



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA Y BIONGENIERIA

**“Análisis de dos reverso transcriptasas de *Arabidopsis thaliana*
potencialmente involucradas en señalización a larga distancia”**

TESIS

Que presenta:

Santiago Valentín Galván Gordillo

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGIA

Director de tesis: Dr. Roberto Ruiz Medrano

Ciudad de México

Noviembre, 2016

Dedicatoria y agradecimientos

A CONACyT por la beca **267732**, con numero de becario 303041 otorgada para realizar mis estudios de postgrado.

A toda mi familia porque siempre me han apoyado y estado conmigo todos mis logros se los debo a ellos, en especial a mi mamá mi esposa, mi tía pola y mi hermano. Así que, este trabajo se los dedico a ellos.

A todas las personas del laboratorio 24 y 12, tanto las que están como las que estuvieron, por su ayuda en todo momento, su compañía y amistad.

A mi director de tesis por su confianza, apoyo y guía y por ser un excelente ejemplo como profesor e investigador.

A mis asesoras por darme siempre su apoyo y buena dirección consejos y ser también excelentes profesoras e investigadoras.

A mis médicos tanto dentro del hospital como fuera.

A todas las personas que han estado conmigo. Muchas gracias.

ÍNDICE GENERAL

<u>1</u>	<u>INTRODUCCIÓN</u>	<u>1</u>
1.1	SISTEMA VASCULAR DE PLANTAS	1
1.2	FLOEMA	2
1.3	EL FLOEMA COMO CONDUCTO DE SEÑALIZACIÓN A LARGA DISTANCIA	2
1.4	REVERSO TRANSCRIPTASA	3
1.5	TELOMERASA	3
1.6	TRANSFERENCIA GÉNICA INTRACELULAR EN PLANTAS	4
1.7	MADURASAS/REVERSO TRANSCRIPTASAS PRESENTES EN ORGANELOS Y NÚCLEO EN PLANTAS	5
1.8	TRANSPOSONES	7
1.8.1	RETROTRANSPOSONES	8
1.8.2	RETROTRANSPOSONES DE TIPO NO-LTR	8
1.9	PSEUDOGENES PROCESADOS	9
1.9.1	RETROPOSONES INDUCIDOS POR ESTRÉS	11
<u>2</u>	<u>ANTECEDENTES</u>	<u>14</u>
<u>3</u>	<u>JUSTIFICACIÓN</u>	<u>15</u>
<u>4</u>	<u>HIPÓTESIS</u>	<u>16</u>
<u>5</u>	<u>OBJETIVO GENERAL</u>	<u>16</u>
5.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
<u>6</u>	<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	<u>17</u>
6.1	MATERIAL VEGETAL	17
6.2	CRECIMIENTO IN VITRO DE PLANTAS DE ARABIDOPSIS	17
6.3	EXTRACCIÓN DE DNA TOTAL	18
6.4	EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL	18
6.5	ELECTROFORESIS DE DNA TOTAL	18
6.6	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS	19
6.7	OBTENCIÓN DE REGIONES PROMOTORAS	19
6.8	BÚSQUEDA DE GENES RVT-ZNF EN EL GENOMA DE ARABIDOPSIS	19
6.9	ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS	20
6.10	ALINEAMIENTO Y EDICIÓN DE LAS SECUENCIAS	20
6.11	RECONSTRUCCIÓN FILOGENÉTICA	21
6.12	AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN PROMOTORA 1.5 KB RIO ARRIBA DEL GEN AT4G29090	21
6.13	OBTENCIÓN DE LA CONSTRUCCIÓN DE LA REGIÓN DE SILENCIAMIENTO DE AT4G29090	22

6.14	LIGACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR AL VECTOR BACTERIANO.....	24
6.15	TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES.....	25
6.16	ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN	25
6.17	VECTORES USADOS EN ESTE PROYECTO	27
6.18	MARCADOR DE PESO MOLECULAR USADO EN TODOS LOS GELES	28
6.19	CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS	28
6.20	SUBCLONACIÓN POR RECOMBINACIÓN.....	28
6.21	TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE CÉLULAS DE <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i> 29	
6.22	AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN PROMOTORA 1.5 Kb RIO ARRIBA DEL GEN AT5G36905.....	30
6.23	OBTENCIÓN DE LA CONSTRUCCIÓN DEL GEN ESTRUCTURAL AT5G36905 FUSIONADO A GFP	31
6.24	LIGACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR AL VECTOR BACTERIANO.....	32
6.25	TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES.....	33
6.26	ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN	33
6.27	CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS	37
6.28	SUBCLONACIÓN POR RECOMBINACIÓN.....	37
6.29	TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE <i>ARABIDOPSIS</i>	38
6.30	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GUS.....	38
6.31	TRATAMIENTO HORMONAL	39
6.32	RT-PCR CUANTITATIVA (QRT-PCR)	39
7	<u>RESULTADOS</u>	40
7.1	EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO	40
7.2	OBTENCIÓN DE LA REGIÓN PROMOTORA DE 1.5 Kb RIO ARRIBA DEL GEN AT4G29090.....	40
7.3	ANÁLISIS CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN DEL FRAGMENTO DE 1.5 Kb	41
7.4	SUBCLONACIÓN POR RECOMBINACIÓN Y VERIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DEL FRAGMENTO DE 1.5 Kb EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN	42
7.5	TRANSFORMACIÓN DE <i>A. TUMEFACIENS</i>	43
7.6	OBTENCIÓN DE LA REGIÓN DE SILENCIAMIENTO DE 310 PB DEL GEN AT4G29090 44	
7.7	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS PROMOTORES DE AT4G29090 Y AT5G36905 POR EL ENSAYO DE GUS.....	47
7.8	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE DIFERENTES GENES EN ARABIDOPSIS CON SIMILITUD A REVERSO TRANSCRIPTASAS BAJO DIFERENTES REGULADORES DE CRECIMIENTO POR QRT-PCR	49
7.9	LOS GENES CON EL DOMINIO DE RVT-ZNF MUESTRAN CARACTERÍSTICAS DE GENES ENDÓGENOS.....	56
7.10	LOS GENES CONTENIENDO EL DOMINIO DE RVT-ZNF ESTÁN SOBRE- REPRESENTADOS EN PLANTAS.	59
7.11	ANÁLISIS DE GENES CONTENIENDO EL DOMINIO DE RVT-ZNF DE ARABIDOPSIS POR BASES DE DATOS DE MICROARREGLOS Y ANOTACIONES GO (GENE ONTHOLOGY).....	60

