



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

CARACTERIZACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE LAS PROTEÍNAS AIB Y MYB122 EN LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL POR GLUCOSA EN *Arabidopsis thaliana*.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
MARIA ISABEL CRUZ LÓPEZ

TUTOR PRINCIPAL  
Dra. Elizabeth Cordoba Martínez  
[Instituto de Biotecnología](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dra. Rosana Sánchez López  
Dr. Enrique Salas Vidal  
[Instituto de Biotecnología](#)

Ciudad de México. Enero, 2018



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.



*Dedico este trabajo a mis hermanos,  
Liliana y Edwin por brindarme su tiempo  
y a mi madre Ma. Del Carmen López por  
enseñarme a ser perseverante y nunca  
darme por vencida.*

# *AGRADECIMIENTOS*

A la primera persona que quiero agradecerle es a mi tutora la Dra. Elizabeth Cordoba Martínez, por permitirme formar parte de este proyecto y por haberme brindado su tiempo, paciencia, conocimiento y dedicación. Ella fue la persona responsable de mostrarme lo maravilloso que es la ciencia y también lo incomprensible que puede ser. Gracias a Ella y a todas las experiencias obtenidas durante el desarrollo de este proyecto han influido en mi decisión de seguir en el camino de la investigación, a pesar de que también experimente momentos de desesperación, el deseo del saber siempre me mantuvo optimista y no me dio por vencida.

También quiero agradecerle a la Dra. Patricia León Mejía por permitirme ser parte de su grupo de investigación en el Instituto de Biotecnología, y a todos los compañeros del laboratorio 23: Luis de Luna, Marel Chenge, Alma Hernández, Julio Sierra y Lina Escobar, ya que gracias al compañerismo, amistad y apoyo han aportado de alguna manera a el proyecto y a mis ganas de seguir adelante.

Al comité tutor formado por la Dra. Rosana Sánchez López y el Dr. Enrique Salas Vidal, gracias por sus observaciones, palabras y tiempo a lo largo de este proyecto.

Finalmente quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme aceptado y abierto las puertas para realizar un posgrado de buena calidad académica. También quiero agradecer el soporte económico a CONACYT por el apoyo # 415636 otorgado.

# ÍNDICE

	Pag
ABREVIATURAS	I
RESUMEN	II
SUMMARY	III
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 Función de los azúcares	1
I.1.1 Los azúcares como moléculas señalizadoras en plantas	1
I.2 Las vías de señalización de azúcares en plantas	4
I.3 Componentes de las vías de señalización	7
I.4 Factores de transcripción	8
I.4.1 Factores de transcripción que participan en la regulación por azúcares	10
I.5 Regulación de la transcripción por factores de transcripción	12
I.5.1 Mecanismos de represión por factores de transcripción	13
I.5.2 Control transcripcional por azúcares	15
II. ANTECEDENTES	17
II.1 Regulación del gen <i>STP1</i> por azúcares	17
II.2 La familia MYB	22
II.2.1 El factor de transcripción MYB122	24
II.3 La familia bHLH	25
II.3.1 El factor de transcripción AIB	26
III. JUSTIFICACIÓN	29
IV. HIPÓTESIS	31
V. OBJETIVO GENERAL	31
VI. OBJETIVOS PARTICULARES	31
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	32
VII.1 Análisis de la expresión del gen <i>STP1</i> en los fondos mutantes sometidos a tratamientos con glucosa	32

VII.1.1 Esterilización de semillas	32
VII.1.2 Extracción de DNA total	32
VII.1.3 Genotipificación de las líneas mutantes	33
VII.1.4 Tratamientos con glucosa	34
VII.1.5 Extracción de RNA total	35
VII.1.6 Análisis de expresión por northern-blot	35
VII.2 Análisis de líneas sobreexpresoras de los factores transcripcionales MYB122 y AIB	37
VII.2.1 Generación de las construcciones pK2GW7::MYB122 y pK2GW7::AIB	37
VII.2.2 Transformación de <i>E. coli</i>	37
VII.2.3 Purificación de plásmido a pequeña escala de <i>E. coli</i> (MINIPREP)	38
VII.2.4 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	38
VII.2.5 Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> con <i>A. tumefaciens</i>	39
VII.2.6 Selección y validación de las plantas transgénicas	39
VII.2.7 Obtención y validación de las líneas homocigotas	40
VII.3 Identificación de los elementos en <i>cis</i> de reconocimiento de los factores transcripcionales MYB122 y AIB	40
VII.3.1 Transformación de la cepa BL21(DE3)pLysS de <i>E. coli</i>	41
VII.3.2 Expresión de proteína recombinante en células competentes BL21(DE3)pLysS	41
VII.3.3 Análisis de la proteína recombinante por western-blot	42
VII.3.4 Purificación de la proteínas recombinante por cromatografía de afinidad	42
VIII. RESULTADOS	44
VIII.1 Genotipificación de las líneas mutantes de los genes <i>AIB</i> y <i>MYB122</i>	44
VIII.1.1 Genotipificación de <i>aib</i>	44
VIII.1.2 Genotipificación de <i>myb122</i>	48
VIII.2 Análisis de expresión del transcrito de <i>STP1</i> en respuesta a azúcares en las mutantes <i>aib</i> y <i>myb122</i>	52
VIII.3 Obtención de plantas transgénicas sobreexpresoras de <i>AIB</i> y <i>MYB122</i>	53
VIII.4 Análisis de expresión del transcrito de <i>STP1</i> en respuesta a	58

azúcares en las líneas 35S:: <i>AIB</i> y 35S:: <i>MYB122</i>	
VIII.5 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes AIB y MYB122	60
VIII.5.1 Purificación de la proteína AIB bajo condiciones nativas	61
VIII.5.2 Purificación de la proteína MYB122 bajo condiciones nativas	64
IX. DISCUSIÓN	66
IX.1 AIB participa como regulador negativo en respuesta a glucosa	67
IX.2 AIB y su posible motivo de unión en la región promotora del gen <i>STP1</i>	69
IX.3 El factor transcripcional MYB122 está involucrado en la respuesta de represión por glucosa	70
IX.4 Mecanismo de represión de AIB/JAM1 y MYB122 en respuesta a glucosa	72
X. CONCLUSIONES	75
XI. PERSPECTIVAS	76
XII. SUPLEMENTARIAS	77
XIII. APÉNDICE	81
XIV. REFERENCIAS	85

# ABREVIATURAS

ABA: ácido abscísico

*AIB/JAM1: "ABA-INDUCIBLE bHLH-TYPE/JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-LIKE1"*

bHLH: "basic helix-loop-helix"

CAT: cloranfenicol acetiltransferasa

EMSA: "Electrophoretic Mobility Shift Assay"

FT(s): factor(es) de transcripción

Glc: glucosa

GPCR: "G Protein Coupled Receptor"

GUS:  $\beta$ -glucuronidasa

HXK1: hexocinasa 1

kDa: kilo daltones

LC-MS/MS: "Liquid chromatography tandem-mass spectrometry"

LUC: luciferasa

MBS: "MYC2 binding sequence"

MPM: marcador de peso molecular

MS: Murashige y Skoog

Mtl: manitol

pb: pares de bases

PCR: "Polymerase Chain Reaction"

rpm: revoluciones por minuto

Snf1: "Sucrose non-fermenting 1"

SnRK1: "SNF1 related protein kinase 1"

SRS: "Sugar Response Sequence"

*STP1: SUGAR TRANSPORTER PROTEIN 1*

TOR: "Target of rapamycin", complejo multiproteínico

## RESUMEN

Los azúcares no sólo son una fuente de energía y componentes estructurales; también actúan como moléculas de señalización que modulan muchos procesos durante el ciclo de vida de los organismos. En las plantas, los niveles de azúcar regulan diferentes procesos durante su crecimiento y desarrollo, a nivel genético y por medio de vías de señalización específicas. A pesar de la importancia de los azúcares como moléculas señalizadoras en la regulación de la transcripción génica, el conocimiento actual de los componentes y los mecanismos moleculares de las vías de señalización es muy limitado, tal es el caso de los efectores finales de las vías, los factores de transcripción. Con el propósito de establecer nuevos componentes en las vías de señalización por azúcares, se ha abordado el estudio de la regulación del gen *STP1*, que codifica para un transportador de hexosa de alta afinidad, su expresión se reprime en presencia de glucosa y de manera específica por una vía independiente de Hexocinasa 1 (HXK1), que actúa como sensor en una de las tres vías principales conocidas para la señalización del azúcar en *Arabidopsis thaliana*. Por medio de un ensayo de "DNA Pull-down" se identificaron los factores de transcripción AIB/JAM1 y MYB122, a través de su unión a algún elemento(s) contenido en la región delimitada de 310 pb, del promotor de *STP1* en respuesta a glucosa. En este estudio, a través del análisis de líneas mutantes y sobreexpresoras se estableció la participación de AIB/JAM1 y MYB122 como componentes novedosos en una vía de señalización independiente de HXK1. Por otra parte, el que dos factores de transcripción regulen una misma respuesta, en este caso particular la represión del gen *STP1* por azúcares, sugiere que esta respuesta podría estar mediada por una interacción de ambos factores de transcripción. Experimentos futuros deberán permitir dilucidar el mecanismo a través del cual estos factores de transcripción reprimen a *STP1* en respuesta a azúcares.

## SUMMARY

Sugars are not only a source of energy and structural components; they also act as signaling molecules that modulate many processes during the life cycle of organisms. In plants, sugar levels regulate different processes during their growth and development at the genetic level by means of signaling pathways. Despite the importance of sugars as signaling molecules in the regulation of gene transcription, the current knowledge of the components and the molecular mechanisms of signaling pathways is very limited, such as the case of the last effectors of the pathways, the transcription factors. In order to establish new components in sugar signaling pathways, the study of the regulation of the *STP1* gene which codes for a high affinity hexose transporter, its expression is repressed in the presence of glucose by an HXK1-independent pathway (Hexokinase 1), which acts as a sensor in one of the three main known pathways for sugar signaling in *Arabidopsis thaliana*. By a "DNA Pull-down" assay, we identified the transcription factors AIB/JAM1 and MYB122 as regulators of the *STP1* promoter in response to Glc via directly interacting within the 310 bp. Analysis of mutant and overexpressing lines, we identified AIB/JAM1 and MYB122 as novel components in a signaling pathway independent of HXK1. The fact that two transcription factors regulate the same response, in this particular case the repression of the *STP1* gene by sugars, suggests that could be mediated by an interaction of both transcription factors, that it is an approach for a future, elucidate the molecular mechanism of these two transcription factors in the regulation by sugars.



# **I. INTRODUCCIÓN**

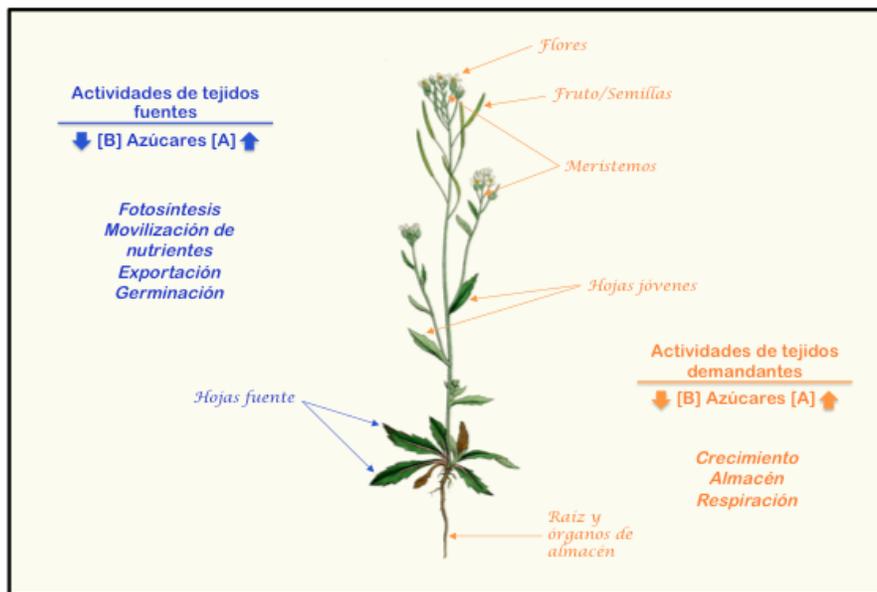
## **I.1. Función de los azúcares**

Los azúcares son moléculas que desempeñan diversas funciones vitales en los organismos; su principal papel consiste en ser una fuente de energía, otra función es el ser componentes estructurales de la pared celular de bacterias y plantas. Asimismo, se reconoce su papel como moléculas señalizadoras. Por medio de esta última función es que los azúcares generan un efecto sobre la regulación de un amplio grupo de genes que están involucrados en procesos fisiológicos y metabólicos, que controlan el crecimiento y el desarrollo de los organismos, como en el caso de las plantas (Jang *et al.*, 1997; León y Sheen, 2003).

### **I.1.1 Los azúcares como moléculas señalizadoras en plantas**

Las plantas son organismos autótrofos que obtienen azúcares a partir del proceso de fotosíntesis, el cual se lleva a cabo principalmente en las hojas. Posteriormente, los azúcares resultantes se distribuyen en forma de sacarosa a los distintos órganos y tejidos que conforman a la planta, a través de la red vascular llamada floema. Esta distribución depende de la demanda que presentan los distintos tejidos para la realización de sus actividades. De acuerdo a estos requerimientos, los tejidos se dividen en dos tipos: los fuente y los demandantes. Los tejidos fuente son las hojas y tejidos fotosintéticos que se encargan de la producción de azúcares, mientras que los tejidos demandantes son tejidos no fotosintéticos que necesitan el aporte de azúcares como lo son: la raíz, las flores, los frutos, los cuales importan azúcares para realizar sus diversas funciones (Figura 1) (Lalonde *et al.*, 1999; Rolland *et al.*, 2002). Debido a que el metabolismo de los azúcares es un proceso dinámico a través del ciclo de vida de la planta, se ha establecido que éstas han desarrollado la habilidad de monitorear y responder a los distintos niveles y tipos de azúcares para regular sus diversas funciones

como la floración, la fotosíntesis, la formación de órganos de reserva, la embriogénesis, la germinación y el desarrollo, entre otros. Esta regulación se da a través de la señalización de moléculas de azúcares, que a su vez, regula la expresión de genes que participan en todos los procesos ya mencionados, con el fin de que entre los distintos tejidos que conforman al cuerpo vegetal se mantenga una homeostasis (Sheen *et al.*, 1999; Gibson, 2005; Rolland *et al.*, 2006).



**Figura 1. Efectos causados por los distintos niveles de azúcares en los tejidos fuente y los tejidos demandantes.** Los bajos niveles de azúcares [B] en los tejidos demandantes, disminuyen las actividades de crecimiento, almacenamiento de nutrientes y la respiración en la planta, mientras que en los tejidos fuente, inducen un aumento en la actividad fotosintética y en la exportación de nutrientes. Por otra parte, el aumento de los niveles de azúcares [A] genera todo lo contrario a lo ya mencionado; en los tejidos demandantes se induce el crecimiento y el almacenamiento de nutrientes, mientras que en los tejidos fuente se disminuye la fotosíntesis, y se induce la movilización y exporte de nutrientes a los tejidos demandantes. Basado en Rolland *et al.*, 2002.

Para la identificación de aquellos genes que se regulan por azúcares y el tipo de azúcar que los regula, se han realizado análisis de expresión global de transcritos, estudios con mutantes de pérdida de función y mutantes con ganancia de función, con los que se ha logrado identificar que la expresión de determinados

genes se encuentra afectada por la presencia y/o ausencia de azúcares. Asimismo, la expresión de ciertos transcritos depende del tipo de azúcar y su concentración en la planta (Smeekens, 1998; Price *et al.*, 2004; Rolland *et al.*, 2006).

En las plantas se presenta una gran variedad de azúcares, lo que ha resultado en la realización de distintos estudios para determinar cuál de ellos en particular se encarga de regular la expresión de un gen o conjunto de genes en específico. Cabe mencionar que el primer estudio que atribuyó un papel de moléculas señalizadoras a los azúcares fue realizado por Sheen en 1990. En este estudio se analizó la actividad transcripcional de siete genes fotosintéticos, a través de la generación de construcciones que portaban el promotor de estos genes fusionados a los genes reporteros de GUS ( $\beta$ -glucuronidasa) y de CAT (cloranfenicol acetiltransferasa) en presencia de azúcares. Dichas construcciones se introdujeron a protoplastos por electroporación, los cuales se sometieron a tratamientos con distintos azúcares (a una concentración de 300 mM) como sacarosa, glucosa, entre otros. Al medir la actividad de los genes reporteros se concluyó que la glucosa (Glc) causó la represión de estos genes y no otro compuesto generado de su metabolismo posterior (Sheen, 1990; Pego *et al.*, 2000). A partir de entonces se han realizado diversos estudios que aportan evidencia de la función señalizadora de azúcares como la sacarosa, la trehalosa, la glucosa y la fructosa (Ohto *et al.*, 1992; Ho *et al.*, 2001; Price *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2009; Cho y Yoo, 2011).

En la Tabla 1 se enlistan los azúcares que han sido reconocidos como moléculas señalizadoras y su efecto en las plantas. En ciertos casos se ha logrado determinar los genes que regulan, pero en otros sólo ha sido posible establecer los procesos que regulan.

**Tabla 1. Azúcares que participan como moléculas señalizadoras en plantas.** Se han identificado que azúcares tienen función de molécula señalizadora en determinadas especies de plantas y los procesos que regulan.

<b>Azúcar</b>	<b>Especie</b>	<b>Descripción</b>	<b>Referencia</b>
<b>Sacarosa</b>	<i>Oryza sativa</i> (arroz)	La ausencia de sacarosa induce la transcripción del gen $\alpha$ -Amy3, mientras que reprime la transcripción de los genes <i>ACT1</i> , <i>ADH2</i> , <i>G3PD</i> , <i>His</i> , <i>HSP86</i> y <i>SSP2</i> .	Ho <i>et al.</i> , 2001
	<i>Ipomoea batatas</i> (camote)	La presencia de sacarosa (600 mM) induce la expresión del gen de la $\beta$ -amilasa.	Ohto <i>et al.</i> , 1992
<b>Trehalosa-6-fosfato (T6P)</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	La T6P actúa como señal del estatus de azúcares en la planta, a concentraciones muy bajas que van de los 5 a 20 $\mu$ M. Asimismo, induce la síntesis de almidón.	Zhang <i>et al.</i> , 2009
<b>Glucosa (Glc)</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	La presencia de Glc (300 mM) induce 444 genes y reprime 534, implicados en la regulación de una gran cantidad de procesos como el metabolismo de carbohidratos, del nitrógeno, de lípidos, la síntesis de hormonas, entre otros.	Price <i>et al.</i> , 2004
<b>Fructosa</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Se ha identificado que <i>FINS1</i> es un factor de regulación que participa en la vía de señalización por fructosa (600 mM). <i>FINS1</i> codifica para la enzima fructosa-1, 6-bifosfatasa, que participa en la biosíntesis de la sacarosa. Se ha reportado que interacciona con ABA durante el desarrollo temprano de la plántula.	Cho y Yoo, 2011

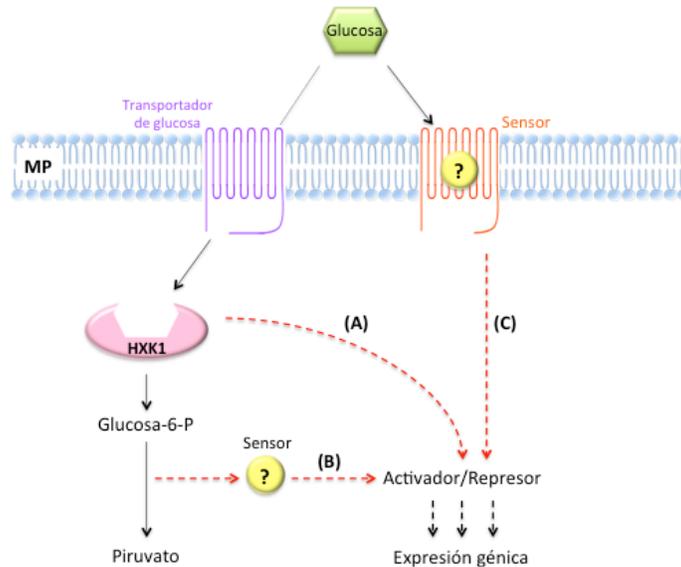
Debido a que la Glc es una molécula que regula un gran número de genes, (como se muestra en la Tabla 1), se ha concluido que es la molécula reguladora más distintiva dentro de los azúcares. A raíz de esto, se han realizado una gran variedad de estudios que han evidenciado la existencia de tres vías de señalización por Glc en plantas (Jang *et al.*, 1997; Xiao *et al.*, 2000).

## **I.2 Las vías de señalización de azúcares en plantas**

En un estudio utilizando plantas transgénicas que sobre-expresan o que presentan niveles disminuidos de HXK1 (Hexocinasa 1) al ser sometidas a un tratamiento con 6% de Glc en el medio, se observó que las plantas

sobreexpresoras mostraron un efecto negativo en el desarrollo de los cotiledones, hipocótilo y la raíz, mientras las líneas silenciadas crecieron normalmente. Estos resultados indicaron que la HXK1 se encarga de regular la expresión de algunos genes del desarrollo en respuesta a Glc (Jang *et al.*, 1997). Posteriormente, se analizaron plantas transgénicas sobreexpresoras de la YHXK2 (enzima heteróloga de la HXK1 que presenta función catalítica y sensora en levadura), por medio de un ensayo enzimático se evidenció que la actividad fosforilativa de la YHXK2 era similar a las plantas sobreexpresoras de la HXK1 de *Arabidopsis*, sin embargo, las plantas portadoras de la YHXK2 mostraron un efecto contrario respecto a la señalización en comparación con la sobreexpresora de la HXK1, en respuesta a Glc. Esto demostró que la enzima YHXK2 no fue capaz de transmitir la señal generada por Glc, pero sí reemplazó la función catalítica, por lo tanto, se determinó que la enzima HXK1 en *Arabidopsis* actúa como un sensor de azúcares (hexosas) (Jang *et al.*, 1997). Con base en esto, se propuso que la HXK1 presenta una función dual, el ser una enzima metabólica que realiza el primer paso de la glucólisis y un sensor de hexosas (Xiao *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2003; Rolland y Sheen, 2005).

A partir de la caracterización de la función sensora de la enzima HXK1 en *Arabidopsis*, se han logrado identificar a tres vías de señalización para Glc, en dos de ellas la HXK1 participa y en una tercera no, siendo ésta última una vía independiente de HXK1 (Figura 2) (Jang *et al.*, 1997; Xiao *et al.*, 2000):



**Figura 2. Las tres vías de señalización por glucosa en plantas.** El esquema representa la vía dependiente de HXK1 (A), que a la vez conlleva a la vía dependiente de la glucólisis (B). En la primera vía la HXK1 es el sensor que genera la señal para la regulación de la expresión génica, mientras que en la segunda vía algún producto de la glucólisis funciona como la señal. Finalmente, la vía independiente de la HXK1 (C), involucra la participación de transportadores o sensores de glucosa que aún no han sido identificados. MP, membrana plasmática. Basado en Rolland *et al.*, 2006.

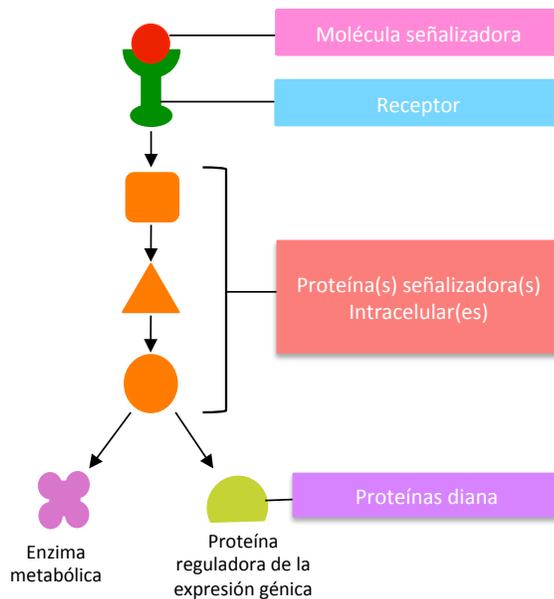
- A. La vía dependiente de HXK1: en esta vía de señalización la HXK1 desempeña una función de sensor/receptor, la unión de la Glc a esta enzima desencadena la señal para la regulación de la expresión génica. Se ha evidenciado que a través de esta vía se regula la expresión de algunos genes fotosintéticos (Figura 2A) (Jang *et al.*, 1997; Xiao *et al.*, 2000; Smeekens *et al.*, 2010).
- B. La vía dependiente de HXK1-dependiente de la glucólisis: en esta vía la HXK1 a través de su actividad catalítica, fosforila a la Glc que prosigue en la glucólisis; donde alguno de los metabolitos intermediarios funge como señal para la regulación de algunos genes, como los genes de respuesta a patógenos (Figura 2B). Cabe señalar que el metabolito implicado en la señalización se desconoce (Jang *et al.*, 1997; Xiao *et al.*, 2000; Rolland *et al.*, 2006).

C. La vía independiente de HXK1: esta vía no depende de la participación de la función sensora, ni catalítica de la HXK1 (Xiao *et al.*, 2000). Como parte de ésta se agrupan algunos componentes semejantes a los identificados en otros sistemas como por ejemplo el complejo cinasa SnRK1 (“SNF1 related protein kinase 1”) cuya función es similar al de la Snf1 (“Sucrose non-fermenting 1”) de levadura (Halford *et al.*, 2002). Otro elemento evidenciado es el análogo de la proteína G del sistema GPCR (“G Protein Coupled Receptor”), similar al de la levadura (Grigston *et al.*, 2008). Por último, el complejo multiproteínico TOR (“Target of rapamycin”), un integrador central del metabolismo, que se encuentra en la mayoría de los organismos; su función de cinasa se activa al recibir la señal de disponibilidad de nutrientes, causando una reprogramación global de la transcripción y del metabolismo (Figura 2C) (Xiong y Sheen, 2012).

### **I.3 Componentes de las vías de señalización**

Las vías de señalización celular son sistemas en cascada, con una serie de etapas secuenciales. El proceso inicia cuando un estímulo es percibido por un receptor e inmediatamente prosigue con la transformación de esa señal extracelular en una intracelular. La transducción de esa señal intracelular concluye con la intervención de proteínas efectoras (activándolas o inactivándolas), las cuales permiten regular los procesos celulares implicados en el crecimiento y desarrollo de los organismos (Menéndez, 2005). Por lo tanto, se ha establecido de manera general que las vías de señalización están conformadas por un receptor (“sensor”), proteínas(s) señalizadora(s) intracelular(es) y la(s) proteína(s) diana (efectores), siendo esta última la encargada de generar una respuesta acorde al estímulo recibido (Figura 3) (Alberts, 2008).

**Figura 3. Componentes de una vía de transducción de señales.** La vía está conformada por: el receptor, que se encarga de percibir el estímulo; la(s) proteína(s) señalizadora(s) intracelular(es), que son intermediarios para llevar la señal del receptor a la proteína diana (efectoras), las cuales se activan o inactivan, tratándose de enzimas metabólicas o bien proteínas reguladoras de la expresión génica. Modificado de Alberts, 2008.

