ser colectados se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido y se almacenaron para su uso posterior. Días después fueron macerados y homogenizados con el reactante Trizol con el fin de obtener el RNA total (Ver Materiales y métodos para mayor detalle). Se utilizó 1 microgramo de RNA total para llevar a cabo la reacción de transcripción reversa y

posteriormente 1 microlitro de esta reacción final para la PCR (ver Materiales y métodos).

Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 18 en la que se puede observar que, tanto el gen *AtLEA18-2* como el gen *AtLEA18-3* se acumulan en cantidades considerables en las líneas obtenidas como mutantes en estos genes, con respecto al control; no así para el gen *AtLEA18-1* que, mientras que su acumulación es notable en plantas silvestres, no sucede así en las plantas mutantes, en donde independientemente del número de ciclos de amplificación que se utilicen en la PCR sólo se llega a detectar una ligera acumulación bajo un alto contraste (Figura 18). Estos resultados son consistentes con la información obtenida bioinformáticamente en relación al sitio de inserción del T-DNA el cual se esperaba que interrumpiera la expresión del gen *AtLEA18-1* debido a que el T-DNA estaría insertado en la región correspondiente al 5' UTR de su mensajero, la cual resulta ser relevante para la expresión óptima del mismo. Consistente con la detección de la acumulación de los transcritos para *AtLEA18-2*, el análisis bioinformático indicó que para la mutante en el gen *AtLEA18-2*, la inserción se encuentra en la región 3' UTR, la cual no necesariamente debe afectar su acumulación, aunque este análisis no nos permitiría descartar si esta inserción afecta su tasa traduccional, sin embargo se demostró que no existía inserción dentro del gen (Figura 17). Para la mutante supuestamente afectada en el gen *AtLEA18-3*, éste no es el caso; ya que lo predicho bioinformáticamente indica que para esta línea hay una inserción en este gen, lo cual no se detecta como tal por lo que podemos asegurar que la inserción ha sido mal localizada o hubo una confusión en el banco de mutantes a la hora de segregar y almacenar las líneas y, por lo tanto, este gen no está afectado en esta línea.

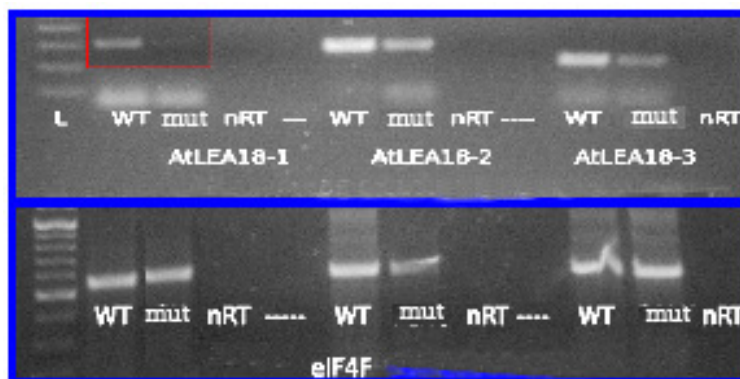


Figura 18. RT-PCR a 35 ciclos de amplificación dirigida contra los transcritos de las tres líneas mutantes ordenadas de los bancos (arriba), se observa su nivel de acumulación comparado con el mismo tejido en plantas silvestres y en las mismas condiciones ambientales. *eIF4F* se utilizó como control de carga (abajo). El recuadro rojo indica una modificación de contraste en la imagen, donde se observa una ligera acumulación de transcrito.

Debido a que los resultados descritos arriba mostraron que los bancos de mutantes de libre acceso solamente nos permitieron contar con una mutación quasi nula en uno sólo (*AtLEA18-1*) de

los genes de esta familia, se propuso la generación de líneas mutantes para los dos genes restantes. Una alternativa para tal fin es el uso de microRNAs artificiales diseñados para silenciar específicamente estos genes. La estrategia que se planteó en esta tesis fue el diseño de un solo microRNA artificial capaz de silenciar los dos RNAs mensajeros para *AtLEA18-1* y *AtLEA18-2* que son los genes que presentan una mayor similitud entre sí (ver siguiente objetivo); de tal manera que si se pretendiera silenciar la familia 6 completa de *Arabidopsis thaliana* se requerirían sólo de dos microRNAs artificiales uno para *AtLEA18-3* y otro para *AtLEA18-1* y *AtLEA18-2*.

Objetivo II

Diseño *ad hoc* de microRNAs artificiales.

Debido a que las mutantes para los genes *AtLEA18-1* y *AtLEA18-2*, detectadas en los bancos libres, no presentan la inserción dentro de la región codificante y a que ningún otro polimorfismo o mutante por inserción reportada hasta ese momento se ubicaba en esta región (quizás debido a que el ORF tiene una longitud muy pequeña aproximada de 300 a 400 nucleótidos), se decidió anticiparse y generar 'mutantes' en estos dos genes mediante silenciamiento génico postranscripcional utilizando microRNAs artificiales.

Se decidió utilizar para este propósito la estrategia de silenciamiento de RNA mediante microRNAs artificiales diseñados *ad hoc* de acuerdo al método propuesto por J.L. Reyes y N.H. Chua (Niu et al., 2006). Esta estrategia tiene la ventaja de ser más eficiente en el caso de la comparación de diferentes líneas debido a que es concentración dependiente (siempre y cuando el precursor del microRNA se encuentre dirigido por un promotor de expresión fuerte), y de que una sola construcción puede silenciar de manera más específica más de un RNA mensajero blanco, comparándolos con el uso de oligonucleótidos antisentido. Lo anterior visto ya en experiencias previas de otros grupos, incluyendo el nuestro al tratar de obtener mutantes en otros genes *LEA*. También, consideramos que tiene ventajas sobre el uso de silenciamiento por RNA de interferencia debido a que la integración en el genoma del precursor del microRNA le da un carácter de heredabilidad. Finalmente, cabe señalar que el uso de esta herramienta ya ha sido establecida en nuestro grupo gracias a la experiencia que el Dr. Reyes adquirió durante su estancia postdoctoral en la Universidad Rockefeller.

Para el diseño de los amiRNAs, se alinearon las secuencias, sin intrones ni UTRs, de los tres genes de la familia 6, mediante el algoritmo T-Coffee (Swiss Institute of Bioinformatics; <http://tcoffee.vital-it.ch>), utilizando la opción '*Combine*' que permite una combinación de los alineamientos de secuencia alternativos múltiples dentro de un alineamiento sencillo múltiple; y la

opción 'Advanced', que permite alinear más de tres secuencias. El análisis demostró que las secuencias de los tres genes comparten una región muy similar; sin embargo, no poseen alguna que permitiera diseñar una secuencia complementaria para un microRNA artificial común a los tres (no mostrado). Por ello se procedió a alinear sólo las secuencias de los genes *AtLEA18-1* y *AtLEA18-2* que, por presentar un arreglo en *tandem* (probable producto de una duplicación génica regional), se esperaba que tuvieran una mayor similitud (ver Discusión). Aunque también se realizaron los alineamientos entre *AtLEA18-1* + *AtLEA18-3* y *AtLEA18-2* + *AtLEA18-3*, tampoco se encontró una región apropiada para complementar con un microRNA común al par. En el alineamiento con *AtLEA18-1* y *AtLEA18-2* se encontró una región con alta similitud entre las dos secuencias, y dentro de ella se encontraron secuencias conservadas; sin embargo, ninguna de estas poseía los 21 nucleótidos necesarios para el diseño de un amiRNA que fuera completamente complementario a ambos transcritos, por lo que se buscaron secuencias en las que pudiera existir apareamiento de guaninas (G) con uracilos (U) (un apareamiento posible entre cadenas de RNA). Con este parámetro se obtuvieron dos secuencias de 21 nucleótidos con una alta complementariedad entre los genes *AtLEA18-1* y *AtLEA18-2* (posteriormente denominados amiRLEA18 $_{\alpha}^{159}$ y amiRLEA18 $_{\beta}^{159}$, Figura 19), las cuales se muestran a continuación incluyendo las posibles regiones "blanco" de estos amiRNAs y de amiRLEA18 $_{3}^{159}$, un microRNA artificial diseñado para silenciar solamente al gen *AtLEA18-3* (ver abajo, Figura 18).

amiRLEA18- α		3' GGGTTCCGGTGGTTCTCGGAT 5'
LEA18-1	250	5' CACAAGGCCACCAAGAGCCTA 3' 230
LEA18-2	222	5' CCGAAGGTCACCAAGAGCCTA 3' 202
amiRLEA18- β		3' GTGGCTACCAGGGTGAGGAAG 5'
LEA18-1	293	5' CACC GATGCTC CCACTCCTTC 3' 273
LEA18-2	265	5' CACC GATGCTCCT ACTCCTTC 3' 245
At5g01400	3047	5' CACCGAGGGGCCCACTCCTTC 3' 3027
amiRLEA18-3		3' CGCCGTGTTGGCTGCGTGGCT 5'
LEA18-3	154	5' GCGGCACAACCGACGCACCGA 3' 134

Figura 18. Mapa de apareamiento entre amiRLEA18 $_{\alpha}^{159}$, amiRLEA18 $_{\beta}^{159}$ y amiRLEA18 $_{3}^{159}$ (arriba) y sus posibles mensajeros blanco derivados del análisis mediante PatMatch (abajo, www.arabidopsis.org), se observa el sentido de las cadenas de tal forma que el apareamiento es el que ocurriría con las cadenas de su RNA blanco.

Como puede observarse, el microRNA denominado amiRLEA18 $_{\beta}^{159}$ tiene un tercer blanco identificado mediante el programa Patmatch versión 1.1 de TAIR (www.arabidopsis.org), introduciendo los parámetros del análisis en ambas cadenas del DNA y permitiendo dos desapareamientos máximos. Cabe aclarar que aunque este algoritmo identifica secuencias similares en la base de datos del genoma completo de Arabidopsis y no se trata de un programa de predicción de posibles blancos de un microRNA, los resultados son consistentes con el análisis realizado con un programa diseñado para la predicción de blancos para microRNAs (WMD, <http://wmd3.weigelworld.org>) (no

mostrados). Este análisis muestra que el posible transcrito blanco tiene una alta probabilidad de aparearse con el microRNA ya que la secuencia semilla de amiRLEA18_β¹⁵⁹ (9 o 10 nucleótidos a partir del extremo 5') es perfectamente complementaria a la secuencia del *locus* predicho. Sin embargo, para complementar este análisis con datos que nos proporcionaran más información sobre la posibilidad de la interferencia de este tercer blanco, se realizó una búsqueda en la literatura y en las bases de datos en relación a sus patrones de expresión, de lo que se dedujo que al abatir su función no se tendría un efecto relacionado con resistencia sensibilidad o tolerancia al déficit hídrico (ver discusión).

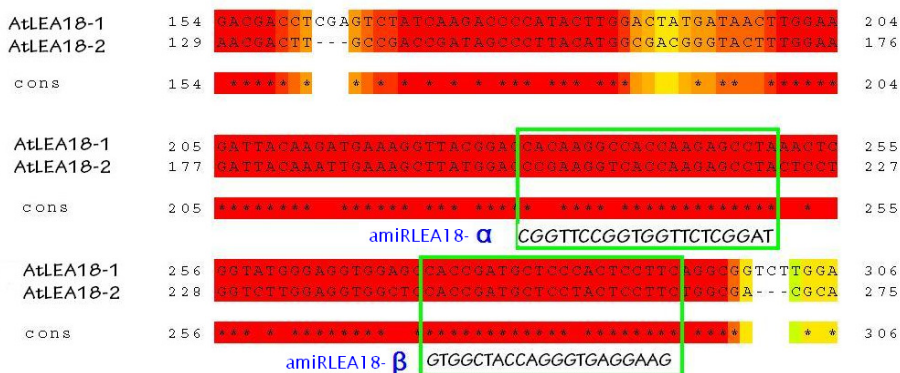


Figura 19. Alineamiento de las secuencias similares en los genes AtLEA18-1 y AtLEA18-2 para el diseño de 2 microRNAs complementarios (letras azules). Los rectángulos verdes indican la zona de apareamiento de los amiRNAs, mientras que los nucleótidos correspondientes a la secuencia de los microRNAs artificiales, se encuentran sobre su secuencia complementaria en cada gen. Las zonas consenso de similitud entre ambas secuencias se señalan con asteriscos en la sección que indica la conservación entre las secuencias (*cons*).

De acuerdo a la estrategia inherente al método de utilización de amiRNAs, los microRNAs diseñados (en los resultados se muestran primero el diseño de amiRLEA18_α¹⁵⁹ y amiRLEA18_β¹⁵⁹ y posteriormente amiRLEA18_γ¹⁵⁹) fueron acoplados a la secuencia del precursor de miR159, un microRNA previamente caracterizado, el cual se expresa de manera casi constitutiva y está altamente conservado en diferentes especies vegetales (Reyes y Chua, 2006). Dentro de este precursor, la secuencia del miR159 fue reemplazada por los microRNAs artificiales diseñados para cada caso de manera independiente y, de igual forma, la secuencia del microRNA estrella (secuencia complementaria al microRNA) de miR159 fue reemplazada por la secuencia complementaria correspondiente para cada diseño. Estas secuencias con los reemplazos fueron analizadas con el algoritmo de plegamiento de RNA 'mfold' (<http://frontend.bioinfo.rpi.edu/>) con la finalidad de elegir aquel precursor artificial que mostrara el plegamiento más estable (Figura 20). De esta manera se confirmó que es poco probable que la inserción de los microRNAs artificiales dentro del precursor afecte su plegamiento.

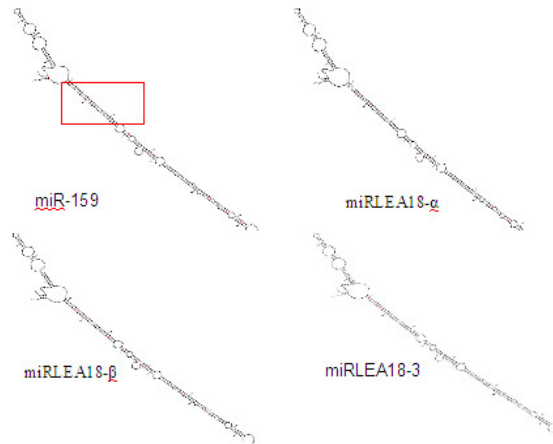


Figura 20. Análisis del plegamiento de los precursores modificados de miR159 y la introducción de las secuencias correspondientes a amiRLEA18_α¹⁵⁹, amiRLEA18_β¹⁵⁹ y amiRLEA18₃¹⁵⁹. El recuadro en rojo indica un acercamiento que corresponde a la Figura 21.