7.12	ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE ELEMENTOS TRANSPONIBLES CONTENIENDO DOMINIO DE REVERSO TRANSCRIPTASA Y DE GENES CON DOMINIO DE RVT-ZNF.	64
7.13	ANÁLISIS FENOTÍPICO DEL RESULTADO DEL <i>KNOCKOUT</i> DE AMBOS GENES	66
8	<u>DISCUSIÓN</u>	70
9	<u>PERSPECTIVAS</u>	73
10	<u>BIBLIOGRAFIA.....</u>	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estructura de telomerasa. Tomada de Autexier <i>et al</i> 2006.....	4
Figura 2 Transferencia intracelular de genes. Tomada de Nugent J. M. 1991	5
Figura 3 Estructura tridimensional de RT de HIV-1. (Tomado de Abbondanzieri <i>et al.</i> , 2008)	7
Figura 4 Clasificación de Elementos Transponibles. Tomada de Vladimir V <i>et al</i> 2008	8
Figura 5 Estructura de Retroposones de tipo no-LTR y Pseudogenes procesados.....	10
Figura 6 Modelo de transposones inducidos por estrés (Tomado de Capy <i>et al.</i> , 2000)	12
Figura 7 Programa de PCR para la amplificación de la región promotora de 1.5 Kb rio arriba del gen At5g36905	21
Figura 8 Programa de PCR para la amplificación del fragmento de silenciamiento de At4g29090	23
Figura 9 Vectores de Expresión en Plantas.	27
Figura 10 Programa de PCR para la amplificación de la región promotora de 1.5 Kb rio arriba del gen At5g36905	30
Figura 11 Programa de PCR para la amplificación del gen estructural At5g36905	32
Figura 12 Vectores de Expresión para plantas.	35
Figura 13 ADN total de <i>A. thaliana</i>	40
Figura 14 Amplificación del promotor por PCR..	40
Figura 15 Extracción de ADN plasmídico.....	41
Figura 16 Análisis de restricción de plásmidos recombinantes.	41
Figura 17 Análisis de la orientación de los insertos en vector de clonación.	42
Figura 18 Linelización del plásmido recombinante en vector de clonación.....	42
Figura 19 Análisis electroforético de la extracción de ADN plasmídico del promotor del gen At4g29090 en el vector de expresión pGWFS7.....	42
Figura 20 Verificación del promotor del gen At4g29090 en el vector de expresión pBGWFS7..	43
Figura 21 Análisis electroforético de la extracción del ADN plasmídico del gen At4g29090 en el vector de expresión pBGWFS7 en <i>Agrobacterium</i>	43

Figura 22 Verificación del inserto del promotor del gen At4g29090 en el vector de expresión pBGWFS7 en <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	44
Figura 23 Amplificación de la región de silenciamiento por PCR.	44
Figura 24 Extracción de ADN plasmídico del vector de clonación.....	45
Figura 25 Análisis de restricción de plásmidos recombinantes.	45
Figura 26 Linearilación del plásmido recombinante en vector de clonación.	45
Figura 27 Análisis electroforético de la extracción de ADN plasmídico de la región de silenciamiento del gen At4g29090 en el vector de expresión pB7GWIWG2(II).....	46
Figura 28 Verificación del promotor del gen At4g29090 en el vector de expresión pB7GWIWG2(II).....	46
Figura 29 Verificación de la presencia de la región de silenciamiento de At4g29090 en el vector de expresión pB7GWIWG2(II) en <i>Agrobacterium</i>	46
Figura 30 Verificación del promotor del gen At4g29090 en el vector de expresión pB7GWIWG2(II) en <i>Agrobacterium</i>	47
Figura 31 Expresión del promotor en Plántulas de <i>Arabidopsis</i> Transformadas con las Construcciones pAt5g36905:GFP-GUS y pAt4g29090:GFP-GUS.....	48
Figura 32 Expresión del promotor en Órganos de Plantas Adultas Transformadas con las Construcciones pAt5g36905:GFP-GUS.....	49
Figura 33 Análisis por qPCR de 6 genes de <i>Arabidopsis</i> conteniendo el dominio de RVT-Znf.	55
Figura 34 Dominio de RVT-Znf en plantas.....	56
Figura 35 Genes de <i>Arabidopsis</i> conteniendo el dominio de RVT-Znf.	59
Figura 36 Análisis por microarreglos de genes con el dominio de RVT-Znf en <i>Arabidopsis</i>	64
Figura 37 Origen de los genes con dominio de RVT-Znf.....	66
Figura 38 Análisis fenotípico de mutantes de inserción de T-DNA homocigotas para At5g36905 y At4g29090.	67
Figura 39 La mutante de inserción de T-ADN muestra una menor tolerancia a estrés salino..	68
Figura 40 Porcentaje de germinación de <i>rt1</i> bajo diferentes concentraciones de ABA.....	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del promotor de 1.5 Kb río arriba del gen At4g29090.....	21
Tabla 2 Mezcla para Reacción de PCR	22
Tabla 3 Secuencia de oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen estructural de At4g29090 a partir de DNA genómico	22
Tabla 4 Mezcla para Reacción de PCR	23
Tabla 5 Mezcla para Reacción de PCR	24
Tabla 6 Mezcla para Reacción de Ligación.....	24
Tabla 7 Mezcla para Digestión con EcoRI	25
Tabla 8 Mezcla de reacción para la recombinación a vector de expresión.....	29
Tabla 9 Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del promotor de 1.5 Kb río arriba del gen AT5G36905.....	30
Tabla 10 Mezcla para Reacción de PCR	31
Tabla 11 Secuencia de oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen estructural de At5g36905 a partir de DNA genómico	31
Tabla 12 Mezcla para Reacción de PCR	32
Tabla 13 Mezcla para Reacción de Ligación.....	33
Tabla 14 Mezcla para Digestión con EcoRI	34
Tabla 15 Reacción de Digestión con EcoRV.....	36
Tabla 16 Reacción de Digestión con EcoRV y BamHI	36
Tabla 17 Mezcla de reacción para la recombinación a vector de expresión.....	37
Tabla 18 Solución de GUS	39
Tabla 19 dominio RVT-Znf en diferentes grupos taxonómicos. El número de genes en diferentes grupos taxonómicos fueron obtenidos de la base de datos de InterPro.....	59
Tabla 20 Localización subcelular y anotaciones GO de genes conteniendo el dominio RVT-znf.....	60