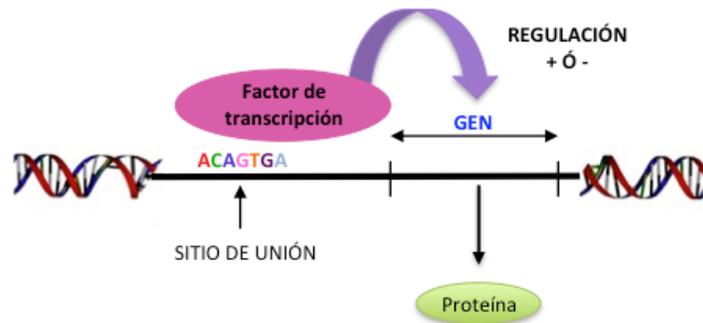


Diversos estudios en plantas han logrado elucidar algunos de los elementos involucrados en las vías de señalización por Glc, como son: la HXK1, que actúa como un sensor de hexosas (Smeekens, 2000); los complejos de cinasas SnRK1 (Halford *et al.*, 2002) y TOR (Deprost *et al.*, 2007); y el regulador RGS1, el cual combina un transportador de hexosas que pudiera ser un receptor extracelular y la proteína G (Grigston *et al.*, 2008). Cabe mencionar que estos elementos participan en vías de señalización que modulan la expresión génica de diversos genes, por medio de la participación de factores de transcripción, efectores finales de la vía de señalización.

#### I.4 Factores de transcripción

Las plantas son capaces de percibir los niveles de azúcares disponibles a través de vías de señalización, generando una respuesta a nivel de la regulación transcripcional. Dicha respuesta depende de la actividad de factores de transcripción y elementos en *cis* en los promotores de los genes que responden a azúcares (Yanagisawa, 1998; Hanson *et al.*, 2008; Franco-Zorrilla *et al.*, 2014).

Los factores de transcripción (FTs) son proteínas reguladoras que disponen de cuatro dominios discretos: un dominio de unión a DNA; un dominio de regulación de la transcripción que permite la interacción con otros elementos de la maquinaria basal de la transcripción, afectando positiva o negativamente su función; un sitio de oligomerización (para la interacción con otras proteínas) y una señal de localización nuclear. Todos estos dominios funcionan en conjunto para la regulación de la expresión génica. Cabe mencionar que el sitio de unión a DNA es el que determina a qué secuencia reguladora en *cis* específica, ubicada en el promotor, se unirá para modular la transcripción de un gen en particular (Figura 4) (Saleh y Pages, 2003; Menéndez, 2005; Du *et al.*, 2009).



**Figura 4. Los factores de transcripción, proteínas reguladoras de la expresión génica.** Los factores de transcripción actúan mediante el reconocimiento de posiciones en *cis* que forman parte de los promotores para activar (+) o reprimir (-) la transcripción del gen, a través de la interacción del dominio de regulación de la transcripción con algún(os) factor(es) de transcripción basal(es) que conforman el complejo de preiniciación de la transcripción (PIC).

Aproximadamente del 6% al 10% del genoma de *Arabidopsis* codifica para FTs, lo que refleja su importancia como proteínas reguladoras en plantas (Franco-Zorrilla *et al.*, 2014). A razón de este hecho es que se han realizado diversos estudios con el fin de entender la importancia de los FTs y su mecanismo de regulación.

Los FTs se agrupan de acuerdo a su dominio de unión a DNA, que tiende a reconocer una secuencia de unión consenso de DNA en las regiones

potenciadoras (“enhancers”) o promotoras adyacentes a los genes que regulan (Todeschini *et al.*, 2014). La idea generalizada de que los miembros pertenecientes a la misma familia comparten una secuencia de unión consenso y exclusiva no se aplica en todos los casos, ya que nuevos datos muestran que puede haber miembros de una familia que son capaces de reconocer una secuencia de unión única respecto a los demás integrantes, o bien pueden tener más de un sitio de unión. Por lo tanto, el estudio de los FTs es un trabajo arduo, ya que no es fácil determinar las secuencias de unión a DNA. Asimismo, el mecanismo de acción puede variar entre ellos (Franco-Zorrilla *et al.*, 2014; Todeschine *et al.*, 2014).

#### **I.4.1 Factores de transcripción que participan en la regulación por azúcares**

La presencia o ausencia de azúcares afecta la expresión de diversos genes, se identificaron genes que codifican para FTs, como por ejemplo: *MYB75* que participa en la regulación de la biosíntesis de antocianinas; *HSI2*, *HSL1*, *HSL2*, *ABI4*, *ABI5* y *ABI8* que están involucrados en las vías de señalización por ácido abscísico (ABA), mientras que *bZIP11*, *bZIP1*, *bZIP44*, *bZIP53*, *SUSIBA1*, *SUSIBA2* y *SUSIBA3* participan en la señalización por azúcares (Sun *et al.*, 2003; Hanson *et al.*, 2008). Además de estar regulados por la presencia de azúcares a nivel transcripcional, algunos FTs participan como componentes de las vías de señalización por azúcares, como es el caso del factor transcripcional *ABI4*. En respuesta a azúcares *ABI4* regula la expresión de los genes *SBE2.2* (“*STARCH BRANCHING ENZYME 2.2*”), *APL3* (“*ADP-GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE 3*”) y *ABI5* (“*ABSCISIC ACID INSENSITIVE 5*”), a través del reconocimiento del elemento CACCG presente en sus promotores. Asimismo, *ABI4* es un regulador de su propia transcripción, por unión a la caja CACCG (Arroyo *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006; Bossi *et al.*, 2009).

El factor transcripcional *bZIP11* participa en la inducción de la transcripción de 25 genes y la represión de 16, en respuesta a Glc. Entre los genes blancos de *bZIP11* se encuentran *ASN1* (“*ASPARAGINE SYNTHETASE 1*”), *ProDH2* (“*PROLINE DEHIDROGENASE 2*”) y otras enzimas que participan en la regulación

del metabolismo de aminoácidos. Los promotores de los genes que se inducen exhiben la caja G (CACGTG), pero los genes que se reprimen no la presentan, por lo que se sugiere que el mecanismo de represión es diferente al de activación para este FT (Handson *et al.*, 2008). Otro TF perteneciente a la misma familia que bZIP11, el cual se ha reconocido como modelo del estudio de las vías de señalización por azúcares, es bZIP1. Este FT se reprime rápidamente en presencia de Glc y participa en una vía dependiente de HXK1, regulando genes implicados en el crecimiento de la semilla a través de su unión a cajas G y C (TGACGTCA). El mecanismo de la función de bZIP1 está influenciado por interacciones con otros FTs pertenecientes a esta familia, de tal manera que modifican su propiedad de unión al DNA (Kang *et al.*, 2010).

Por otra parte, se han identificado tres FT del tipo WRKY: SUSIBA1, SUSIBA2 y SUSIBA3, los cuales participan en la regulación de los genes de síntesis de almidón en arroz en respuesta a azúcares, se unen al elemento SURE (“Sugar Responsive Element”) y a la caja W (TGACT). Otro gen es *ISO1* (“*ISOAMYLASE 1*”), que codifica para una enzima que participa en la síntesis de almidón, y es blanco de SUSIBA2. Para el caso de SUSIBA 1 y 3 se desconocen diversos aspectos, inclusive a los genes que regulan en particular, aún cuando presentan una alta similitud con SUSIBA2 (Sun *et al.*, 2003).

Estudios en los genes de  $\alpha$ -amilasas en cereales, indican que en el promotor de éstos se encuentra una secuencia de respuesta a azúcares (SRS, por sus siglas en inglés “Sugar Responsive Sequence”), que posee tres motivos: la caja GC, la caja G y el elemento TATCCA. Este último elemento es reconocido por tres factores transcripcionales tipo MYB: MYBS1, MYBS2 y MYBS3. En presencia de azúcares, el factor MYBS2 se encarga de reprimir la transcripción del gen  $\alpha$ -AMY3, mientras que en ausencia de azúcares se une MYBS1 para inducir su expresión, por lo tanto, existe una competencia por el mismo elemento de unión entre MYBS1 y MYBS2, que actúan como activador y represor de la expresión, respectivamente. El desplazamiento entre estos dos FT de la secuencia de unión es un mecanismo de regulación de la expresión del gen  $\alpha$ -AMY3 (Lu *et al.*, 2002).

Los FT mencionados anteriormente son sólo algunos reguladores que participan en la modulación de la transcripción en respuesta a azúcares que pertenecen a distintas familias. Su acoplamiento a secuencias específicas permite inducir o reprimir la transcripción; sin embargo, el mecanismo de cómo ejercen su función se desconoce en su mayoría, pero ha sido posible elucidar que algunos de ellos actúan en coordinación con los componentes basales de la maquinaria transcripcional para regular la expresión de determinados genes en respuesta a diversos estímulos, tal es el caso de los azúcares (Riechmann, 2002; Osuna *et al.*, 2007)

### **I.5 Regulación de la transcripción por factores de transcripción**

La regulación de la expresión génica eucariota involucra la coordinación e interacción de múltiples proteínas, dando como resultado una integración de múltiples señales que forman una red compleja de regulación, para mantener la homeostasis en los organismos complejos (Reményi *et al.*, 2004).

El proceso de transcripción requiere de un gran número de proteínas, entre las cuales se encuentran proteínas que remodelan la estructura de la cromatina y el DNA, proteínas del complejo de preiniciación de la transcripción (PIC, por sus siglas en inglés), la RNA pol II y diversos FT. Éstos últimos pueden tener una función activadora, represora o inclusive ambas (Stracke *et al.*, 2001). También, se ha determinado que los FT pueden fungir como subunidades de activadores/represores compuestos que junto con el DNA y la maquinaria basal, forman un gran complejo de regulación (interacción indirecta), mientras otros pueden actuar por sí solos mediante una interacción directa (Tjian y Manlatin, 1994; Reményi *et al.*, 2004).

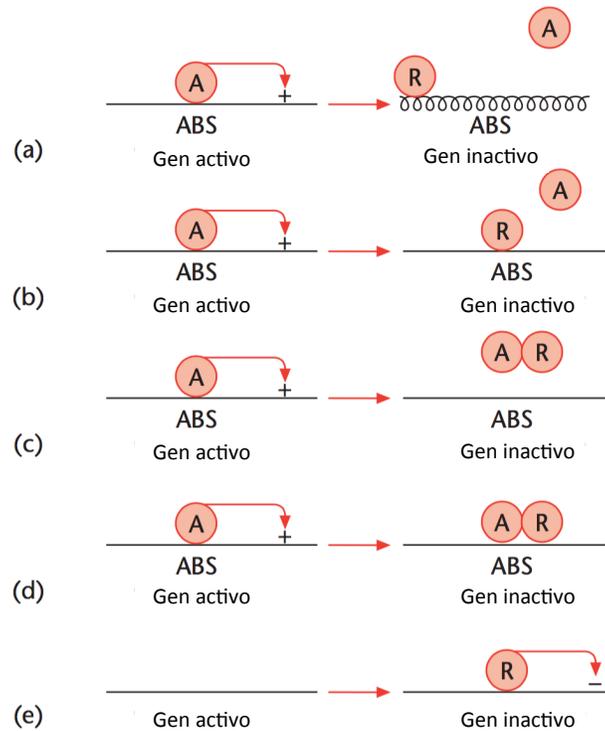
Diversos estudios han evidenciado que la unión de un FT al DNA puede causar alteraciones en la estructura de la proteína, que incluye rearrreglos de los núcleos hidrofóbicos y cambios en su estructura cuaternaria. Estas modificaciones pueden permitir la interacción con otro(s) FTs que en conjunto forman un homo- o heterodímero para activar o reprimir la transcripción (Reményi *et al.*, 2004). Las descritas anteriormente son sólo algunas generalidades de la manera en la que

pueden participar los FTs, tanto para activar como para reprimir la transcripción. Algunos mecanismos particulares para la función de un FT como represor se abordarán enseguida en el siguiente apartado.

### **I.5.1 Mecanismos de represión por factores de transcripción**

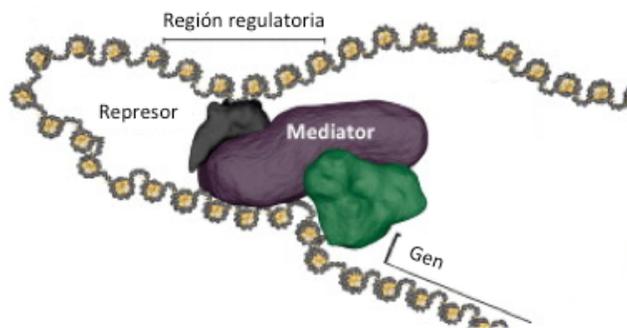
Existen varios mecanismos que permiten la represión de la expresión génica a distintos niveles que van desde la modificación de la estructura de la cromatina a la formación de grandes complejos proteínicos. A continuación se describen los que se conocen.

Los FTs que inhiben la transcripción pueden actuar interfiriendo con la actividad de un factor que actúa positivamente, es decir, bloquean el efecto inductor de la expresión génica de un activador. Esto se puede llevar a cabo por medio del impedimento de la unión del inductor a su secuencia blanco en el DNA, por la modificación de la organización de la estructura de la cromatina a una forma inactiva (Figura 5a), mediante la unión del represor al mismo sitio de unión de DNA que el activador (competencia por el sitio de unión al DNA) (Figura 5b) o mediante la inhibición del activador a través de la formación del complejo activador-represor que altera o reduce la función de unión a DNA del activador (Figura 5c). En otro mecanismo el inhibidor se une al dominio de activación de la transcripción del activador, cuando el activador se encuentra ya unido al DNA, dicho fenómeno es conocido como “quenching” (Figura 5d). Asimismo, se conocen FTs que pueden inhibir directamente la transcripción en la ausencia de un activador (Figura 5e) (Latchman, 2011).



**Figura 5. Mecanismos de represión por factores de transcripción.** El represor (R) inhibe la función del activador (A), uniéndose al sitio de unión a DNA (ABS), produciendo una estructura de la cromatina inactiva (a), por competencia por el sitio de unión a DNA (b), por secuestro del activador (c), por inhibición de la función inductora de la transcripción (d) o a través de una represión directa (e). Tomado de Latchman, 2011.

Se han reportado variantes del mecanismo de represión directa (Figura 5e), que consisten en que el represor interactúe con una o más moléculas para así poder realizar su función represora, por ejemplo la represión tipo anti-enhancer, la cual consiste en inhibir la activación de la transcripción por un enhancer, a través de un represor que se asocia a éste (Cowel, 1994; Courey y Jia, 2001). Otra variante es, que el complejo multiproteico Mediator actúa en interfase para asociar la respuesta del FT a la unidad transcripcional basal ensamblada en el promotor de un gen, lo que puede producir la activación o represión de la transcripción (Figura 6) (Mathur *et al.*, 2011).



**Figura 6. Represión por el complejo Mediator.** La represión también puede darse a través del complejo mediador (morado), donde el represor (negro) se une a éste y al complejo PIC (verde).

La eficiencia de represión depende principalmente de la afinidad de unión relativa del represor por el DNA, así como por la de los elementos basales de la transcripción o por los activadores. De tal manera que se pueda generar una respuesta rápida en consecuencia de un estímulo dado (Rojo, 2001).

### **I.5.2 Control transcripcional por azúcares**

Se ha mencionado que los azúcares controlan la expresión de una gran variedad de genes a nivel transcripcional, mediante la unión de proteínas a secuencias conocidas como elementos en *cis* que contiene el promotor de un gen, y que actúan en la inducción o represión de la transcripción (Lu *et al.*, 2002; Alberts, 2008). El gen  $\alpha$ -AMY3 emplea este mecanismo de regulación para su expresión. Este gen codifica para la enzima  $\alpha$ -amilasa, que participa en la degradación del almidón en *O. sativa* (arroz), el cual se reprime en presencia de azúcares durante la germinación (Lu *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2006). Se determinó que en el promotor de este gen se encuentra la secuencia SRS (“Sugar Response Sequence”), que contiene tres elementos esenciales para la represión; la caja GC, la caja G y el elemento TATCCA, localizados entre -186 y -8 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción. El elemento TATCCA es característico para la unión de factores transcripcionales tipo MYB, y se ha identificado que dos de ellos, MYBS1 y MYBS2, están implicados en la regulación de la transcripción en presencia de azúcares, en *O. sativa*. Además, se evidenció que la expresión de

los genes de estos MYBS se encuentra regulada por los niveles de azúcares: en presencia de Glc los niveles de expresión de *MYBS1* y *MYBS3* son bajos, mientras que los niveles de *MYBS2* son altos (Toyofuku *et al.*, 1998; Ho *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2002). Esto contribuyó a determinar que existe un mecanismo complejo de control, donde los azúcares regulan la expresión de FTs, los cuales a su vez se encargan de regular la expresión de los genes blanco (Lu *et al.*, 2002).

Estudios realizados en algunas gramíneas como arroz, trigo y cebada, han evidenciado que el promotor del gen  $\alpha$ -AMY se presentan los elementos TACGTA, TATCCAT, CGACG y CCTTT, los cuales participan en la regulación transcripcional por azúcares y que contribuyen en la represión del gen  $\alpha$ -AMY (Hwang *et al.*, 1998; Toyofuku *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2006).

El gen que codifica para la patatina (hidrolasa acilo lipolítica), se regula por azúcares; en el promotor de este gen en *Solanum tuberosum* (papa), se identificó al elemento CACTT/CCA ("SURE"), el cual participa en esta regulación (Grierson *et al.*, 1994). Dicho elemento se presenta en el gen ortólogo en arroz, trigo y cebada. Pero fue hasta el estudio en la cebada que se identificó el factor transcripcional que reconoce a este elemento, tratándose del factor SUSIBA2, miembro de la familia WKRY, el cual actúa como activador de la expresión del gen de la patatina (Sun *et al.*, 2003).

Así como los genes de la enzima  $\alpha$ -amilasa y de la patatina se encuentran regulados a nivel transcripcional por la presencia de azúcares, existe un extenso grupo de genes de respuesta a azúcares que se regula de igual manera, a nivel transcripcional (Osuna *et al.*, 2007), tal es el caso del gen que codifica para la proteína transportadora de azúcares 1 (*STP1*) (Price *et al.*, 2004).

## II. ANTECEDENTES

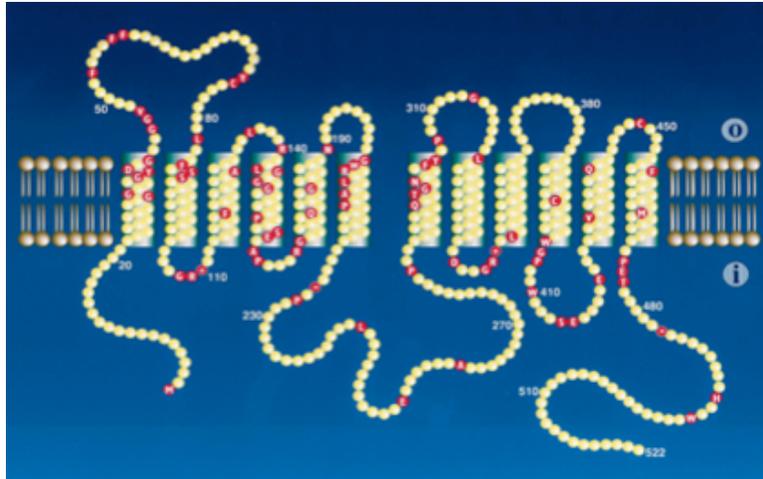
Con el propósito de establecer nuevos componentes en las vías de señalización por azúcares, y de manera específica en una vía independiente de HXK1, se abordó la regulación de un gen de respuesta a Glc, considerando que esto permitirá disectar la vía corriente arriba. A partir de la identificación de elementos en *cis* y posteriormente de los factores transcripcionales que se unen a dichos elementos y de proteínas de interacción con éstos, se pretende llegar a identificar componentes iniciales de la vía de transducción. El abordaje de esta estrategia se basa en el análisis de la regulación del gen *STP1* (*SUGAR TRANSPORTER PROTEIN 1*), cuya expresión se reprime en presencia de azúcares.

### II.1 Regulación del gen *STP1* por azúcares

Se ha mencionado que los azúcares controlan la expresión de una gran variedad de genes, dicha regulación se da por medio de las proteínas regulatorias que actúan en coordinación con los componentes basales de la maquinaria transcripcional, afectando su transcripción (Lu *et al.*, 2002). Entre los genes que se regulan por azúcares, se encuentra el gen que codifica para la proteína transportadora de azúcares 1 (*STP1*).

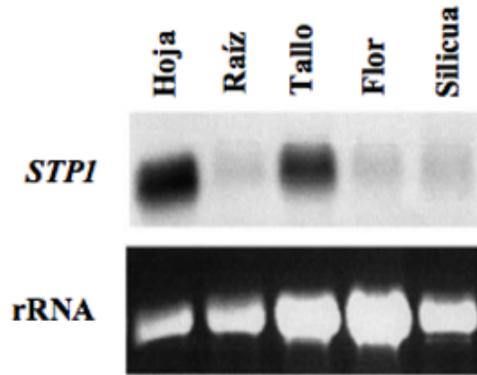
*STP1* es un gen que codifica para una proteína integral de membrana, tipo “simporter”, que se encarga de importar hexosas, mediante el transporte unidireccional de un protón ( $H^+$ ) por cada molécula de azúcar, al interior de las células. Este transportador presenta una alta afinidad por la Glc ( $K_m \sim 50 \mu M$ ), aunque también puede transportar otras hexosas como la galactosa, la xilosa y la manosa. Esta proteína está constituida de 522 aminoácidos, lo que representa un peso molecular de 57.5 KDa y una estructura compuesta por 12 dominios

transmembranales unidos por regiones hidrofílicas que forman “loops” (Figura 7) (Boorer *et al.*, 1994; Büttner y Sauer, 2000; Sherson *et al.*, 2003; Büttner, 2010).



**Figura 7. Modelo topológico del transportador de monosacáridos STP1, en *Arabidopsis*.** Se muestran las posiciones de las hélices transmembranales. Los residuos en color rojo indican los aminoácidos que están conservados en todos los transportadores de monosacáridos de algas y plantas superiores. Región extracelular (o) e intracelular (i) de la membrana plasmática. Tomado de Büttner y Sauer, 2000.

Para determinar el patrón de expresión de *STP1*, Sherson y colaboradores (2003), generaron plantas transgénicas portadoras de la fusión del promotor de *STP1* de *Arabidopsis* con el gen reportero de la luciferasa (LUC). Se observó que la actividad del gen reportero (emisión de luz) predominaba en las hojas jóvenes de plántulas de 14 días de edad, en comparación con los otros órganos. Posteriormente, a través de un análisis tipo northern-blot, se evidenciaron los niveles de expresión de este gen en los distintos órganos de la planta, alcanzando los niveles de expresión más altos en las hojas, y de manera descendente en el escapo (tallo), las silicuas, las flores y las raíces (Figura 8) (Boorer *et al.*, 1994; Sherson *et al.*, 2000; Stadler *et al.*, 2003). Por lo tanto, ambos estudios demostraron que *STP1* se expresa principalmente en las hojas jóvenes de plantas de *Arabidopsis* de 14 días de edad.



**Figura 8. Niveles de expresión del gen *STP1* en diferentes órganos de *Arabidopsis*.** Tomado de Sherson *et al.*, 2003.

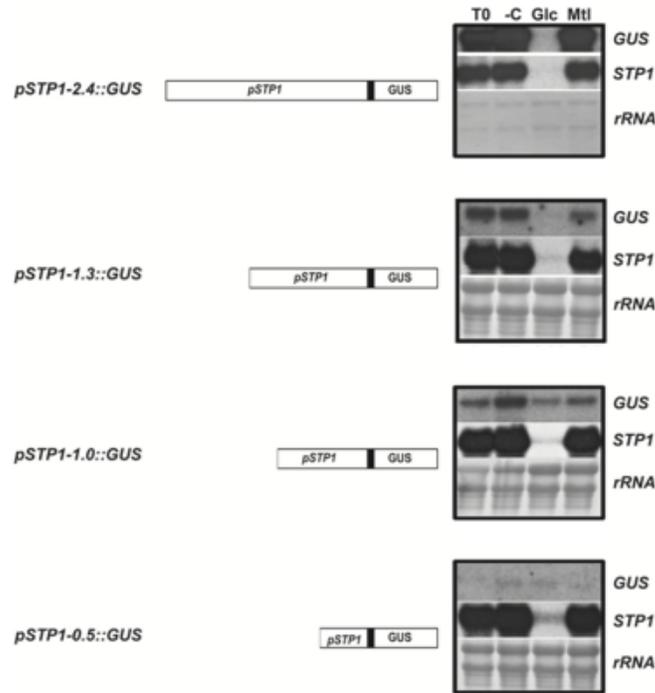
A través de un análisis transcriptómico por microarreglos, se determinó que la expresión de *STP1* se reprime en presencia de Glc, tal como sucede con otros genes que codifican para proteínas transportadoras de monosacáridos. Asimismo, se ha evidenciado que la reducción de los niveles de transcrito de *STP1* es más drástica en comparación con el resto de los miembros de la familia de genes *STP*, que también son transportadores de azúcares. Al parecer la expresión de estos genes está asociada con su función transportadora y el azúcar disponible en el medio en el que se encuentren (Price *et al.*, 2004).

Otro factor que participa en la regulación de la expresión de *STP1* es la exposición a la luz. El cambio de luz a oscuridad por el ritmo circadiano, genera variaciones en la presencia del transcrito de *STP1*; en la oscuridad aumentan sus niveles, mientras que en la luz disminuyen (Stadler *et al.*, 2003; Büttner, 2010).

En un estudio realizado por Cordoba y colaboradores (2015), evidenciaron que la represión de la expresión de *STP1* en presencia de Glc es una respuesta rápida, ya que en los primeros 15 minutos se presenta una gran disminución del transcrito y en un tiempo más prolongado en esta condición, se llega a una represión total (Cordoba *et al.*, 2015). Para determinar la vía de señalización implicada en su regulación, se analizó el transcrito de *STP1* en plantas mutantes. Las mutantes empleadas fueron *gin2/hxk1*, *abi4*, *abi5*, *kin10*, *kin11* y *rgs1*, que corresponden a mutantes en la enzima metabólica HXK1, a los FT ABI4 y ABI5, a

las subunidades del complejo SnRK1 (KIN10 y KIN11) y la proteína G (RGS1), respectivamente. Los FT ABI4 y ABI5 son componentes que participan en la vía de señalización dependiente de HXK1 (Cordoba *et al.*, 2015). En el análisis del transcrito de *STP1* en las mutantes de estos componentes, se observó que la represión por Glc fue similar a las plantas tipo silvestre, por lo tanto, se determinó que la vía implicada en la regulación del gen *STP1* es independiente de HXK1, debido a que en las mutantes de esta vía se mantiene la represión por azúcares (Cordoba *et al.*, 2015). Por otra parte, el complejo SnRK1 y la proteína RGS1 son elementos de una vía independiente de HXK1, aunque no se sabe si están asociados a una sola vía de señalización o si corresponden a dos vías de señalización independientes de HXK1. En las mutantes *kin10*, *kin11* y *rgs1* también se presentó la represión por Glc de *STP1*, indicando que las vías en las que participan estos componentes tampoco están involucradas en la regulación de *STP1* por azúcares (Cordoba *et al.*, 2015).