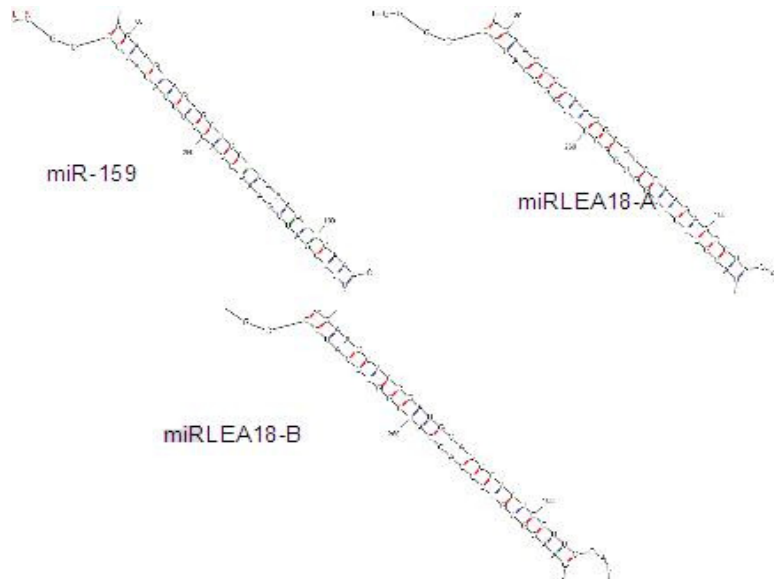


Figura 21. Acercamiento del cambio en la secuencia de miR159 por la secuencia de los microRNAs artificiales amiRLEA18_α¹⁵⁹ y amiRLEA18_β¹⁵⁹, en el caso de amiRLEA18₃¹⁵⁹ el apareamiento es completamente igual al encontrado en miR159 sin algún cambio (no mostrado)

Introducción de los precursores modificados en vectores binarios.

Con el fin de introducir los amiRNAs en el precursor del miR159, se diseñaron oligonucleótidos específicos de los tres microRNAs artificiales utilizando como templado el precursor de miR159. Puesto que el precursor de miR159 está clonado en el vector pENTR/SD/D-TOPO (Sistema

'Gateway', de 2.6 kb, Figura 22), se utilizó este plásmido como templado para la reacción en cadena de la polimerasa (Figura 23; PCR).

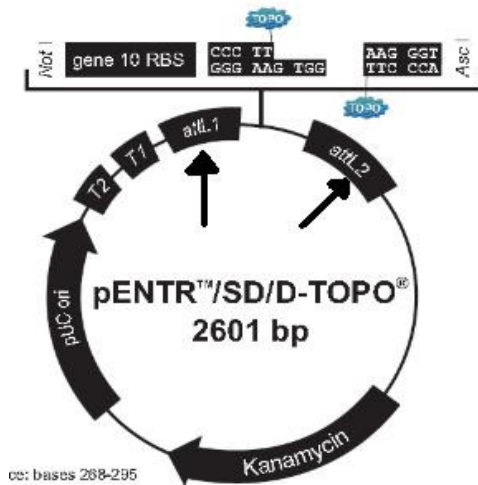


Figura 22. Vector pENTR/SD/D-TOPO que permite que, con el sistema 'Gateway' de recombinación (secuencias *attL1* y *attL2*, señaladas con flechas), ocurra la recombinación en una sola reacción con un vector binario que contenga estas secuencias complementarias, introduciendo así el gen de interés. Las zonas observadas en azul con la leyenda TOPO es el sitio donde se insertaron los amiRNAs. Se observa también que posee un gen de resistencia a kanamicina (Kanamicin).

Modificación del precursor miR159 con amiRNAs por PCR

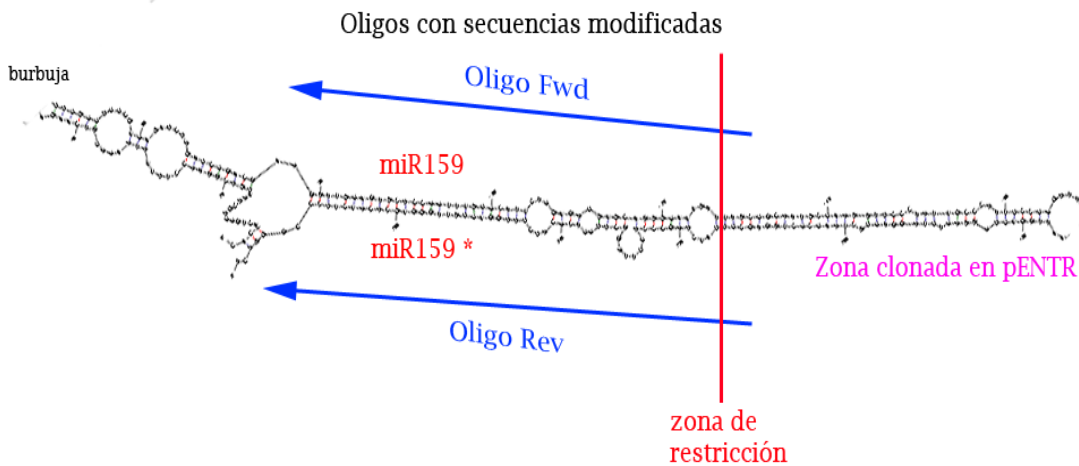


Figura 23. Estrategia para la introducción de los tres microRNAs artificiales en el precursor de miR159 y su posterior clonación en el vector pENTR. Se muestra la zona de apareamiento entre miR159 y miR159* (estrella) en un plegamiento predicho del precursor de miR159. Los oligonucleótidos modificados con la secuencia de los amiRNA y amiRNA* se muestran con flechas azules. Se añadieron sitios de restricción (línea roja) para que los precursores ya modificados se introdujeran en el vector pENTR que ya contenía parte del precursor de miR159 clonado (letras rosas), por medio de una reacción de ligación

Los fragmentos amplificados (ver Figura 23 y 24) fueron digeridos y, posteriormente,

introducidos en el mismo vector cortado, en los mismos sitios de restricción, a través de una reacción de ligación, obteniéndose así los plásmidos modificados denominados pENTR.amirLEA18 α ¹⁵⁹ y pENTR.amirLEA18 β ¹⁵⁹ (Figuras 23 y 24) y posteriormente pENTR.amirLEA18 γ ¹⁵⁹. Las tres construcciones fueron sometidas a clonación en bacterias y seleccionadas por resistencia a kanamicina. La inserción se identificó usando oligonucleótidos específicos para el vector pENTR en una reacción de PCR (aproximadamente 400 pares de bases). Debido a que el microRNA miR159 contiene un sitio de restricción para la enzima *Sac*I, las clonas candidatas se digirieron con esta enzima para determinar si las clonas seleccionadas contenían los vectores con el precursor de miR159 modificado con la secuencia de los microRNAs artificiales. De las colonias que resultaron positivas después de este análisis se extrajo plásmido para obtener la secuencia de nucleótidos correspondiente, utilizando un oligonucleótido (m-13 -20 R) capaz de aparear en el pENTR cerca del sitio de la inserción. La secuencia obtenida confirmó que los tres vectores contenían al precursor de miR159 modificado con los microRNA y microRNA estrella (no mostrados).

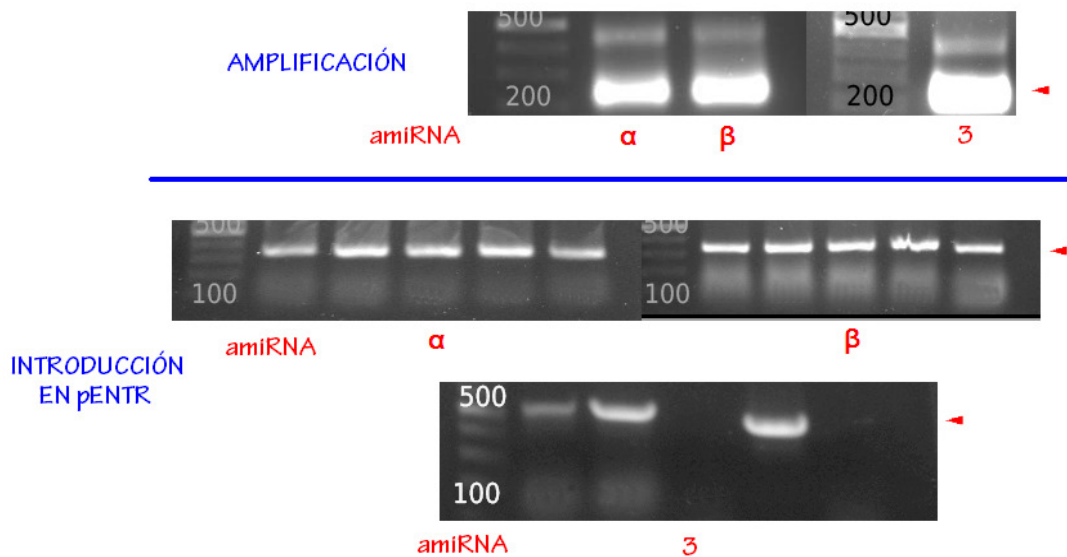


Figura 24. Amplificación del precursor de miR159 con los oligonucleótidos modificados que intercambian este microRNA por amirLEA18 α ¹⁵⁹, amirLEA18 β ¹⁵⁹ y amirLEA18 γ ¹⁵⁹ (arriba), como se muestra en la figura 23, y confirmación de su introducción en el vector pENTR después de una reacción de digestión y ligación (abajo), las cabezas de flecha indican el tamaño esperado (aproximadamente 230 y 470 nt) de los productos de cada reacción. Cada banda dentro del gel (abajo) pertenece a una clona independiente. Se observa el marcador de peso molecular con los tamaños señalados.

pENTR.amirLEA18 α ¹⁵⁹ y pENTR.amirLEA18 β ¹⁵⁹ fueron sometidos entonces a una reacción de recombinación (Figura 26 y 27) para introducir los fragmentos de interés en un vector binario con capacidad de mediar la integración al genoma vegetal de las secuencias de interés. El vector pBA-DC tiene un cassette de resistencia al antibiótico espectinomomicina para su selección en bacterias y dentro de la región correspondiente al T-DNA contiene un gen que confiere resistencia al herbicida BASTA a las plantas que lo contienen; el sitio donde ocurre la recombinación se encuentra en una región río

arriba de un promotor fuerte de origen viral denominado 35S que permite una expresión casi constitutiva del gen que controla (Figura 25). En el caso de pENTR.amirLEA18¹⁵⁹ la recombinación se realizó con el vector pK2-GW7, el cual confiere una resistencia a espectinomicina en bacterias y kanamicina en plantas, y cuyo mapa es muy similar al del pBA-DC que se muestra en la figura 25, sustituyendo el gen de resistencia a BASTA por el de resistencia al antibiótico.

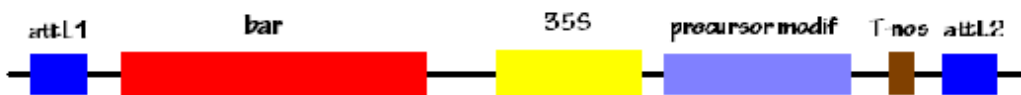


Figura 25: Mapa de la zona de T-DNA encontrada en el vector PBA-DC en donde ocurre la reacción de recombinación (Figura 26), los rectángulos azules indican las secuencias necesarias para la recombinación con pENTR, el gen de resistencia a BASTA se señala con un rectángulo rojo y en amarillo, morado y café, se señalan las regiones del promotor 35S, el precursor del microRNA artificial y el terminador del gen para nopalina sintasa, respectivamente.

Las tres reacciones de recombinación se llevaron a cabo mediante la enzima comercial LR clonasa II que contiene las enzimas Integrasa y Exicionasa del fago lambda y el factor de integración del hospedero IHF de *E. coli* (Invitrogen). Estas enzimas permiten la integración por recombinación de un fragmento de DNA en el genoma de un organismo. Debido a que los vectores pBA-DC y pK2GW7 contienen las secuencias complementarias a las regiones de recombinación de pENTR, pueden ser reconocidos y así lograr recombinación entre ambos (pENTR (2.6 kb) y pBA, pK2 (~12kb)). Los plásmidos contienen las secuencias para recombinación homóloga como se muestra en la fórmula de la figura 27.

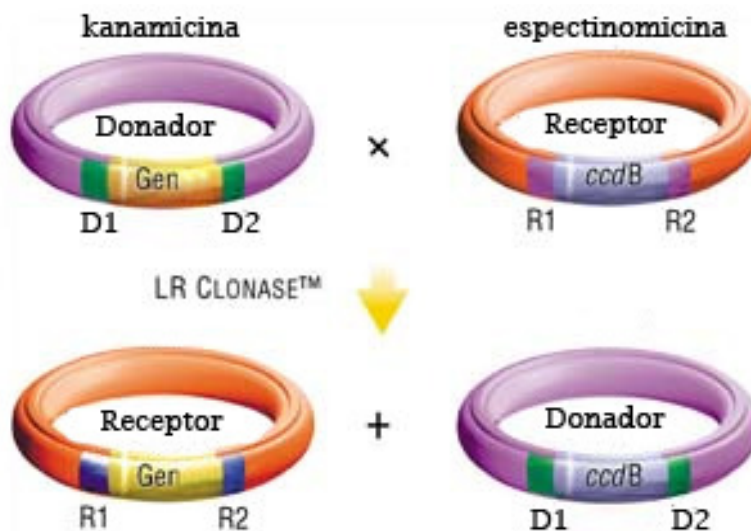


Figura 26. Esquema de la reacción de recombinación utilizando la enzima LR clonasa®. Después de la reacción de recombinación, el vector donador (superior izquierdo) posee ahora el cassette *ccdB*, el cual es tóxico para el crecimiento de *E. coli* (inferior derecho), mientras que el vector de destino (superior derecho) intercambia por recombinación ese cassette por el gen de interés (inferior izquierdo). Los vectores implicados contienen genes que confieren resistencia a diferentes antibióticos para su selección (kanamicina y ampicilina, respectivamente).