RESUMEN

Las plantas poseen un sistema de señalización a larga distancia, conformado por el floema, el cual les permite la comunicación entre órganos distantes, este sistema permite comunicar las señales ambientales sensadas por los órganos maduros hacia los órganos en crecimiento y permitir así que los nuevos órganos recién formados desarrollen las características óptimas ante el medio en el cual van desarrollarse y funcionar. A través de floema se transportan además de metabolitos y moléculas pequeñas, una gran cantidad de macromoléculas como proteínas y diversos RNAs (RNAs mensajeros, RNAs pequeños interferentes y micro RNAs) los cuales tienen una función como moléculas señales y son cruciales para la fisiología de la planta y su desarrollo.

En el análisis del transcriptoma diferencial de savia de floema de calabaza infectado con virus del mosaico del pepino se detectó un RNA mensajero para una reverso transcriptasa (Lough y Lucas, resultados no publicados). La reverso transcriptasa (RT) es una enzima ampliamente conservada, esto a pesar de que no cumple ninguna función celular (salvo por la telomerasa), contiene dos dominios principales: uno de DNA-polimerasa RNA-dependiente y otro de RNasa H y se encarga de sintetizar DNA de doble cadena usando RNA como molde; esta enzima es codificada principalmente por retroposones y retrovirus y es esencial para su ciclo de replicación, además de que se ha encontrado también en el grupo II de intrones en bacterias, cloroplastos y mitocondria. Así esta proteína no sólo es empleada para la replicación de elementos genéticos "parásitos" sino que es necesaria también para la proliferación celular normal.

Durante el trabajo de maestría se estudió su homólogo en *Arabidopsis thaliana* (At5g36905) pudimos comprobar que la proteína se expresa en floema. Durante el trabajo de doctorado nos propusimos trabajar con otra RT la cual también se encuentra en el transcriptoma de savia de calabaza y se expresa a niveles detectables según la base de datos de microarreglos.

1 INTRODUCCIÓN

Evidencias experimentales obtenidas en nuestro laboratorio indican que la savia de floema de calabaza contiene RNAs que codifican reverso transcriptasas pertenecientes a retrotransposones (Hinojosa-Moya y Ruiz-Medrano, resultados no publicados). Esto a su vez sugiere que ciertos RNAs podrían ser retrotranscritos. Por otra parte, dichos RNAs fueron hallados en bibliotecas sustractivas de savia de calabaza infectada por el virus del mosaico del pepino (CMV), pero no en plantas sin infectar. De manera especulativa, la inducción de tales RNAs ocurriría presumiblemente en respuesta a un estímulo externo, como por ejemplo el ataque por patógenos. Estudios llevados a cabo por otros grupos han demostrado la presencia de RNAs para reverso transcriptasas adicionales, en particular una que muestra semejanza con un retroelemento de *Arabidopsis* (Lough y Lucas, comunicación personal) Se desconoce por completo el papel de la transcriptasa reversa en plantas. Dada su localización en floema, se considera que puede estar involucrada en señalización entre tejidos distantes a través de este conducto. El objetivo del presente trabajo es, precisamente, contribuir al conocimiento de las reverso transcriptasas de plantas y cuál es su papel en la señalización a través del floema en plantas.

1.1 Sistema Vasculare de Plantas

La evolución del sistema vascular de las plantas permitió la colonización del hábitat terrestre. Además de dar soporte mecánico al crecimiento de las plantas, está involucrado en la distribución de agua y nutrientes. El sistema vascular consta de xilema, constituido por células muertas conductoras de agua, iones y en general compuestos de bajo peso molecular de las raíces al resto de la plantas, y de floema, encargado del transporte de fotosintatos de tejidos fuente fotosintéticamente activos a tejidos consumidores. Es también conocido que señales químicas son distribuidas a través de los conductos que forman el sistema vascular. El conocimiento de la función de tales señales es aún muy rudimentario; sin embargo, algunas parecen tener un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis. Por ejemplo, se han encontrado en savia moléculas reguladoras del crecimiento como citocininas, auxinas y brasinoesteroides.

1.2 Floema

El floema está formado por células acompañantes y elementos cribosos, estos últimos en su madurez son células que carecen de gran parte de organelos, como núcleo, mitocondrias y ribosomas (aunque pueden encontrarse cloroplastos inmaduros). Como ya se ha mencionado, la función más estudiada del floema es el transporte de fotoasimilados de las hojas fotosintéticas al resto de la planta. Sin embargo, estudios recientes han descrito la presencia de macromoléculas tales como proteínas, diversos RNAm, RNAs pequeños interferentes, microRNAs y complejos ribonucleoproteicos (RNPs) específicos en floema. Más aún, muchos de estos RNAs mensajeros codifican reguladores del crecimiento (Ruiz-Medrano *et al*, 1999, Lucas 2001). Experimentos con injertos han demostrado que estos RNAm pueden moverse a larga distancia a través del floema. Hay fuertes indicios que sugieren que la entrada y salida de estas macromoléculas al y del floema está sometida a una estricta regulación por proteínas específicas que median la formación y transporte de complejos ribonucleoproteicos, por lo que su presencia en elementos cribosos no es casual.

1.3 El floema como conducto de señalización a larga distancia

El floema juega así un papel esencial en la distribución de nutrientes y las diversas moléculas que viajan a través de él pueden estar implicadas en la regulación de muchos procesos esenciales para la planta como: floración, respuesta a estrés hídrico o ataque por patógenos, entre muchas otras respuestas.