A través del análisis de plantas transgénicas que portan al promotor del gen *STP1* fusionado con el gen reportero de GUS, se demostró que en una región de 2.4 kb se encuentran los elementos en *cis* necesarios para la respuesta de represión por glucosa. Por medio de deleciones sucesivas a partir de las 2.4 kb iniciales, se generaron diferentes versiones del promotor, fusionadas al gen reportero de GUS. Utilizando plantas portadoras de estas construcciones se delimitó una región de 310 pb, donde se encuentran los elementos en *cis* que confieren la represión por Glc, entre las versiones que portaban 1 y 1.3 kb del promotor de *STP1* (Figura 9). Un análisis detallado de esta región permitió identificar 17 motivos (que se agrupan en 8 tipos diferentes de elementos en *cis*) que han sido reconocidos por participar en la represión por azúcares (Cordoba *et al.*, 2015).



**Figura 9. Análisis del promotor de *STP1*.** Se generaron plantas transgénicas portadoras de versiones de 2.4, 1.3, 1, y 0.5 kb del promotor *STP1*, fusionadas al gen reportero de *GUS* (*pSTP1::GUS*). Las plantas fueron sometidas a tratamientos con medio sin fuente de carbono (-C), medio con glucosa (Glc), manitol (Mtl) y un control previo al experimento (T0). Se determinó que en plantas portadoras de la versión de 1 kb del promotor, no se presentó una disminución del transcrito de *GUS* en el tratamiento con glucosa (Glc), en comparación a la versión de 1.3 kb, indicando que entre estos fragmentos se ubican los elementos de regulación por azúcares. Cordoba *et al.*, 2015.

Con la finalidad de identificar proteínas que participan en la regulación de la expresión de *STP1* y establecer componentes posicionados como efectores en la vía de señalización por azúcares, se aislaron proteínas que de alguna manera se asociaron físicamente con la región regulatoria identificada. Por medio de un ensayo tipo “DNA Pull-Down” se aislaron proteínas nucleares que posiblemente están involucradas en la regulación de la expresión del gen *STP1* en respuesta a Glc. Este ensayo consistió en inmovilizar la región regulatoria acotada previamente (310 pb), que contiene a los elementos en *cis* de represión por Glc, a una matriz y exponerla a un extracto de proteínas nucleares proveniente de

plantas de 12 días de edad y que fueron tratadas por 6 hrs con 150 mM de Glc o manitol (Mtl), éste último como control osmótico del efecto osmótico del soluto en la solución. Las proteínas que se unieron de manera directa o indirecta (unión de complejos proteínicos) al fragmento de DNA fueron separadas y posteriormente se secuenciaron por LC-MS/MS. La selección de las proteínas candidatas para ejercer la regulación de *STP1* por Glc se basó en los siguientes criterios: que la proteína presentara la capacidad de unirse al DNA de manera directa o indirecta o que estuviera asociada con la regulación de la transcripción y que se presentara en al menos dos de los cuatro experimentos independientes realizados. Aunado a lo anterior, las proteínas candidatas fueron seleccionadas considerando diferentes posibles escenarios en la regulación: estar presente únicamente en la condición por Glc, debido a que la proteína que esté involucrada solamente pudiera ejercer su función de represión en respuesta a Glc y no por Mtl; considerando la ausencia de un activador en presencia de Glc, por lo que estaría presente en la condición de Mtl, así como también se tomaron en cuenta las proteínas reguladoras presentes en Mtl; además, se contempló la posibilidad de que la proteína reguladora podría sufrir modificaciones post-traduccionales en respuesta a Glc para ejercer su función represora/activadora, por lo que se incluyeron aquellas proteínas reguladoras presentes en ambos tratamientos. Teniendo en cuenta estos criterios y partiendo de un total de 321 proteínas identificadas, se obtuvo una lista de 10 proteínas candidatas, siendo las siguientes: MYB122 (AT1G74080), AIB (AT2G46510), MED14 (AT3G04740), OFP6 (AT3G52525), RGD3 (AT3G54280), AHL1 (AT4G12080), HSC70 (AT5G02500), UAP56 (AT5G11170), RAD51 (AT5G20850) y FIB1 (AT5G52470). Las dos primeras corresponden a factores transcripcionales, mientras el resto corresponde a componentes del complejo MEDIADOR y proteínas que participan en la transcripción (Cruz-López, Tesis de Licenciatura, 2015).

## **II.2 La familia MYB**

En plantas, los factores de transcripción tipo MYB comprenden una de las familias génicas más amplias. A razón de esto, se han realizado análisis genéticos

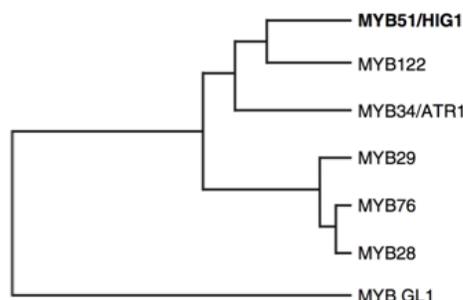
y moleculares para determinar los procesos biológicos que regulan y su mecanismo de acción. Dichos estudios se han realizado utilizando algunas especies de plantas como: *Arabidopsis*, maíz (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), petunia (*Petunia hybrida*), uva (*Vitis vinífera*), álamo (*Populus tremuloides*) y manzana (*Malus domestica*) (Dubos *et al.*, 2010).

Las proteínas MYB se caracterizan por presentar el dominio de unión a DNA del cual deriva su nombre, el dominio MYB, que consiste de una a cuatro secuencias repetidas imperfectas de 52 residuos cada una, denominados R1, R2, R3 y R4. Cada secuencia repetida forma una estructura secundaria en forma de  $\alpha$ -hélice y se encuentran separadas por tres residuos de triptófano. La tercera  $\alpha$ -hélice se le denomina “recognition helix”, ya que es la encargada de hacer contacto directo con el DNA. Durante el contacto con el DNA, dos de las secuencias repetidas trabajan cooperativamente para reconocer el motivo de unión para que la tercera  $\alpha$ -hélice pueda realizar el contacto directo con el DNA (Stracke *et al.*, 2001; Yanhui *et al.*, 2006; Dubos *et al.*, 2010). La secuencia de unión a DNA que reconocen estos FTs es variable, pero se ha identificado que la más frecuente es la secuencia T/CACCA/TAC/AC (Du *et al.*, 2009). El número de integrantes de esta familia es de 190 aproximadamente en *Arabidopsis* (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003).

Esta familia se divide en cuatro diferentes clases, de acuerdo al número de secuencias repetidas adyacentes. La clase I sólo presenta un miembro, conocida como 4R-MYB; la clase II denominada R1R2R3-MYB, de la cual se desconoce el número preciso de integrantes que la conforman; la clase III es la R2R3-MYB, con un total de 125 miembros y la clase IV, donde se reúnen a los miembros “MYB-related” que no cumplen con las características que presentan las otras clases. De todas éstas la más estudiada es la clase III categorizada a su vez, en 22 subclases (Stracke *et al.*, 2001; Yanhui *et al.*, 2006; Dubos *et al.*, 2010). Asimismo, se ha determinado que todos estos FTs están involucrados en el control de los siguientes procesos: en el metabolismo primario y secundario, en el destino e identidad celular, en procesos del desarrollo y en la respuesta a estrés biótico y abiótico (Dubos *et al.*, 2010).

## II.2.1 El factor de transcripción MYB122

En un estudio realizado por Frerigman y Gigolashvili (2014) identificaron que el factor de transcripción MYB122/HIG2 esta involucrado en la regulación de los genes de la vía de glucosinolatos, pero no se determinó que genes en particular regula y su mecanismo de acción. Asimismo se identificó que MYB34/ATR1 y MYB51/HIG1 son los homólogos más cercanos a MYB122 según su secuencia de aminoácidos (Figura 10), que en conjunto conforman a la clase 12 de la subfamilia R2R3-MYB y que presentan función redundante en la regulación transcripcional de la vía de glucosinolatos. Los glucosinolatos son metabolitos secundarios derivados del triptófano, contribuyen a la defensa de la planta contra microorganismos y herbívoros. La vía biosintética de estos compuestos se ha determinado en su totalidad así como los genes que codifican para las enzimas de la vía, pero aún no se han identificado que factor de transcripción regula la expresión de cada uno de ellos (Frerigmann y Gigolashvili, 2014).



**Figura 10. Filogenia del subgrupo 12 de la familia R2R3-MYB.** Tomado de Gigolashvili *et al.*, 2007.

Para determinar si la expresión de los genes *MYB122*, *MYB34* y *MYB51* responden a moléculas señalizadoras como ABA (ácido abscísico), metil-jasmonato, etileno y ácido salicílico, se realizó un análisis de expresión bajo estas diferentes hormonas como tratamientos. Se observó que en presencia de ABA se induce *MYB34*, mientras que el metil-jasmonato induce la expresión de *MYB34* y

*MYB122* y reprime la expresión de *MYB51*. En el tratamiento con ácido salicílico y el precursor de etileno (ACC, 1-carboxilato de 1-aminociclopropano) se observó una inducción de la expresión de *MYB51*. Todos estos tratamientos se compararon con la referencia a un tratamiento con ausencia de dichas hormonas. Para determinar si la inducción dependiente de hormona de la expresión de *MYB34*, *MYB51* y *MYB122* está relacionada con la regulación de la biosíntesis de glucosinolatos, se analizaron mutantes simples y dobles. Se concluyó que *MYB34* es importante para la regulación de glucosinolatos mediada por ABA, mientras que *MYB51* por el ácido salicílico y etileno, y *MYB122* en respuesta a etileno/metiljasmonato (Frerigmann y Gigolashvili, 2014).

Asimismo, se ha mostrado que *MYB122* se expresa menos que sus homólogos, por lo tanto, el efecto metabólico observado refleja la abundancia de transcrito, pero su función destaca en respuesta a los cambios ambientales. También se dio a conocer que la transcripción de *MYB122* es regulada positivamente por *MYB51*, lo que demuestra que el control de estos MYBs no solamente afectan los genes blancos de la vía de glucosinolatos sino que son capaces de coordinarse y regularse de manera recíproca (Frerigmann y Gigolashvili, 2014). Aún falta mucho por dilucidar sobre el factor de transcripción *MYB122* y determinar si su función se ve limitada a la respuesta de defensa de la planta. Esto deja a la posibilidad que *MYB122* participe de alguna manera en la respuesta a Glc para regular el gen *STP1*.

### **II.3 La familia bHLH**

Las proteínas pertenecientes a la familia bHLH (“basic helix-loop-helix”) son componentes regulatorios importantes en la transcripción, implicados en el control de una gran variedad de procesos que van desde la proliferación celular hasta el establecimiento del linaje celular. Con 147 miembros la familia bHLH es la segunda más grande de FTs en *Arabidopsis*, los cuales se clasifican en 21 subfamilias (designados del 1 al 21). Debido a que aún no se ha caracterizado a la familia completa en plantas, se cuenta con poca información sobre sus miembros; sin embargo, en otros organismos se han estudiado con mayor detalle, por

ejemplo en mamíferos (Heim *et al.*, 2002; Toledo-Ortiz *et al.*, 2003; Carretero-Paulet *et al.*, 2010).

La familia está definida por su dominio bHLH, conformado por 60 aminoácidos, el cual contiene dos regiones funcionales distintas: en el extremo N-terminal se encuentra la región básica, formada por 17 aminoácidos en su mayoría básicos determinan la actividad de unión al DNA y la región HLH en el extremo C-terminal, compuesta por residuos hidrofóbicos que generan dos estructuras  $\alpha$ -hélice separadas por una asa (“loop”) y que permite la dimerización que pueden ser homodímeros o heterodímeros, (Heim *et al.*, 2002; Toledo-Ortiz *et al.*, 2003; Carretero-Paulet *et al.*, 2010).

La secuencia de DNA que reconoce esta familia de FTs es el hexanucleótido consenso conocida como la caja E (5'-CANNTG-3'). Existen variantes de esta caja, que dependen de la identidad de las dos bases centrales siendo éstas: la caja G, con la secuencia 5'-CACGTG-3' y los que no se unen a la caja G, reconociendo otras bases diferentes a la caja E. Dichas cajas son reconocidas por los aminoácidos conservados en la región básica de la proteína siendo estos Glu-13 y Arg-16, mientras que el resto de los residuos de la misma región ayudan a estabilizar la posición de estos residuos clave, de tal manera que juegan un rol indirecto en la unión a DNA y que conceden la especificidad. También se han descubierto que 27 integrantes de la familia denominados proteínas HLH, no pueden unirse al DNA debido a que carecen de la región básica, pero funcionan como reguladores negativos de proteínas bHLH, ya que impiden que el bHLH con el que dimerizan no pueda interactuar con su contraparte para unirse al DNA (Heim *et al.*, 2002; Toledo-Ortiz *et al.*, 2003).

### **II.3.1 El factor de transcripción AIB**

AIB/JAM1 (“ABA-INDUCIBLE bHLH-TYPE”/“JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-LIKE1”, AT2G46510) es un factor transcripcional de 567 aminoácidos que pertenece a la familia de los bHLH, la región básica del dominio bHLH reconoce y se une a la caja E (CANNTG), mientras la región HLH es la encargada de formar dímeros (Sasaki-Sekimoto *et al.*, 2013).

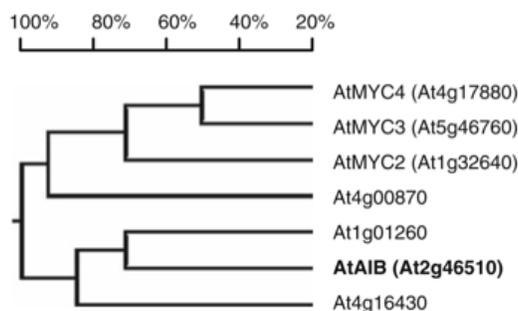
A través de la base de datos de microarreglos “genevestigator” (<https://genevestigator.com>), se identificó que el gen *AIB/JAM1* es inducible por ABA, una fitohormona involucrada en diversos procesos fisiológicos como en la germinación, la dormancia, el crecimiento de la plántula, la respuesta al estrés ambiental entre otros (Sasaki-Sekimoto *et al.*, 2013).

Por medio de un análisis tipo northern-blot se determinó que la expresión de *AIB/JAM1* es inducida por ABA y que dicha respuesta sucede rápidamente y de manera momentánea, ya que a los 15 minutos en presencia de ABA su transcrito llega al máximo nivel y a los 60 minutos regresa a ser basal, lo cual sugiere que posiblemente *AIB* tenga un papel en la vía de señalización de ABA. Se ha determinado el patrón de expresión espacio-temporal de *AIB/JAM1*; en la etapa temprana se expresa principalmente en la punta de la raíz, los cotiledones, el hipocótilo, las hojas y las células guarda, mientras que en la fase adulta se expresa en el tallo, las flores y las silicuas. Posteriormente, en un análisis a plantas transgénicas portadoras del gen reportero *GFP* (“*green fluorescent protein*”) fusionado a la región codificante de *AIB/JAM1*, se evidenció que es una proteína que se localiza en el núcleo (Li *et al.*, 2007).

Por otro lado, para evaluar la participación de *AIB/JAM1* en la respuesta a ABA, se realizó un ensayo de enverdecimiento de los cotiledones en líneas transgénicas antisentido y sobreexpresoras de *AIB/JAM1*. Los resultados revelaron que en presencia de un rango de concentración que va de 0.3 a 1  $\mu$ M de ABA, las plántulas antisentido fueron menos sensibles a este fitoregulador en comparación con las plántulas silvestres, mientras que las líneas sobreexpresoras mostraron un fenotipo de hipersensibilidad al efecto inhibitorio de ABA, en comparación con la silvestre. Aunado a esto, en las líneas sobreexpresoras se observó una mejora en la tolerancia al estrés causada por la sequía. Estos resultados sugieren que *AIB* actúa como un regulador positivo en la modulación de la respuesta a ABA en *Arabidopsis* (Li *et al.*, 2007).

Se ha determinado que *Arabidopsis* presenta una pequeña subfamilia de proteínas “*AIB-related*” del tipo bHLH, donde *AIB/JAM1* comparte un 30% de identidad en su secuencia aminoácídica, con *MYC2*, un factor de transcripción

involucrado en la señalización por ABA, jasmonato y luz (Li *et al.*, 2007). En un estudio posterior se identificó que los homólogos de AIB/JAM1 más cercanos son JAM2 (AT1G01260) y JAM3 (AT4G16430), presentando un 47% y 34% de identidad a nivel de secuencia aminoacídica con AIB, respectivamente (Figura 11), por lo que AIB adquirió el nombre JAM1. Estos tres FTs participan como reguladores negativos en la respuesta a jasmonato en *Arabidopsis* (Sasaki-Sekimoto *et al.*, 2013).



**Figura 11. Árbol filogenético de las proteínas “AIB-related” de *Arabidopsis*.** Los homólogos de AIB son JAM2 (At1g01260) y JAM3 (At4g16430) que presentan un 47% y 34% de identidad con AIB, respectivamente. Tomado de Li *et al.*, 2007; Sasaki-Semimoto *et al.*, 2013.

A través de un ensayo tipo EMSA (“Electrophoretic Mobility Shift Assay”) se evidenció que AIB/JAM1 se puede unir a variantes de la caja E (CANNTG), la caja G (CACGTG) y la secuencia MBS (“MYC2 binding sequence”), así como a la caja TG (CACGTT). También se determinó que AIB/JAM1 es un represor pasivo, no tiene actividad represora intrínseca (carece del dominio de represión transcripcional). Estas proteínas reprimen la transcripción compitiendo con activadores transcripcionales para la unión al DNA (Nakata *et al.*, 2013). Es importante hacer notar que la secuencia MBS se encuentra en la región reguladora acotada del gen *STP1*, por lo que existe la posibilidad que sea a través del reconocimiento de este elemento por lo que AIB/JAM1 participe en la respuesta a la señalización por Glc.

### III. JUSTIFICACIÓN

Diversos estudios han evidenciado las funciones que cumplen los azúcares en la célula, como ser la fuente primaria de energía, componentes estructurales y moléculas señalizadoras. Por medio de esta última función es que se regulan una gran variedad de procesos vitales en los organismos, como en el caso de las plantas.

De la gran variedad de azúcares presentes en las plantas, se ha observado que particularmente la Glc tiene un rol importante en el mecanismo de regulación génica, ya que se han identificado tres vías de señalización por Glc: dos son dependientes de HXK1 y la tercera es independiente de la actividad sensora o catalítica de esta enzima. A pesar de la existencia de estas vías de señalización, aún se desconocen en su mayoría a los elementos que participan en ellas, así como los receptores primarios y las moléculas señalizadoras intracelulares, particularmente en aquellas que no dependen de la HXK.

Estudios realizados a promotores de genes que responden a azúcares, en diferentes especies de plantas como el arroz, la cebada y el trigo, indican que la regulación por azúcares puede darse a nivel transcripcional, por medio del reconocimiento y unión de factores transcripcionales a elementos en *cis* específicos, presentes en el promotor de un gen. Para el caso particular del gen *STP1*, se ha reconocido que en su región promotora existen elementos en *cis* de respuesta a represión por azúcares y se han identificado a 10 proteínas como posibles candidatos para participar en esta respuesta, entre las cuáles se encuentran MYB122 y AIB/JAM1.

Con la finalidad de establecer efectores finales dentro de una vía de señalización, se ha abordado el estudio de la regulación de *STP1* por azúcares; la caracterización de las proteínas candidatos para la represión del gen *STP1*

permitirá posicionar a nuevos componentes en las vías de señalización de azúcares específicamente, en una vía independiente de HXK1.

## **IV. HIPÓTESIS**

Los factores de transcripción MYB122 y AIB/JAM1 funcionan como reguladores negativos (represores) de la expresión del gen *STP1* en respuesta a glucosa.

## **V. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la participación de los factores transcripcionales MYB122 y AIB en la represión del gen *STP1* por glucosa en *Arabidopsis thaliana*.

## **VI. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Determinar la expresión de *STP1* en los fondos mutantes de los factores de transcripción MYB122 y AIB, en tratamientos con glucosa.
2. Aislar y clonar los genes *MYB122* y *AIB* para generar construcciones que permitan su sobreexpresión en *A. thaliana*.
3. Generar líneas transgénicas sobreexpresoras de *A. thaliana* de los factores de transcripción MYB122 y AIB.
4. Evaluar la expresión *STP1* en plantas de las líneas sobreexpresoras de MYB122 y AIB.
5. Identificar a los elementos en *cis* de reconocimiento de los factores de transcripción MYB122 y AIB en la región promotora de *STP1*.

## **VII. MATERIALES Y MÉTODOS**

Para medios y soluciones ver apéndice.

### **VII.1 Análisis de la expresión del gen *STP1* en los fondos mutantes sometidos a tratamientos con glucosa**

#### **VII.1.1 Esterilización de semillas**

En un microtubo de 1.5 mL se colocaron semillas, se efectuó un lavado con 1 mL de etanol al 70%, agitando por 1 min aproximadamente. Se retiró el etanol y se adicionó 1 mL de solución de hipoclorito de sodio al 20%, agitando por 7 min. Después se realizaron tres lavados con 1 mL de agua estéril y finalmente, las semillas se mantuvieron en 300  $\mu$ L de agua estéril, a una temperatura de 4°C por 4 días. Las semillas se sembraron posteriormente en los medios de crecimiento correspondientes y se incubaron bajo las condiciones determinadas para cada experimentación.

#### **VII.1.2 Extracción de DNA total**

Para la extracción de DNA total se utilizaron hojas de plantas adultas crecidas en sustrato Metromix-200. Las hojas se maceraron hasta obtener un polvo fino con nitrógeno líquido en un microtubo de 1.5 mL con ayuda de pistilos para microtubos. Una vez macerado el tejido se agregaron 300  $\mu$ L de CTAB 2X, se mezcló y se incubó por 45 min a 65°C. La muestra se dejó enfriar a temperatura ambiente, se adicionaron 300  $\mu$ L de cloroformo y se agitó vigorosamente. Se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min y el sobrenadante se transfirió a un microtubo nuevo, se adicionaron 300  $\mu$ L de isopropanol y se mezcló cuidadosamente por inversión. El DNA se dejó precipitar por aproximadamente 18 h a -20°C. Se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min y se decantó el sobrenadante. El botón formado se lavó con 500  $\mu$ L de etanol al 70% y se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min. La pastilla se secó al vacío a 45°C por aproximadamente 5 min. Finalmente,

el DNA se resuspendió en 100  $\mu$ L de agua ultrapura y se calentó a 70°C por 10 min.

### **VII.1.3 Genotipificación de las líneas mutantes**

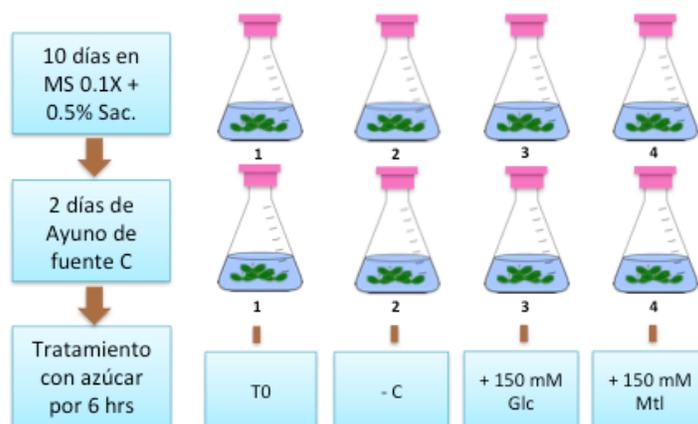
La genotipificación de las líneas mutantes CS874647 y Salk\_137512, que corresponden a AIB/JAM1 y MYB122 respectivamente, se realizó a través de la técnica PCR (“Polymerase Chain Reaction”), utilizando DNA de individuos pertenecientes a cada línea mutante y oligonucleótidos específicos para cada uno de los genes (Tabla S1). Se verificó la presencia de la inserción del T-DNA y la ausencia de amplificación del gen silvestre en cada línea mutante. Las líneas mutantes provienen del banco de TAIR, cada línea corresponde a una mutante de inserción con un T-DNA distinto (a su vez, cada una presenta resistencia a un agente selectivo diferente). Después de identificar a individuos homocigotos, se seleccionó a un individuo de cada línea mutante para llevar a la siguiente generación y realizar nuevamente la genotipificación para validar el estado homocigoto de la mutación en la nueva generación.

Una vez habiendo seleccionado la línea homocigota para cada mutante, se realizó un análisis por RT-PCR (“Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction”), para comprobar la ausencia del transcrito del gen. Para ello, se empleó cDNA y los oligonucleótidos MYB122-428Fw y MYB122-nstpRv para analizar el transcrito del gen *MYB122*, y AIB-atgB1Fw y AIB-1118Rv para el gen de *AIB*. El cDNA se generó a partir de muestras de RNA total de plantas crecidas en medio GM 1X por 10 días, utilizando el kit “M-MLV Reverse Transcriptase”, de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Se colocó en un microtubo de 1.5 mL, 3 ng de una muestra de RNA total, se adicionó 1  $\mu$ L de oligonucleótido dT (500  $\mu$ g/mL), 1  $\mu$ L de una mezcla de 10 mM de dNTP’s y 12  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O (ultrapura), se incubó por 5 min a 65°C y seguidamente se colocó en hielo. Se centrifugó brevemente para recuperar las gotas condensadas en el tubo. A continuación se agregó a la reacción 4  $\mu$ L de Buffer FS, 2  $\mu$ L de DTT y 1  $\mu$ L de inhibidor de RNAsa y se incubó por 2 min a 37°C. Posteriormente se agregó 1  $\mu$ L de enzima transcriptasa reversa y se incubó por 1 h a 37°C y por 15 min a 70°C.

Cabe señalar que el gen que se empleó como control de síntesis del cDNA fue *UBQ1* y los oligonucleótidos usados fueron UBQ1-q-F y UBQ1-q-R (Tabla S1).

#### VII.1.4 Tratamientos con glucosa

Las semillas esterilizadas de las líneas mutantes homocigotas seleccionadas CS874647 3-5-3 y Salk\_137512 2-6 se sembraron en medio líquido a base de sales de Murashige y Skoog (MS) 0.1X y MES (1X), suplementado con 0.5% de sacarosa, a pH 5.7. Se incubaron en un cuarto de crecimiento con fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad, a 21°C, en agitación continua (200 rpm). Después de 10 días de crecimiento, las plantas fueron sometidas a una etapa de ayuno, la cual consistió en suprimir la fuente de carbono por 2 días. Al término de este tiempo, se prosiguió con el tratamiento, donde el medio se reemplazó por uno sin fuente carbonada (como control de ausencia de azúcares), con 150 mM de glucosa (como tratamiento de fuente carbonada), o con 150 mM de manitol (como un control de efecto osmótico), por 6 h (Figura 12). Las plantas se colectaron y se realizó la extracción de RNA total.