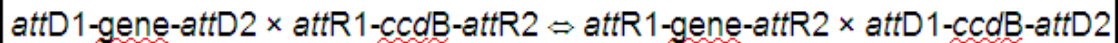


Figura 27. Fórmula de la reacción de recombinación entre vectores. Las regiones *att* son reconocidas por las enzimas que promueven la recombinación, presentes en ambos vectores, mientras que D y R representan a los vectores Donador y Receptor, respectivamente. *ccdB* representa al cassette que contiene los genes responsables de la inhibición del crecimiento de *E. coli* y que después del intercambio por recombinación queda en el vector de origen (Donador)

Los productos de la recombinación se introdujeron en células electro-competentes de *E. coli*, resultando en la selección de aquellas colonias bacterianas que contenían los plásmidos con la recombinación adecuada capaces de crecer en el medio de selección conteniendo espectinomicina. Las células con los plásmidos pBA y pK2 se pierden en la selección ya que contienen el gen *ccdB*, el cual cuando está presente impide el crecimiento de *E. coli*, y que se elimina al producirse la recombinación. La introducción del fragmento de interés en el vector se confirmó mediante una reacción de PCR utilizando un oligonucleótido específico para el fragmento y otro para el vector binario. Además, de las colonias positivas se extrajo plásmido que posteriormente fue secuenciado utilizando un oligonucleótido complementario a una parte del promotor 35S. De esta manera se obtuvieron los vectores pBA.amirLEA18 α ¹⁵⁹, pBA.amirLEA18 β ¹⁵⁹ y pK2.amirLEA18 γ ¹⁵⁹ quedando en reserva para futuros requerimientos del laboratorio.

Confirmación del procesamiento de los amiRNAs en el sistema heterólogo *Nicotiana benthamiana*.

Los tres vectores se introdujeron en células de *Agrobacterium tumefaciens*, las cuales tienen la capacidad de infectar plantas y, además, pueden introducir un plásmido a las células vegetales el cual puede integrarse al genoma de la planta por un mecanismo de recombinación no homóloga producto de la introducción de T-DNA mediante un sistema de secreción de tipo IV (Gelvin, 2009). Esta estrategia de transformación presenta una mayor eficiencia en comparación con otros métodos de transformación de plantas debido a que produce un número menor de muerte celular (ventaja sobre la estrategia de Biobalística), aunque también está sometida a fenotipos no esperados debido a que el sitio de integración es azaroso y el número de inserciones es variable (generalmente 1 o 2,

revisado en Gelvin, 2009).

Después de la transformación por electroporación (ver Materiales y métodos), las células de *A. tumefaciens* fueron seleccionadas con el antibiótico espectinomycin debido a la resistencia conferida por los plásmidos pBA-DC y pK2GW7, y con el antibiótico rifampicina, que permite el crecimiento selectivo de células de *A. tumefaciens*. Para identificar la presencia del vector binario con las secuencias apropiadas se llevó a cabo PCR de las colonias aisladas utilizando los mismos oligonucleótidos mencionados anteriormente. Verificada la inserción y transformación se guardaron las colonias seleccionadas. Las colonias posteriormente se utilizaron para realizar una transformación transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana*, con la finalidad de determinar si los precursores artificiales se procesaban en amiRNAs de 21 nucleótidos. Para ello, se prepararon cultivos líquidos de algunas de las colonias seleccionadas de *A. tumefaciens* en presencia de rifampicina y espectinomycin que se sometieron a un tratamiento con acetosiringona – debido a que es una molécula de señalización de la planta a la presencia bacteriana, que prepara el sistema de secreción bacteriano para la infección – preparada en una solución de magnesio con el fin de hacer las células competentes para la infección de plantas. Este cultivo se utilizó para infiltrar hojas de *N. benthamiana*.

Para analizar la producción de los amiRNAs, dos días después de la infección se extrajo RNA de las hojas infectadas y se procedió a realizar un experimento tipo Northern para la detección de los amiRNAs procesados; la detección de miR159 se utilizó como control de transferencia del RNA a la membrana al igual que el marcador de peso molecular para RNAs pequeños (DECADE, Figura 28).

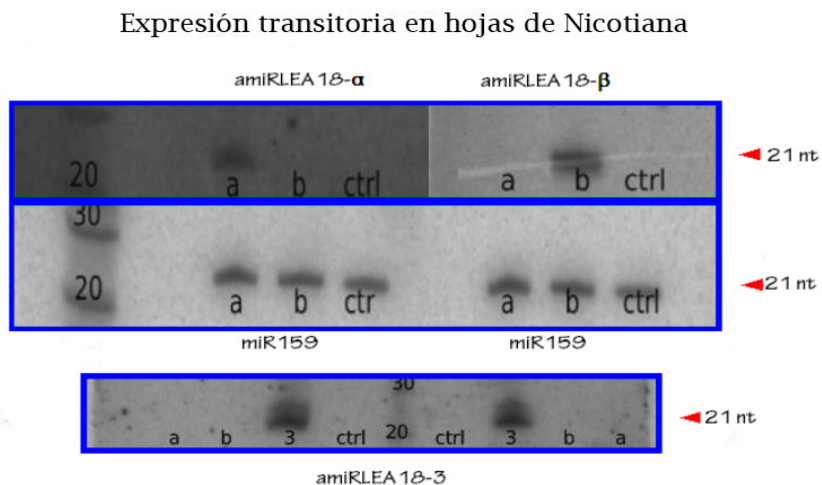


Figura 28. Detección de amiRLEA18 $_{\alpha}$ ¹⁵⁹, amiRLEA18 $_{\beta}$ ¹⁵⁹ (arriba) y amiRLEA18 $_{3}$ ¹⁵⁹ (abajo). Se muestra también la hibridación con miR159 (como control de carga, centro) del RNA obtenido de hojas de *N. benthamiana* sometidas a transformación transitoria con los vectores conteniendo los microRNAs artificiales. A la izquierda se observa el marcador de peso molecular de RNAs pequeños utilizado además como control de transferencia y

las puntas de flecha señalan los tamaños esperados de los amiRNAs maduros.

Un análisis más detallado de amiRLEA18 α ¹⁵⁹ y amiRLEA18 18 β ¹⁵⁹ reveló un error en su diseño. El precursor de miR159 contiene un desapareamiento en los nucleótidos 9 y 10, a partir del extremo 5' del microRNA, en su apareamiento con el microRNA estrella, en tanto que, erróneamente estos dos amiRNAs poseen ese mismo 'gap' en los nucleótidos 12 y 13. Este error es derivado del diseño y se esperaba que no afectara en gran medida el procesamiento del amiRNA maduro, ya que su secuencia no varía (ver Discusión). De cualquier manera, como actividad preventiva se diseñaron otros oligonucleótidos en los cuales la secuencia del amiRNA estrella fue modificada para que el precursor contuviera el desapareamiento en la posición correcta. Dado a que la transformación transitoria de *N. benthamiana* reveló que estos microRNAs se procesaban de forma correcta, no fue necesario continuar con la obtención de los microRNAs con el desapareamiento correcto, debido a que, como se mencionó anteriormente la secuencia del amiRNA maduro era la misma.

Generación de plantas transgénicas.

Las tres construcciones fueron introducidas nuevamente en *A. tumefaciens* con el fin de establecer una transformación estable en plantas de Arabidopsis. Todas las colonias transformantes fueron sometidas al análisis por PCR confirmando la inserción del vector como se realizó con anterioridad, y, de la misma manera, los vectores fueron verificados mediante secuenciación (no mostrado). Las colonias se crecieron después en medio líquido conteniendo los dos antibióticos (espectinomicina y rifampicina para las 3 construcciones) durante 2 días hasta obtener una densidad óptica suficiente como lo indica el protocolo para transformación de Arabidopsis (Zhang et al., 2006) (ver Materiales y métodos). Se introdujeron un par de modificaciones al protocolo debido a que en una transformación previa no se obtuvieron transformantes ya que las plantas murieron al tratamiento de infección, por lo que se variaron los parámetros para una transformación más exitosa (ver Materiales y métodos).

Después del proceso de infección, las plantas fueron sometidas a un día en oscuridad para su recuperación, y al siguiente día fueron descubiertas y regadas normalmente (ver Materiales y métodos). Tres semanas después se recolectó la primer cosecha. Con el fin de seleccionar las semillas transformantes se utilizaron 15000 semillas pertenecientes a las plantas transformadas con la construcción pBAa.miRLEA18 α ¹⁵⁹, 8000 semillas correspondientes a la transformación con pBA.amiRLEA18 β ¹⁵⁹ y 6000 semillas correspondientes a pK2.amiRLEA18 β ¹⁵⁹. Se plaquearon alrededor de 2000 semillas por placa de cada construcción en cajas Petri con medio MS conteniendo los antibióticos para evitar el crecimiento de la cepa de *A. tumefaciens*, y el herbicida de selección: BASTA / MSO para las dos primeras construcciones y el antibiótico kanamicina para la tercera.

Cabe mencionar que el herbicida “BASTA” (glufosinato) tiene alta toxicidad tanto en plantas como en los seres humanos, debido a que inhibe la actividad de la glutamina sintetasa por competencia por el sustrato y por ende produce la acumulación de amonio en las células, por lo que, en presencia de este, las plantas mueren durante la germinación. Debido a la toxicidad antes mencionada, se decidió utilizar MSO (Metil-sulfoximidina) en lugar de “BASTA” debido a que tiene pequeños cambios en la estructura del elemento activo, y a que su uso es más manejable en pequeñas cantidades (www.ine.gob.mx. Maughan y Cobbett, 2003).

De esta selección se obtuvieron 5 plántulas transformantes con la construcción pBA.amirLEA18_α¹⁵⁹, 36 transformantes con pBA.amirLEA18_β¹⁵⁹, y 6 plántulas que resistieron a kanamicina, lo que indicaba que éstas últimas contenían la construcción pK2.amirLEA18_β¹⁵⁹. Las plántulas seleccionadas para las tres construcciones fueron resemebradas en medio con una cantidad mayor de antibiótico o herbicida para confirmar si eran transformantes reales.

Objetivo III

Caracterización de las líneas transgénicas

Las plantas que germinaron y crecieron normalmente en presencia del herbicida o antibiótico a una concentración inicial y al doble de concentración después del resemebrado, se consideraron como transformantes, por lo que se les asignó un nombre y se establecieron como líneas independientes. Los nombres asignados corresponden a tres parámetros: I) La primera letra o dígito designa la construcción que contiene cada línea (a, b ó 3); II) la segunda se refiere a la fecha de obtención de las transformantes originales (dividido en dos rondas: una letra A, B ... E, para la primera ronda de transformación, y las líneas producto de la segunda ronda, carecen de este dígito); y III) para algunos casos, la tercera se refiere a su ubicación durante el trasplante para semillar (números del 1 al 6 dependiendo de su ubicación en una charola, y letras de “a” hasta “e” para el caso de la línea 3). Con estos parámetros se definieron líneas que van desde “aA1” hasta “bC3”, para la primera ronda de transformación, y de “a1” hasta “3f” para la segunda pasando por “b1”, “b2” etc.

Las líneas independientes se trasplantaron en sustrato “Metromix” con el fin de obtener semillas, y después de 4 semanas en condiciones de cuarto de crecimiento, se obtuvieron las semillas independientes para cada línea; estas semillas se dejaron secar y posteriormente se analizó su viabilidad en medio MS sin antibiótico y su respuesta a concentraciones estándares de MSO y kanamicina. De las 36 líneas transformantes para la construcción pBA.amirLEA18_β¹⁵⁹, 31 semillas

respondieron eficientemente a la selección en placa (germinación y crecimiento de la plántula), 3 de las 5 líneas que no germinaron en el medio MS con el químico de selección, tampoco germinaron en el medio MS sin antibiótico, por lo que no se pudo establecer la línea, probablemente debido a que el T-DNA se insertó en alguna región correspondiente a un gen de expresión constitutiva (housekeeping). Un caso similar podría estar ocurriendo con las transformantes que no respondieron a la selección, posiblemente T-DNA pudo haberse insertado en regiones cercanas a centrómero o secuencias repetidas por lo que la expresión tanto del precursor del microRNA artificial, así como el marcador de selección no pudieron expresarse de forma adecuada (debido a posibles arreglos de cromatina); sin embargo no se descarta algún otro tipo de alteración debido a la inserción azarosa de este DNA transferido (ver Discusión) o a que no eran transformantes. De acuerdo a los criterios de selección, se obtuvieron 5 y 6 líneas transgénicas con las construcciones pBA.miRLEA18 α ¹⁵⁹ y pK2.miRLEA18 β ¹⁵⁹, respectivamente. Estos resultados se presentan en síntesis en la Tabla 2.

Construcción	Plantas transformantes	Semillas analizadas	Eficiencia de transformación	Líneas obtenidas
α	5	15000	0.03%	5
β	36	8000	0.43%	31
3	6	6000	0.10%	5

Tabla 2. Eficiencias de transformación con las diferentes construcciones introducidas en Arabidopsis, y el número de líneas establecidas por construcción.