Existen muchas funciones por las cuales los RNAs de floema antes mencionados pueden ejercer un papel regulatorio a larga distancia. Cabe especular, por ejemplo que un determinado RNAm transportado a través del floema puede al llegar a su célula blanco, traducirse a una proteína con función regulatoria, y regular la expresión o crecimiento de la célula blanco. Otra posibilidad es la síntesis de RNAs antisentido, que podría desembocar, una vez que hubiese formado un dúplex con su RNA blanco, en la supresión de la expresión génica. Este escenario sería semejante al de RNAs pequeños interferentes (siRNAs) los cuales activan silenciamiento génico controlando así numerosos procesos fisiológicos y del desarrollo de la planta. Los microRNAs, que también han sido detectados en savia de floema, pueden ser elemento esenciales para la regulación de la expresión a larga distancia a través del

floema, como se ha descrito en los casos de la inducción de tubérculos y respuesta a estrés por fosfato.

1.4 Reverso transcriptasa

La reverso transcriptasa es una enzima altamente conservada multifuncional y en algunos casos dimérica o multimérica que convierte el RNA en DNA, esta enzima muestra actividad polimerasa que puede usar RNA como molde, así como una actividad de Ribonucleasa H (RNasa H) que hidroliza la cadena de RNA de un híbrido DNA-RNA (Abbondanzieri *et al*, 2008). Es codificada por una diversidad de organismos como: retroposones, retrovirus, intrones del tipo II, por organelos en plantas y hongos (con función desconocida) y por organismos eucariotas en general, desempeñando una función esencial para la correcta proliferación celular (telomerasa). Todas las RT Poseen siete motivos muy conservados relacionados con su actividad de reverso transcriptasa y un mecanismo de catálisis de dos metales para llevar a cabo la transferencia química de nucleótidos, los aminoácidos involucrados en este mecanismo son principalmente los residuos conservados de Asp o Glu cercanos al sitio activo, los cuales tienen la propiedad de unir metales.

1.5 Telomerasa

La telomerasa es esencial para la proliferación celular normal, ya que se encarga de formar o extender los extremos de los cromosomas regulando la correcta proliferación celular e impidiendo la muerte celular, se descubrió en 1985 y se encontró que poseía características interesantes, poseía la información que determinaba su producto ya que una porción de la sub unidad de RNA de la telomerasa le sirve de molde (Greider, CW. *et al*, 1989), poseía un centro catalítico de reverso transcriptasa; posteriores estudios confirmaron que poseía características estructurales y funcionales con otras reverso transcriptasas, así como el mecanismo de catálisis (experimentos de mutagénesis de sitios activos de otras RTs conocidas abolían su actividad) la holoenzima es muy variable en cuanto a tamaño y puede contener otras proteínas asociadas, específicas de cada especie que le confieran la capacidad de llevar a cabo su función en los diversos seres vivos donde actúa. Evolutivamente, esta RT con función celular tan importante pudo surgir como una adaptación de una RT ancestral durante o poco después del cambio de genomas circulares a lineales.

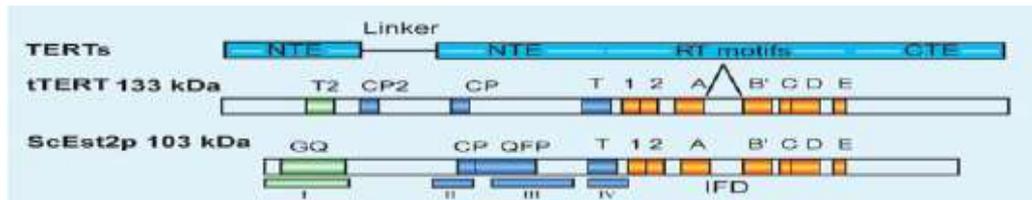


Figura 1 Estructura de telomerasa. Tomada de Autexier *et al* 2006

1.6 Transferencia génica intracelular en plantas

La existencia de genes nucleares que codifican para proteínas organelares sugiere su transferencia desde los organelos al núcleo. Aunque el éxito de tal transferencia parece complicarse por la necesidad de que ocurran por lo menos tres eventos independientes: la transferencia del gen desde el organelo hacia el núcleo, la activación del gen nuclear y la ganancia de un péptido señal y por último la pérdida del gen organelar, evidencia de tal transferencia intracelular de genes en plantas existe para el caso de cloroplastos (Baldauf y Palmer 1990), es interesante el hecho de que tal transferencia de genes parece involucrar un paso de reverso transcripción, (puede darse antes de la salida del gen, es decir dentro del organelo, en el citoplasma o bien después de su entrada al núcleo, y el lugar exacto aún se desconoce). La presencia de proteínas semejantes a RTs en mitocondria (Wahleithner *et al*, 1990; Moenne A. *et al*, 1997) así como la existencia de pseudogenes procesados (también llamados retropseudogenes) en núcleo sugieren que las células de plantas pueden contener la actividad de reverso transcriptasa necesaria para llevar a cabo la transferencia de genes .

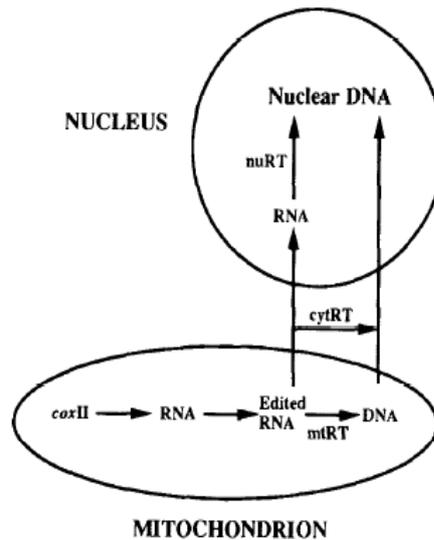


Figura 2 Transferencia intracelular de genes. Tomada de Nugent J. M. 1991

1.7 Madurasas/Reverso Transcriptasas presentes en organelos y núcleo en plantas

Los intrones de los genes de organelos en plantas, al igual que los de los genes nucleares deben ser removidos para que se lleve a cabo la correcta maduración del RNAm y su traducción ; sin embargo a diferencia de los intrones nucleares que requieren de un espliceosoma para su correcta remoción, la mayoría de los intrones organelares pertenecen al grupo II de intrones (también llamados de auto splicing), estos poseen ciertas características interesantes, se ha visto en estudios *in vitro* que son secuencias de RNA catalíticamente activas y además codifican para los factores de splicing necesarios para procesarse, estos factores son llamados madurasas y como se mencionó son producidos por la traducción del grupo II de intrones recién escindidos. Las madurasas comprenden un dominio de reverso transcriptasa (RT), un dominio exclusivo de madurasas (dominio X) y en algunos casos un dominio de endonucleasa (RNasa H) en el extremo carboxi terminal. Estas madurasas están presentes tanto en mitocondrias como en cloroplastos (solo se ha descrito una, *matK*), además se han encontrado genes parecidos a estas madurasas/reverso transcriptasas en el genoma nuclear de Arabidopsis y arroz indicando la posible transferencia intracelular de estas madurasas.