**Figura 12. Esquema del tratamiento con azúcar.** Las semillas fueron sembradas en medio líquido con los nutrientes necesarios (10 días), después se sometieron a una etapa de ayuno (2 días) y finalmente fueron a tratamientos por incubación en medio MS 0.1X con 150 mM de glucosa (Glc) o 150 mM de manitol (Mtl). Los controles correspondieron a plantas colectadas al término del ayuno previo al tratamiento (T0) y a las que se incubaron en ausencia de fuente carbonada por 6 h (-C).

### **VII.1.5 Extracción de RNA total**

La extracción de RNA se realizó utilizando TRIzol<sup>®</sup> y de acuerdo al protocolo de la casa comercial. El tejido vegetal proveniente de los tratamientos fue macerado empleando nitrógeno líquido, hasta formar un polvo fino. Parte de este tejido (~100 mg) se colocaron en un microtubo de 1.5 mL, se adicionó 1 mL de “TRIzol<sup>®</sup> Reagent” y se agitó para homogenizar con ayuda de un vortex. Después se agregaron 200 µL de cloroformo, se homogenizó y se centrifugó a 12,000 g por 15 min a 4°C, formándose una interfase. La fase acuosa fue transferida a un microtubo de 1.5 mL, se adicionaron 500 µL de isopropanol y se incubó por 18 h a -20°C, para precipitar el RNA.

Una vez concluido el tiempo de precipitación, el RNA se recuperó por centrifugación a 12,000 g por 10 min a 4°C. El botón formado se lavó con 1 mL de etanol al 75% y se volvió a centrifugar a 7,500 g por 5 min a 4°C. El RNA se secó a temperatura ambiente, se resuspendió en 40 µL de agua ultrapura y se incubó a 70°C por 10 min. Finalmente, las muestras se colocaron en hielo y se cuantificó la concentración de RNA en un espectrofotómetro (nanodrop) a una longitud de onda de 260 nm.

### **VII.1.6 Análisis de expresión por northern-blot**

Para realizar el análisis de expresión se utilizaron 10 µg de RNA total, que fueron mezclados con un buffer de carga para RNA (ver apéndice), se incubaron a 65°C por 10 min y se corrieron en un gel desnaturalizante de agarosa al 1.5% con formaldehído al 37%. La electroforesis se corrió a 80 Volts durante 2 h con buffer MOPS 1X. Al finalizar el tiempo de corrida, el RNA se transfirió a una membrana de nylon (Amersham Hybond-P, GE Healthcare), utilizando SSC 10X por alrededor de 16 h. El RNA se fijó a la membrana con luz UV (Stratalinker), se enjuagó con agua destilada y se tiñó con azul de metileno para revelar los RNAs ribosomales, y se fotodocumentó para utilizarlo como control de carga.

Por otra parte, la sonda empleada se generó por medio de PCR, utilizando como templado el plásmido que porta un fragmento de 499 pb del extremo 3' del gen *STP1* y los oligonucleótidos STP1-1 y STP1-2 (Tabla S1). El producto resultante de la PCR se marcó por “random primer” empleando el kit de marcaje

Megaprime DNA labelling systems. La reacción de marcaje de la sonda fue la siguiente:

Sonda (Fragmento purificado DNA)	2 $\mu$ L
Solución de "random primers"	5 $\mu$ L
-Incubación a 95°C por 10 min.	
-Incubación en hielo por 5 min.	
"Labelling Buffer" 10X	10 $\mu$ L
Enzima Klenow	2 $\mu$ L
dCT <sup>32</sup> P[10 $\mu$ Ci/ $\mu$ L]	5 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O (ultrapura) cbp	50 $\mu$ L

La reacción de marcaje se incubó a 37°C por aproximadamente 3 h. La sonda se desnaturalizó a 95°C por 5min, se incubó en hielo por 2 min y se centrifugó brevemente y se vertió en el tubo de hibridación.

La membrana fue sometida inicialmente a una prehibridación por 4 h y posteriormente a la hibridación, adicionando la sonda marcada, por 12 h, ambas realizadas en un horno de hibridación a 65°C. Después de la hibridación, se efectuarán lavados a 65°C con las siguientes soluciones en el orden en que se muestran:

- 1) SSC 2X/SDS 0.1% (2 veces por 15 min)
- 2) SSC 0.5X/SDS 0.1% (2 veces por 15 min)
- 3) SSC 0.1X/SDS 0.1% (2 veces por 15 min)

Finalmente, se efectuó un lavado con con SSC 0.1X a temperatura ambiente, se retiró el exceso de esta solución con papel absorbente y la membrana se colocó se en un cassette para la exposición de una placa fotográfica. Se incubó por 18 h a -70°C y se reveló la placa fotográfica.

La placa fotográfica se digitalizó para realizar el análisis densitométrico de las bandas utilizando el analizador de imágenes ImageJ. En este análisis se comparó la intensidad de la banda obtenida en los tratamientos de -C, Glc y Mtl con respecto al T0 y se normalizaron con respecto al control de carga, de tal manera que se obtuvieron valores cuantitativos que son más concisos.

## **VII.2 Análisis de líneas sobreexpresoras de los factores transcripcionales MYB122 y AIB**

### **VII.2.1 Generación de las construcciones pK2GW7::MYB122 y pK2GW7::AIB**

Los genes *MYB122* y *AIB* se obtuvieron por amplificación por PCR a partir de cDNA. El cDNA se generó a partir de muestras de RNA total de plantas sometidas a tratamientos con glucosa, utilizando el kit “M-MLV Reverse Transcriptase”, de acuerdo a las indicaciones del fabricante (como se describe en la sección VII.1.3).

El cDNA de ambos genes se amplificó por PCR utilizando oligonucleótidos específicos para cada gen, los cuales introducen los sitios parciales de attB: MYB122-atgB1Fw y MYB122-stpB2Rv (Tabla S1) fueron empleados para el gen *MYB122*, mientras que para el gen *AIB* se usaron AIB-atgB1Fw y AIB-stpB2Rv (Tabla S1). Posteriormente se efectuó una segunda reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos attB1 y attB2 (Tabla S1), para generar los sitios attB completos. Los productos de PCR se purificaron con el kit “Wizard® SV Gel and PCR Clean UP System” y con éstos se efectuaron las reacciones de recombinación BP con el vector pDONR-Zeo. Una vez verificada la clonación de cada gen de interés, se realizó la reacción de recombinación LR, con el vector destino correspondiente. Para la sobreexpresión de los genes se utilizó el vector de expresión para plantas pK2GW7 (ver mapa en apéndice), el cual coloca a la secuencia de interés bajo la regulación del promotor constitutivo del Virus del Mosaico de la Coliflor, CAMV35S (p35S) y para la expresión heteróloga en bacterias, se utilizó el vector pDEST17 (ver mapa en el apéndice), que permite la fusión con el epítipo de seis histidinas en el extremo amino terminal de las proteínas.

### **VII.2.2 Transformación de *E. coli***

Se utilizaron células electrocompetentes de *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) las cuales se descongelaron en hielo, se agregaron 2  $\mu$ L de las reacciones de recombinación correspondientes y se sometieron al paso de corriente por medio de un electroporador Bio-Rad Micro pulser<sup>TM</sup>. Las células se recuperaron en 1 mL de

medio LB, por 1 h a 37°C, en agitación continua. Para la selección de las transformantes, se sembraron en cajas con medio LB bajo en sales adicionado con el antibiótico zeocina (50 µg/mL), para las clonaciones en el pDONR-Zeo: LB adicionado con espectinomomicina (100 µg/mL), para la selección de las clonas portadoras del vector pK2GW7 y para el vector pDEST17, ampicilina (100 µg/mL). Se incubaron por ~18 h a 37°C .

### **VII.2.3 Purificación de plásmido a pequeña escala de *E. coli* (MINIPREP)**

La purificación de los plásmidos se realizó de un cultivo de 3 mL, de *E. coli*, de 18 h de incubación en LB adicionado con el antibiótico correspondiente. Se transfirieron 1.5 mL de este cultivo a un microtubo de 1.5 mL y se centrifugó por 1 min a 7,000 rpm. Se dejaron 50 µL del medio para resuspender el botón celular y se adicionaron 300 µL de solución TENS y se mezcló cuidadosamente. Posteriormente se agregaron 150 µL de acetato de sodio (3 M, pH 5.2), se homogenizó y se centrifugó por 10 min a 13,000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un microtubo de 1.5 mL nuevo y se agregaron 900 µL de etanol absoluto frío. La mezcla se centrifugó por 10 min a 13,000 rpm, el botón formado se lavó con 1 mL de etanol al 70% y se centrifugó por 5 min a 13,000 rpm. El DNA se secó por centrifugación al vacío y se resuspendió en 50 µL de agua ultrapura y se adicionaron 3 µL de RNAsa (5 mg/mL).

### **VII.2.4 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens***

Se utilizaron células electrocompetentes de la cepa C58 de *Agrobacterium tumefaciens*, las cuales se descongelaron en hielo y se adicionaron alrededor de 3 µg de los plásmidos pK2GW7::MYB122 y pK2GW7::AIB. Las células se electroporaron y se recuperaron en 1 mL de medio LB por incubación por 3 h a 28°C, en agitación continua (225-250 rpm). Después se sembraron en cajas con medio LB adicionado con ampicilina (100 µg/mL), rifampicina (100 µg/mL) y espectinomomicina (100 µg/mL), y se incubaron a 28°C por 2 a 3 días.

### **VII.2.5 Transformación de *Arabidopsis thaliana* con *A. tumefaciens***

Se utilizaron plantas de *Arabidopsis* (Col-0), las cuales se crecieron en sustrato Metromix-200, en condiciones de fotoperiodo 16 h luz/8 h oscuridad, a 21°C. Al momento que las plantas presentaron la formación de las primeras silicuas en el escapo principal, se eliminó el meristemo apical para inducir la formación de nuevos meristemos florales laterales (de esta manera se obtuvieron más botones florales para transformar). La agroinfiltración se llevó a cabo por el método de inmersión floral. Para esto, se crecieron cultivos de *A. tumefaciens* portadoras de cada una de las construcciones en medio LB con rifampicina, ampicilina y espectinomicina, y se incubaron a 28°C, por 18 h. Los cultivos se centrifugaron y el botón celular se resuspendió con medio de infiltración, para generar una agrosuspensión. Las plantas se colocaron hacia abajo en un recipiente donde se vertió la agrosuspensión, de tal manera que los botones florales se encontraran en contacto con la agrosuspensión y se aplicó vacío por 1 min. Las plantas se rociaron con agua, utilizando un aspersor y se colocaron de manera horizontal en una charola con un domo. Después de 24 h, las plantas se enjuagaron con agua destilada y se colocaron de manera vertical, en condiciones de fotoperiodo. Las semillas que se obtuvieron de dichas plantas transformadas correspondieron a la T1.

### **VII.2.6 Selección y validación de las plantas transgénicas**

Para la selección de las plantas transgénicas las semillas T1 fueron sembradas en medio GM 1X con kanamicina (50 µg/mL). Las plantas resistentes mostraron enverdecimiento de los cotiledones las cuales después de 10 días de crecimiento, se transfirieron a sustrato Metromix-200 para que continuaran con su desarrollo y generaran la siguiente generación T2. Durante este periodo, cuando la planta mostró la roseta ya desarrollada, se cortó una hoja de cada individuo, para realizar la extracción de DNA genómico. Por medio de la técnica de PCR utilizando el DNA genómico que previamente se extrajo y oligonucleótidos específicos (uno oligonucleótido sobre el promotor 35S y otro sobre la secuencia del gen), se confirmó la presencia del transgen. Para validar las líneas transgénicas de la construcción pK2GW7::MYB122, se emplearon los

oligonucleótidos 35SminFTOPO y MYB122-nstpRv (Tabla S1), mientras que para pK2GW7::*AIB* fueron 35SminFTOPO y AIB-1118Rv (Tabla S1).

### **VII.2.7 Obtención y validación de las líneas homocigotas**

Para generar líneas homocigotas con una sola inserción de las construcciones, semillas de la T2 se sembraron en medio con kanamicina (50 µg/mL), considerando una proporción fenotípica 3:1. Las poblaciones de plantas T2 que mostraron 75% de plantas resistentes a kanamicina (50 µg/mL) se seleccionaron para obtener la generación T3. La generación T3 se evaluó nuevamente en presencia de kanamicina (50 µg/mL). Las poblaciones que mostraron un 100% de plantas resistentes a kanamicina (50 µg/mL) permitieron identificar a las líneas homocigotas; confirmó el estado homocigoto de las líneas en T2.

A partir de las líneas seleccionadas que mostraron 100% de plántulas resistentes a kanamicina (50 µg/mL) se extrajo RNA total, para analizar los niveles de expresión de los transcritos de *MYB122* o *AIB* por northern-blot e identificar a las líneas sobreexpresoras. El procedimiento fue similar al que se describe en la sección VII.1.5, con excepción que se utilizó una sonda específica para cada gen. La sonda se obtuvo por medio de la técnica de PCR, utilizando DNA genómico y oligonucleótidos específicos para *MYB122*, MYB122-428Fw y MYB122-nstpRv y para *AIB*, AIB-648Fw y AIB-1118Rv (Tabla S1).

Habiendo validado la sobreexpresión por northern-blot y el 100% de resistencia al antibiótico de selección, se eligieron dos líneas independientes para 35S::*AIB* y 35S::*MYB122* pertenecientes a la T3, para ser sometidas al tratamiento con Glc y al análisis tipo northern-blot, para la evaluación de la expresión de *STP1*.

### **VII.3 Identificación de los elementos en cis de reconocimiento de los factores transcripcionales MYB122 y AIB**

Se efectuó la clonación del cDNA de MYB122 y AIB en vectores de expresión heteróloga en *E. coli* y se logró purificar la proteína AIB. Utilizando las proteínas purificadas se pretende realizar ensayos tipo EMSA ("Electrophoretic

Mobility Shift Assay”) para determinar si existe interacción entre la proteínas de interés con una región específica de DNA.

### **VII.3.1 Transformación de la cepa BL21(DE3)pLysS de *E. coli***

Se utilizaron células electrocompetentes de la cepa BL21(DE3)pLysS de *E. coli*, las cuales se descongelaron en hielo y se adicionó 1 µg del plásmido correspondiente a las construcción pDEST17::MYB122 o pDEST17::AIB. Las células se electroporaron, se recuperaron en 1 mL de medio LB y se incubaron por 1 h a 37°C, en agitación continua (225-250 rpm). Después se sembraron en cajas con medio LB adicionado con ampicilina (100 µg/mL) y se incubaron a 37°C por 18 h.

### **VII.3.2 Expresión de proteína recombinante en células competentes BL21(DE3)pLysS**

Se inocularon 5 mL de LB adicionado con ampicilina (100 µg/mL) y cloranfenicol (50 µg/mL), con células BL21(DE3)pLysS transformadas, y se incubaron a 37°C por 18 h. Después, se tomaron 2 mL de dicho cultivo para inocular 1 L de LB (sin antibióticos) y se incubó a 30°C hasta que alcanzó una densidad óptica (OD<sub>600nm</sub>) de 0.6–0.8. Habiendo alcanzado la OD óptima, se tomó una muestra de 10 mL del cultivo, que correspondió al control previo a la inducción (sin IPTG). La muestra se centrifugó a 7000 rpm por 10 min a 4°C, y el botón de bacterias que se obtuvo se guardó a -20°C. Por otra parte, al cultivo restante se adicionó IPTG (a una concentración final de 1 mM), se incubó por 6 h a 30°C en agitación continua (220-250 rpm). Concluido este periodo, se colectó el cultivo y se centrifugó a 7000 rpm por 20 min a 4°C. Para la purificación se llevó a cabo la lisis celular para liberar la proteína recombinante. El pellet obtenido (las muestras: sin IPTG y con IPTG), se resuspendió en Buffer de lisis (a partir de un cultivo de 200 mL se agrega 10 mL de Buffer de lisis) adicionado con 1 mg/mL de lisozima y 1 µL/mL de inhibidor de proteasa. Una vez resuspendido el pellet se colocó a -70°C por 1 h, esta temperatura se recomienda para que la lisozima sea más eficiente. Concluida la hora, el pellet se descongeló a temperatura ambiente y se centrifugó a 10,000 rpm por 30 min a 4°C. La fracción de proteína soluble se colocó en un

nuevo tubo y la fracción de proteína insoluble se volvió a resuspender en un menor volumen de Buffer de lisis. Posteriormente, ambas fracciones de proteína (20 µg totales) fueron analizadas por SDS-PAGE al 10%, el cual se tiñó con Azul de Coomassie.

### **VII.3.3 Análisis de la proteína recombinante por western-blot**

La expresión de la proteína recombinante se validó por medio de un análisis tipo western-blot empleando un anticuerpo contra el epítipo de histidinas que contiene la proteína recombinante. Se analizaron las fracciones de las proteínas (20 µg totales) por SDS-PAGE al 10% y después fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa empleando Buffer de transferencia, a una corriente constante de 350 mA. Para verificar la transferencia de las proteínas la membrana se tiñó con el reactivo de Ponceau, se lavó con agua destilada y se fotodocumentó. La membrana se bloqueó con una solución de leche descremada al 5% disuelta en PBS 1X con tritón al 0.5% y se incubó por 18 h a 4°C. Posteriormente, se desechó la solución de bloqueo y la membrana se lavó tres veces con PBS 1X + Tritón al 0.5% (por 10 min cada vez), en agitación moderada. Se agregó el anticuerpo primario ( $\alpha$ His 1:6000 en PBS 1X con tritón al 0.5%) y se incubó por 1 h en agitación moderada. Enseguida se realizaron tres lavados con la solución PBS 1X + Tritón al 0.5% en agitación moderada. Se agregó la solución con el anticuerpo secundario (HRP 1:3000 en PBS 1X con tritón al 0.5%) y se dejó por 1 h en agitación. Se prosiguió con tres lavados por 10 min con la solución de PBS 1X + Tritón al 0.5%, en agitación. Para revelar la proteína recombinante se empleó la reacción de quimioluminiscencia, utilizando el kit SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate (ThermoFisher).

### **VII.3.4 Purificación de la proteína recombinante por cromatografía de afinidad**

Para la purificación de las proteínas recombinantes se utilizó resina de Ni-NTA Agarose (Qiagen). Se transfirió 1 mL de la solución homogénea de la resina a un tubo cónico de 14 mL (1 mL resina/10 mL de extracto de proteína soluble). La

resina se dejó precipitar para remover el sobrenadante, e inmediatamente la resina se resuspendió en 2.5 mL de Buffer de lisis ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM + NaCl 300 mM + Imidazol 10 mM, a pH 8). Una vez que la resina volvió a precipitarse, se retiraron 2 mL del sobrenadante. A la resina se le adicionaron 10 mL de la muestra de la fracción de proteína soluble y se dejó incubando en un “roller” por 18 h a 4°C.

Concluido el tiempo de incubación, la mezcla resina-proteína se colocó en una columna de polipropileno de 5 mL (Qiagen). Una vez que la resina precipitó, se removió la tapa y se colectó la fracción de proteína no retenida por la resina. A la resina retenida en la columna de polipropileno se le agregaron 5 mL de Buffer de lavado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM + NaCl 300 mM + Imidazol 20 mM, a pH 8). Finalmente, la proteína recombinante se eluyó cinco veces utilizando 500  $\mu\text{L}$  de Buffer de elución ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50mM + NaCl 300 mM + Imidazol 500 mM, a pH 8) cada vez, y cada una de estas fracciones se colectó por separado en microtubos de 1.5 mL. Concluida la purificación por cromatografía de afinidad, se realizó el analisis de las fracciones obtenidas durante la marcha de la purificación por SDS-PAGE al 10% y por western-blot, para verificar la fracción enriquecida con la proteína de interés.

## VIII. RESULTADOS

### VIII. 1 Genotipificación de las líneas mutantes de *AIB* y *MYB122*

Para elucidar la participación biológica de los factores transcripcionales *AIB* y *MYB122* en la represión del gen *STP1* en respuesta a glucosa, se analizaron las líneas mutantes de *A. thaliana* CS874647 y Salk\_137512 que portan una inserción de T-DNA en los genes *AIB* (AT2G46510) y *MYB122* (AT1G74080), respectivamente, que fueron adquiridas del banco “Salk Institute Genomic Analysis Laboratory” ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)). Es importante resaltar que una mutante por inserción de T-DNA en estado homocigoto hace referencia a que las dos copias de la secuencia nucleotídica de un determinado gen se encuentran interrumpidas por el T-DNA, y por ende, la formación de un producto proteínico se ve afectada.

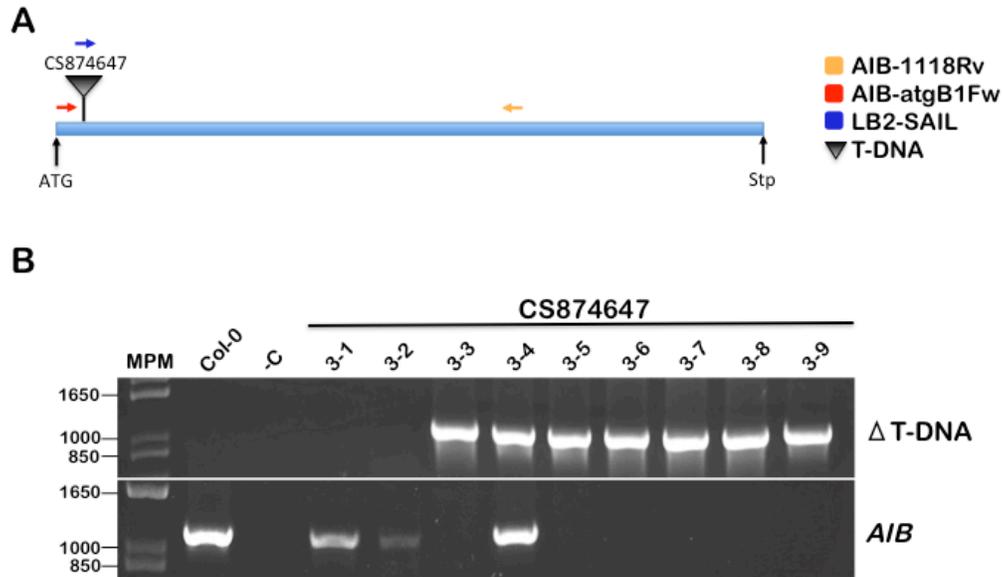
Para verificar que las mutantes obtenidas presentaran la inserción de T-DNA en los genes *AIB* y *MYB122*, se llevó a cabo la genotipificación de las líneas mutantes por la técnica de PCR, utilizando DNA genómico proveniente de individuos (plantas independientes) de cada línea mutante y oligonucleótidos específicos (Tabla S1), para cada caso. Posteriormente, para determinar la ausencia de transcrito en las mutantes *aib* y *myb122*, se realizó un análisis por RT-PCR y finalmente, se evaluó la expresión de *STP1* en presencia de glucosa en estos fondos mutantes.

#### VIII. 1. 1 Genotipificación de *aib*

De acuerdo a la información obtenida del banco de TAIR, la línea CS874647 presenta la inserción del T-DNA cerca del inicio de la traducción, como se muestra en la figura 13A. Para corroborar la inserción del T-DNA se emplearon los oligonucleótidos LB2-SAIL, que se posiciona en el borde izquierdo del T-DNA (flecha azul; Figura 13A) y AIB-1118Rv sobre *AIB* (flecha amarilla; Figura 13A). Este par de oligonucleótidos permitieron la amplificación de un producto de 1070

pb, en las plantas que contienen la inserción. Por otra parte, para corroborar la homocigosis de la línea, se requirió confirmar la ausencia de amplificación del locus de interés, debido a la interrupción de éste con el T-DNA. Para esto, se utilizaron los oligonucleótidos AIB-atgB1Fw (flecha roja; Figura 13A) y AIB-1118Rv (flecha amarilla; Figura 13A), que se posicionan sobre el *locus* de interés y que bordean los extremos 5' y 3' del T-DNA respectivamente, permitiendo la amplificación de un producto de 1118 pb que correspondió al gen silvestre, en las plantas que carecen de la inserción o bien, que se encontraron en estado heterocigoto.

La genotipificación de nueve individuos correspondientes a la línea CS874647, permitió evidenciar que siete individuos que presentaron amplificación positiva de un producto del tamaño esperado de 1070 pb, portan la inserción del T-DNA en el locus correspondiente (Figura 13B). Asimismo, se evidenció que de estos siete, seis exhibieron ausencia de amplificación del gen silvestre *AIB* (Figura 13B), por lo tanto, estos resultados permitieron determinar que dentro de los nueve individuos analizados, seis son homocigotos para la mutación de *AIB*.

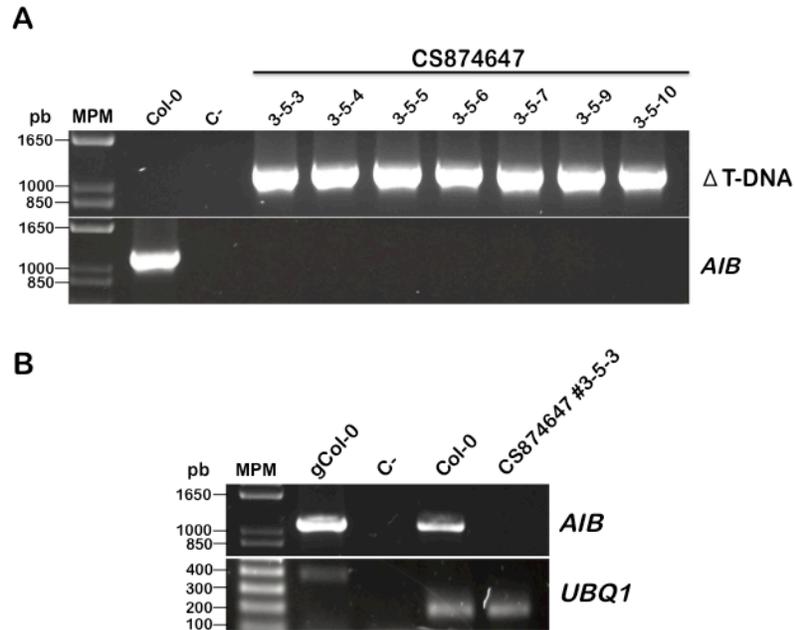


**Figura 13. Genotipificación de la línea CS874647.** **A.** Esquema del locus correspondiente a *AIB*, ATG2G46510, donde se muestra el posicionamiento de los oligonucleótidos utilizados para la genotipificación y la inserción del T-DNA. La secuencia de *AIB* no presenta intrones, está constituido por un solo exón (caja azul). Las flechas en color indican el posicionamiento de los oligonucleótidos específicos, de acuerdo al código presentado (en la parte derecha), y el triángulo invertido indica la localización de la inserción del T-DNA, de acuerdo al banco de Salk. **B.** Productos de la amplificación por PCR del inserto de T-DNA ( $\Delta$ T-DNA) y del gen silvestre *AIB*. Los carriles corresponden a los individuos analizados de la parental CS874647. Col-0, DNA genómico silvestre; C-, control negativo (mezcla de PCR sin templado). MPM, marcador de peso molecular. Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 1% y se tiñeron con bromuro de etidio.