Se procedió a analizar la segregación de todas las líneas en medio de selección con el fin de comprobar indirectamente el número de inserciones de T-DNA por línea (ver Discusión). Se plaquearon aproximadamente 200 semillas por línea en cajas de Petri de manera que cada placa tuviese 100 semillas de 4 líneas independientes (25 semillas de cada línea por placa) con el fin de que los resultados no fueran dependientes de las características intrínsecas cada placa, y pudiesen añadir resultados falsos-positivos. En el caso de las líneas correspondientes a las construcciones que poseen el microRNA artificial amiRLEA18 β ¹⁵⁹, se obtuvieron proporciones cercanas al 75% de semillas positivas, cabe señalar que ninguna línea obtuvo una proporción mayor al 75%, lo que sería esperado en el caso de que existiese más de una inserción de T-DNA por línea; sin embargo, por otro lado, para el caso de las líneas que poseen las construcciones acarreadoras de amiRLEA18 α ¹⁵⁹ y amiRLEA18 β ¹⁵⁹ no se obtuvieron proporciones mayores a 60% en semillas positivas y, al contrario, la mayoría de las líneas de ambos amiRNAs obtuvieron proporciones menores a 40%, por lo que, posiblemente la concentración del herbicida de selección MSO, no fue la adecuada para el sometimiento de las líneas transgénicas a selección, sin que esta pudiese afectar su crecimiento y desarrollo como se había propuesto en la literatura (Maughan y Cobbett, 2003), además, se decidió

no utilizar una concentración menor de MSO, debido a que se comprobó que utilizando el 50% de la concentración propuesta en la literatura, permitía el desarrollo de plántulas silvestres, por lo que, se podrían arrojar resultados falsos positivos a la segregación (no mostrado). Por ello se decidió analizar directamente la presencia de los amiRNAs maduros de cada línea transgénica. Para este fin se obtuvo RNA total de planta completa en la generación T1 (las plantas progenitoras de las semillas donde se analizó la segregación que son descendientes de las plantas sometidas al proceso de transformación), y se llevó a cabo un experimento tipo Northern para microRNAs. El RNA de las distintas líneas fue transferido en diferentes membranas y fueron sometidos a distintas reacciones de hibridación contra sondas específicas para amiRLEA18 α ¹⁵⁹, amiRLEA18 β ¹⁵⁹, y amiRLEA18 γ ¹⁵⁹, con el fin de detectar el amiRNA maduro después de su procesamiento. En este resultado se obtuvieron los siguientes resultados, algunos de los cuales pueden ser analizados en la figura 29

- Se encontraron 5 líneas correspondientes a amiRLEA18 β ¹⁵⁹ que carecían de amiRNA maduro; como era de esperarse, estas 5 líneas fueron las que no germinaron en el medio de selección, consistente con los resultados de ambos experimentos.
- En todas las líneas analizadas para la presencia del amiRLEA18 β ¹⁵⁹ maduro resultaron ser positivas; en tanto que en el caso de las líneas correspondientes al amiRLEA18 γ ¹⁵⁹, solamente una de las 6 líneas analizadas no mostró la producción del microRNA maduro (Figura 29), por lo que posiblemente haya sido un resultado de escape o producto de una mala selección, resultados que se observan con frecuencia en los experimentos de caracterización de plantas transgénicas (Yadira Olvera, comunicación personal).
- Todas las las líneas que contienen amiRLEA18 α ¹⁵⁹ procesan el amiRNA eficiente y específicamente

amiRNAs maduros en *Arabidopsis thaliana*

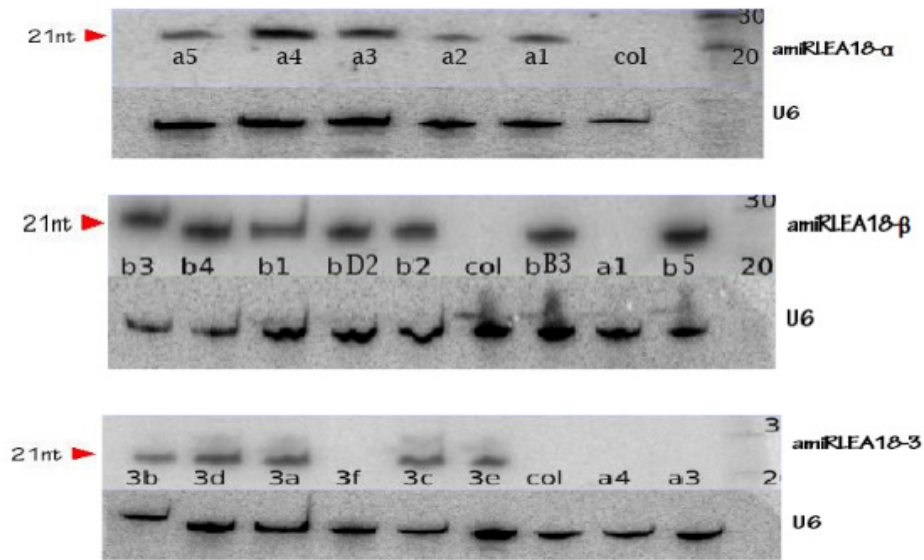


Figura 29. Experimento tipo Northern para detectar acumulación de los amiRNAs diseñados en las diferentes líneas transgénicas. Nótese que se muestran solamente algunos resultados, debido a que el número de líneas analizadas asciende a 40. Se observan hibridaciones contra sondas: de arriba hacia abajo $\text{amiRLEA18}_\alpha^{159}$, $\text{amiRLEA18}_\beta^{159}$ y amiRLEA18_3^{159} . Los diferentes dígitos dentro de los geles corresponden a la línea que posteriormente fue analizada para el silenciamiento de los transcritos de interés; las puntas de flecha indican el tamaño esperado. Se añade abajo de cada hibridación con amiRNAs el control de carga usando el RNA pequeño U6. De igual manera en cada membrana se observa el control de planta silvestre (col).

Comprobación del silenciamiento de los RNAs mensajeros “blanco”

Procediendo a la comprobación de la maduración de los amiRNAs, se analizó el silenciamiento de las líneas transgénicas tanto para $\text{amiRLEA18}_\alpha^{159}$ como para $\text{amiRLEA18}_\beta^{159}$. El silenciamiento provocado por amiRLEA18_3^{159} no se analizó debido a que la acumulación de su transcrito blanco (AtLEA18-3) es pobre y restringida a una estructura reproductiva, por lo que es complicado observar un silenciamiento cuantitativamente relevante para los objetivos de este trabajo (Ver Discusión).

Los ensayos de silenciamiento se analizaron en dos generaciones de plantas transgénicas (T2 y T3, en la última se tienen sólo plantas homocigotas) debido a que en experiencias previas en el laboratorio, se observó que la intensidad de silenciamiento cambia de una generación a otra. Para estos experimentos se tomó RNA total mediante extracción con Trizol (ver Materiales y métodos) de hojas de la roseta sometidas a condiciones de sequía mediante cámara húmeda (ver Materiales y métodos), y se realizaron análisis de comparación entre niveles de acumulación de AtLEA18-1 y AtLEA18-2 (ambos blanco de $\text{amiRLEA18}_\alpha^{159}$ y $\text{amiRLEA18}_\beta^{159}$) entre plantas silvestres y las transgénicas generadas.

Mediante experimentos de RT-PCR semi-cuantitativo se observó que en la generación T2, las 5 líneas que contienen a *amiRLEA18 α ¹⁵⁹* y lo procesan correctamente (ver sección anterior), tienen la capacidad de silenciar el transcrito de *AtLEA18-2* a diferentes niveles (Figura 30b); sin embargo, estas mismas líneas en las que se esperaba que también se silenciara el transcrito de *AtLEA18-1*, esto no sucedió con la misma intensidad con la que disminuyó la acumulación de transcrito de *AtLEA18-2* (comparar líneas α 4 y α 5 en ambas gráficas.(a y b Figura 30; ver Discusión)

Por otro lado, el análisis de silenciamiento mediado por *amiRLEA18 β ¹⁵⁹* fue realizado solamente para algunas líneas debido a lo propuesto en su diseño (ver discusión), y a que el número de las líneas era grande, por lo que el análisis de cada una de estas líneas no es esencial ya que se podrían obtener resultados redundantes. De la misma manera que los resultados con las líneas *amiRLEA18 α ¹⁵⁹*, se encontraron algunas líneas *amiRLEA18 β ¹⁵⁹* con la capacidad de silenciar el transcrito de *AtLEA18-2* de manera más eficiente que otras (Figura 30d). Sin embargo, de acuerdo al diseño de *amiRLEA18 β ¹⁵⁹* se esperaba que el silenciamiento mediado fuera deficiente (ver Discusión). *amiRLEA18 β ¹⁵⁹* tiene un efecto de silenciamiento sobre *AtLEA18-1* similar al obtenido con las líneas *amiRLEA18 α ¹⁵⁹* (Figura 30c).

Cabe señalar que al analizar el silenciamiento de los transcritos en la siguiente generación (T3, plantas homocigotas dominantes) se observó que el decremento del transcrito *AtLEA18-2* mediado por *amiRLEA18 β ¹⁵⁹* se abatió (Figura 31d). Resultados similares ocurren en las mismas líneas en el caso del silenciamiento para *AtLEA18-1* (Figura 31c). Esto ya se había observado con anterioridad en el laboratorio (Yadira Olvera, tesis de doctorado); sin embargo, en los casos anteriores no se observó su ocurrencia al paso de pocas generaciones (2), por lo que es posible que el efecto observado sea producto del diseño del *amiRNA* (ver Discusión). Por otro lado, el silenciamiento mediado por *amiRLEA18 α ¹⁵⁹* sobre *AtLEA18-2* es más estable durante el cambio de generación (Figura 31b) a pesar de que no se detectó silenciamiento al mismo nivel en todas las líneas analizadas en las generaciones T2 y T3 (comparar línea α 1 de Figura 30b con Figura 31b). En el caso del silenciamiento de *AtLEA18-1* mediado por *amiRLEA18 α ¹⁵⁹* se observaron datos similares a los que se muestran anteriormente, con un ligero incremento en la acumulación de este transcrito en todas las líneas (ver Discusión).

Análisis del silenciamiento en las líneas transgénicas en generación T2

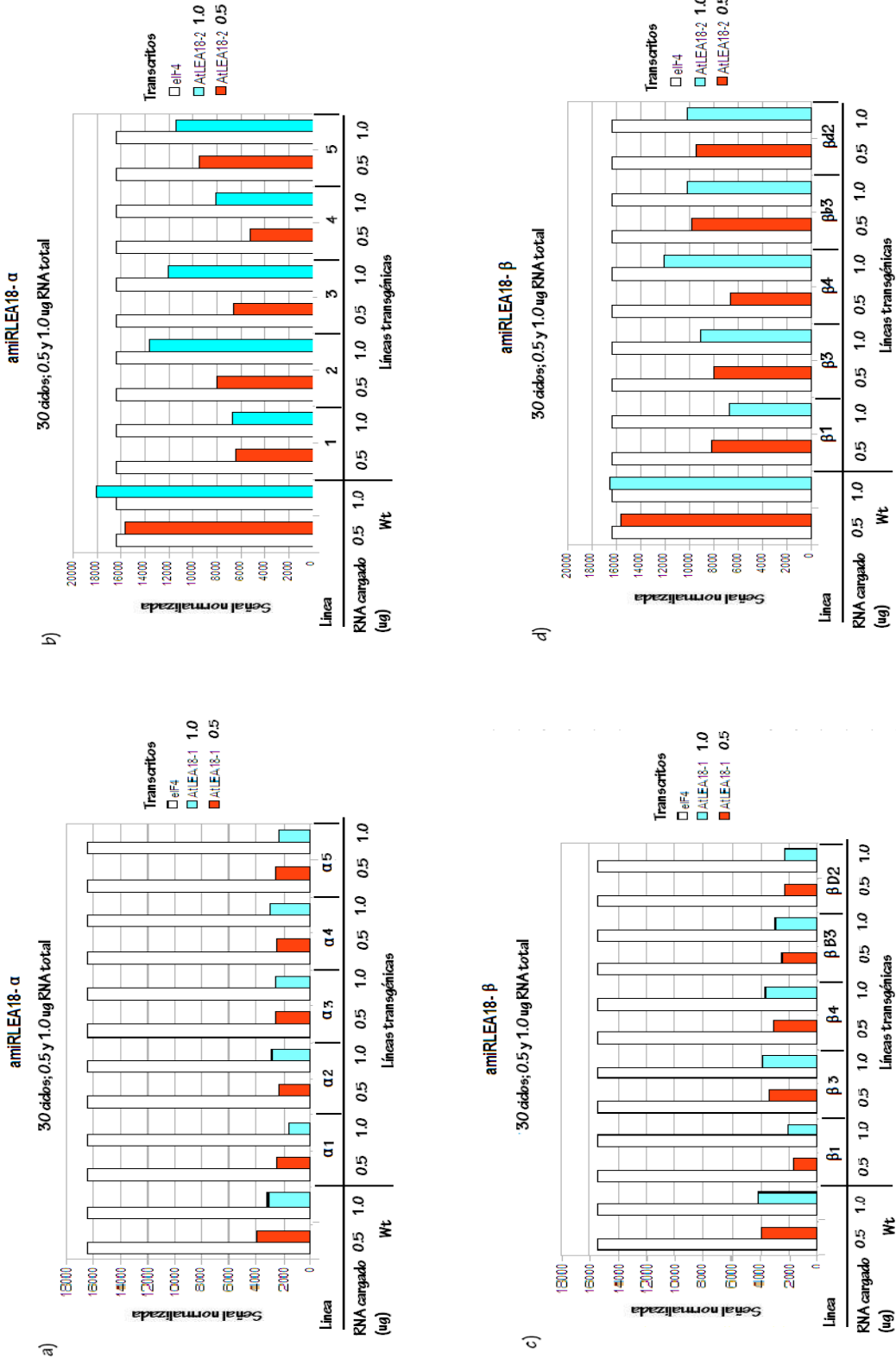


Figura 30. Análisis del silenciamiento en las líneas transgénicas generación T2. Se observa la cuantificación mediante el programa GE ImageQuant® de la intensidad de las bandas normalizadas con el control de carga (eIF4, barras blancas) en un experimento de RT-PCR semi-cuantitativo a dos concentraciones iniciales de RNA total para la retro-transcripción (0.5 μ g, barras rojas, y 1.0 μ g, barras turquesa). a) Silenciamiento de AtLEA18-1 mediado por amiRLEA18- α , b) silenciamiento de AtLEA18-2 mediado por el mismo amiRNA. c) y d) Silenciamiento mediado por amiRLEA18- β de AtLEA18-1 y AtLEA18-2, respectivamente. No se muestran los controles de No RT-PCR debido a que el programa es incapaz de detectar una banda en esos carriles.