Reverso Transcriptasa del virus de VIH-1

La RT mas estudiada por sus implicaciones médicas es la RT codificada por el virus de VIH-1, por lo tanto es importante describirla más a detalle y que de esta forma nos ayude a entender un poco más sobre la estructura y mecanismo de acción de una RT. Esta funciona como un heterodímero con dos subunidades: una de 66 kDa, la p66 y otra de 51 kDa, la p51. Presenta dos sitios catalíticos: uno con actividad de DNA polimerasa en el extremo terminal con 440 residuos y otro con actividad de RNasa H en el extremo C terminal con 120 residuos, ambos en la p66. Tiene además la capacidad de acomodar tres diferentes sustratos y su orientación determina su actividad catalítica (Abbondanzieri *et al*, 2008). La subunidad p51 se forma a partir de la ruptura del dominio de RNasa H de la subunidad 66 y no posee actividad de polimerasa.

Aunque estas dos subunidades son iguales en cuanto a su secuencia de aminoácidos, su estructura terciaria es muy diferente. Este heterodímero se nombra como si fuera una mano derecha debido a su forma y contiene tres sub dominios: dedos, palma y pulgar con el pulgar y los dedos en la subunidad p66 (Figura 3). El subdominio conector une a los sitios catalíticos de polimerasa y RNasa H. aunque p51 contiene un subdominio conector este carece del dominio RNasa H. los subdominios de palma y el conector tres láminas β con α hélices en un lado. El subdominio de pulgar comprende tres α hélices (Abbondanzieri *et al.*, 2008).

La mayoría de las interacciones entre el aminoacil-tRNA y el RNA ocurren entre p66 y el esqueleto de fosfatos del ácido nucleico Las dos α hélices del pulgar en combinación con los dedos forman una pinza que mantiene al ácido nucleico sobre la palma, la cual contiene el sitio activo de polimerasa (Jacobo-Molina y Arnold, 1991). El sitio activo de polimerasa coordina los dNTPs con residuos de Lys65, Arg72, y los iones de magnesio catalítico el sitio activo de p66 contiene tres residuos catalíticos en el subdominio de palma que puede unir iones metálicos que son Asp¹⁸⁵, Asp¹⁸⁶ y Asp¹¹⁰ esta triada catalítica se posiciona cerca del extremo 3'OH del tRNA iniciador. La subunidad p51 une al tRNA al principio de la reverso transcripción y tiene más bien un papel estructural (Rigourd y Goldschmidt, 2003).

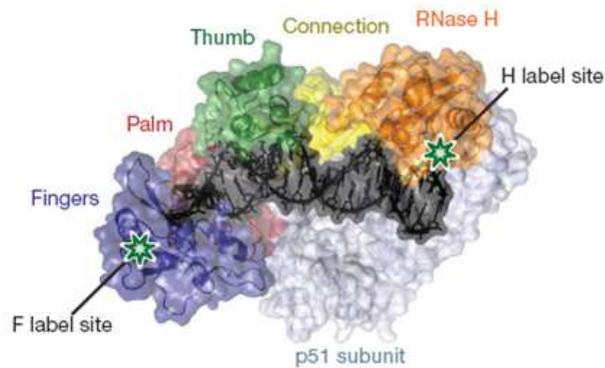


Figura 3 Estructura tridimensional de RT de HIV-1. (Tomado de Abbondanzieri *et al.*, 2008)

1.8 Transposones

Los transposones, que están presentes en prácticamente todos los seres vivos y en grandes cantidades, consisten en secuencias de DNA que se encuentran dispersas a través de todo el genoma de un organismo huésped. Los transposones pueden generar diversos rearrreglos en el DNA y alterar la expresión de genes vecinos, así como generar un aumento en el tamaño del genoma. Como consecuencia de lo anterior estos elementos genéticos podrían tener un papel importante en la generación de diversidad en los genomas de los organismos que los albergan. Es evidente, por tanto, la importancia de los transposones en la evolución de los seres vivos. Existen dos clases principales de transposones: transposones de DNA y retrotransposones; a diferencia de la mayoría de los transposones que utilizan un mecanismo de corte y empalme para transponerse, todos los retrotransposones utilizan un mecanismo de copia y empalme mediante un intermediario de RNA y donde cada ciclo completo de replicación produce una nueva copia, lo que los vuelve los mayores contribuyentes a las fracciones repetitivas en los genomas. Los transposones también pueden clasificarse de acuerdo a la autosuficiencia para transponerse (Lewin, 2008). A continuación se muestra una tabla con la clasificación aceptada para transposones.