A partir del individuo CS874647 #3-5, homocigoto para la inserción de T-DNA, se obtuvo la siguiente generación. La progenie derivada de esta planta fue sembrada en medio GM 1X y después de 10 días, siete plántulas fueron transferidas a macetas con sustrato para completar su desarrollo y obtener la siguiente generación. Los siete individuos fueron sometidos al mismo análisis anterior de genotipificación, para corroborar la homocigosis de la mutación de *AIB* (durante su desarrollo se colectó una hoja de la roseta para extraer DNA genómico). Se evidenció que los siete individuos analizados mostraron amplificación positiva para la presencia del T-DNA y ausencia de amplificación del

gen silvestre *AIB* (Figura 14A). Estos resultados permitieron validar que debido a que la nueva generación obtenida es homocigota, la línea parental inicial (CS874647 #3-5) es a su vez homocigota para la mutación por inserción de T-DNA en *AIB*.

Con la finalidad de determinar el efecto de la inserción del T-DNA en la expresión de *AIB* en las línea mutante seleccionada, se realizó un análisis por RT-PCR. A partir de una hoja de la roseta del individuo CS874647 #3-5-3 se extrajo RNA total (ver materiales y métodos) y se generó cDNA. Por medio de PCR, utilizando como templado el cDNA obtenido y los oligonucleótidos AIB-atgB1Fw y AIB-1118Rv (Figura 13A), se realizó la amplificación de la secuencia del transcrito de *AIB*. Al corroborar el producto de la amplificación, se observó que el individuo analizado no mostró amplificación de *AIB* (Figura 14B), esto indica que la presencia de la inserción del T-DNA interrumpe la secuencia del gen, evitando la generación del transcrito de *AIB*. Por lo tanto, se concluyó que el individuo CS874647 #3-5-3 es una mutante nula de *AIB* (de ahora en adelante será referida como la mutante *aib*).

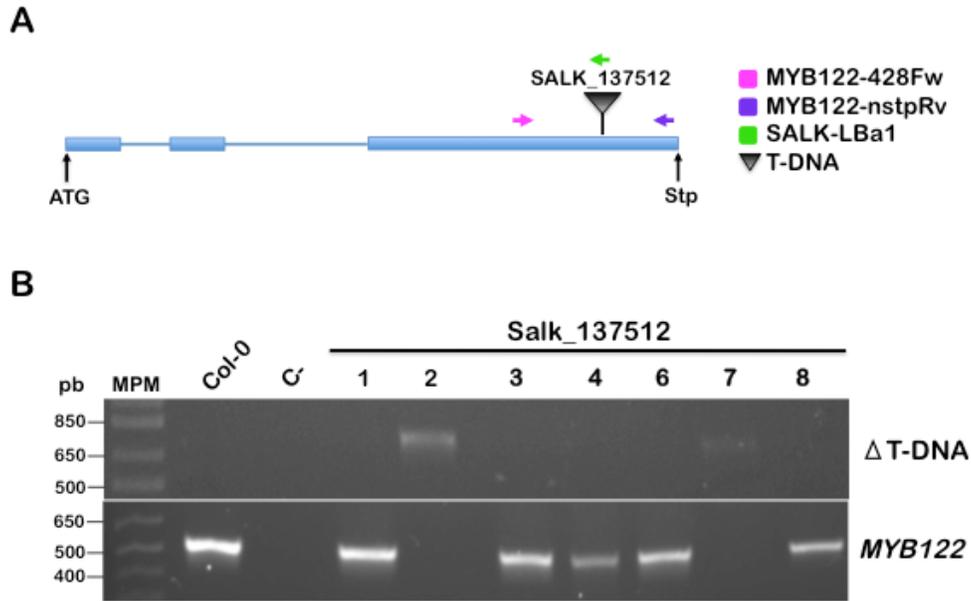


**Figura 14. Análisis de expresión en la mutante homocigota en *AIB*.** **A.** Genotipificación de la línea CS874647 #3-5. Productos de amplificación por PCR de la inserción de T-DNA ( $\Delta$ T-DNA) y del gen silvestre *AIB*. Los carriles corresponden al DNA genómico de individuos provenientes del parental CS874647 #3-5. Col-0, DNA genómico silvestre; C-, control negativo; MPM, marcador de peso molecular. **B.** Análisis de expresión de *AIB* por RT-PCR. El RNA total se aisló de una hoja de la roseta de una planta tipo silvestre (Col-0) y del individuo CS874647 #3-5-3, se generó el cDNA y se realizó una amplificación por PCR, utilizando como templado el cDNA y los oligonucleótidos AIB-atgB1Fw y AIB-1118Rv. Como control positivo de la reacción de PCR se utilizó DNA genómico de plantas tipo silvestre (gCol-0), y como control negativo la mezcla sin templado (C-). Se empleó el gen de *UBIQUITINA 1* como control de la síntesis de cDNA, *UBQ1*. El tamaño del producto de *UBQ1* a partir de DNA genómico de plantas tipo silvestre es de 400 pb aproximadamente, mientras que el producto proveniente del cDNA es de menor tamaño (190 pb). La productos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 1% y se tiñeron con bromuro de etidio.

## VIII. 1. 2 Genotipificación de *myb122*

La evaluación de la línea mutante Salk\_137512 correspondiente al gen *MYB122*, se realizó de manera similar al de la mutante de *AIB*. La inserción del T-DNA de la línea Salk\_137512 se localiza en el extremo 3', como se observa en la figura 15A. Para confirmar la inserción del T-DNA se emplearon los oligonucleótidos MYB122-428Fw y SALK-LBa1 (flecha rosa y verde,

respectivamente; Figura 15A), que generaron un producto de 750 pb mediante PCR, en las plantas que portan la inserción. Por otra parte, para la verificación del estado homocigoto de la mutación, se utilizaron los oligonucleótidos MYB122-428Fw y MYB122-nstpRv (flecha rosa y morada, respectivamente; Figura 15A), que permitieron la amplificación de un fragmento de 570 pb. En un análisis a siete individuos se evidenció que dos de ellos mostraron amplificación positiva para la inserción del T-DNA, ya que se observó una banda con el tamaño esperado (750 pb, Figura 15B). Cabe mencionar que estos mismos individuos mostraron ausencia de amplificación del gen silvestre *MYB122*, mientras que el resto de los individuos analizados presentaron amplificación de un producto de 570 pb, que corresponde al esperado para el gen silvestre (Figura 15B). A razón de estos resultados, se determinó que dentro de los siete individuos analizados, dos son homocigotos para la mutación en *MYB122* (Figura 15B).

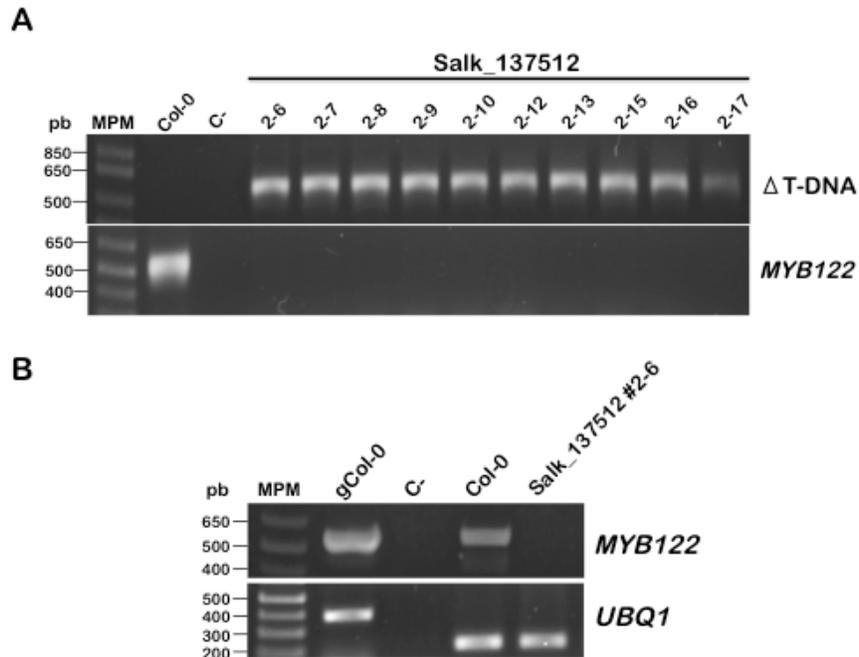


**Figura 15. Genotipificación de la línea Salk\_137512.** **A.** Posicionamiento de los oligonucleótidos y de la inserción del T-DNA sobre el locus AT1G74080 (*MYB122*). Las cajas y líneas en azul indican los exones e intrones, respectivamente. Las flechas en color indican el posicionamiento de los oligonucleótidos utilizados (indicados a la derecha). El triángulo invertido indica la localización de la inserción del T-DNA. **B.** Productos de amplificación por PCR del inserto de T-DNA ( $\Delta$ T-DNA) y del gen silvestre *MYB122*. Se indican los carriles correspondientes a la amplificación con el DNA genómico de los individuos analizados. Col-0, DNA genómico silvestre; C-, control negativo; MPM, marcador de peso molecular. Las productos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 1% y se tñieron con bromuro de etidio.

Semillas provenientes del individuo Salk\_137512 #2 fueron sembradas en medio GM 1X y después de 10 días, algunas plántulas fueron transferidas a sustrato para que concluyeran su ciclo de vida y obtener la siguiente progenie. Esta nueva generación obtenida fue analizada para verificar el estado homocigoto de la mutación. El resultado de la genotipificación de diez individuos confirmaron que efectivamente se trató de una generación homocigota, ya que todos ellos mostraron amplificación positiva del inserto de T-DNA y ausencia del producto del gen silvestre *MYB122* (Figura 16A).

A partir de una hoja de la roseta del individuo Salk\_137512 #2-6 se extrajo RNA total, y se sintetizó cDNA. Utilizando el cDNA como templado y los

oligonucleótidos MYB122-428Fw y MYB122-nstpRv, se realizó una amplificación por PCR para verificar la presencia del transcrito del gen *MYB122*. El resultado obtenido reveló que el individuo Salk\_137512 #2-6 es una mutante nula (en adelante referida como *myb122*), ya que no mostró amplificación de la región codificante de *MYB122* (Figura 16B).



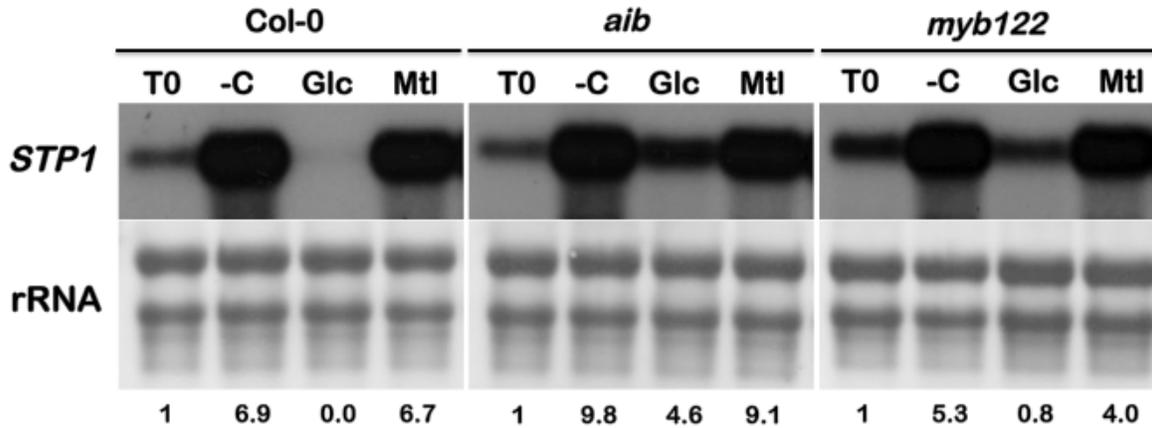
**Figura 16. Análisis de la mutante homocigota *myb122*.** **A.** Genotipificación de la línea Salk\_137512 #2. Se muestran los productos de amplificación por PCR de la inserción de T-DNA ( $\Delta$ T-DNA) y del gen silvestre *MYB122*. Los carriles corresponden al DNA genómico de individuos provenientes del parental Salk\_137512 #2. Col-0, DNA genómico silvestre; C-, control negativo (mezcla sin templado); MPM, marcador de peso molecular. **B.** Análisis de expresión de *MYB122* por RT-PCR. El RNA total se aisló de una hoja de la roseta de una planta tipo silvestre (Col-0) y del individuo Salk\_137512 #2-6, se generó cDNA y se realizó la amplificación por PCR utilizando como templado el cDNA obtenido y los oligonucleótidos MYB122-428Fw y MYB122-nstpRv. gCol-0, DNA genómico silvestre; C-, control negativo; MPM, marcador de peso molecular. Se empleó el gen de *UBIQUITINA 1 (UBQ1)*, como control de la síntesis de cDNA. Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 1% y se tiñeron con bromuro de etidio.

## VIII.2 Análisis de expresión del transcrito de *STP1* en respuesta a azúcares en las mutantes *aib* y *myb122*

Habiendo corroborado el estado homocigoto y la ausencia del transcrito en las mutantes *aib* y *myb122*, se prosiguió a evaluar el efecto de la ausencia de los FTs AIB y MYB122 en la represión de *STP1*, en respuesta a glucosa. Cabe señalar que ambas mutantes no mostrarán un fenotipo visible alterado en condiciones de crecimiento control (MS 1X + 2% sacarosa) en comparación con el fenotipo silvestre. Las plantas mutantes fueron crecidas en medio líquido (MS 0.1X) con sacarosa por 10 días, con una fase de ayuno de fuente carbonada por 2 días y tratadas por 6 h con medio sin fuente de carbono o con 150 mM de glucosa (Glc) o 150 mM de manitol (Mtl) (Tampoco se observó un fenotipo visible alterado en presencia de los azúcares utilizados, respecto a la silvestre) (ver materiales y métodos). Las plantas se colectaron y el análisis de expresión de *STP1* se efectuó por northern-blot.

El resultado del northern-blot mostró que los niveles del transcrito del gen *STP1* en la planta silvestre (utilizada como un control) se redujeron en presencia de Glc, con respecto al tiempo inicial (T0). Por otra parte, en la condición de ausencia de carbono (-C) o en presencia de manitol (Mtl), el nivel del transcrito de *STP1* aumentó en comparación con el T0. Considerando que la muestra T0 correspondió al nivel basal de *STP1* antes de los tratamientos correspondientes, esto permitió establecer que los niveles de *STP1* se reprimen por la presencia de Glc. En contraste, en el caso de las mutantes *aib* y *myb122*, se observó que la represión por Glc se pierde en ambas mutantes, aunque en niveles variables entre cada ensayo (Suplementaria S1), ya que se presentó acumulación del transcrito de *STP1* en comparación con la planta silvestre bajo la misma condición (Figura 17). Cabe señalar que la acumulación del transcrito no llegó al nivel que se presentó en las condiciones de -C o Mtl, tanto en la planta silvestre como en las mutantes. Esto sugiere que sería necesaria la presencia de un activador para alcanzar los niveles presentes en ausencia de Glc. También se observó que el patrón de expresión de *STP1* en las condiciones de -C y Mtl de las mutantes *aib* y *myb122* es similar a la silvestre (Figura 17), esto indica que el tratamiento se

efectuó correctamente y que el comportamiento del transcrito de *STP1* observado se debe a la presencia de la Glc.



**Figura 17. Análisis del transcrito de *STP1* en respuesta a glucosa (Glc), en las mutantes *aib* y *myb122*.** Se muestra el resultado representativo del análisis por northern-blot de tres experimentos independientes. El RNA total fue extraído de plántulas crecidas en medio líquido (MS 0.1X) con sacarosa por 10 días, sometidas a 2 días de ayuno de fuente de carbono y tratadas por 6 hrs sin fuente de carbono (-C) o con 150 mM de glucosa (Glc) o de manitol (Mtl). T0, muestra correspondiente al control inicial, previo a los tratamientos. Cada carril contiene 10 µg de RNA total que se hibridó con una sonda radioactiva específica para *STP1*. Se muestra el rRNA como control de carga. Col-0, RNA proveniente de plantas tipo silvestre. Los valores indicados debajo de los carriles corresponden a la cuantificación densitométrica con respecto al T0 y normalizados con respecto al control de carga.

A pesar que las mutantes mostraran variaciones en el nivel del transcrito de *STP1* en presencia de Glc en cada ensayo independiente, en todas las réplicas biológicas se observó una pérdida de represión. Estos resultados permitieron determinar que los factores de transcripción AIB y MYB122 están involucrados en la represión de *STP1* en respuesta a Glc.

### VIII. 3 Obtención de plantas transgénicas sobreexpresoras de *AIB* y *MYB122*

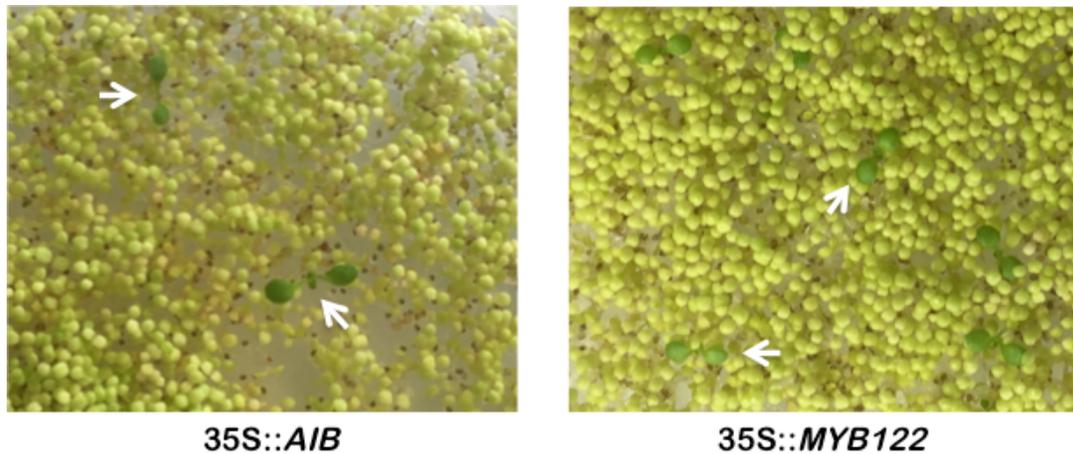
Con la finalidad de confirmar la participación de AIB y MYB122 como represores de *STP1* en respuesta a Glc, se efectuó el análisis de expresión en

plantas sobreexpresoras de estos factores transcripcionales, en las cuales se espera obtener una represión exacerbada.

Inicialmente se amplificó la región codificante de *AIB* y *MYB122* por PCR a partir de cDNA. Cabe señalar que los oligonucleótidos específicos utilizados se diseñaron para generar sitios *attB* en los extremos 5' y 3' del gen, necesarios para la clonación por el sistema Gateway. Una vez amplificados los fragmentos de DNA de 1700 y 1000 pb, que corresponden *AIB* y *MYB122* respectivamente, se purificaron y se clonaron en el vector de entrada pDONR-Zeo y posteriormente se subclonaron en el vector binario de expresión para plantas pK2GW7.

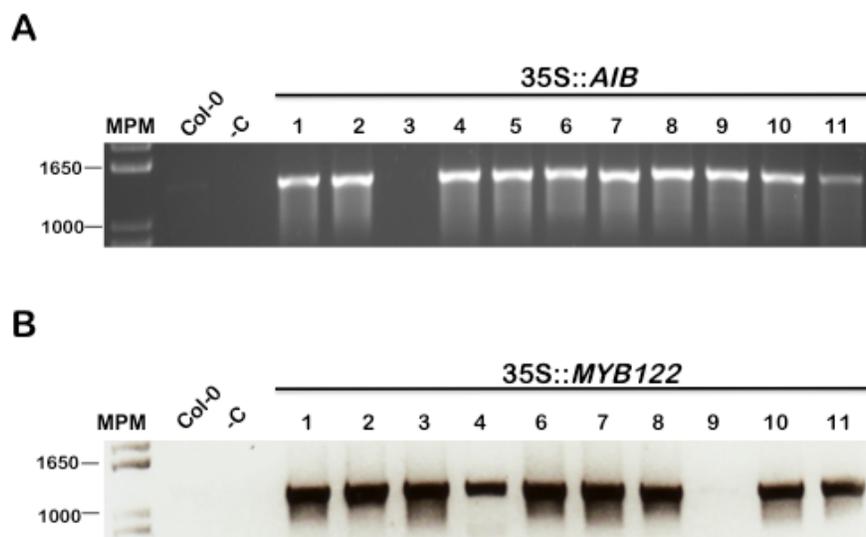
El vector pK2GW7 contiene un sitio/segmento/fragmento/región de T-DNA, el cual está constituido por el gen de selección *nptII*, que confiere resistencia al antibiótico kanamicina para la selección de las plantas transgénicas; el promotor y terminador 35S, para la expresión constitutiva del gen de interés, entre los cuales se introdujo la región codificante de *AIB* o *MYB122* y los bordes derecho (RB) e izquierdo (LB), que permiten el reconocimiento y transferencia del T-DNA al genoma vegetal. Los plásmidos portadores de *AIB* y *MYB122* fueron posteriormente transferidos a *A. tumefaciens* (C58). Utilizando estas cepas de *A. tumefaciens* se procedió a transformar plantas de *Arabidopsis* (Col-0), con cada una de las construcciones por el método de inmersión floral (descrito en métodos).

Las semillas T1 provenientes de las plantas transformadas se colectaron y se seleccionaron en medio GM 1X adicionado con kanamicina (50 µg/mL). Las plantas transgénicas resistentes a kanamicina, mostraron un fenotipo de cotiledones verdes (Figura 18), y fueron transferidas a macetas con sustrato para completar su desarrollo y obtener semillas de la generación T2. Las líneas transformadas con las construcciones en pK2GW7 para sobreexpresar *AIB* y *MYB122* fueron nombradas como 35S::*AIB* y 35S::*MYB122*, respectivamente.



**Figura 18. Selección de las plantas transgénicas 35S::*AIB* y 35S::*MYB122*.** Selección de las plantas transgénicas (T1), con la construcción pK2GW7::*AIB* (35S::*AIB*) o pK2GW7::*MYB122* (35S::*MYB122*), en medio GM 1X adicionado con kanamicina (50 µg/mL). Las plantas resistentes mostraron un fenotipo de cotiledones verdes (flecha), mientras que las plantas no resistentes presentaron cotiledones verde pálido.

Utilizando una muestra de hoja de las planta seleccionadas de la T1 se confirmó la presencia del inserto del T-DNA, a través de PCR, utilizando oligonucleótidos específicos sobre la secuencia del gen *AIB* (AIB-1118Rv) o *MYB122* (MYB122-nstpRv), en combinación con el oligonucleótido 35SminTOPOFw, que se posicionó sobre el promotor 35S. Se seleccionaron 11 plantas para la construcción con *AIB*, de las cuales 10 mostraron amplificación de un producto de 1300 pb, que correspondió a la fusión del promotor 35S con la región codificante de *AIB* (Figura 19A). Para las plantas transformadas con la construcción 35S::*MYB122*, 9 de 10 plantas seleccionadas exhibieron amplificación de un producto de PCR de 1100 pb, que correspondió a la fusión del promotor 35S con la región codificante de *MYB122* (Figura 19B).



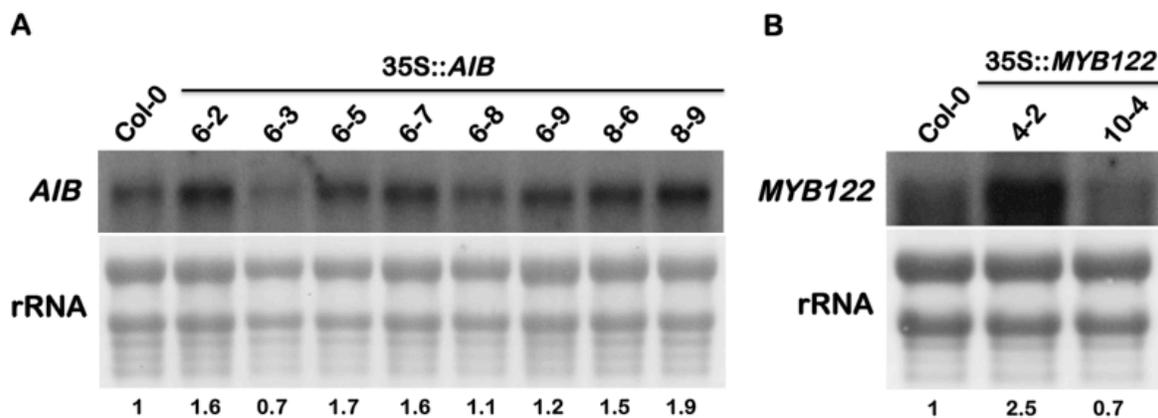
**Figura 19. Confirmación de la presencia de los transgenes *AIB* y *MYB122* en las plantas seleccionadas.** Se muestra la amplificación de los productos de PCR correspondientes a la fusión del promotor 35S con el gen respectivo *AIB*, en A o *MYB122* en B, en plantas T1 resistentes a kanamicina. Col-0, DNA genómico de plantas tipo silvestre; C-, control negativo; MPM, marcador de peso molecular. Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 1% y se tiñeron con bromuro de etidio.

Con la finalidad de generar líneas homocigotas con una sola inserción de las construcciones, semillas de la T2 fueron evaluadas para la segregación de la resistencia al agente selectivo (kanamicina), considerando que una proporción fenotípica 3:1 corresponde a una herencia mendeliana monogénica, donde el transgen se comporta como un alelo dominante. De esta manera, las poblaciones de plantas T2 que mostraron 75% de plantas resistentes a kanamicina se seleccionaron para obtener la generación T3, tratándose de líneas transgénicas portadoras de una sola inserción de los transgenes de interés.

Para confirmar el estado homocigoto de la inserción en las líneas transgénicas, la generación T3 se evaluó nuevamente en presencia de kanamicina. Las poblaciones que mostraron un 100% de plantas resistentes a kanamicina permitieron identificar a las líneas homocigotas; esto confirmó el estado homocigoto de las líneas en T2. Para los análisis posteriores se utilizaron

semillas pertenecientes a la T3 siendo dos líneas independientes tanto para 35S::*AIB* y para 35S::*MYB122*.

Para determinar la sobreexpresión de los genes correspondientes, se analizaron los niveles de expresión de *AIB* y *MYB122* por northern-blot en las líneas homocigotas seleccionadas. El resultado de este análisis mostró que plantas pertenecientes a las dos líneas 35S::*AIB* (6 y 8), presentaron un nivel del transcrito de *AIB* mayor en comparación con la silvestre (Col-0) (Figura 20A). Debido a que las líneas independientes 35S::*AIB* 6-2 y 35S::*AIB* 8-9 presentaron los niveles más elevados de sobreexpresión del factor de transcripción *AIB* en comparación con el resto de las líneas, fueron seleccionadas para llevar a cabo el análisis de expresión de *STP1* en tratamientos con Glc.