Análisis del silenciamiento en las líneas transgénicas T3 (homócligas)

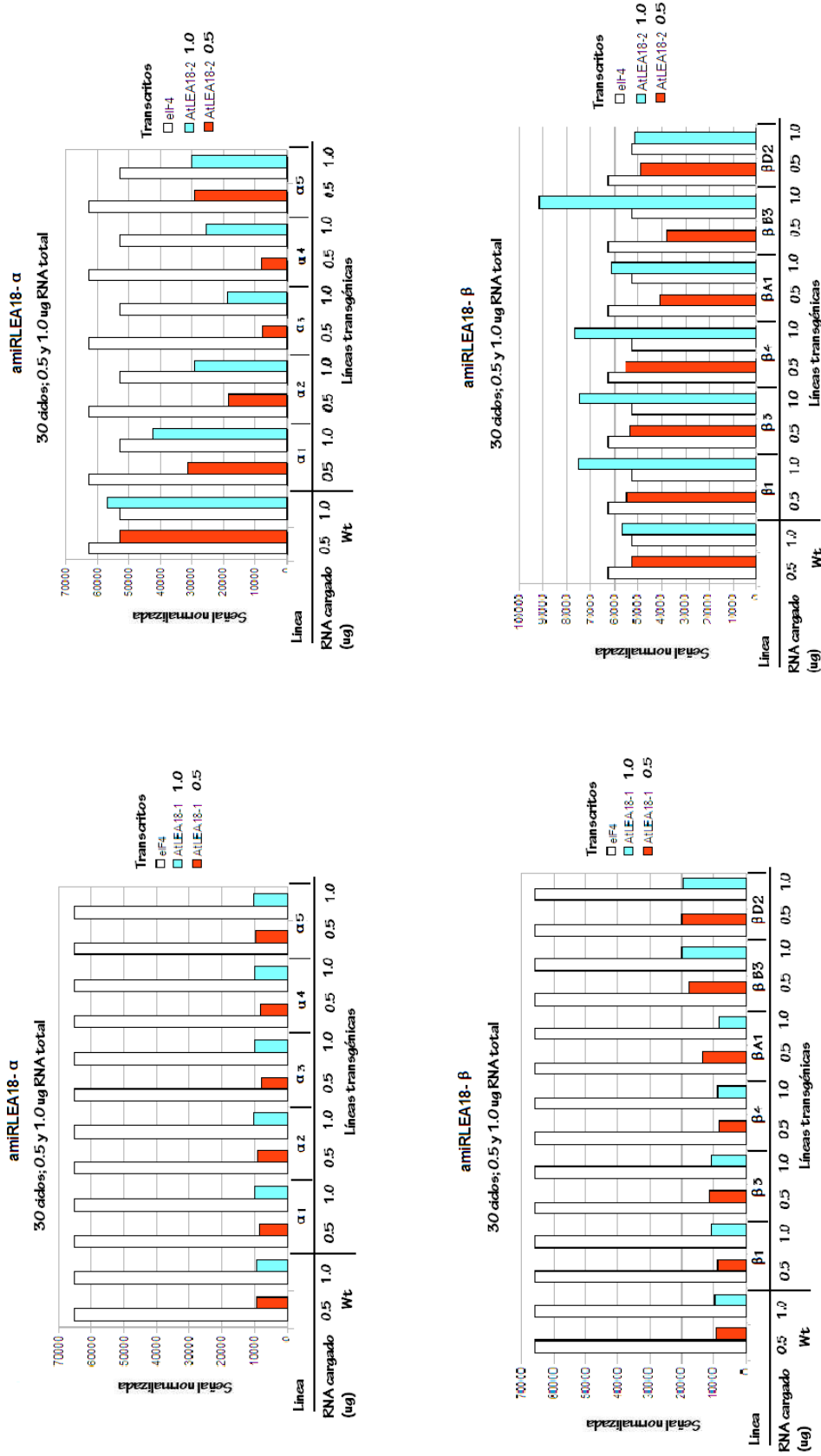


Figura 31. Análisis del silenciamiento en las líneas transgénicas generación T3, generación homócliga dominante. Se observa la cuantificación mediante el programa GE ImageQuant @ de la intensidad de las bandas normalizadas con el control de carga (eIF4, barras blancas) en un experimento de RT-PCR semicuantitativo a 2 concentraciones iniciales de RNA total para la retrotranscripción (0.5 ug, barras rojas, y 1.0 ug, barras turquesa). a) silenciamiento de AtLEA18-1 mediado por amiRLEA18_α¹⁵⁹, b) silenciamiento de AtLEA18-2 mediado por el mismo amiRNA. c) y d) Silenciamiento mediado por amiRLEA18_β¹⁵⁹ de AtLEA18-1 y AtLEA18-2, respectivamente. No se muestran los controles de No RT-PCR debido a que el programa es incapaz de detectar una banda en esos carriles.

DISCUSIÓN

Ortólogos del gen *Pvlea-18* en *A. thaliana*.

Como se mostró en los antecedentes, con el fin de hallar los genes que en *Arabidopsis* codifican para el o los ortólogos de la proteína LEA18, se decidió comparar bioinformáticamente la secuencia encontrada en la base de datos de NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) correspondiente a LEA18 de *Phaseolus vulgaris* (U72764) utilizando el programa de comparación de secuencias TAIR TBLASTX, el cual utiliza el mismo algoritmo de comparación que el encontrado en NCBI (Altschul, 1990). De los tres genes ortólogos que se encontraron, *AtLEA18-1* es el más similar a *PvLEA-18* debido a que su valor E es más cercano a cero que el que muestran los otros dos genes (*AtLEA18-2* y *AtLEA18-3*). En el genoma de *Arabidopsis*, *AtLEA18-1* está en tándem con *AtLEA18-2* y esta característica podría implicar que su origen fue producto de una duplicación de esa región); por tanto, se podría especular que *AtLEA18-2* era más parecido a *PvLEA-18* que *AtLEA18-3*; sin embargo, este último era más parecido a *PvLEA-18* (Figura 32). Por otra parte, el hecho de que obtengamos genes que sean muy similares al gen *PvLEA-18*, predice que sus proteínas, podrían tener la misma función que *PvLEA-18* independientemente del lugar donde se estén acumulando, una explicación que no necesariamente implica que tengan la misma funcionalidad durante una condición de estrés o bajo condiciones óptimas. Conjuntando las dos ideas anteriores y sumado el hecho de que los tres genes estén presentes dentro del mismo cromosoma, podría deberse a que un solo gen pudo dar origen a los 3 existentes para LEA18; este gen ancestral pudo (de acuerdo a las evidencias de secuencia y generación de un árbol (Figura 32)) haber sido sometido a dos rondas de duplicación, una que dio lugar a *AtLEA18-3* y, una más reciente, que pudo dar lugar a *AtLEA18-1* y *AtLEA18-2*. Posteriormente estos genes duplicados fueron sometidos a una presión selectiva que como consecuencia, pudo haber modificado sus patrones de acumulación, aunque, debido a su secuencia, se puede especular que tienen la misma función en diferentes compartimentos (Chen et al., 2004). Esta hipótesis de temporalidad las duplicaciones que dieron origen a *AtLEA18* es soportada, también, por el hecho de que *AtLEA18-3* tiene una expresión restringida, que implica quizás una función más especializada dentro de ese tejido; esta expresión permite especular que los genes expresados en polen y otras estructuras de resistencia son más ancestrales si se toma en cuenta su participación en el déficit hídrico, ya que son estructuras que desde su aparición están sometidas a condiciones de deshidratación. Sin embargo, por otra parte, no puede ser completamente sustentada debido a que el genoma de frijol no está completamente secuenciado y a la fecha no existe información suficiente que permita asignar la expresión por órganos de los diferentes transcritos producidos.

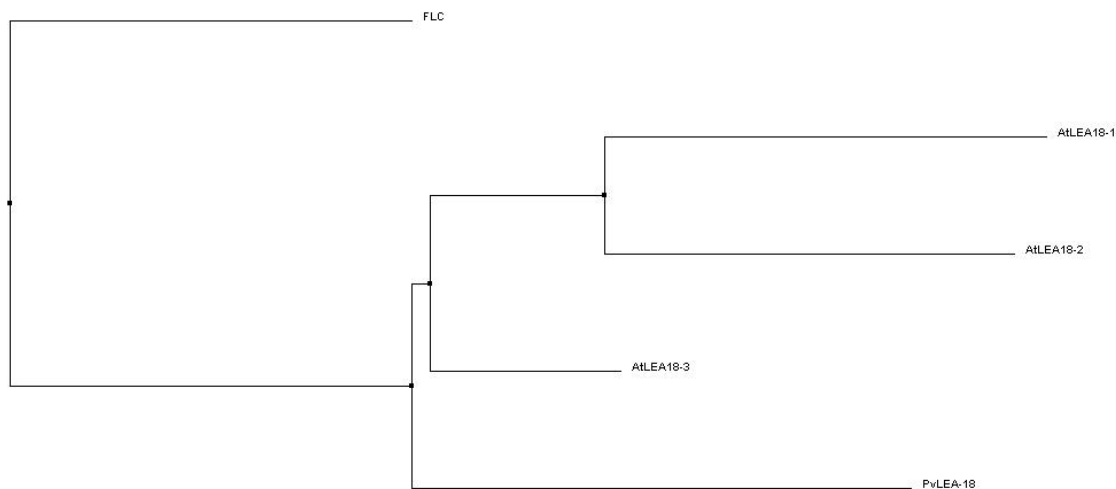


Figura 32. Distribución por homología de los tres miembros del grupo 6 de las proteínas LEA de Arabidopsis realizado mediante el programa ClustalW2 (www.ebi.ac.uk/) por el método de adición del vecino (Neighbour joining) utilizando el porcentaje de identidad de las secuencias de los genes *AtLEA18-1*, *AtLEA18-2* y *AtLEA18-3*, incluyendo regiones codificantes, y las no codificantes en las regiones 5' y 3'. Como grupo externo se utilizaron las mismas regiones en el gen FLC (Flowering locus C) cuya función es externa a los genes de interés

Selección y caracterización de líneas mutantes para los genes de LEA18.

Dado que Arabidopsis tiene la ventaja de poseer un banco de mutantes por inserción, se eligió tomar esta primera opción para conseguir las mutantes sencillas y con ellas generar tanto una doble como una triple mutante en los genes *LEA* del grupo 6, y así analizar su papel en condiciones de estrés. Generalmente, para cada gen predicho en el genoma de Arabidopsis existen de 2 a 3 líneas de inserción de T-DNA (considerando que en promedio un gen es de un tamaño mayor a 1kb), sin embargo, para el caso de los genes *LEA* del grupo 6 sólo existe una inserción disponible para cada uno de los genes. Esto es posiblemente debido a que la región codificante de los 3 genes corresponde a tamaños pequeños que van desde ~260 hasta ~400 nucleótidos, por lo que la probabilidad de una inserción en esta región es muy baja; incluso, las inserciones reportadas para los genes *AtLEA18-1* y *AtLEA18-2* no se encuentran dentro del exón; y para el caso del gen *AtLEA18-3*, para el cual la base de datos indica que se encuentra en el ORF, la amplificación por PCR de la región comprendida entre el gen y la inserción no corresponde al tamaño esperado, por lo que muy posiblemente la inserción se encuentre en un sitio cercano y no en la región codificante (ver Resultados y más abajo).

Del análisis 2 realizado en este trabajo de la región genómica que contiene al gen *AtLEA18-* se predice un gen que se localizaría en el promotor del gen *AtLEA18-2* (cuya ubicación corresponde al locus At2g23118; aunque no es posible descartar su existencia, su existencia se ha puesto en

duda debido a que la región codificante detectada es menor a 200 nucleótidos (aprox. 66 aminoácidos), a que es rica en A y T (característicamente abundantes en regiones no codificantes, Revisado en Yamamoto et al., 2006), a que no existe ningún reporte en la literatura de algún transcrito correspondiente a esta región, y a que está sobrepuesto casi completamente con la región que correspondería al promotor central del gen *AtLEA18-2*, sin embargo, la existencia de un transcrito proveniente de esta región no puede ser descartada sin una validación experimental..

Verificando las inserciones

Indirectamente una inserción puede ser identificada por conferir una resistencia a un químico de selección; sin embargo, algunas líneas pueden silenciar o perder de alguna manera el gen de resistencia y seguir presentando la inserción (Inoue, 1997, Olvera-Carrillo, comunicación personal). Este fue el caso de la línea SALK_018685C, la cual no presentó resistencia al antibiótico de selección (kanamicina) aunque la presencia de la inserción se confirmó mediante PCR. Este tipo de resultados lleva a la recomendación de realizar un análisis meticuloso de caracterización de las mutantes adquiridas de los bancos públicos de mutantes para evitar llegar a conclusiones erróneas. Como se muestra en esta tesis, la caracterización de las mutantes disponibles llevaron a descartar algunas de ellas por errores en la base de datos de los bancos que las albergan, por lo que se considera que es apropiado considerar la obtención de mutantes en los genes de interés mediante estrategias alternativas confiables.

Debido a que se obtuvo un resultado positivo de la amplificación de la inserción en el gen *AtLEA18-3*, pero que el tamaño esperado no correspondía al obtenido experimentalmente, se concluyó muy posiblemente exista un error de mapeo de la inserción en las bases de datos, sin embargo, esta aproximación no puede ser usada para observar la presencia de las inserciones en *AtLEA18-1* y *AtLEA18-2* ya que no se conservan las secuencias para identificarlas ya que los T-DNAs están clonados en vectores distintos. por lo anterior, se decidió diseñar oligonucleótidos que aparearan en regiones del gen de interés adyacentes a el sitio predicho de la inserción, por lo que, si esta existiese en ese lugar, la amplificación sería negativa, pero si no hay inserción, se amplificaría el tamaño esperado del gen comprendido entre ambas zonas de apareamiento de los oligonucleótidos.. Sin embargo, a pesar de ser una estrategia viable de observar la inserción de T-DNA en el sitio esperado, a posibilidad de observar resultados falso-positivos en este experimento es muy alta si no se parte de una genotipia adecuada. Es decir, si las líneas supuestamente mutantes se encuentran en un estado heterocigoto, la amplificación de la región del gen va a ser positiva debido a que la zona tiene un alelo con inserción y un alelo silvestre sobre el cual es posible amplificar la región silvestre,

confundiéndose así con la ausencia de la inserción. Para evitar esta confusión es importante partir para este análisis de líneas homocigotas – como se realizó en este trabajo para la línea mutante en el gen *AtEA18-2*. En el caso del gen *AtLEA18-3*, donde no existió selección por antibiótico (Ver resultados), la inserción se confirmó con la amplificación de la zona comprendida entre una secuencia del gen y otra de la inserción. Como sería de esperarse, al utilizar oligonucleótidos que hibridan con las regiones al extremo de la región a insertarse la amplificación es positiva estando o no en el gen de interés (ver figura 17).

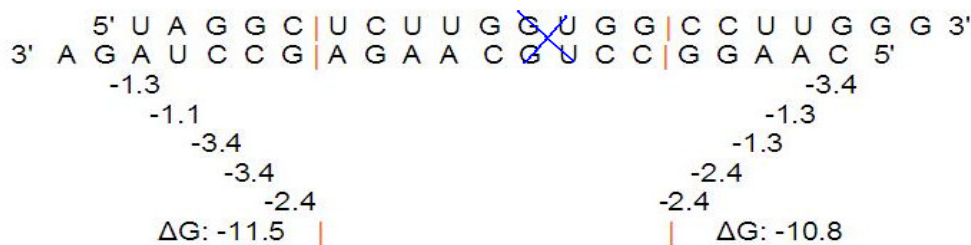
Confirmación de la ausencia de transcritos.