UNIVERSAL CLASSIFICATION SCHEME OF TEs					
Type 1: DNA transposons		Type 2: retrotransposons			
Superfamily	TSDs bp	Non-LTR retrotransposons Superfamily (Clade)	TSDs bp	LTR retrotransposons Superfamily (Clade)	TSDs bp
<i>Chapae</i>	4	<i>CRE</i>	22–50	<i>Copia</i>	5,6
<i>En/Spm (CACTA)</i>	3	<i>NeSL</i>	7–22	<i>Gypsy</i>	3,5
<i>hAT</i>	5,6,8	<i>R4</i>	~13	<i>BEL</i>	4,5
<i>Harbinger (Pif)</i>	3	<i>R2</i>	0–30	<i>ERV1</i>	4
<i>ISL2EU (IS4EU)</i>	2	<i>LI</i>	~15	<i>ERV2</i>	6
<i>Kolobok</i>	4	<i>RTE</i>	0–100	<i>ERV3</i>	5
<i>Mariner</i>	2	<i>Jockey</i>	~10		
<i>Merlin</i>	8,9	<i>CR1</i>	0	<i>DIRS</i>	–
<i>Mirage</i>	2	<i>Rex1</i>	0		
<i>MuDR (MULE)</i>	9,10	<i>I</i>	10–15		
<i>Novosib</i>	8	<i>Rand1 (Dualen)</i>	~10		
<i>P</i>	7,8	<i>Tx1</i>	~15		
<i>PiggyBac</i>	4	<i>SINE1</i>	*		
<i>Rehavkus</i>	9	<i>SINE2</i>	*		
<i>Transib</i>	5	<i>SINE3</i>	*		
<i>Helitron</i>	–	<i>Penelope</i>	0		
<i>Polinton (Maverick)</i>	6				

Figura 4 Clasificación de Elementos Transponibles. Tomada de Vladimir V et al 2008

1.8.1 Retrotransposones

Los retrotransposones, o retroposones, se transponen por replicación a través de intermediarios de RNA (de ahí su nombre). Los hay de tipo LTR (“long terminal repeat” o repetidos terminales largos), que son semejantes a virus tanto en estructura como en su mecanismo de reverso transcripción y sólo difieren de los últimos en que no son capaces de salir de la célula (ya que carecen del gen *env*) y de tipo no-LTR (por carecer de los repetidos terminales largos), dentro de estos los hay autónomos llamados LINES (“long interspersted nuclear elements”), que codifican para una reverso transcriptasa, y no autónomos llamados SINES (“small interspersted nuclear elements”), (Lewin, 2008).

1.8.2 Retrotransposones de tipo no-LTR

Los LINES, (Elementos Nucleares Largos Intercalados) son elementos móviles autónomos ya que codifican para las diferentes proteínas necesarias para su replicación, en uno o dos marcos abiertos de lectura: el primero codifica para una proteína esencial de función desconocida y el segundo codifica un polipéptido bifuncional (al cual se accede por corrimiento del marco abierto de lectura) con actividades de RT y de endonucleasa (EN). Estructuralmente cuentan con un promotor *interno* inusual para la RNA polimerasa II, un extremo 3’ poliadenilado

(3' poliA) y la mayoría tienen un extremo 5' truncado. Los LINES son muy activos; por ejemplo, en el genoma humano existen aproximadamente 500,000 L1, de estos cerca de trescientos a cuatrocientos se encuentran completos y un estimado de 40-60 son activos. Su mecanismo de transposición es análogo al mecanismo de reverso transcripción iniciada por el blanco (TPRT por sus siglas en inglés target primed reverse transcription), se encuentran sobrerrepresentados en regiones ricas en A-T características de regiones no codificantes del DNA (las regiones codificantes tienden a ser más ricas en G-C) lo que podría volver parásitos más eficientes ya que les permite alcanzar un gran número de copias sin causar daño al genoma. Otra característica importante es el hecho de que poseen una reverso transcriptasa, la cual a pesar de mostrar preferencia por LINES; al reconocer el extremo 3' poliA, es capaz de procesar otros RNAs semejantes como los de SINES o RNAs mensajeros endógenos del huésped produciendo así retropseudogenes (o genes procesados).

Por otra parte los SINES ("Short Interspersed Nuclear Elements" o Elementos Nucleares Cortos Entremezclados) no codifican para ninguna proteína, aunque estructuralmente también cuentan con un extremo 3' poliadenilado. Se ha propuesto que pueden ser retrotranscritos en *trans* por la reverso transcriptasa codificada por los LINES a través del reconocimiento de este extremo 3' (Luan *et al*, 1993; Oshima *et al*, 1996).

1.9 Pseudogenes procesados

Estos son generados como se comentó anteriormente cuando la RT/EN de LINES se une a un RNA mensajero maduro (del huésped) el cual es posteriormente insertado en el genoma, los retropseudogenes por lo tanto poseen ciertas características que los identifican: carecen de intrones, poseen un extremo 3' poliA y además son infértiles (al menos al momento de su inserción) ya que carece de un promotor. Aunque su formación depende de la unión azarosa de la RT con el RNAm el evento ocurre debido a la gran cantidad de estos posibles moldes de RNA. Aunque se ha visto que estos moldes proveen un bajo número de copias, estas pueden tener función a largo o corto plazo. Existen diversos ejemplos de cómo retropseudogenes han ayudado a generar variación en los genomas de los organismos huésped, a continuación se muestran diferentes mecanismos por los cuales esto pudo ocurrir.

Un retropseudogen podría generar una copia del antiguo gen bajo un patrón de expresión diferente, cuando regiones que se encuentren flanqueando al retropseudogen adquieran capacidad regulatoria o por la integración de una nueva región reguladora en un sitio cercano o bien puede integrarse desde el principio en un sitio que posibilite su transcripción.

Otro evento que ocasionalmente ocurre es que el retropseudogen se inserte en un gen preexistente, lo que resulta en un gen fusionado o en exón *shuffling*; por ejemplo, cuando tenemos un exón excepcionalmente grande dentro de un gen con un tamaño de exones promedio más pequeño y debido a la propiedad modular de las proteínas el nuevo gen así formado podría exhibir funciones diferentes.

También es importante mencionar que estudios demuestran que la gran cantidad y variedad de proteínas no pudo haberse formado en el tiempo evolutivo transcurrido por simple mutación de secuencias por lo que cambios más grandes en el genoma debieron ser fundamentales, tales cambios los ofrece la duplicación cromosómica por recombinación, sin embargo este mecanismo de generación de variación a gran escala presenta una ventaja ante el primero ya que los retropseudogenes al ser primeramente inactivos pueden acumular mutaciones facilitando mayores cambios estructurales sin provocar el posible daño de expresar moléculas defectuosas muy semejantes que pudieran funcionar como mutantes dominantes negativas, después de un tiempo evolutivo considerable estas secuencias pudieron ganar actividad transcripcional y traduccional y ejercer funciones diferentes a los genes de los cuales provinieron. Así los cambios provocados por la acción de retroposones debieron ser cruciales en la evolución.