**Figura 20. Evaluación de la sobreexpresión de *AIB* y *MYB122* en las líneas transgénicas.** Se muestra el análisis por northern-blot de las líneas transgénicas 35S::*AIB*, en A y 35S::*MYB122*, en B. Se cargaron 10 µg de RNA total. Se muestran el rRNA como control de carga. Col-0, RNA proveniente de plantas tipo silvestre. Los valores debajo de los carriles corresponden a la cuantificación densitométrica de la señal con respecto al Col-0 y normalizados con respecto al control de carga.

De la misma manera, para evaluar la posible sobreexpresión *MYB122*, se analizaron las dos líneas independientes 35S::*MYB122* 4-2 y 10-4 por northern-blot. A partir de este análisis se observó que la línea 35S::*MYB122* 4-2 presentó sobreexpresión de *MYB122*, en comparación con la planta silvestre (Figura 20B).

Por lo que respecta a la línea 35S::*MYB122* 10-4, ésta mostró un nivel de transcrito similar a la planta silvestre (Figura 20B). A pesar de que esta última línea presentó niveles similares a la silvestre se utilizó para realizar los tratamientos con Glc, considerando que la regulación bajo el promotor 35S permite una expresión constitutiva, esto podría permitir que la expresión de *MYB122* en cualquier momento del desarrollo y tejido de la planta, evitando el efecto de una regulación temporal y tejido-específica a la que seguramente está sujeto el gen endógeno.

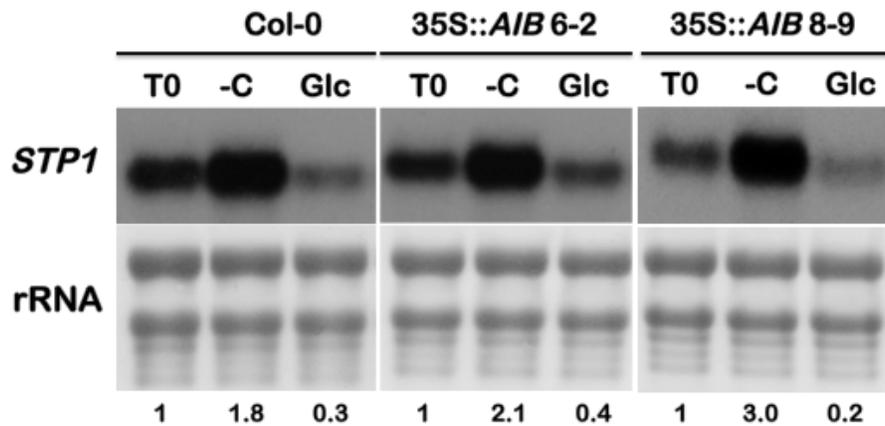
#### **VIII.4 Análisis de expresión del transcrito de *STP1* en respuesta a azúcares en las líneas 35S::*AIB* y 35S::*MYB122***

Las líneas sobreexpresoras seleccionadas tanto para *AIB* y *MYB122* no presentaron un fenotipo visible alterado debido a la sobreexpresión de dichos factores de transcripción al ser sembradas en un medio control y en la presencia de los azúcares Glc o Mtl, en comparación a la planta silvestre bajo las mismas condiciones.

Se evaluó la expresión del transcrito de *STP1* en las líneas transgénicas 35S::*AIB* 6-2 y 8-9, así como en las líneas 35S::*MYB122* 4-2 y 10-4, en respuesta a Glc, por medio de un ensayo tipo northern-blot. Este análisis permitiría evidenciar si la sobreexpresión de estos factores de transcripción exacerban la represión de *STP1* en presencia de Glc. Se ha reportado que a partir de un tratamiento con 5 mM de azúcares por 30 min, se observa una represión menor que la presentada en mayores concentraciones de Glc (Cordoba *et al.*, 2015). Por lo tanto, debido a que se requerían condiciones en las que la represión fuera menor para evaluar si la sobreexpresión exacerbaba esta respuesta, se emplearon dichas condiciones. De esta manera, las plantas fueron crecidas en medio líquido (MS 0.1X) con sacarosa por 10 días, con una fase de ayuno de fuente carbonada por 2 días y tratadas por 30 min con medio sin fuente de carbono o con 5 mM de Glc, las plantas se colectaron y se aisló el RNA total.

A partir del análisis por northern-blot se evidenció que las líneas 35S::*AIB* 6-2 y 8-9 presentaron un nivel del transcrito de *STP1* similar a la silvestre, en presencia de Glc (Figura 21 y Suplementaria S2). Con respecto a los niveles

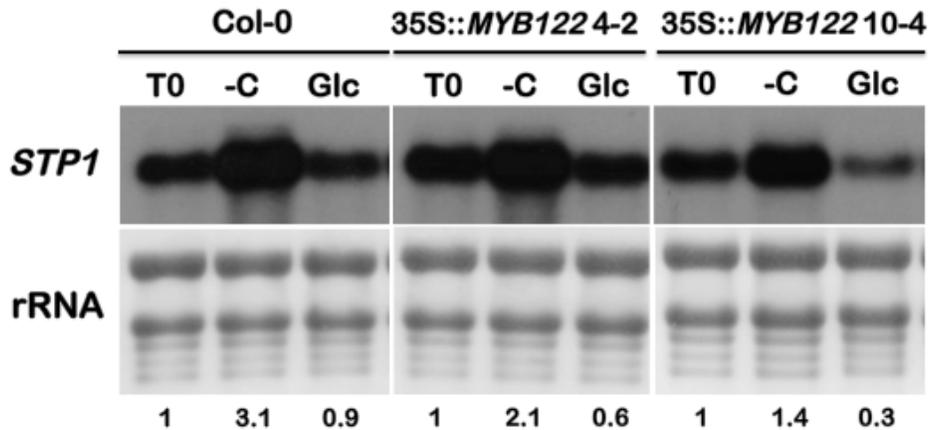
iniciales (T0) del transcrito de *STP1*, se obtuvo una ligera reducción en las líneas 35S::*AIB* 8-9, con respecto al observado en la planta silvestre (valores densitométricos, Figura 21); sin embargo, esta diferencia resultó mínima en un solo ensayo (0.9 vs 0.7). Estos resultados muestran que la sobreexpresión de *AIB* no tuvo un efecto sobre la regulación del transcrito de *STP1* ya que no se presentaron cambios drásticos/significativos en el nivel del transcrito en presencia de Glc.



**Figura 21. Análisis de la expresión de *STP1* en respuesta a glucosa (Glc), en líneas sobreexpresoras de *AIB*.** Se muestra el resultado representativo de tres ensayos independientes. El RNA total fue extraído de plántulas crecidas en medio líquido (MS 0.1X) con sacarosa por 10 días, sometidas a 2 días de ayuno de fuente de carbono y tratadas por 30 min sin fuente de carbono (-C) o con 5 mM de glucosa (Glc). T0, muestras previas al tratamiento con Glc. Cada carril contiene 10 µg de RNA total que se hibridó con una sonda radioactiva específica para *STP1*. Se muestra el rRNA como control de carga. Col-0, RNA proveniente de plantas tipo silvestre. Los valores indicados debajo de los carriles corresponden a la cuantificación densitométrica de la señal con respecto al T0; valores normalizados con respecto al control de carga.

Por otra parte, el resultado del northern-blot que corresponde a las líneas sobreexpresoras de *MYB122*, reveló la presencia de una mayor disminución en los niveles de transcrito de *STP1* en ambas líneas (4-2 y 10-4) en el tratamiento con Glc, con respecto a la planta silvestre. Estos resultados fueron validados con tres ensayos biológicos independientes que mostraron el mismo comportamiento del

transcrito de *STP1* en presencia de Glc (Figura 22 y Suplementaria S3). Por lo tanto, la sobreexpresión de MYB122 generó una represión ligeramente mayor en la condición de Glc del gen *STP1*, esto permitió corroborar la función represora de MYB122 en respuesta a Glc.



**Figura 22. Análisis del transcrito de *STP1* en respuesta a glucosa (Glc), en las líneas 35S::MYB122.** Se muestra el resultado representativo de tres experimentos biológicos independientes. El RNA total fue extraído de plántulas crecidas en medio líquido (MS 0.1X) con sacarosa por 10 días, sometidas a 2 días de ayuno de fuente de carbono y tratadas por 30 min sin fuente de carbono (-C) o con 5 mM de glucosa (Glc). T0, muestras previas al tratamiento con Glc. Cada carril contiene 10 µg de RNA total, que fue hibridado con una sonda radioactiva específica para *STP1*. rRNA, control de carga. Col-0, RNA proveniente de plantas tipo silvestre. Los valores indicados debajo de los carriles corresponden a la cuantificación densitométrica de la señal con respecto al T0; valores normalizados con respecto al control de carga.

### VIII. 5 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes AIB y MYB122

Debido a que en la región del promotor de *STP1* (310 pb), se ubica(n) el(los) elemento(s) en *cis* que confieren la regulación por Glc, se planteó como objetivo determinar la unión de los factores transcripcionales AIB y MYB122 a esta región. Para esto se consideró utilizar un ensayo tipo EMSA (“Electrophoretic Mobility Shift Assay”). Este ensayo requiere de la purificación de las proteínas o bien, de una fracción proteínica enriquecida con la proteína de interés. En seguida

se presenta el avance en el cumplimiento de este objetivo, que comprende la expresión heteróloga y purificación de la proteína AIB.

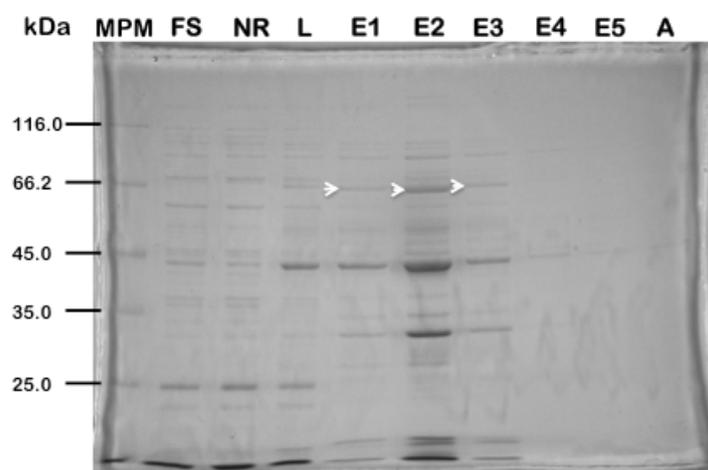
La región codificante de los genes *AIB* o *MYB122* clonadas previamente en el vector de entrada pDONR-Zeo, fueron transferidas al vector de expresión bacteriana pDEST17, el cual permite expresar proteínas en el sistema heterólogo en *E. coli*. El vector pDEST17 permite la expresión de la proteína de interés bajo la regulación del promotor del fago T7 y el sitio de unión a ribosomas (RBS), generando la fusión de la proteína de interés con una etiqueta de histidinas (6xHis) en el extremo N-terminal. Esta última requerida para la purificación de la proteína por afinidad a una resina de níquel.

Bacterias electrocompetentes BL21(DE3)pLysS fueron transformadas con las construcciones pDEST17::*AIB* o pDEST17::*MYB122*, y cultivadas hasta alcanzar una OD<sub>600nm</sub> de 0.6 – 0.8 al momento de inducir la expresión de la(s) proteína(s) con 1mM de IPTG, la inducción se incubó por 6 hrs a 30°C.

### **VIII. 5.1 Purificación de la proteína AIB bajo condiciones nativas**

Se analizaron por SDS-PAGE las fracciones de proteína soluble e insoluble, que fueron obtenidas a partir de un lisado bacteriano sin (previo a la inducción se tomó la muestra) y con IPTG. Se observó que la expresión de la proteína AIB se indujo con IPTG; sin embargo, la proteína fue más abundante en la fracción insoluble (debido posiblemente a la formación de cuerpos de inclusión), evidenciada como una banda abundante que corresponde al peso esperado de 64 kDa (flecha blanca, Suplementaria S4.A). La presencia de la proteína en la fracción soluble se ratificó por un análisis tipo western-blot (flecha blanca, Suplementaria S4.C), utilizando el anticuerpo anti-His, por lo tanto, a pesar de su baja concentración, la proteína se purificó a partir de esta fracción. En la fracción soluble también se revelaron bandas con un menor peso molecular, éstas podrían corresponder a una unión inespecífica del anticuerpo o bien, tratarse de la degradación de la proteína AIB. Aunado a esto, se confirmó que en las fracciones correspondientes sin IPTG no hay expresión basal de AIB, ya que no se observó ninguna banda del peso esperado (Suplementaria S4.C).

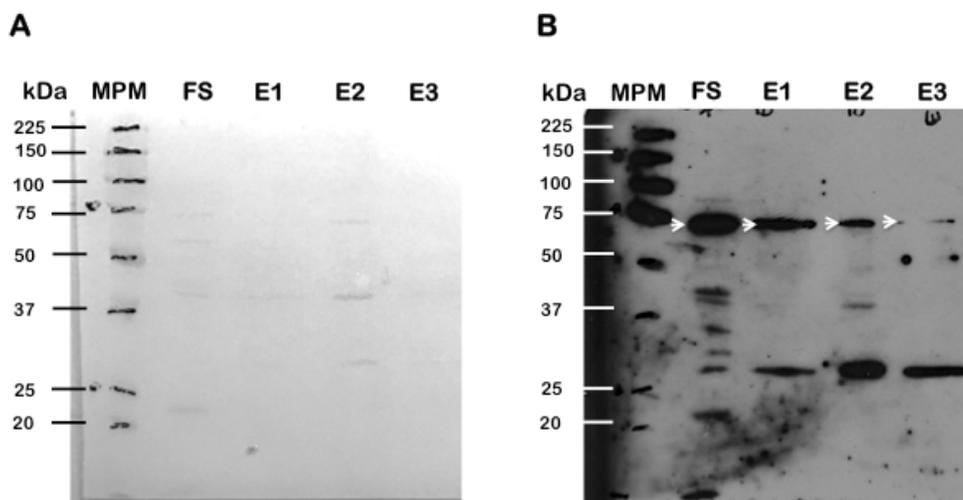
Las fracciones proteicas obtenidas a partir de la secuencia de purificación por columna de niquel, se analizaron por SDS-PAGE. El análisis mostró que la proteína AIB que presenta un peso de aproximadamente 64 kDa, fue más abundante en las primeras tres eluciones (flechas blancas, carril E1 al E3, Figura 23), respecto a las fracciones anteriores y las eluciones posteriores, donde no se logró observar la banda del tamaño esperado. También, se observó que particularmente en E2 la abundancia de la proteína AIB fue mucho mayor respecto a E1 y E3 (Figura 23).



**Figura 23. Análisis por SDS-PAGE de las fracciones obtenidas durante la purificación de la proteína recombinante AIB.** Las fracciones obtenidas en el proceso de purificación se evaluaron por SDS-PAGE al 10%. Las flechas señalan la proteína recombinante AIB. FS, fracción de proteínas solubles; NR, fracción de proteínas no retenidas; L, Lavado; E1 a E5, eluciones 1 a la 5; A, agua que se pasó por la columna y MPM, marcador de peso molecular. En cada carril se cargaron 25  $\mu$ L de la fracción correspondiente.

Para confirmar que la identidad de la banda de 64 kDa correspondía a la proteína AIB, se realizó un western-blot de las fracciones FS, E1, E2 y E3. El resultado del western-blot evidenció la presencia de AIB en las fracciones analizadas, ya que se observó señal en la banda que corresponde al tamaño de AIB (flechas, Figura 24B). También se observaron bandas de menor peso

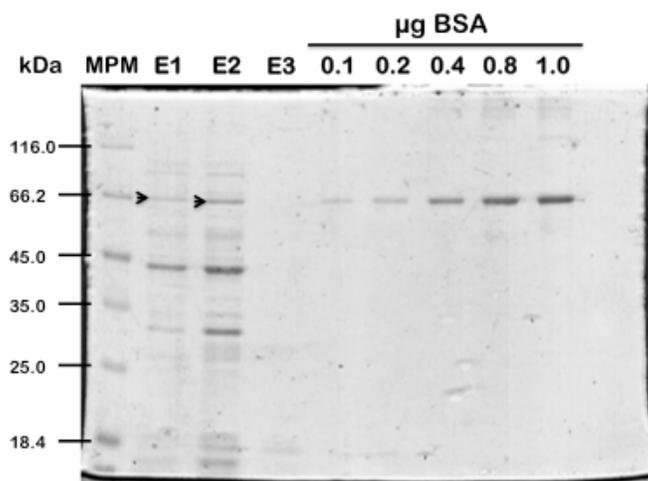
molecular que pueden corresponder a uniones inespecíficas del anticuerpo o degradación de la proteína AIB (Figura 24B). De manera general, el análisis por western-blot permitió confirmar que la banda de 64 kDa observada en el análisis previo (Figura 23), corresponde a AIB (flechas, Figura 24B) y que por consiguiente, se cuenta con una fracción que contiene a la proteína de interés.



**Figura 24. Detección de la proteína recombinante AIB por western-blot. A.** Control de transferencia de carga de la inmunodetección. **B.** Inmunodetección con anti-His que revelan la banda correspondiente a la proteína AIB (flechas). FS, fracción de proteína soluble; E1 a E3, eluciones 1 a la 3; MPM, marcador de peso molecular. Cada carril contiene 4  $\mu$ g de proteína total.

Una vez verificada la presencia de la proteína AIB en las eluciones 1 a 3, se prosiguió a estimar la concentración de AIB por comparación con concentraciones conocidas de BSA (0.1  $\mu$ g, 0.2  $\mu$ g, 0.4  $\mu$ g, 0.8  $\mu$ g y 1.0  $\mu$ g) en un gel SDS-PAGE. La cuantificación se realizó comparando la intensidad de la banda correspondiente a AIB, presente en la eluciones, con las bandas de la curva estándar de BSA, utilizando el analizador de imágenes ImageJ. Cabe mencionar que en el gel se cargaron 10  $\mu$ L de las eluciones E1-E3, que contienen la proteína AIB y otras proteínas contaminantes co-purificadas. Utilizando este volumen en E1 y E2, se evidenció la banda de 64 kDa (flechas, Figura 25), mientras que en E3 no, esto

pudo deberse a que AIB se encuentra muy diluida en esta última muestra, por lo tanto fue descartada. Los resultados de la cuantificación por densitometría mostraron que la concentración de AIB en E1 es de 14 ng/ $\mu$ L, mientras que en E2 es de 32 ng/ $\mu$ L.



**Figura 25. Cuantificación de la concentración de la proteína AIB.** Se cargaron 10  $\mu$ L de las muestras correspondientes a E1-E3 y diferentes concentraciones de BSA como referencia en un SDS-PAGE al 10%. La concentración de AIB (flechas) en cada elución se efectuó comparando los valores de densitométricos de las banda de AIB con las de referencia. BSA; albúmina de suero bovino; MPM, marcador de peso molecular. Se cargaron 10  $\mu$ L totales/carril.

### VIII. 5.2 Purificación de la proteína MYB122 bajo condiciones nativas

La evaluación de la expresión de la proteína recombinante MYB122 en un sistema heterologo se realizó por SDS-PAGE, de manera similar a la proteína AIB (apartado anterior). Se observó que la expresión de la proteína MYB122 se indujo con la presencia de IPTG; sin embargo, la proteína fue más abundante en la fracción insoluble (formación de cuerpos de inclusión), evidenciada como una banda abundante con el peso esperado de 37 kDa (No se muestra figura). Asimismo, se logró identificar por western-blot (utilizando el anticuerpo anti-His) que en la fracción soluble la proteína MYB122 estaba presente pero en muy bajos niveles (No se muestra figura). A partir de la fracción soluble se realizó el proceso

de purificación de MYB122, de manera similar en la que se obtuvo AIB. Sin embargo, no se logró obtener una fracción con la proteína MYB122 enriquecida. Es sabido que el método de purificación “estandar” no es eficiente para todas las proteínas recombinantes a purificar, por lo que se suele realizar modificaciones al protocolo, actualmente no se han logrado estandarizar las condiciones para purificar MYB122.

## IX. DISCUSIÓN

La regulación a nivel transcripcional por azúcares ha sido extensamente estudiada, se dispone de información acerca de que existe un gran número de genes regulados por la presencia de Glc (Price *et al.*, 2004). Sin embargo, a pesar de la importancia de los azúcares como moléculas señaladoras, el conocimiento actual de los componentes y los mecanismos moleculares de transmisión de señales mediada por los azúcares es muy limitado, tal es el caso de los efectores finales de las vías, los factores de transcripción.

En un estudio a la región promotora del gen *STP1* se identificó a una región de 310 pb que contiene elementos en *cis* que posiblemente participan en la regulación de la expresión de *STP1* en presencia de Glc (Cordoba *et al.*, 2015). Por otra parte, por medio de un ensayo de “DNA pull-down” se lograron identificar a los FTs AIB/JAM1 y MYB122, que corresponden a la familia de FTs bHLH y MYB, respectivamente, a través de su unión a algún elemento(s) contenido en la región previamente delimitada de 310 pb, del promotor de *STP1* en respuesta a la presencia de Glc (Cruz-López, Tesis de Licenciatura, 2015). En este estudio, a través del análisis de líneas mutantes y sobreexpresoras se estableció la participación de AIB/JAM1 y MYB122 como componentes novedosos, que se posicionan como efectores finales en una vía de señalización independiente de HXK1. El que dos FTs regulen una misma respuesta, en este caso particular la represión de *STP1* por azúcares, sugiere que esta respuesta podría estar mediada por una interacción de ambos FTs. De hecho, ya se han descrito múltiples interacciones de los factores bHLH y MYB con otros factores transcripcionales para la modulación de diversas funciones biológicas tales como la diferenciación celular epidermal, formación de los tricomas, en la biosíntesis de antocianinas, en la biosíntesis de antocianinas, biosíntesis de glucosinolatos, entre otros (Afrin *et al.*, 2014; Bemer *et al.*, 2017).

## IX.1 AIB participa como regulador negativo en respuesta a glucosa

AIB/JAM1 es un miembro de una de las familias de FTs más extensas en *Arabidopsis*, la familia bHLH. Inicialmente se reportó que AIB/JAM1 participa como un regulador positivo de la señalización por ABA, debido a que plantas silenciadas con RNAi presentaron hiposensibilidad a ABA (Li *et al.*, 2007). Posteriormente se evidenció que también tiene un papel de regulador negativo en la señalización por jasmonato; la sobreexpresión de AIB/JAM1 y la inhibición por RNAi produjeron respectivamente, fenotipos de insensibilidad e hipersensibilidad en respuesta a ácido jasmónico (Nakata *et al.*, 2013). Derivado de lo anterior se puede establecer que AIB/JAM1 presenta una actividad dual, y esto sugiere que la interacción con otro factor podría estar determinando su papel como activador o represor, dependiendo de la respuesta a determinado estímulo.

Actualmente no existen reportes que relacionen a AIB/JAM1 en la respuesta a azúcares, por lo que el presente estudio evaluó la participación de AIB/JAM1 en la represión de *STP1* en respuesta a Glc, por medio del análisis del transcrito de *STP1* en el fondo mutante *aib*. El resultado del análisis mostró que la represión del gen *STP1* por Glc se perdió en esta mutante, ya que se presentó acumulación del transcrito de *STP1* en comparación con la planta silvestre bajo la misma condición (Figura 17). La acumulación del transcrito no llegó al nivel que se presentó en las condiciones de sin fuente carbonada (-C) o Mtl, tanto en la planta silvestre como en las mutantes, esto sugiere la presencia de un activador para alcanzar los niveles presentes en ausencia de Glc. Se evidenció que AIB/JAM1 tiene un papel como regulador transcripcional (en este caso particular como regulador negativo), en la señalización por azúcares.

Los represores transcripcionales pueden catalogarse como represores activos o pasivos; los represores activos influyen directamente con la transcripción, ya que poseen un dominio de represión, mientras que los pasivos carecen de éste, pero interfieren físicamente con los activadores compitiendo por el mismo sitio de unión a DNA o bien, pueden secuestrar al activador e interferir con su actividad (Krogan y Long, 2009). A través del análisis de secuencia de aminoácidos, se determinó que el FT AIB/JAM1 carece de un dominio de

represión (Nakata *et al.*, 2013), que en otros bHLH contiene sitios de unión para otras proteínas con funciones activadoras de la transcripción, por lo tanto, al carecer de este dominio no puede reclutar a la maquinaria de la RNA pol II para activar la transcripción, debido a esto se ha clasificado a AIB/JAM1 como un represor pasivo (Nakata *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2013; Goossens *et al.*, 2016).

En la regulación de genes en respuesta a jasmonatos, AIB/JAM1 se une y compite por el mismo motivo de unión del activador transcripcional MYC2 un FT tipo bHLH (Nakata *et al.*, 2013). Sin embargo, para el caso particular de represión de *STP1* por Glc se sugiere un escenario con algunas variantes. A partir del análisis de expresión se concluyó que en la mutante *aib* los niveles del transcrito de *STP1* no disminuyeron con respecto al T0 en presencia de Glc, aunado a esto, se observó que en la condición de Glc no se alcanzaron los niveles de acumulación de transcrito que se presentaron en las condiciones sin fuente carbonada (-C) o Mtl, donde se presentó un aumento del nivel del transcrito de *STP1* (Figura 17). Lo anterior sugiere que para alcanzar los niveles presentes en las condiciones de ausencia de fuente carbonada y Mtl se requiere de la intervención de un activador, que al parecer estaría ausente o inactivo en presencia de Glc. Considerando además que en ausencia de AIB/JAM1 en el fondo mutante *aib* el sitio de unión quedaría “libre” para que se una el activador; sin embargo, parece que esto no sucede. Aunado a esto, no se descarta que el sitio de unión del activador sea diferente al sitio de unión del represor, involucrando un mecanismo diferente al de competencia de unión por el mismo motivo de reconocimiento en la región regulatoria del gen *STP1*. Así, en ausencia de Glc se estimularía la función del activador (o bien, se induciría su expresión), mientras AIB/JAM1 se encontraría inactivo (o ausente), mientras que en presencia de Glc el activador se inactivaría y AIB/JAM1 podría ejercer su función represora.

Ahora bien, debido a que AIB/JAM1 carece de un dominio de represión canónico, parece necesaria la presencia de otro factor que lleve a cabo la función represora, y bajo este escenario AIB/JAM1 se consideraría que requiere de una interacción con otra proteína como un co-represor. Por ejemplo, la función represora de AIB/JAM1 está mediada por las proteínas represoras JAZ en

respuesta a jasmonatos (Song *et al.*, 2013). En este sentido, los resultados obtenidos a partir de las líneas sobreexpresoras indicaron que al parecer, es necesaria la intervención de otro factor, debido a que se esperaba que la respuesta de represión por Glc de *STP1* en estas plantas estuviera exacerbada. Como mostraron los resultados, en comparación con las plantas silvestres, no se observó una disminución significativa en los niveles de transcrito de *STP1* en ninguna de las líneas analizadas en presencia de Glc. Con base en estos resultados se puede sugerir que ante la sobreexpresión de AIB/JAM1, no fue posible incrementar la represión debido a que posiblemente esta depende de la interacción con otro represor, que en este caso se encontraría limitado en cantidad con respecto a AIB/JAM1, considerando que las interacciones guardan una relación 1:1 de AIB/JAM1:interactor.