Como se mencionó en la sección de resultados, los transcritos codificados por los genes *AtLEA18-2* y *AtLEA18-3* se detectaron en las líneas supuestamente mutadas en estos genes, contrariamente a lo ocurrido con el gen *AtLEA18-1* para el cual se detectó la inserción en la región 5' no traducida (ver Resultados). Consistente con la literatura, las regiones que flanquean el marco abierto de lectura de genes que tienen la capacidad de producir una proteína son importantes para darle una estabilidad durante procesos como el transporte a citoplasma y la posterior traducción del mRNA. Existen muchos reportes de que la región 5' UTR es indispensable para su traducción, como la señalización a CAP (Alberts et al., 2007). Recientemente se ha demostrado que en plantas la región 3' UTR también es importante para la traducción eficiente de un mensajero, pero es medianamente dispensable (Moreno-Fonseca, 2004; Battaglia et al., en revisión). Dado estos antecedentes, suponemos que las inserciones que se ubiquen dentro del marco abierto de lectura (ORF), así como dentro de la región 5' UTR, podrían derivar en una disminución en los niveles de su transcrito y/o proteína. En el caso de la línea mutante por inserción en el gen *AtLEA18-2*, para el cual la inserción se localizó en la región 3' UTR, los resultados obtenidos muestran que esta interrupción no da lugar a una disminución en la producción del RNA mensajero correspondiente. Por lo que se refiere a la supuesta inserción en el ORF del gen *AtLEA18-3* (www.arabidopsis.org), los resultados de este trabajo demuestran que la inserción en realidad no se encuentra en el ORF de este gen sino en otro sitio cercano, razón por la cual se detecta la acumulación de su transcrito (ver sección anterior).

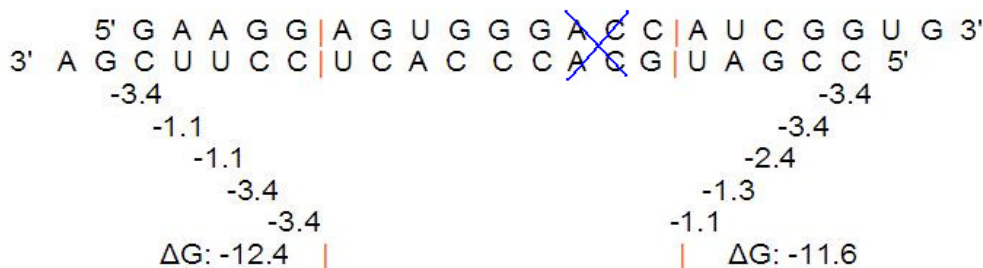
Diseño bioinformático, procesamiento de microRNAs artificiales y silenciamiento de sus blancos.

La eficiencia con la que un microRNA artificial silencia un RNA mensajero de interés, depende directamente de su diseño. En plantas, se ha descrito que la gran mayoría de los microRNAs endógenos poseen una batería reducida de posibles RNAs mensajeros blanco, debido a que su

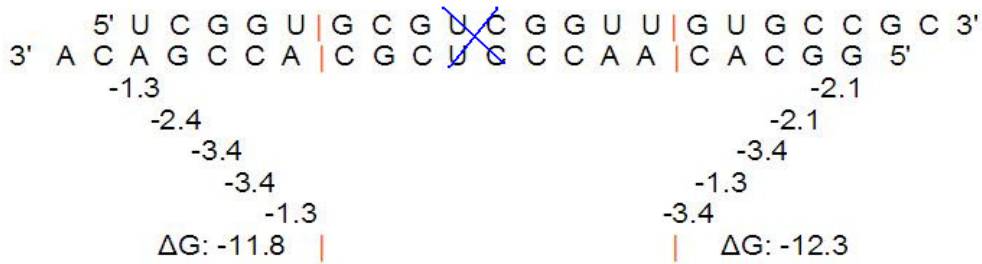
apareamiento por complementariedad de bases es extensivo, característica que permite que el RNA mensajero blanco sea procesado por la proteína Argonauta 1 en las regiones cercanas al centro del apareamiento microRNA – mensajero blanco, promoviendo así su degradación (Bartel, 2004; ver Figura 14 en Introducción Metodológica). Cabe resaltar que en muchos de los casos donde los microRNAs regulan por inhibición traduccional, su apareamiento es en la región final del ORF, o inicio de la región 3' UTR. Aprovechando esta cualidad, se diseñaron los amiRNAs de tal forma que el apareamiento con sus RNAs mensajeros blanco fuese extensivo y estuviese dentro del ORF, propiciando de esta manera la degradación del mensajero blanco. Es importante señalar que está determinado que para los microRNAs endógenos, la asimetría termodinámica de los extremos de la doble cadena – producto del apareamiento del microRNA y el microRNA* no olvidando que tienen 2 nucleótidos colgantes en el extremo 3' de cada cadena – determina la hebra que se carga en el complejo RISC-Argonauta 1 (determinado por el extremo que sea más fácil de abrir (ΔG más cercano a 0)), y consecuentemente la hebra que se degradará (Schwarz et al., 2003). Tomando este parámetro en cuenta, después de observar los niveles de silenciamiento de los transcritos blanco para nuestros amiRNAs (ver figura 30 y 31) se midió deetrmínó la asimetría termodinámica del apareamiento entre los amiRNA y amiRNA* para predecir cuál de las cadenas estaría cargándose preferentemente en RISC (Figura 33).



Asimetría del apareamiento amiRLEA18_α¹⁵⁹ - amiRLEA18_α¹⁵⁹* (estrella)



Asimetría del apareamiento amiRLEA18_β¹⁵⁹ - amiRLEA18_β¹⁵⁹* (estrella)



Asimetría del apareamiento amiRLEA18₃¹⁵⁹ - amiRLEA18₃¹⁵⁹* (estrella)

Figura 33. Cálculos y esquemas sobre la termodinámica de los extremos del dúplex (dsRNA) entre los diferentes miRNA con sus miRNA*. Las líneas en rojo delimitan las zonas analizadas (números debajo del apareamiento analizado) mientras que las líneas cruzadas azules señalan los desapareamientos entre ambas cadenas que no afectan los valores termodinámicos de los extremos. (<http://www.bioinfo.rpi.edu/zukerm/cgi-bin/efiles-3.0.cgi#STACK>)

Como puede observarse en la Figura 33, los ΔG de los extremos son muy similares, por lo que no habría preferencia evidente del cargado de una hebra en el complejo RISC como ocurriría con extremos lo suficientemente asimétricos (Figura 36); sin embargo, no se descarta un caso en el que ninguna de las cadenas sea desplazada y el amiRNA no se esté asociando al complejo RISC. La hipótesis de una aparente elección al azar de la cadena correlaciona con los resultados obtenidos del experimento tipo Northern para determinar su procesamiento en *N. benthamiana*, en los cuales cuando se hibrida contra una sonda complementaria al amiRNA* se nota una acumulación similar a la observada en la hibridación con el amiRNA maduro (Figura 34 y 35).

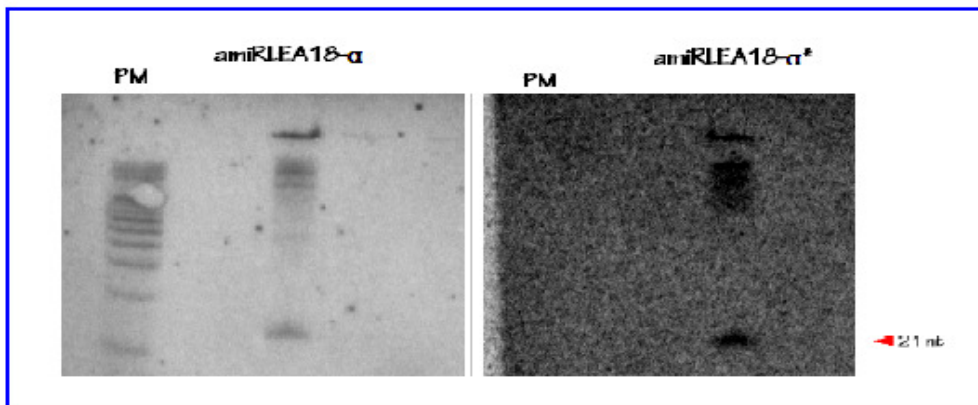


Figura 34. Comparación de la acumulación de amiRLEA18_α¹⁵⁹ (izquierda) y amiRLEA18_α¹⁵⁹* (derecha). Se puede observar que fue posible detectar ambos RNAs pequeños por hibridación para cada uno utilizando la misma membrana. Nótese que una membrana parece carecer de marcador de peso molecular, debido a que por la estabilización del isótopo radioactivo, ya no se detecta.

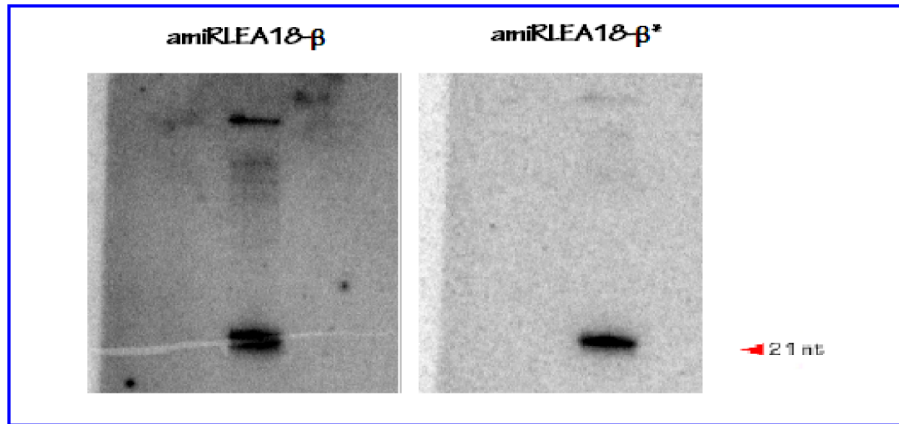


Figura 35. Comparación entre la acumulación de $\text{amiRLEA18}_\beta^{159}$ (izquierda) y $\text{amiRLEA18}_\beta^{159*}$ (derecha). Nótese que el nivel de acumulación entre las diferentes exposiciones es muy similar, posiblemente debido a que los dos RNAs pequeños se mantienen como microRNAs maduros con el fin de cargarse en el complejo RISC

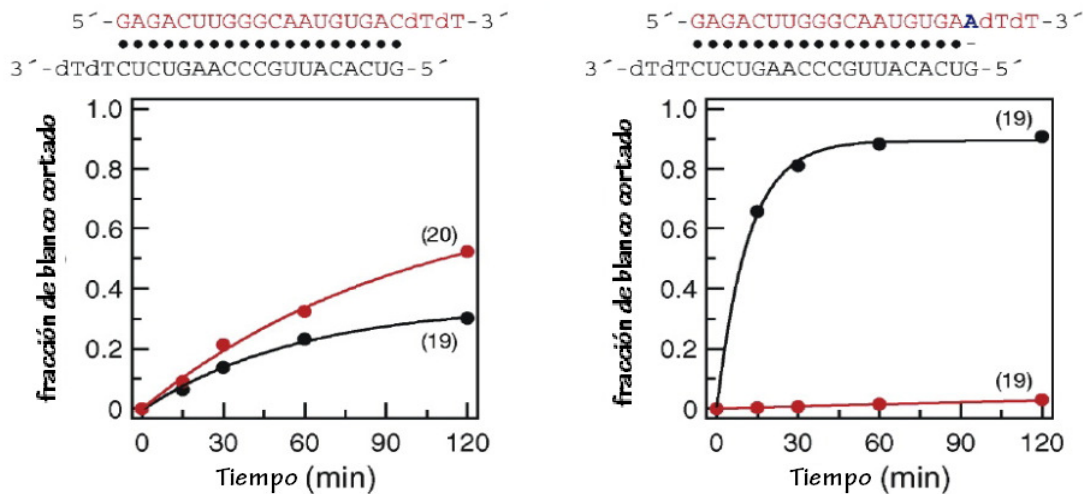


Figura 36. Análisis de silenciamiento utilizando RNAs mensajeros artificiales que son regulados por la cadena sentido (rojo) o la cadena antisentido (negro), en condiciones donde los extremos son termodinámicamente casi simétricos (izquierda) y cuando existe un gap en un extremo (letra azul) que determina una asimetría de los extremos (derecha). Nótese que las graficas de corte del mensajero sintético indican que existe preferencia por el lado menos apareado (líneas rojas y negras. Adaptado de Schwarz et al., 2003)

Otra característica que se puede observar en los amiRNAs diseñados es que tanto $\text{amiRLEA18}_\alpha^{159}$ como $\text{amiRLEA18}_\beta^{159}$ en su extremo 5' poseen una uracilo (U), característica que permite con una alta probabilidad la asociación al complejo RISC-Argonata 1 (RISC-Ago1). En un estudio realizado recientemente se demuestra que Ago1 se asocia preferencialmente a microRNAs que en su extremo 5' poseen U, por otro lado Ago2 y Ago4 se ven asociados mayoritariamente con RNAs pequeños que comienzan con adenina (A), y Ago5 se asocia con RNAs pequeños que comienzan con citosina (C, revisado en Mi et al., 2008), esta característica puede ser aplicable al $\text{amiRLEA18}_\alpha^{159*}$ (estrella) y al $\text{amiRLEA18}_\beta^{159*}$ (estrella) que comienzan con C; por lo que, si se acumulan, se podrían estar asociando con Argonata 5. Ago5 es muy similar a Ago1 – pertenecen al clado 1 entre las proteínas argonata – y se propone que su actividad es la misma – dado que tienen

la misma localización intracelular, incluso se sabe que algunos microRNAs como miR169 comienzan con C, por lo que este microRNA en particular se estaría asociando a RISC-Ago5 para silenciar su mensajero blanco (Vaucheret, 2008). Esta característica podría ser contraproducente en la elección del uso de microRNAs artificiales si fuera posible que los amiRNA* tuviesen un mensajero blanco propio independiente de los amiRNAs maduros; sin embargo, un análisis bioinformático evidenció que el único posible blanco de los amiRNA* es la cadena complementaria de los genes de interés (no mostrado) y, considerando que esta cadena no se estaría transcribiendo (revisado en Alberts et al., 2007), éstos no tendrían un mensajero al cual acoplarse, por tanto, y si la presencia del mensajero blanco es necesaria para un cargado del amiRNA en el complejo RISC, estos amiRNA* no se estarían cargando en el complejo. En el caso de los microRNAs que comienzan con guanina (G, es el caso de amiRLEA18_β¹⁵⁹ y el amiRNA* de amiRLEA18_β¹⁵⁹) se desconoce el complejo RISC-Argonauta con el que se estarían asociando; sin embargo, como la asociación de Ago1 con microRNAs 5' U no es restrictiva, posiblemente debido a su gran acumulación, amiRLEA18_β¹⁵⁹ y el amiRNA* de amiRLEA18_β¹⁵⁹, se podrían asociar a esta proteína y de esta manera silenciar el gen de interés (en el caso de amiRLEA18_β¹⁵⁹).