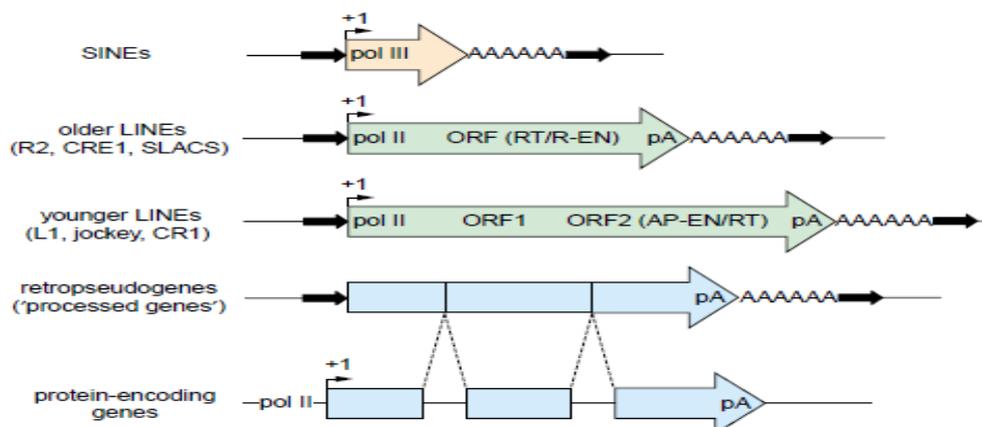


Figura 5 Estructura de Retroposones de tipo no-LTR y Pseudogenes procesados.
Tomada de Weiner A. M.

1.9.1 Retroposones inducidos por estrés

La primera referencia de transposones inducidos por estrés fue reportada por McClintock en 1951. Quien propuso que los transposones se encuentran inactivos durante el desarrollo. Sin embargo, pueden ser inducidos ante un estímulo, minimizando así los daños que su transposición pudiese causar en el genoma.

Los distintos tipos de transposones tienen sitios preferentes de inserción; en mamíferos los SINEs se encuentran preferencialmente en regiones ricas en G/C y los LINEs en regiones ricas en A/T lo que es evidencia de la inserción no azarosa de los transposones. También se encontró que estos elementos móviles se ubican en regiones del genoma en estado de heterocromatina (Dimitri, 2007). Más recientemente, se ha determinado que la inserción y transcripción de transposones induce la formación de heterocromatina. Esto ocurre por silenciamiento génico transcripcional y post-transcripcional (TGS y PTGS, respectivamente), cuando RNAs pequeños interferentes (siRNAs, por sus siglas en inglés) generados por la degradación específica de transcritos derivados de transposones reclutan la maquinaria necesaria para metilar histonas y DNA. Esto a su vez resulta en la eventual formación de heterocromatina (Chan, 2008).

Existe una interacción entre los elementos transponibles y el genoma del organismo huésped que aún no ha sido del todo entendida; Sin embargo, se ha observado que cuando un organismo es sometido a estrés ocurren respuestas a nivel fisiológico y genético que resultan en la activación de genes de defensa por medio de factores de transcripción específicos que pueden inducir elementos transponibles, se encontraron pequeñas regiones reguladoras similares a motivos de regiones reguladoras de genes de defensa en el elemento *Tnt 1* (Grandbastien *et al*, 1997). Por otro lado, se encontraron elementos muy similares a motivos de secuencia de promotores de *hsp* (de respuesta a choque térmico, por sus siglas en inglés) en regiones reguladoras de los elementos de *copia* y *mariner* de *Drosophila* (McDonald *et al*, 1997).

Aunque se desconoce si hay una relación causal entre mecanismos de defensa a estrés y activación de transposones, una hipótesis sugiere que el organismo huésped pudo haber “domesticado” a sus elementos transponibles, puesto que su presencia a la larga puede ser benéfica para el huésped (la generación de variación). Por otra parte, es posible que los transposones hayan adquirido genes, o bien secuencias regulatorias del organismo huésped, por lo que son regulados de manera semejante a genes endógenos, casualmente, muchos de ellos, de respuesta a estrés. Otra alternativa combina aspectos de estas hipótesis, puesto que propone la perpetuación de los transposones por presentar beneficios al huésped, pero como una consecuencia de la regulación génica y de su transposición por parte del huésped.

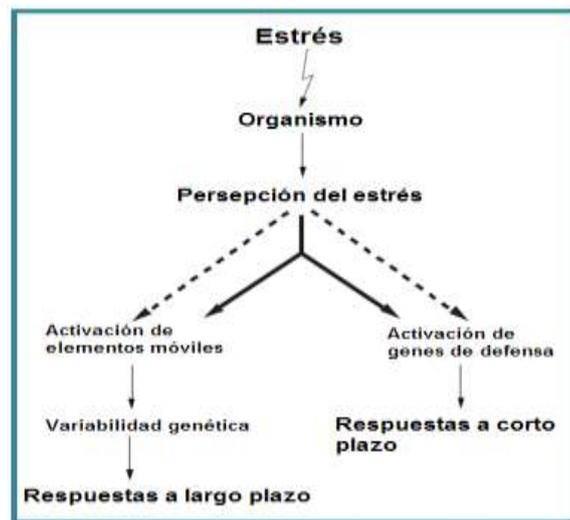


Figura 6 Modelo de transposones inducidos por estrés (Tomado de Capy et al., 2000)

Hay evidencias de la inducción de la transcripción de retrotransposones por estrés tras la formación de protoplastos, En efecto, se ha demostrado la activación transcripcional del elemento *Tnt 1* de tabaco cuando se expuso a un extracto fúngico usado para degradar la pared celular (Pouteau *et al.*, 1994). Condiciones de cultivo celular también activan la transcripción de elementos transponibles de tabaco, los *Tto 1* y *Tto 2* y *Tos17* de arroz (Hirochika, 1993; Hirochika *et al.*, 1996).

Además, diferentes tipos de estrés biótico y abiótico, como daño mecánico, estrés oxidativo e infección por patógenos inducen la expresión de los elementos *Tnt 1* y *Tto* en plantas completas de tabaco (Kumar y Bennetzen, 1999; Grandbastien, 1998).