Algunos estudios han evidenciado que las proteínas bHLH son capaces de formar homo- y heterodímeros entre miembros de la misma y otras familias, de tal manera que la dimerización de estos FTs puede ser un mecanismo por el cual los FTs tipo bHLH generan suficiente diversidad para regular una gran variedad de genes en respuesta a determinados estímulos (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003; Goossens *et al.*, 2016).

## **IX.2 AIB y su posible motivo de unión en la región promotora del gen *STP1***

La familia de FTs bHLH se unen a una secuencia hexanucleotídica consenso conocida como caja E (CANNTG), con sus variantes conocidas como la caja G (CACGTG), la caja E (CAGCTG) y MBS (“MYC2 binding sequence”, CACGAC), y a otros motivos relacionados como la caja N (CACGGC o CACGAC), la caja TG (CACGTT) y al elemento CACGAC (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003; Nakata *et al.*, 2013). Por medio de un ensayo tipo EMSA y ensayos transitorios se identificó que AIB/JAM1 es capaz de unirse a las cajas G y TG y a la secuencia MBS, como el FT MYC2 (Nakata *et al.*, 2013).

Por medio de un ensayo tipo “DNA Pull-Down” se aisló el FT AIB/JAM1. El ensayo consistió en inmovilizar la región regulatoria delimitada de 310 pb del gen *STP1* a una matriz y exponerla a un extracto de proteínas nucleares provenientes

de plantas tratadas con Glc. Posteriormente, en un análisis más detallado a la región regulatoria delimitada de 310 pb del gen *STP1*, reveló que contiene a la variante de la caja E, MBS (CACATG), por este motivo es que se logró aislar el FT AIB/JAM1 (Cruz-López, Tesis de Licenciatura, 2015). A razón de esto se decidió evaluar en este estudio a la mutante de *AIB/JAM1* en la respuesta a Glc.

Por otra parte, existe evidencia de que la caja E está involucrada en la regulación por azúcares en hepatocitos de mamíferos. Se ha reportado que los genes *S14* y *L-PK* (“*L-type Pyruvate Kinase*”) se inducen en presencia de Glc y que el mecanismo es complejo, ya que involucra la presencia de dos Cajas E separadas por 5 pb (Liu *et al.*, 1993; Koo y Towle, 2000; Vaultont *et al.*, 2000). Considerando los datos ya mencionados y el resultado de la evaluación a la mutante *aib*, que evidencía la pérdida de la represión de *STP1* en presencia de Glc (Figura 17), se puede establecer que AIB/JAM1 participa en la represión de *STP1* en respuesta a Glc, y que posiblemente esta respuesta esté mediada a través de su unión al elemento MBS, que corresponde a una variante de la caja E.

### **IX.3 El factor transcripcional MYB122 está involucrado en la respuesta de represión por glucosa**

La evaluación de la mutante *myb122* indicó que el FT MYB122 está involucrado en la represión de *STP1* en respuesta a Glc; se observó que la represión en presencia de Glc se pierde en comparación con la planta silvestre. Sin embargo, nuevamente, como en el caso de la mutante *aib* no se alcanzan los niveles de acumulación del transcrito de *STP1* en ausencia de Glc, en las condiciones de -C y Mtl (Figura 17). MYB122 pertenece a la clase R2R3-MYB, la más abundante de la familia génica *MYB*. Los FTs de esta clase pueden actuar como activadores, represores o inclusive, pueden tener una actividad dual, tal es el caso del FT MYB4 que funciona como activador y represor según el estímulo percibido (Stracke *et al.*, 2001; Feller *et al.*, 2011). Por lo tanto, en la regulación en respuesta a Glc del gen *STP1* parecen estar actuando dos FTs que al mismo tiempo actúan como represores. Lo anterior sugiere que posiblemente estos FTs actúan de manera simultánea, a través de una interacción física entre éstos en respuesta a Glc. A través de un análisis de interacción proteína-proteína *in vivo*, se

ha mostrado que determinados integrantes de la clase R2R3-MYB interactúan con algunos miembros de la familia bHLH formando heterodímeros, lo que permite que las proteínas reconozcan a un determinado elemento en *cis* con mayor afinidad y especificidad (Stracke *et al.*, 2001; Dubos *et al.*, 2010; Pireyre y Burow, 2015). La dimerización ayuda a dar una mayor estabilidad a la unión del FT con el DNA, por lo que la actividad de algunos de éstos es dependiente de dicha interacción. Además, se ha identificado que estos FTs pueden sufrir modificaciones post-traduccionales para realizar su función (Dubos *et al.*, 2010; Pireyre y Burow, 2015). Los FTs de la clase R2R3-MYB están involucrados en la regulación de diversos genes que a su vez, regulan una gran variedad de procesos como el desarrollo, producción de metabolitos secundarios (Dubos *et al.*, 2010), la respuesta a azúcares (Lu *et al.*, 2002) entre otros.

Se ha reportado que tres FTs tipo MYB en arroz se unen al elemento en *cis* TATCCA en respuesta a Glc presente en los promotores de los genes  $\alpha$ -amilasa de cereales (Lu *et al.*, 2002), mientras que en *Arabidopsis* dos miembros de la familia MYB participan en la regulación por Glc, MYBS1 y MYBS2 (Chen *et al.*, 2017). Por otra parte, un análisis *in silico* de la región regulatoria del gen *STP1* mostró la presencia de 8 motivos de unión involucrados en la represión por azúcares siendo estos; TATCCAOSAMY (TATCCA), MYBST1 (GGATA), la caja I (GATAA), CGACGOSAMY3 (CGACG), EVENINGAT (TATCT), CATCC, GATTA y la caja G (ACGTG). Asimismo, se detectó que los elementos TATCCAOSAMY y MYBST1 son reconocidos por FTs tipo MYB, que participan en la represión en respuesta a Glc (Cordoba *et al.*, 2015). Sin embargo, un análisis de estos elementos permitió descartar al motivo TATCCAOSAMY como elemento de represión de *STP1* en respuesta a Glc (Cordoba *et al.*, 2015). Posteriormente, por medio de un ensayo "DNA pull-down" se identificó que el FT MYB122 se une a la región regulatoria de *STP1*, pero aún se desconoce el motivo de unión que reconoce (Cruz-López, Tesis de Licenciatura, 2015).

Por su parte, el análisis de las plantas sobreexpresoras de *MYB122* (4-2 y 10-2) sugirió una ligera represión mayor en presencia de Glc en comparación con las plantas tipo silvestre (Figura 22). Esto puede indicar que la función de MYB122

está ligeramente exacerbada en las plantas sobreexpresoras, aunque se esperaba que esta respuesta tuviera un mayor impacto en la represión. Lo anterior puede obedecer a la posible interacción con el FT AIB/JAM1; existe la posibilidad que MYB122 forme heterodímeros con AIB/JAM1 (o con otro FT), para realizar de manera más eficiente la represión de *STP1* en presencia de Glc. En las líneas sobreexpresoras, debido a que la estequiometría entre dichos factores se encontraría afectada, esta respuesta no se puede ejercer de manera correlativa al incremento de expresión de *MYB122*.

Por el momento, tomando en cuenta la presencia de elementos en *cis* reconocidos por FTs tipo MYB en el promotor de *STP1*, la captura de MYB122 por el ensayo “DNA pull-down” y la pérdida de la represión de *STP1* en respuesta a Glc en la mutante *myb122*, se sugiere que MYB122 participa en la represión de *STP1* en respuesta a Glc.

#### **IX.4 Mecanismo de represión de AIB/JAM1 y MYB122 en respuesta a glucosa**

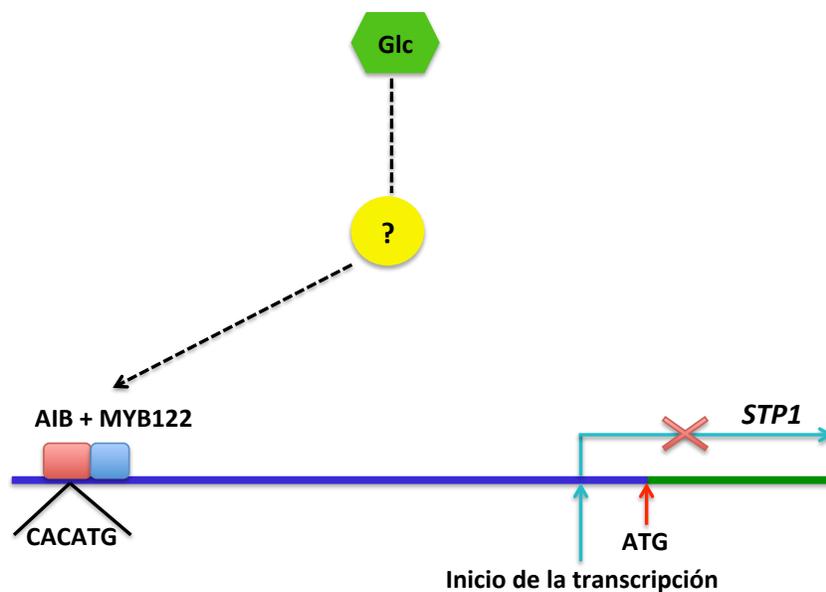
Como se mostró anteriormente, el análisis de expresión de *STP1* en las mutantes *aib* y *myb122*, evidenció que los FTs AIB/JAM1 y MYB122 están involucrados en la represión del gen *STP1* en respuesta a Glc debido a que bajo estas condiciones la represión se perdió en ambas mutantes. Los FTs pertenecientes a las familias bHLH y MYB pueden interaccionar entre ellos formando complejos heterodiméricos que permite dar una mayor especificidad de respuesta a un determinado estímulo, debido a la gran diversidad que se puede generar por las interacciones entre FT-FT, aunado al gran número de miembros de cada familia y a la variedad de elementos en *cis* a los que se unen (Stracke *et al.*, 2001; Dubos *et al.*, 2010; Nakata *et al.*, 2013; Fonseca *et al.*, 2014; Pireyre y Burow, 2015; Goossens *et al.*, 2016).

En un estudio Schweizer y colaboradores (2013), mostraron que el FT MYC2, el cual pertenece a un FTs tipo bHLH, interacciona con diversos MYBs que participan en la regulación de los genes encargados de la biosíntesis de glucosinolatos, y entre éstos se encuentra MYB122 (Schweizer *et al.*, 2013; Afrin *et al.*, 2014). También se ha reportado que MYC2, que participa en la respuesta a

jasmonato, comparte un 30% de identidad de aminoácidos con AIB/JAM1 y por lo tanto, se consideran homólogos, dentro de la familia de FTs tipo bHLH (Nakata *et al.*, 2013). Por consiguiente, tomando en cuenta que un homólogo a AIB/JAM1, MYC2, interacciona con MYB122, y que junto con el resultado del análisis del transcrito de *STP1* en las mutantes *aib* y *myb122* en respuesta a Glc, se puede especular una posible interacción entre AIB/JAM1 y MYB122 para reprimir a *STP1* en respuesta a Glc. Diversas interacciones específicas entre bHLH con MYBs se han descrito y se reconoce el mecanismo de acción de dicha interacción para la regulación de la transcripción en respuesta a estímulos específicos (Bemer *et al.*, 2017): (i) Estabilidad y afinidad de la interacción FT-FT, la estabilidad del FT puede ser modificada por la incorporación de otro FT. Por ejemplo, TT8 (un FT tipo bHLH), interacciona con un FT R2R3-MYBs (PAP1, PAP2, MYB111 o MYB114) y con TCP3 (proteína de la familia WD-40) para formar un complejo proteínico estable y afin, para la regulación de genes que participan en la biosíntesis de flavonoides y en la respuesta a auxinas (Afrin *et al.*, 2014; Bemer *et al.*, 2017). (ii) Especificidad de la unión al DNA: la combinación de dos FT con distintas propiedades de unión a DNA, pueden resultar en un aumento de la afinidad en la unión a DNA (unión cooperativa), o bien, la interacción FT-FT puede conllevar a nuevas propiedades de reconocimiento, fenómeno llamado especificidad latente. Este mecanismo es empleado en la interacción entre los FTs PAP1-GL3 (FT tipo MYB y bHLH, respectivamente) para regular los genes de la biosíntesis de antocianinas (Afrin *et al.*, 2014; Bemer *et al.*, 2017).

Las interacciones combinatorias entre las familias bHLH y MYB tienen un papel importante en la regulación de diversos procesos en respuesta a diversos estímulos. Actualmente no hay reportes sobre la interacción entre algún bHLH y MYB para la regulación por azúcares, pero existe evidencia suficiente que apunta a una nueva hipótesis: AIB/JAM1 interacciona con MYB122 para reprimir la transcripción de *STP1* en respuesta a Glc. Con base en los resultados obtenidos en este estudio y la información disponible sobre las interacciones de bHLH con MYB, se propone que el mecanismo de acción puede darse por el siguiente posible escenario (Figura 26): La interacción AIB/JAM1 con MYB122 proporciona

estabilidad y afinidad por el DNA. En este modelo se propone que inicialmente AIB/JAM1 se une a la región regulatoria de *STP1* (posiblemente a través del elemento CACATG) y posteriormente MYB122 se incorpora para formar el complejo de represión, y de esta manera se genera estabilidad y afinidad al factor de transcripción AIB/JAM1, o bien podría suceder que se una primeramente MYB122 y posteriormente AIB/JAM1. Este modelo podría ser evaluado en seguimiento al estudio del mecanismo de regulación por los FTs AIB/JAM1 y MYB122 en respuesta a azúcares, y en particular por Glc.



**Figura 26. Posible modelo de acción de los factores de transcripción AIB-MYB122, en la represión de *STP1* por glucosa.** La glucosa (Glc) es percibida por algún sensor/receptor desconocido (diferente al sensor hexocinasa 1), manda la señal a través de la participación de otra(s) proteína(s) señalizador(as) intracelular(es) (también desconocidos, círculo amarillo) para activar la función de los factores de transcripción AIB (cuadro azul) y MYB122 (cuadro rojo), y reprimir la transcripción del *STP1*. El factor de transcripción AIB se une al elemento CACATG presente a -1211 pb del ATG, por otro parte se desconoce a que elemento *in cis* se une MYB122. La interacción entre AIB y MYB122 genera estabilidad y afinidad al complejo represor. El inicio de la transcripción se encuentra a -133 pb del ATG.

## **X. CONCLUSIONES**

Con base en los resultados descritos, es posible concluir que:

1. A partir del análisis de expresión de *STP1* en los fondos mutantes *aib* y *myb122*, se determinó la participación de los FTs AIB/JAM1 y MYB122 en la represión de la transcripción de *STP1* en respuesta a Glc.
2. La evaluación del transcrito de *STP1* en las líneas sobreexpresoras de AIB demostró que la función de represor de AIB/JAM1 no está aumentada en la respuesta a Glc.
3. La evaluación del transcrito de *STP1* en las líneas sobreexpresoras de MYB122 evidenciaron que MYB122 presenta una represión ligeramente aumentada en respuesta a Glc.

## **XI. PERSPECTIVAS**

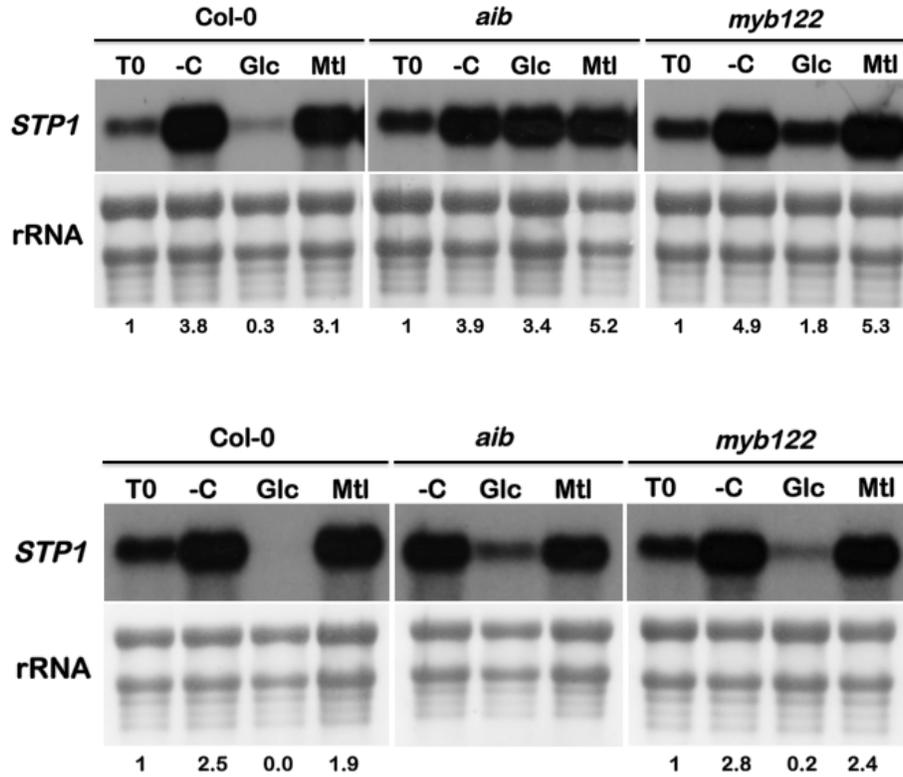
Los resultados obtenidos a través de este estudio permitieron establecer que los FTs AIB/JAM1 y MYB122 participan en la represión del gen *STP1* en respuesta a Glc. Tratándose de nuevos componentes en las vías de señalización de azúcares es necesario esclarecer el mecanismo de acción de AIB/JAM1 y MYB122 en la represión de *STP1* en presencia de Glc. Por lo tanto, se plantea realizar un análisis tipo EMSA para identificar el sitio en *cis* de unión de MYB122 y si ambos FTs en conjunto se unen a la región reguladora de *STP1*. También se propone generar una doble mutante *aib/myb122* o una doble sobreexpresora, con la finalidad de analizar el transcrito de *STP1* en estos fondos. Un ensayo de interacción tipo BiFC (“Bimolecular Fluorescence Complementation”) en protoplastos de *Arabidopsis*, evidenciará la formación del heterodímero AIB/JAM1-MYB122. Asimismo, se realizará una co-inmunoprecipitación para identificar otras proteínas de interacción de AIB/JAM1 y MYB122, como componentes de un posible complejo represor. También por medio de un ensayo de co-inmunoprecipitación de la cromatina se determinará el impacto global en la regulación génica por los factores de transcripción AIB/JAM1 y MYB122 en respuesta a glucosa.

Estas estrategias experimentales nos permitirán obtener un panorama más dirigido sobre el mecanismo de represión involucrado en una vía de señalización independiente de HXK1.

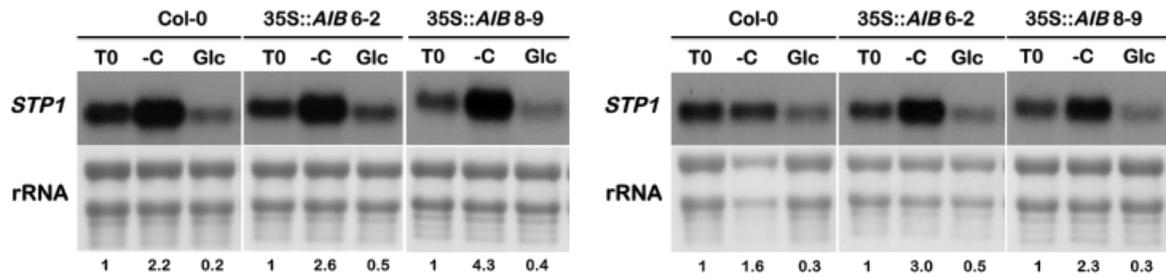
## XII. SUPLEMENTARIAS

Tabla S1. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados.

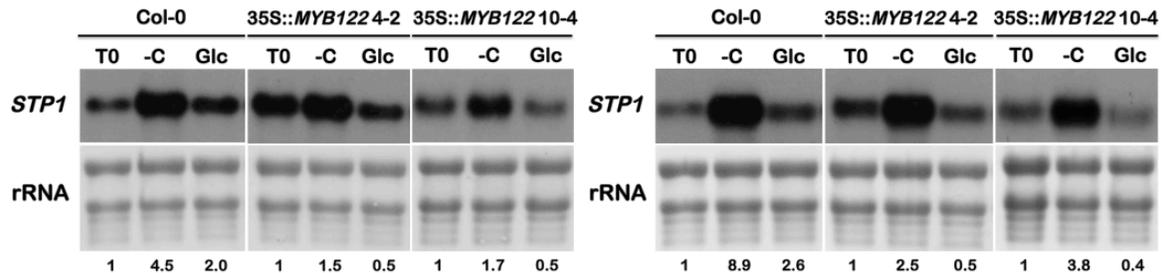
Nombre del oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'
LB2-SAIL	GCTTCCTATTATTATATCTTCCCAAATTACCAATACA
AIB-1118Rv	ACAGAACTATTCCTGCTCCTGC
AIB-atgB1Fw	AAAAAGCAGGCTTCATGAATATGAGTGATTTAGG
AIB-stpB2Rv	AGAAAGCTGGGTTTTATATATCACCAGAGACCTGTGAAC
AIB-648Fw	CTTGAGCTTGGTTCTGTTTGGTC
SALK-LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG
MYB122-428Fw	CTCCA ACTACAAGTGTTCAG
MYB122-atgB1Fw	AAAAAGCAGGCTTCATGGTACGGACGCCGTGTTGTAG
MYB122-stpB2Rv	AGAAAGCTGGGTTTCATCCAAAATAATTGTCAATCCC
MYB122-nstpRv	TCCAAAATAATTGTCAATCCC
UBQ1-q-F	ATGCAGATCTTCGTGAAAACCTTG
UBQ1-q-R	ACCTCCTCTAAGCCTCAACACAAG
35SminFTOPO	CACCGATGTGATATCTCCACTGAC
STP1-1	TGCTATAGTGGTTGTAACGTTTCAT T
STP1-2	GGCTAATACACTTTTTCTTTACGACA
attB1	GGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT
attB2	GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT



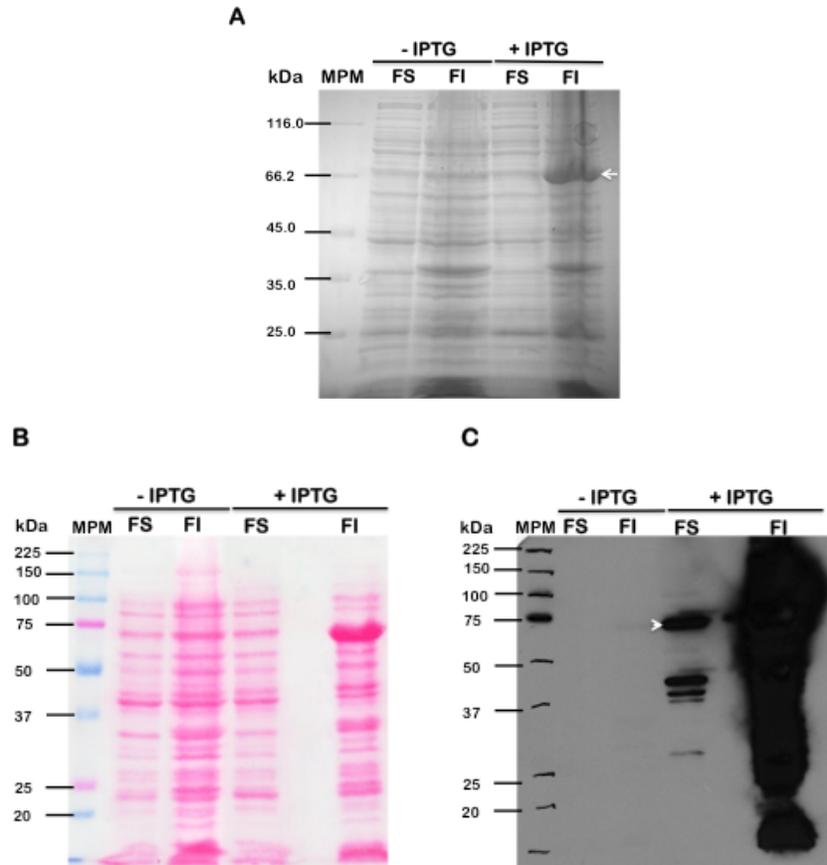
**Suplementaria S1. Análisis del transcrito de *STP1* en respuesta a glucosa (Glc), en los fondos mutantes *aib* y *myb122*, a partir de tres ensayos biológicamente independientes.** El RNA total fue extraído de plántulas crecidas en medio líquido (MS 0.1X) con sacarosa por 10 días, sometidas a 2 días de ayuno de fuente de carbono y tratadas por 6 h sin fuente de carbono (-C) o con 150 mM de glucosa (Glc) o 150 mM de manitol (Mtl). Cada carril contiene 10 µg de RNA total. Se utilizó una sonda radioactiva específica para *STP1*. Se muestran el rRNA como control de carga. Col-0, RNA proveniente de plantas tipo silvestre.



**Suplementaria S2. Análisis del transcrito de *STP1* en respuesta a glucosa (Glc), en líneas sobreexpresoras de *AIB*, a partir de dos ensayos biológicamente independientes.** El RNA total fue extraído de plántulas crecidas en medio líquido (MS 0.1X) con sacarosa por 10 días, sometidas a 2 días de ayuno de fuente de carbono y tratadas por 30 min sin fuente de carbono (-C) o con 5 mM de glucosa (Glc). Cada carril contiene 10 µg de RNA total. Se utilizó una sonda radioactiva específica para *STP1*. Se muestran el rRNA como control de carga. Col-0, RNA proveniente de plantas tipo silvestre.



**Suplementaria S3. Análisis del transcrito de *STP1* en respuesta a glucosa (Glc), en líneas sobreexpresoras de *MYB122*, a partir de dos ensayos biológicamente independientes.** El RNA total fue extraído de plántulas crecidas en medio líquido (MS 0.1X) con sacarosa por 10 días, sometidas a 2 días de ayuno de fuente de carbono y tratadas por 30 min sin fuente de carbono (-C) o con 5 mM de glucosa (Glc). Tiempo cero, al iniciar el tratamiento (T0). Cada carril contiene 10 µg de RNA total. Se utilizó una sonda radioactiva específica para *STP1*. Se muestran el rRNA como control de carga. Col-0, RNA proveniente de plantas tipo silvestre.



**Suplementaria S4. Análisis de la expresión de la proteína AIB.** **A.** Expresión de la proteína AIB. Por medio de un análisis por SDS-PAGE al 10% se comprobó la expresión de la proteína recombinante AIB (flecha blanca) en el cultivo bacteriano BL21(DE3)pLysS. Se empleó una concentración de 1mM de IPTG para la inducción (+IPTG) y un tiempo de 6 h. -IPTG; sin inducir, control. Se analizaron las fracciones de proteínas solubles (FS) e insolubles (FI). **B.** Control de transferencia, membrana teñida con Ponceau's. **C.** western blot de la proteína AIB. Se observó que la expresión de la proteína AIB (flecha blanca) se dio en presencia del inductor y que fue muy abundante en la fracción insoluble (FI) en comparación con la fracción soluble (FS). MPM; marcador de peso molecular.