Debido a que – como se mencionó anteriormente – posiblemente no se estuviese eligiendo preferencialmente el amiRNA sobre el amiRNA* ya que el dsRNA es bastante simétrico, se especula que se obtendría aproximadamente un 50% menos de silenciamiento de los mensajeros de interés del que podría haberse esperado con extremos asimétricos, ya que solamente son blancos de los amiRNA maduros; ésto descartando la controversial idea de que también la presencia del mensajero blanco en el complejo RISC determina la cadena que se carga en el complejo. Esta hipótesis podría explicar por qué el silenciamiento en las distintas líneas transgénicas – por lo menos las analizadas – no es completo. Adicional a esta posible explicación habría que considerar otras variables que podrían influir sobre el nivel de silenciamiento obtenido como el sitio de inserción, la modificación del precursor, la eficiencia de transformación, entre otras, que determinan el nivel de silenciamiento de un microRNA artificial.

Aún cuando los resultados de este trabajo permiten tener una idea de los niveles de silenciamiento inducido por las construcciones descritas, aún no se han determinado, los niveles de acumulación de las proteínas correspondientes; ya que hasta el momento no se cuenta con los anticuerpos específicos para detectarlas. Sin embargo, en un trabajo muy reciente sobre miR159 (el microRNA cuyo precursor se usa para nuestros amiRNAs) se muestra que éste tiene una actividad bifuncional; es decir, de corte y degradación y de inhibición traduccional de sus mensajeros blanco (que codifican los factores transcripcionales MYB33 y MYB120; Li et al., 2010). Esto me lleva a especular que si fuese posible que la secuencia del precursor de miR159 definiera la forma de actuar del complejo RISC-Ago1 (degradación o inhibición) sería probable que nuestros transcritos blanco se

mantuvieran en un estado basal de acumulación, mientras que la acumulación de la proteína podría abatirse completamente.

Inherente al diseño de los amiRNAs, se propone que los cambios que se realicen en la secuencia de un precursor endógeno, sean lo suficientemente no invasivos con el fin de que la maquinaria de RNAi los reconozca como el precursor endógeno, y genere los amiRNAs de interés. Por esta característica, es necesario que se analicen una serie de parámetros que permiten, bioinformáticamente, disminuir el número de variables libres y, por tanto, disminuya la probabilidad de que el precursor introducido no sea reconocido; este es el caso de los análisis de plegamiento. En ellos observamos que, esencialmente, los precursores modificados carecen de cambios estructurales, lo que les permitiría ser reconocidos como el precursor de miR159; sin embargo, derivado de estos análisis, se observó que tanto el precursor de amiRLEA18_α¹⁵⁹ como de amiRLEA18_β¹⁵⁹ poseen una diferencias con el precursor de miR159. Este precursor endógeno posee un desapareamiento entre el miRNA – miRNA* aproximadamente en el nucleótido 9 y 10 a partir del extremo 5' del futuro microRNA maduro y, al tratar de imitar ese *gap* para tener el menor número de divergencias, se introdujo el mismo en otra zona (nucleótidos 12 y 13 a partir de la misma zona, ver resultados). No se puede definir si este error de diseño pudo afectar la estabilidad o reconocimiento de precursor, de tal manera que el amiRNA no pudiera ser procesado por la célula. A pesar de ello, en los resultados obtenidos en la transformación transitoria en hojas de *N. benthamiana*, observamos que el procesamiento no está afectado para estos dos amiRNAs, comparando los resultados con el procesamiento de amiRLEA18_β¹⁵⁹, el cual contiene el desapareamiento en la misma posición que miR159 – miR159*. Por este motivo, no se decidió utilizar posteriormente precursores con el desapareamiento en el lugar correcto, ya que una vez procesados, esta divergencia no afectaría el silenciamiento debido a que la secuencia del amiRNA maduro se mantiene sin cambios (ver Resultados).

Caracterización de las plantas transgénicas.

La genética clásica es de gran ayuda para comprender aspectos genotípicos en la selección y caracterización de mutantes. La inserción de T-DNA posee un cassette de resistencia a algún químico lo que permite su selección por viabilidad (fenotipo), esta resistencia es debida a un solo gen, por lo que su segregación va a ser sometida a las leyes de la genética mendeliana (Alberts et al., 2007). Si la resistencia está dada por un solo gen, se toma en cuenta que la población de plantas transformantes fundamentalmente tendrían una copia (un alelo) de este gen en su genoma y entonces se consideran heterocigotas (pertenecen a la generación T1 ya que derivan de las transformadas (T0)). Cuando las plantas heterocigotas T1 producen descendencia, la heredabilidad

de los genes se dará en proporción fenotípica 3:1, es decir, el 75% de las plantas poseerán una o las 2 copias de la inserción en su genoma, mientras que el 25% de las plantas que no la posean, no serán viables a la selección. En este trabajo se proponía que las líneas que segregaran en la generación T2 una proporción fenotípica aproximada de 75%, poseían una sola inserción; si esta proporción era mayor, seguramente se debía a que existía más de una inserción en la línea transgénica. Sin embargo, las plantas transgénicas que poseían el amiRLEA18₃¹⁵⁹ segregaron en una proporción cercana o menor al 75%, mientras que, las plantas transgénicas que poseían los otros amiRNAs no llegaron a presentar una proporción fenotípica mayor al 60% (ver resultados). Esto implica que el efecto del herbicida utilizado en la selección para las plantas que contenían a amiRLEA18_α¹⁵⁹ o a amiRLEA18_β¹⁵⁹ provocó defectos en la germinación y el desarrollo de las plantas, de tal manera que esto afectó la proporción esperada; no así en el caso de la selección de las plantas conteniendo el amiRLEA18₃¹⁵⁹ la cual se realizó por resistencia a un antibiótico. Derivado de esto, se había propuesto utilizar otra concentración de MS que permitiría seleccionar las plantas sin afectar significativamente su desarrollo; sin embargo, se probó que la mitad de la concentración utilizada y las plantas silvestres fueron capaces de desarrollarse normalmente, por lo que se decidió analizar la acumulación de amiRNAs en todas las líneas transgénicas y, posteriormente, analizar las líneas positivas a este experimento, mediante Southern Blot para identificar el número de inserciones por cada línea. Ese experimento ya no se realizó como parte de la presente tesis pero se llevará a cabo como continuación del proyecto.

De la selección de las plantas transgénicas se encontró que para la construcción pBA/amiRLEA18_α¹⁵⁹ se detectaron 5 falsos positivos, 3 de ellos no respondieron a condiciones normales de germinación, por lo que se propone que la inserción de la construcción ocurrió en la región cercana al un gen que al interrumpirse derivó en un fenotipo letal; sin embargo, no se descarta la idea de que estas líneas no hayan germinado debido a que la viabilidad de las semillas haya sido deficiente producto de las características ambientales que afectaran a las semillas, por ejemplo, si las semillas no presentan una desecación óptima, su posterior germinación se ve inhibida; de la misma forma, si el periodo en que las semillas se someten a dormancia no es adecuado, las semillas no germinarían (Olvera-Carrillo y Marina Battaglia, comunicación personal)

Por otro lado, el hecho de que se decidiera no analizar el nivel de silenciamiento provocado por la introducción de amiRLEA18₃¹⁵⁹, es debido a que la expresión de *AtLEA18-3* (su blanco) está restringida a polen, por lo que, el análisis del efecto provocado por la interrupción de *AtLEA18-3* se llevará a cabo mediante experimentos diseñados a analizar la viabilidad de polen. De igual manera, se decidió no analizar en este momento el nivel de silenciamiento, debido a que, por lo restringido de su acumulación, había sido difícil observar su expresión en experimentos previos, y no fue sino hasta

hace poco tiempo, que se plantearon experimentos para observar su acumulación, en conclusión, la temporalidad de la presente tesis no es suficiente para obtener un acoplamiento con los trabajos a dilucidar la función de AtLEA18-3, sin embargo, el presente trabajo dará cabida a los posteriores análisis de este gen.

En el caso de AtLEA18-1, cabe mencionar que su acumulación en hojas de la roseta fue muy complicada de observar, ya que su acumulación sólo se observa en condiciones de deshidratación (ver Antecedentes y Resultados), En los experimentos de RT-PCR, puede observarse que la acumulación del transcrito de AtLEA18-1 es más baja en las líneas transgénicas, que la observada en las plantas silvestres, sin embargo, no es significativamente menor, este fenómeno se observa ya que, además de estar sometidas a numerosas rondas de amplificación, en experiencias previas en el laboratorio se ha observado que en condiciones de limitación de agua, otros amiRNAs son menos eficaces en el silenciamiento de su RNA mensajero blanco, esto puede explicarse debido a dos fenómenos: I) que la maquinaria de RNAi esté regulando preferencialmente otros RNAs mensajeros blanco cuya represión es necesaria para una tolerancia a la sequía, debido a que, el silenciamiento de mensajeros que no intervienen en sequía, o que son benéficos para una condición de deficiencia de agua, implicaría un gasto de energía cuya síntesis se ve ya empobrecida en la condición de estrés (ver introducción); o II) que la cantidad de transcrito destinado a silenciar, sea tan abundante en sequía que la concentración – ya sesgada por la explicación anterior – sea insuficiente como para silenciarlo. Cabe mencionar que estas dos posibles explicaciones no son mutuamente excluyentes, por lo que no se puede apoyar alguna de ellas y podamos ver un efecto sinérgico (Olvera-Carrillo, comunicación personal).

CONCLUSIONES

- En esta tesis se comprueba el uso de microRNAs artificiales como un alternativa viable para generar mutantes para los genes que no posean inserciones mutagénicas disponibles, así como también, se pueden diseñar amiRNAs que tengan como blanco proteínas pequeñas como proteínas LEA (soportada por trabajos anteriores en el laboratorio), y, además, el diseño de los mismos está intrínsecamente relacionado con la eficiencia de silenciamiento.
- Se observó que la variabilidad en la acumulación de amiRNAs es dependiente de su secuencia, y esta variabilidad en secuencia tiene una repercusión en el silenciamiento de sus transcritos blanco. También se observó que el diseño de los amiRNAs (el inicio de su secuencia y el apareamiento con el microRNA*) influye de manera sustancial en la capacidad de silenciamiento, confirmando lo observado en la literatura.
- De la misma manera, se observó que el silenciamiento mediado por amiRNAs no mantiene niveles estables cuando se hereda a la siguiente generación, y que esta estabilidad podría estar mediada por la secuencia del microRNA o las secuencias que permiten el apareamiento del dúplex, sin embargo, la comprobación de esta hipótesis no estuvo contemplada en este trabajo.
- Se posee un conjunto de mutantes para analizar los fenotipos derivados de la interrupción de la familia LEA 6 en *Arabidopsis thaliana*: una línea mutante para el gen AtLEA18-1, líneas transgénicas que silencian tanto el transcrito producido por AtLEA18-1 (en menor medida) y AtLEA18-2, y líneas transgénicas dirigidas al silenciamiento de AtLEA18-3 (a comprobar).

PERSPECTIVAS

- Generación de una línea transgénica que esté silenciando los tres genes ortólogos a *PvLEA-18* en *A. thaliana*, lo que permitirá estudiar la participación de la familia completa tanto en condiciones normales, como en sequía.
- Llevar a cabo los análisis fenotípicos de las mutantes generadas en este trabajo, con el fin de dilucidar la función de cada uno de los ortólogos a *PvLEA-18* en condiciones óptimas y de limitación de agua.

- Comparar los resultados obtenidos de la mutación de LEA18 en Arabidopsis, con los generados por la sobreexpresión de esta proteína, con el fin de definir su potencial agronómico como marcador molecular o biotecnológico como gen que determine una mayor resistencia a la sequía en cultivos transgénicos.
- Generar anticuerpos contra las posibles proteínas codificadas por *AtLEA18-1*, *AtLEA18-2* y *AtLEA18-3* para observar si existe correlación entre la disminución del transcrito provocada por el silenciamiento por los amiRNAs diseñados en este trabajo, y los niveles de proteína en la planta.
- Para comprobar que los fenotipos que se obtengan son debidos realmente al silenciamiento de los productos deseados, se deberán generar línea transgénicas en Arabidopsis que contenga el gen silvestre correspondiente bajo un fondo mutante, con el fin de verificar la complementación del fenotipo mutante.

REFERENCIAS

- **Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D, Shinozaki K** (1997) Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* 9(10): 1859-1868.
- **Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P** (2007) *Molecular Biology of the Cell*. 5ta edición. Garland Science. USA.
- **Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ** (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410
- **Artus NN, Uemura M, Steponkus PL, Gilmour SJ, Lin C, Thomashow MF** (1996) Constitutive expression of the cold-regulated Arabidopsis thaliana COR15a gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance. *PNAS* 93(23): 13404-9.
- **Bartel DP** (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell* 116(2): 281-297.
- **Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Garcarrubio A, Campos F, Covarrubias AA** (2008) The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol* 178(1): 6-24.
- **Bonhert HJ, Sheveleva E** (1998) Plant stress adaptations – making metabolism move. *Curr Opin Plant Biol* 1(3): 267-274.
- **Boyer JS** (1982) Plant productivity and environment. *Science* 218(4571): 443-448.
- **Bravo JM, Campo S, Murillo I, Coca M, San Segundo B** (2003) Fungus- and wound-induced accumulation of mRNA containing a class II chitinase of the pathogenesis-related protein 4 (PR-4) family in maize *Plant Mol Biol* 52(4): 745-759.
- **Bray E, Weretilnyk E, Bailey-Serres W** (2000) Responses to abiotic stress. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, USA.
- **Bray EA** (1993) Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol* 103(4): 1035-1040
- **Browne JA, Dolan KM, Tyson T, Goyal K, Tunnacliffe A, Burnell AM** (2004) Dehydration-specific induction of hydrophilic protein genes in the anhydrobiotic nematode *Aphelenchus avenae*. *Eukaryot Cell* 3(4): 966-975.
- **Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL** (2005) *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists. Maryland. USA.
- **Busk PK, Pagés M** (1998) Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Mol Biol* 37(3): 425-435.
- **Chen CN, Chiang YC, Ho TH, Schaal BA, Chiang TY** (2004) Coalescent processes and relaxation of selective constraints leading to contrasting genetic diversity at paralogs AtHVA22d and AtHVA22e in Arabidopsis thaliana. *Mol Phylogenet Evol* 32(2): 616-626.
- **Choi H, Hong J, Ha J, Kang J, Kim SY** (2000) ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J Biol Chem* 275(3): 1723-1730.
- **Close TJ, Lammers PJ** (1993) An osmotic stress protein of cyanobacteria is immunologically related to plant dehydrins. *Plant Physiol* 101(3): 773-779.
- **Colmenero-Flores JM, Campos F, Garcarrubio A, Covarrubias AA** (1997) Characterization of Phaseolus vulgaris cDNA clones responsive to water deficit: identification of a novel late embryogenesis abundant-like protein. *Plant Mol Biol* 35(4): 393-405.
- **Colmenero-Flores JM, Moreno LP, Smith CE, Covarrubias AA** (1999) Pvlea-18, a member of a new late-embryogenesis-abundant protein family that accumulates during water stress and in the growing regions of well-irrigated bean seedlings. *Plant Physiol* 120(1): 93-104.
- **Covarrubias AA, Reyes JL** (2009) Post-transcriptional gene regulation of salinity and drought responses by plant microRNAs. *Plant Cell Environ* Sep 23 en prensa.
- **Delseny M, Bies-Etheve N, Carles C, Hull G, Vicient C, Raynal M, Grellet F, Aspart L.** (2001) Late Embryogenesis Abundant (LEA) protein gene regulation during Arabidopsis seed