## XIII. APÉNDICE

### XIII.1 Reacciones

#### Reacciones de PCR

Las mezclas de reacción de PCR consistieron de manera general con los siguientes componentes (con excepción de los oligonucleótidos) y en un volumen final de 25 $\mu$ L:

Oligonucleótido Fw (10mM)	0.75 $\mu$ L
Oligonucleótido Rv (10mM)	0.75 $\mu$ L
Taq Polimerasa (KAPA 3G)	0.2 $\mu$ L
Buffer (2X)	12.5 $\mu$ L
Enhancer (KAPA 3G)	0.25 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	8.55 $\mu$ L
Templado (DNA total)	2.0 $\mu$ L

#### Reacción BP

Producto de PCR con los sitios attB	15-150ng
Vector pDONR-Zeo	150ng
Buffer TE (Invitrogen)	8 $\mu$ L
Enzima BP Clonasa (Invitrogen)	2 $\mu$ L
Incubar por 1hr a 25°C	
Proteinasa K	1 $\mu$ L
Incubar por 10min a 37°C	

#### Reacción LR

Clona de entrada	50-150ng
Vector destino (pK2GW7 o pDest17)	150ng
Buffer TE (Invitrogen)	8 $\mu$ L
Enzima LR Clonasa (Invitrogen)	2 $\mu$ L
Incubar por 1hr a 25°C	

Proteinasa K	1 $\mu$ L
Incubar por 10min a 37°C	

### XIII.2 Medios

Todos los medios se prepararon con H<sub>2</sub>O ultrapura.

#### Medio LB (1L)

Bactotripton	10gr
Extracto de levadura	5gr
Cloruro de sodio	10gr
pH	7
Agar (si es sólido)	15gr

#### Medio LB bajo en sales (1L)

Bactotripton	10gr
Extracto de levadura	5gr
Cloruro de sodio	5gr
pH	7
Agar (si es sólido)	15gr

#### Medio GM 1X (1L)

MS 1X	4.44gr
MES	0.5gr
Sacarosa 1%	10gr
Phytagar	5gr
pH	5.7

#### Medio MS 0.1X (1L)

MS 0.1X	0.444gr
MES	0.5gr
pH	5.7

**Medio MS 0.1X + 0.5% Sacarosa (1L)**

MS 0.1X	0.444gr
MES	0.5gr
Sacarosa 0.5%	5gr
pH	5.7

**Medio MS 0.1X + 150mM Mtl (1L)**

MS 0.1X	0.444gr
MES	0.5gr
Manitol 150mM	27.32gr
pH	5.7

**Medio MS 0.1X + 150mM Glc (1L)**

MS 0.1X	0.444gr
MES	0.5gr
Glucosa 150mM	29.75gr
pH	5.7

**Medio de infiltración (1L)**

MS 0.5X	2.22gr
Sacarosa 5%	50gr
Silwet L-77	400µL

**XIII.3 Soluciones y Buffers**

Todos las soluciones y buffer se prepararon con H<sub>2</sub>O ultrapura.

**Sol. Anticuerpo primario**

Leche descremada	0.2%
PBS	1X
Tritón	0.5%
Anticuerpo αHis (Roche)	1:6000

**Sol. Anticuerpo secundario**

Leche descremada	0.2%
PBS	1X
Tritón	0.5%
Anticuerpo HRP (Roche)	1:3000

**Sol. De bloqueo**

Leche descremada	0.5%
PBS	1X
Tritón	0.5%

**Sol. CTAB 2X**

CTAB	2%
NaCl	1.4M
Tris-HCl pH 8	100mM
EDTA	20mM

**Sol. TENS**

Tris-HCl pH 8	10mM
EDTA	1mM
NaOH	0.1N
SDS	0.5%

**Sol. MOPS 10X (1L)**

MOPS	108gr
Acetato de sodio	4.1gr
EDTA 0.5M pH8	20mL

**Sol. PBS 1X**

NaCl	0.14M
KCl	2.7mM
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	10mM
Tritón	0.5%

**Sol. De prehibridación (100mL)**

Buffer de fosfatos 1M pH 7.2	52mL
SDS 20%	35mL
EDTA 0.5M pH 8	102.5µL
BSA	1gr

**Buffer de carga (para 1 muestra de RNA)**

Formamida	15µL
MOPS 10X	3µL
Formaldehido al 37%	4.8µL
Bromuro de etidio	

### Buffer SSC 20X (1L)

NaCl	52.9gr
Citrato de sodio	26.4gr
pH	7

### Buffer de transferencia

Tris-HCl	25mM
Glicina	192mM
Metanol	20%
pH	8.3

### XIII.4 Gel de agarosa al 1.5% + formaldehido para RNA (100mL)

Agarosa	1.5gr
H <sub>2</sub> O	84.6mL
MOPS 10X	10mL
Formaldehido al 37%	5.6mL

### XIII.5 SDS-PAGE

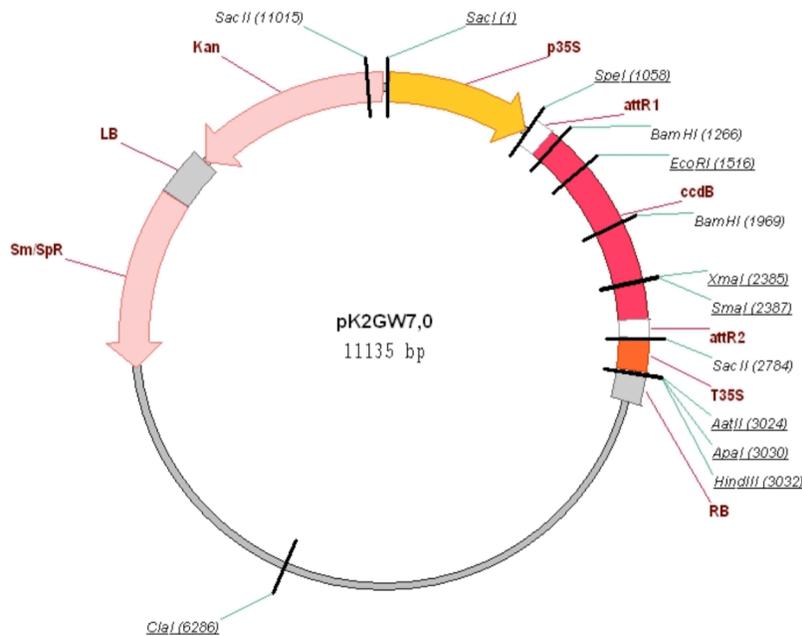
#### Gel separador al 10% (10mL)

H <sub>2</sub> O	4mL
Acrilamida al 30%	3.3mL
Tris-HCl 1.5M pH 8.8	2.5mL
SDS 10%	0.1mL
APS 10%	0.1mL
TEMED	4µL

#### Gel concentrador (3mL)

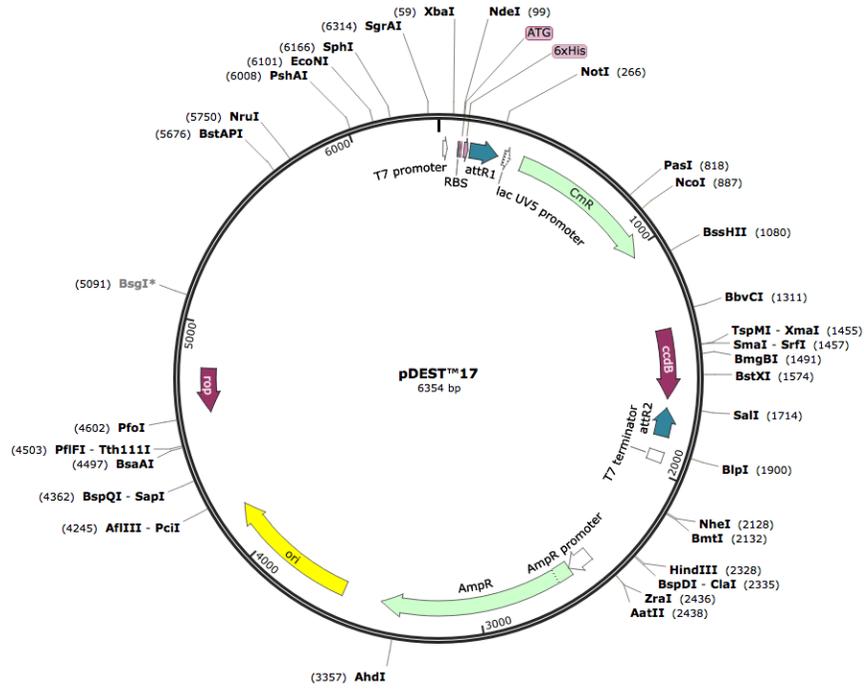
H <sub>2</sub> O	2.1mL
Acrilamida al 30%	0.5mL
Tris-HCl 1.0M pH 6.8	0.38mL
SDS 10%	0.03mL
APS 10%	0.03mL
TEMED	3µL

### XIII.6 Mapa pK2GW7



### XIII.7 Mapa pDEST17

Created with SnapGene®



## XIV. REFERENCIAS

**Afrin S., Nuruzzaman M., Zhu J. y Luo Z.** (2014) Combinatorial interactions of MYB and bHLH in flavonoid biosynthesis and their function in plants. *J. Plant Bio. Res.* **3**(2): 65-77.

**Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Walker P.** (2008) *Biología Molecular de la Célula*. 5ª Edición. Ediciones Omega. Barcelona. No. Páginas:1711. Págs. 879-892.

**Arroyo A., Bossi F., Finkelstein R. y León P.** (2003) Three Genes That Affect Sugar Sensing (*Abscisic Acid Insensitive 4*, *Abscisic Acid Insensitive 5*, and *Constitutive Triple Response 1*) Are Differentially Regulated by Glucose in Arabidopsis. *J. Plant Physiol.* **133**: 231-242.

**Bemer M., Dijk A. y Immink R.** (2017) Cross-Family Transcription Factor Interactions: An Additional Layer of Gene Regulation. *Trends in Plant . Sci.* **22**: 66-80.

**Boorer K., Loo D. y Wright E.** (1994) Steady-state and Presteady-state Kinetics of the H+/Hexose Cotransporter (STPI) from *Arabidopsis thaliana* Expressed in *Xenopus* Oocytes. *J. Biol. Chem.* **269**, 32: 20417-20424.

**Bossi F., Cordoba E., Dupré P., Santos-Mendoza M., San-Román C., León P.** (2009) The *Arabidopsis* ABA-INSENSITIVE (ABI) 4 factor acts as a central transcription activator of the expression of its own gene, and for the induction of *ABI5* and *SBE2.2* genes during sugar signaling. *Plant J.* **59**: 359–374.

**Büttner M.** (2010) The *Arabidopsis* sugar transporter (AtSTP) family: an update. *Plant Biol.* **12**: 35–41.

**Büttner M. y Sauer N.** (2000) Monosaccharide transporters in plants: structure, function and physiology. *BBA-Biomembranes.* **1465**: 263-274.

**Carretero-Paulet L., Galstyan A., Roig-Villanova R., Martínez-García JF., Bilbao-Castro JR. y Robertson D.** (2010) Genome-Wide Classification and Evolutionary Analysis of the bHLH Family of Transcription Factors in Arabidopsis, Poplar, Rice, Moss, and Algae. *Plant Physiology.* **153**: 1398-1412

**Chen P., Chiang C., Tseng T. y Yu S. M.** (2006) Interaction between Rice MYBGA and the Gibberellin Response Element Controls Tissue-Specific Sugar Sensitivity of alpha-Amylase Genes. *Plant Cell.* **18**: 2326-2340.

**Chen YS., Chao YC., Tseng TW., Huang CK., Lo PC. Y Lu C.** (2017) Two MYB-related transcription factors play opposite roles in sugar signaling in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.* **93**(3): 299-311.

**Cho YH. y Yoo SD.** (2011) Signaling Role of Fructose Mediated by FINS1/FBP in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* **7**(1): e1001263.

**Cordoba E., Aceves-Zamudio D., Hernández-Bernal AF., Ramos-Vega M. y León P.** (2015) Sugar regulation of *SUGAR TRANSPORTER PROTEIN 1 (STP1)* expression in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* **10**: 1-13

**Courey AJ. y Jia S.** (2001) Transcriptional repression: the long and the short of it. *Genes & Develop.* **15**: 2786-2796

**Cowell, I.** (1994) Repression versus activation in the control of gene transcription. *Trends Biochem. Sci.* **19**: 38-42

**Cruz-López MI.** (2015) Búsqueda de proteínas de unión a la región regulatoria del gen *STP1 (SUGAR TRANSPORTER PROTEIN 1)* en respuesta a azúcares en *Arabidopsis thaliana*. Tesis de licenciatura en Biología. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México. pp: 93.

**Du H., Zhang L., Liu L., Tang X., Yang W., Wu Y., Huang Y. y Tang Y.** (2009) Biochemical and Molecular Characterization of Plant MYB Transcription Factor Family. *Biochemistry* **74**: 1-11.

**Dubos C., Stracke R., Grotewold E., Weisshaar B., Martin C. y Lepiniec L.** (2010) MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science.* **15**: 573-581

**Feller A., Machemer K., Braun EL. y Grotewold E.** (2011) Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors. *Plant J.* **66**: 94-116.

**Fonseca S., Fernández-Calvo P., Fernández G., Díez-Díaz M., Gimenez-Ibanez S., López-Vidriero I., Godoy M., Fernández-Barbero G., Leene JV., Jaeger GD., Franco-Zorrilla JM. Y Solano R.** (2014) bHLH003, bHLH013 and bHLH017 Are New Targets of JAZ Repressors Negatively Regulating JA Responses. *PLoS ONE.* **9**(1): e86182.

**Franco-Zorrilla JM., López-Vidriero I., Carrasco JL., Godoy M., Vera P. y Solano R.** (2014) DNA-binding specificities of plant transcription factors and their potential to define target genes. *PNAS* **111**: 2367-2372

**Frerigmann H., Berger B. y Gigolashvili T.** (2014) bHLH05 Is an Interaction Partner of MYB51 and a Novel Regulator of Glucosinolate Biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **166**: 349-369.

**Gibson S.** (2005) Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**: 93-102.

**Gonzalez A., Zhao M., Veavitt JM. y Lloyd AM.** (2008) Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings. *Plant J.* **53**: 814-827.

**Goodman M., Ecker J. y Dean C.** (1995) The genome of *Arabidopsis thaliana*. *PNAS. USA* **92**: 10831-10835.

**Goossens J., Mertens J. y Goossens A.** Role and functioning of bHLH transcription factors in jasmonate signalling. *J. Exp. Bot.* **68** (6): 1333-1347.

- Grierson C., Du J., de Torres Z., Beggs K., Smith C., Holdsworth M. y Bevan M.** (1994) Separate *cis* sequences and *trans* factors direct metabolic and developmental regulation of a potato tuber storage protein gene. *Plant J.* **5**: 815-826.
- Grigston J., Osuna D., Scheible W., Liu C., Stitt M. y Jones A.** (2008) D-Glucose sensing by a plasma membrane regulator of G signaling protein, AtRGS1. *FEBS Lett.* **582**: 3577–3584.
- Halford N., Hey S., Jhurreea D., Laurie S., Mckibbin R., Paul M. y Zhang Y.** (2002) Metabolic signalling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase. *J. Exp. Bot.* **382**: 467- 475.
- Hanson J., Hanssen M., Wiese A., Hendriks M. y Smeekens S.** (2008) The sucrose regulated transcription factor bZIP11 affects amino acid metabolism by regulating the expression of *ASPARAGINE SYNTHETASE1* and *PROLINE DEHYDROGENASE2*. *Plant J.* **53**: 935–949.
- Heim MA., Jakoby M., Werber M., Martin C., Weisshaar B. y Bailey PC.** (2002) The Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor Family in Plants: A Genome-Wide Study of Protein Structure and Functional Diversity. *Mol. Biol. Evol.* **20**: 735-747.
- Ho L., Chao C., Tong F. y Yu S. M.** (2001) Sugar Coordinately and Differentially Regulates Growth- and Stress-Related Gene Expression via a Complex Signal Transduction Network and Multiple Control Mechanisms. *Plant Physiol.* **125**: 877–890.
- Hwang Y., Karrer E., Thomas B., Chen L. y Rodriguez R.** (1998) Three *cis*-elements required for rice  $\alpha$ -amylase *Amy3D* expression during sugar starvation. *Plant Mol. Biol.* **36**: 331-341.
- Jang J., León P., Zhou Li. y Sheen J.** (1997) Hexokinase as a Sugar Sensor in Higher Plants. *Plant Cell* **9**: 5-19.
- Kang SG., Price J., Lin P., Hong JC. y Jang J.** (2010) The Arabidopsis bZIP1 Transcription Factor Is Involved in Sugar Signaling, Protein Networking, and DNA Binding. *Molecular Plant.* **3**: 361-373.
- Koo SH. y Towle HC.** (2000) Glucose Regulation of Mouse S<sub>14</sub> Gene Expression in Hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **275**(7): 5200-5207.
- Krogan NT. y Long JA.** (2009) Why so repressed? Turning off transcription during plant growth and development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**(5): 628-636.
- Lalonde S., Boles E., Hellmann H., Barker L., Patrick J., Frommer B. y Warda J.** (1999) The Dual Function of Sugar Carriers: Transport and Sugar Sensing. *Plant Cell* **11**: 707–726.
- Latchman DS.** (2011) Transcriptional Gene Regulation in Eukaryotes. eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- León P. y Sheen J.** (2003) Sugar and hormone connections. *Plant Sci.* **8**: 3.

- Li Y., Lee K., Walsh S., Smith C., Hadingham S., Sorefam K., Cawley G. y Bevan M.** (2006) Establishing glucose- and ABA-regulated transcription networks in *Arabidopsis* by microarray analysis and promoter classification using a Relevance Vector Machine. *Genome Res.* **16**: 414–427.
- Li H., Sun J., Xu Y., Jiang H. y Wu X.** (2007) The bHLH-type transcription factor AtAIB positively regulates ABA response in *Arabidopsis*. *Plant. Mol. Biol.* **65**: 655-665.
- Liu Z., Thompson KS. y Towle HC.** (1993) Carbohydrate Regulation of the Rat L-type Pyruvate Kinase Gene Requires Two Nuclear Factors: LF-A1 and a Member of the *c-myc* Family. *J. Biol. Chem.* **268**(17): 12787-12795.
- Lu A., Ho T., Ho L. y Yu S. M.** (2002) Three Novel MYB Proteins with One DNA Binding Repeat Mediate Sugar and Hormone Regulation of  $\alpha$ -Amylase Gene Expression. *Plant Cell* **14**: 1963–1980.
- Mathur S., Vyas S., Kapoor S. y Tyagi AK.** (2011) The Mediator complex in plants: structure, phylogeny, and expression profiling of representative genes in a dicot (*Arabidopsis*) and a monocot (rice) during reproduction and abiotic stress. *Plant Physiol.* **157**: 1609-27.
- Meinke D., Cherry J., Dean C., Rounsley S. y Koornneff M.** (1998) *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. *Science.* **282**: 262-682.
- Menéndez, FM.** (2005) Mecanismos de señalización celular: implicaciones fisiopatológicas. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia.*
- Moore B., Zhou L., Rolland F., Hall Q., Cheng W., Liu Y., Hwang I., Jones T. y Sheen J.** (2003) Role of the *Arabidopsis* Glucose Sensor HXK1 in Nutrient, Light, and Hormonal Signaling. *Science.* **300**: 332-336.
- Nakata M., Mitsuda N., Herde M., Koo AJK., Moreno JE., Suzuki K., Howe GA. y Ohme-Takagi M.** (2013) A bHLH-Type Transcription Factor, ABA-INDUCIBLE BHLH-TYPE TRANSCRIPTION FACTOR/JA-ASSOCIATED MYC2-LIKE1, Acts as a Repressor to Negatively Regulate Jasmonate Signaling in *Arabidopsis*. *P. Cell.* **25**: 1641-1656.
- Ohto M., Nakamura-kito K. y Nakamura K.** (1992) Induction of Expression of Genes Coding for Sporamin and, a  $\alpha$ -Amylase by Polygalacturonic Acid in Leaf-Petiole Cuttings of Sweet Potato. *Plant Physiol.* **99**: 422-427.
- Osuna D., Usadel B., Morcuende R., Gibon Y., Blasing O., Hohne M., Gunter M., Kamlage B., Threthewey R., Scheible W. y Stitt M.** (2007) Temporal responses of transcripts, enzyme activities and metabolites after adding sucrose to carbon-deprived *Arabidopsis* seedlings. *Plant J.* **49**: 463–491.
- Page D. y Grossniklaus U.** (2002) The art and design of genetic screens: *Arabidopsis thaliana*. *Nature.* **3**: 124-136.
- Pego J., Kortstee A., Huijser C. y Smeekens S.** (2000) Photosynthesis, sugars and the regulation of gene expression. *J. Exp. Bot.* **51**: 407–416.

**Pireyre M. y Burow M.** (2015) Regulation of MYB and bHLH Transcription Factors: A Glance at the Protein Level. *Mol. Plant.* **8**: 378-388.

**Price J., Laxmi A., Martin S. y Jang J.** (2004) Global Transcription Profiling Reveals Multiple Sugar Signal Transduction Mechanisms in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 2128–2150.

**Reményi A., Schöler HR. y Wilmanns M.** (2004) Combinatorial control of gene expression. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**: 812-815.

**Riechmann J.** (2002) Transcriptional Regulation: a Genomic Overview. *The Arabidopsis Book American Society of Plant Biologists.* 1ª Edición. USA. No. Páginas: 46.

**Rojo, F.** (2001) Mechanisms of transcriptional repression. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**: 145-151.

**Rolland F., Moore B. y Sheen J.** (2002) Sugar Sensing and Signaling in Plants. *Plant Cell.* **14**: 185-205.

**Rolland F., Baena-Gonzalez E. y Sheen J.** (2006) Sugar Sensing and Signaling in Plants: Conserved and Novel Mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**: 675-709.

**Rolland F. y Sheen J.** (2005) Sugar sensing and signalling networks in plants. *Biochem. Soc. Trans.* **33**: 269-271.

**Saleh A. y Pages M.** (2003) Plant AP2/ERF transcription factors. *Genetika.* **35**: 37-50.

**Sasaki-Sekimoto Y., Jikumaru Y., Obayashi T., Saito H., Masuda S., Kamiya Y., Ohta H. y Shirasu K.** (2013) Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factors JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-LIKE1 (JAM1), JAM2, and JAM3 Are Negative Regulators of Jasmonate Responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **163**: 291-304.

**Schweizer F., Fernández-Calvo P., Zander M., Diez-Diaz M., Fonseca S., Glauser G., Lewsey MG., Ecker JR., Solano R. y Reymond P.** (2013) *Arabidopsis* Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factors MYC2, MYC3, and MYC4 Regulate Glucosinolate Biosynthesis, Insect Performance, and Feeding Behavior. *Plant Cell.* **25**: 3117-3132.

**Sheen J., Zhou L. y Jang J.** (1999) Sugars as signaling molecules. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**: 410–418.

**Sheen J.** (1990) Metabolic Repression of Transcription in Higher Plants. *Plant Cell.* **2**: 1027-1038.

**Sherson S., Hemmann G., Wallace G., Forbes S., Germain V., Stadler R., Bechtold N., Sauer N. y Smith S.** (2000) Monosaccharide/ proton symporter *AtSTP1* plays a major role in uptake and response of *Arabidopsis* seeds and seedlings to sugars. *Plant J.* **24**: 849-857.

**Sherson M., Alford L., Forbes M., Wallace G. y Smith M.** (2003) Roles of cell-wall invertases and monosaccharide transporters in the growth and development of *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **54** (382): 525-531.

**Shindo C., Bernasconi G. y Hardtke C.** (2007) Natural Genetic Variation in *Arabidopsis*: Tools, Traits and Prospects for Evolutionary Ecology. *Ann. Bot.* **99**: 1043-1053.

**Smeekens S., Ma J., Hanson J. y Rolland F.** (2010) Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Curr. Opin. Plant Biol.* **13**: 274-279.

**Smeekens S.** (1998) Sugar regulation of gene expression in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**: 230-234.

**Song S., Qi T., Fan M., Zhang X., Gao H., Huang H., We D., Guo H. y Xie D.** (2013) The bHLH Subgroup IIIId Factors Negatively Regulate Jasmonate-Mediated Plant Defense and Development. *PLoS Genet.* **9**(7): e1003653.

**Stadler R., Büttner M., Ache P., Hedrich R., Ivashikina N., Melzer M., Shearson M., Smith S. y Sauer N.** (2003) Diurnal and Light-Regulated Expression of AtSTP1 in Guard Cells of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **133**: 528–537.

**Stracke, R., Werber, M. y Weisshaar, B.** (2001) The *R2R3-MYB* gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**: 447-457.

**Sun C., Palmqvist S., Olsson H., Boren M., Ahlandsberg S. y Jansson C.** (2003) A novel WRKY transcription factor, SUSIBA2, participates in sugar signaling in barley by binding to the sugar-responsive elements of the iso1 promoter. *Plant Cell* **15**: 2076-2092.

**The QIAexpressionist™ A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins.** June 2003. 5th Edition. QIAGEN

**Tjian R. y Manlatis T.** (1994) Transcriptional Activation: A Complex Puzzle with Few Easy Pieces. *Cell.* **77**: 5-8.

**Todeschini A., Georges A. y Veitia RA.** (2014) Transcription factors: specific DNA binding and specific gene regulation. *Trends in Genetics* **30**: 211-219.

**-Ortiz G., Huq E. y Quail PH.** (2003) The *Arabidopsis* Basic/Helix-Loop-Helix Transcription Factor Family. *Plant Cell.* **15**: 1749-1770.

**Toyofuku K., Umemura T. y Yamaguchi J.** (1998) Promoter elements required for sugar-repression of the R-Amy3D gene for  $\alpha$ -amylase in rice. *FEBS Lett* **428**: 275-280.

**Vaulont S., Vasseur-Cognet M. y Kahn A.** (2000) Glucose Regulation of Gene Transcription. *J. Biol. Chem.* **275**(41): 31555-31558.

**Xiao W., Sheen J. y Jang C.** (2000) The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. *Plant Mol. Biol.* **44**: 451-461.

**Xiong Y. y Sheen J.** (2012) Rapamycin and Glucose-Target of Rapamycin (TOR) Protein Signaling in Plants. *J. Biol. Chem.* **287**: 2836-2842.

**Yanagisawa, S.** (1998) Transcription Factors in Plants: Physiological Functions and Regulation of Expression. *J. Plant Res.* **111**: 363-371.

**Yanhui C., Xiaoyuan Y., Kun H., Meihua L., Jigang L., Zhaofeng G., Zhiqiang G., Yunfei Z., Xiaoxiao W., Xiaoming Q., Yunping S., Li Z., Xiaohui D., Jingchu L., Xing-Wang D., Zhangliang C., Hongya G. Y Li-Jia Q.** (2006) The MYB transcription factor superfamily of Arabidopsis: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant Mol. Biol.* **60**: 107-124.

**Zhang Y., Primavesi L., Jhurrea D., Andralojc P., Mitchell R., Powers S., Schluemann H., Delatte T., Wingler A. y Paul M.** (2009) Inhibition of SNF1-Related Protein Kinase1 Activity and Regulation of Metabolic Pathways by Trehalose-6-Phosphate. *Plant Physiol.* **149**: 1860–1871.