maturation. *J Plant Physiol* 158: 419-427

- **Ditt RF, Kerr KF, de Figueiredo P, Delrow J, Comai L, Nester EW** (2006) The *Arabidopsis thaliana* transcriptome in response to *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Plant Microbe Interact.* 19(6): 665-681.
- **Dure L 3rd** (1993) A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *Plant J* 3(3): 363-369.
- **Dure L, Chlan C** (1981) Developmental biochemistry of cotton seed embryogenesis and germination: XII, purification and properties of principal storage proteins. *Plant Physiol* 68(1): 180-186.
- **Espelund M, Saebøe-Larssen S, Hughes DW, Galau GA, Larsen F, Jakobsen KS** (1992) Late embryogenesis-abundant genes encoding proteins with different numbers of hydrophilic repeats are regulated differentially by abscisic acid and osmotic stress. *Plant J* 2(2): 241-252.
- **Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC** (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.
- **Fujita M, Fujita Y, Maruyama K, Seki M, Hiratsu K, Ohme-Takagi M, Tran LS, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2004) A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway *Plant J.* 39(6): 963-876.
- **Fujita Y, Fujita M, Satch R, Maruyama K, Parvez M** (2005) AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA-signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17(12): 3470-3488.
- **Galau GA, Bass HW, Hughes DW** (1988) Restriction fragment length polymorphisms in diploid and allotetraploid *Gossypium*: assigning the late embryogenesis-abundant (Lea) alleles in *G. hirsutum*. *Mol Gen Genet* 211(2): 305-314.
- **Galau GA, Wang HY, Hughes DW** (1992) Cotton Lea4 (D19) and LeaA2 (D132) group 1 Lea genes encoding water stress-related proteins containing a 20-amino acid motif. *Plant Physiol* 99(2): 783-788.
- **Garay-Arroyo A, Colmenero-Flores JM, Garcarrubio A, Covarrubias AA** (2000) Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *J Biol Chem* 275(8): 5668-74.
- **Gelvin SB** (2009) *Agrobacterium* in the genomics age. *Plant Physiol* 150(4):1665-76
- **Gilmour SJ, Artus NN, Thomashow MF** (1992) cDNA sequence analysis and expression of two cold-regulated genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 18(1): 13-21.
- **Giraudat J.** (1995) Abscisic acid signaling. *Curr Opin Cell Biol* 7(2): 232-238.
- **Goday A, Jensen AB, Culiñez-Macià FA, Mar Albà M, Figueras M, Serratos J, Torrent M, Pagès M** (1994) The maize abscisic acid-responsive protein Rab17 is located in the nucleus and interacts with nuclear localization signals. *Plant Cell* 6(3): 351-360.
- **Godoy JA, Lunar R, Torres-Schumann S, Moreno J, Rodrigo RM, Pintor-Toro JA** (1994) Expression, tissue distribution and subcellular localization of dehydrin TAS14 in salt-stressed tomato plants. *Plant Mol Biol* 26(6): 1921-1934.
- **Goldur Y, Rom S, Ghirlando R, Shkolnik D, Shadrin N, Konrad Z, Bar-Zvi D** (2007) Desiccation and zinc binding induce transition of tomato abscisic acid stress ripening 1, a water stress- and salt stress- regulated plant-specific protein, from unfolded to folded state, *Plant Physiol* 143(2): 617-628.
- **Guo L, Arteca RN, Phillips AT, Liu Y** (1992) Purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate N- malonyltransferase from etiolated mung bean hypocotyls. *Plant Physiol* 100(4): 2041-2045.
- **Hand SC, Jones D, Menze MA, Witt TL** (2007) Life without water: expression of plant LEA genes by an anhydrobiotic arthropod. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* 307(1): 62-66.
- **Hannon GJ** (2002) RNA interference. *Nature* 418(6894): 244-251.
- **Heidel JD, Hu S, Liu XF, Triche TJ, Davis ME** (2004) Lack of interferon response in animals

to naked siRNAs. *Nat Biotechnol* 12: 1579-1582.

- **Herr AJ, Molnár A, Jones A, Baulcome DC** (2006) Defective RNA processing enhances RNA silencing and influences flowering in *Arabidopsis*. *PNAS* 103(41): 14994-15001.
- **Ingram J, Bartels D** (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 377-403.
- **Inoue Y** (1997) Spontaneous loss of antibiotic-resistant plasmids transferred to *Escherichia coli* in experimental chronic bladder infection. *Int J Urol* 4(3): 285-288.
- **Ismail AM, Hail AE, Close TJ** (1999) Purification and partial characterization of a dehydrin involved in chilling tolerance during seedling emergence of cowpea. *Plant Physiol* 120(1): 237-244.
- **Jaglo-Ottosen KR, Gilmour SJ, Zarka DG, Schabenberger O, Thomashow MF** (1998) *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* 280(5360): 104-106.
- **Kaye C, Guy CL** (1995) Perspectives of plant cold tolerance: physiology and molecular responses. *Sci Prog* 78(Pt4): 271-299.
- **Kazuoka IT, Torikai S, Kikuchi H, Oeda K** (2000) A zinc finger protein RHL41 mediates the light acclimatization response in *Arabidopsis*. *Plant J* 24(2):191-203.
- **Lee SH, Lee MH, Chung WI, Liu JR** (1998) WAPK, a Ser/Thr protein kinase gene of *Nicotiana tabacum*, is uniquely regulated by wounding, abscisic acid and methyl jasmonate. *Mol Gen Genet* 259(5): 516-522.
- **Lee Y, Park J, mi K, Kim K, Lee J, Lee K, Park JA, Lee TK, Park DS, Yang JS, Kim D, Lee S** (2006) *Arabidopsis* leaf necrosis caused by simulated acid rain is related to the salicylic acid signaling pathway. *Plant Physiol Biochem* 44(1): 38-42.
- **Leung J, Giraudat J** (1998) Abscisic acid signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 199-222.
- **Levitt J** (1986) Recovery of turgor by wilted, excised cabbage leaves in the absence of water uptake: a new factor in drought acclimation. *Plant Physiol* 82(1): 147-153.
- **Li J, Lin L, Alonso-Peral MM, Allen RS** (2010) Mechanisms and sequence requirements of *Arabidopsis* miR159 mediated gene regulation. *Keystone Symposia Congress in RNA Silencing Mechanism in Plants*. Santa Fe, NM. Febrero 2010.
- **MacRobbie EA** (1993) Ca²⁺ and cell signaling in guard cells. *Semin Cell Biol* 4(2): 113-122.
- **Manfre AJ, LaHatte GA, Climer CR, Marcotte WR Jr** (2009) Seed dehydration and the establishment of desiccation tolerance during seed maturation is altered in the *Arabidopsis thaliana* mutant *atem6-1*. *Plant Cell Physiol* 50(2): 243-53
- **Maskin L, Frankel N, Gudesblat G, Demergasso MJ, Pietrasanta LI, Iusem ND** (2007) Dimerization and DNA-binding of ASR1, a small hydrophilic protein abundant in plant tissues suffering from water loss. *Biochem Biophys Res Commun* 352(4):831-835.
- **Maughan SC, Cobbett CS** (2003) Methionine sulfoximine, an alternative selection for the bar marker in plants. *J Biotech* 102(2): 125-128
- **Melcher K, Ng LM, Zhou XE, Soon FF, Xu Y, Suino-Powell KM, Park SY, Weiner JJ, Fujii H, Chinnusamy V, Kovach A, Li J, Wang Y, Li J, Peterson FC, Jensen DR, Yong EL, Volkman BF, Cutler SR, Zhu JK, Xu HE** (2009) A gate-latch-lock mechanism for hormone signaling by abscisic acid receptors. *Nature* 462(7273): 602-608.
- **Mi S, Cai T, Hu Y, Chen Y, Hodges E, Ni F, Wu L, Li S, Zhou H, Long C, Chen S, Hannon GJ, Qi Y** (2008) Sorting of small RNAs into *Arabidopsis* argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell* 133(1): 116-2
- **Moreno-Fonseca LP, Covarrubias AA** (2001) Downstream DNA sequences are required to modulate *Pvlea-18* gene expression in response to dehydration. *Plant Mol Biol* 45(5): 501-515.
- **Moss EG** (2001) RNA interference: it's a small RNA world. *Curr Biol* 19: 772-775.
- **Mouillon JM, Eriksson SK, Harryson P** (2008) Mimicking the plant cell interior under water

stress by macromolecular crowding: disordered dehydrin proteins are highly resistant to structural collapse. *Plant Physiol* 148(4): 192-1937-

- **Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R** (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2(4): 279-89
- **Niu QW, Lin SS, Reyes JL, Chen KC, Wu HW, Yeh SD, Chua NH** (2006) Expression of artificial microRNAs in transgenic *Arabidopsis thaliana* confers virus resistance. *Nat Biotechnol* 24(11): 1420-1428.
- **Plana M, Itarte E, Eritja R, Goday A, Pagès M, Martínez MC** (1991) Phosphorylation of maize RAB-17 protein by casein kinase 2. *J Biol Chem* 266(33): 22510-4.
- **Reyes JL, Campos F, Wei H, Arora R, Yang Y, Karlson DT, Covarrubias AA** (2008) Functional dissection of hydrophilins during in vitro freeze protection. *Plant Cell Environ* 31(12): 1781-1790.
- **Reyes JL, Chua NH** (2007) ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during *Arabidopsis* seed germination. *Plant J* 49: 596-606.
- **Ried JL, Walker-Simmons MK** (1993) Group 3 Late Embryogenesis Abundant proteins in desiccation-tolerant seedlings of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol* 102(1): 125-131.
- **Roberts JK, DeSimone NA, Lingle WL, Dure L 3rd** (1993) Cellular concentrations and uniformity of cell-type accumulation of two lea proteins in cotton embryos. *Plant Cell* 5(7): 769-780.
- **Robertson M, Chandler PM** (1994) A dehydrin cognate protein from pea (*Pisum sativum* L.) with atypical pattern of expression. *Plant Mol Biol* 26(3): 805-816.
- **Schroeder JI, Kwak JW, Allen GJ** (2001) Guard cell abscisic acid signaling and engineering drought hardiness in plants. *Plant Physiol* 140(6826): 327-330.
- **Schwarz DS, Hutvagner, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD** (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115(2): 199-208
- **Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki** (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J Exp Bot* 58(2): 221-227.
- **Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (1997) Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol* 115(2): 327-334.
- **Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* 3(3): 217-223.
- **Soulages JL, Kim K, Walters C, Cushman JC** (2002) Temperature-induced extended helix/random coil transitions in a group 1 late embryogenesis-abundant protein from soybean. *Plant Physiol* 128(3): 822-32.
- **Stacy RA, Aalen RB** (1998) Identification of sequence homology between the internal hydrophilic repeated motifs of group 1 late-embryogenesis-abundant proteins in plants and hydrophilic repeats of the general stress protein GsiB of *Bacillus subtilis*. *Planta* 206(3): 476-478.
- **Steponkus PL, Uemura M, Joseph RA, Gilmour SJ, Thomashow MF** (1998) Mode of action of the COR15a gene on the freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(24):14570-5.
- **Taylor JE, Renwich KF, Webb AA, McAinsh MR, Furini A, Bartels D, Quatrano RS, Marcotte WR Jr, Hetherington AM** (1995) ABA-regulated promoter activity in stomatal guard cells. *Plant J* 7(1): 129-134.
- **Thomashow MF** (1999) Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 571-599.
- **Tuteja R** (2005) Type I signal peptidase; an overview. *Arch Biochem Biophys* 441(2): 107-111.
- **Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2000)

Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(21): 11632-11637.

- **Vaucheret H** (2008) Plant ARGONAUTES. *Trends Plant Sci* 13(7): 350-8
- **Vierling E, Kimpel JA** (1992) Plant responses to environmental stress. *Curr Opin Biotechnol* 3(2): 164-170.
- **Voetberg GS, Sharp RE** (1991) Growth of the maize primary root at low water potentials: II. Role of increased proline deposition in osmotic adjustment. *Plant Physiol* 96(4): 1125-1130.
- **Welling A, Rinne P, Viherä-Aarnio A, Kontunen-Soppela S, Heino P, Palva ET** (2004) Photoperiod and temperature differentially regulate the expression of two dehydrin genes during overwintering of birch (*Betula pubescens* Ehrh.). *J Exp Bot* 55(396): 507-516.
- **Wolkers WF, McCready S, Brant WF, Lindsey GG, Hoekstra FA** (2001) Isolation and characterization of a D-7 LEA protein from pollen that stabilizes glasses in vitro. *Biochim Biophys* 1544(1-2):196-206.
- **Yadav V, Mallappa C, Gangappa SN, Bhatia S, Chattopadhyay S** (2005) A basic helix-loop-helix transcription factor in Arabidopsis. MYC2 acts as a repressor of blue light-mediated photomorphogenic growth. *Plant Cell* 17(7): 1953-1966.
- **Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2005) Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and col-stress- responsive promoters. *Trends Plant Sci.* 10(2):88-94.
- **Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K.** (1994) A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell.* 6(2):251-264.
- **Yamamoto YY, Ichida H, Matsui M, Obokata J, Sakurai T, Satou M, Seki M, Shinozaki K, Abe T** (2006) Identification of plant promoter constituents by analysis of local distribution of short sequences. *BMC Genomics* 8: 67.
- **Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN** (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 217(4566): 1214-1222.
- **Yang CY, Chen YC, Jauh GY, Wang CS** (2005) A lily ASR protein involves abscisic acid signaling and confers drought and salt resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol* 139(2): 836-846.