2 ANTECEDENTES

En Nuestro grupo de trabajo se han encontrado RNAs mensajeros similares a reverso transcriptasas en savia de calabaza, al igual que otros grupos (Lough y Lucas, resultados no publicados). Dos de estos tienen homólogos en Arabidopsis, At5g36905 y At4g29090. Se Arabidopsis es la planta modelo por excelencia ya que cuenta con un genoma secuenciado y anotado, una base de herramientas genéticas disponibles así como recursos bioinformáticos para análisis de grupos de genes y regiones promotoras *in silico*.

El análisis de estos genes puede proporcionar información sobre varios aspectos. En primer lugar, nos permitirá conocer nuevos casos exitosos de co-opciones o domesticación de elementos genéticos móviles, estudiarlos detalladamente desde un punto de vista funcional, y, por último, puede aportar información acerca de los RNAs móviles de floema. Determinando sus patrones de expresión en *Arabidopsis*, determinando si efectivamente se expresan en floema también es importante saber si estos genes son regulados por la planta. De ser así proponemos que el RNA mensajero puede ser una señal sistémica. Dado que la reverso transcriptasa es capaz de unir y manipular ácidos nucleicos sugerimos que estos genes pueden ser importantes para el procesamiento de ácidos nucleicos incluyendo, síntesis, maduración, degradación o incluso transporte de los mismos.

3 JUSTIFICACIÓN

Muchos genes importantes para el desarrollo de plantas y sus interconexiones surgieron por la domesticación de sus elementos genéticos móviles, aun no se cuenta con reportes de nuevos genes domesticados involucrados el desarrollo o función del sistema vascular. El caracterizar genes similares a retroposones, con características de genes endógenos, nos permitirá profundizar más acerca de la domesticación de estos elementos genéticos en plantas y su posible función en la función o desarrollo del sistema vascular.

4 HIPÓTESIS

Los genes similares a reverso transcriptasas homólogos en *Arabidopsis thaliana* de las reverso transcriptasas de savia de calabaza se expresan en floema y son ejemplos de domesticación de elementos genéticos móviles en plantas, son transcripcionalmente activos y podrían tener un papel en el desarrollo de la planta.

5 OBJETIVO GENERAL

Determinar si los genes similares a reverso transcriptasas en *Arabidopsis thaliana* son endógenos de plantas, si son transcripcionalmente activos y funcionales y si se expresan en tejido vascular.

5.1 Objetivos Específicos

- Búsqueda de homólogos de los genes similares a reverso transcriptasas en *Arabidopsis* y otras especies y su análisis filogenético con respecto a otros elementos genéticos móviles, para determinar su posible origen.
- Análisis del patrón de expresión de dos genes similares a reverso transcriptasas en *Arabidopsis thaliana* (No. Acceso: At5g36905, At4g29090) por medio del ensayo de la beta-glucuronidasa y microscopía confocal.
- Análisis de mutantes de inserción de T-ADN de ambos genes para determinar su posible función en *Arabidopsis*.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material Vegetal

Se obtuvieron las líneas de inserción de T-DNA del ABRC stock center (Arabidopsis Biological Resource Center) para ambos genes en *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia. La línea parental SALK_049922 es homocigota para la inserción en el gen At5g36905 y la línea parental SALK_084100 es heterocigota para la inserción en el gen At4g29090 y la línea parental SALK_023866 es homocigota para el mismo gen (At4g29090), estas se analizaron directamente en suelo sin marcador de selección (de acuerdo a recomendaciones del proveedor). Se analizaron un total de 36 plantas WT y 12 de cada una de las líneas de inserción de T-DNA. Para genotipificación se diseñaron oligos para la inserción de T-DNA disponible en la red (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>).

6.2 Crecimiento in vitro de plantas de Arabidopsis

Plantas de *Arabidopsis* mutantes y silvestres fueron crecidas en condiciones controladas tanto en suelo como *in vitro*.

Las semillas fueron estratificadas a 4°C durante 2 días y sembradas en suelo/turba/agrolita en proporciones 4:4:2. Las plantas se mantuvieron en cámara de crecimiento (Conviron, A1000, Winnipeg, Canada) con las siguientes condiciones: Humedad relativa 70%, 22°C de temperatura y un fotoperiodo de 16 horas luz, 8 oscuridad. Las plantas también fueron crecidas en cuarto de crecimiento, sin fotoperiodo con una intensidad luminosa de 470-418 Luxes $\mu\text{M}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ a 25 °C hasta su uso.

Para crecimiento in vitro las semillas de *Arabidopsis* fueron lavadas con hipoclorito al 15% durante 3 minutos seguido de etanol al 70% 5 minutos, posteriormente fueron lavadas 5 veces con agua estéril.

Las semillas fueron sembradas en medio MS (Murashige-Skoog) (0.5 – 1 X, 0 -2 % sacarosa) para los diferentes experimentos. Su estratificación se llevó a cabo durante 2 a 4°C. Las condiciones de crecimiento *in vitro* fueron las siguientes: sin fotoperiodo con una intensidad luminosa de 470-418 Luxes $\mu\text{M}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ a 25 °C en cámara de crecimiento (Conviron, A1000, Winnipeg, Canada).

6.3 Extracción de DNA total

Las muestras de tejido fueron recolectadas de plantas silvestres de *Arabidopsis* de aproximadamente 4 semanas de edad, a partir de hojas seccionadas manualmente. El tejido fue pulverizado por crio-fractura con nitrógeno líquido usando un mortero y un pistilo hasta obtener un polvo fino. La extracción fue hecha mediante el kit comercial DNeasy (QIAGEN), de acuerdo a las recomendaciones del proveedor.

6.4 Extracción de RNA total

Las plántulas de *Arabidopsis* fueron colectadas a las dos semanas post-germinación, en pools de 3 a 6 plántulas por replica biológica, fueron removidas del medio MS. El tejido fue pulverizado por crio-fractura con nitrógeno líquido usando un mortero y un pistilo hasta obtener un polvo fino. La extracción fue hecha mediante el kit comercial Direct-zol RNA Miniprep (Zymo Research), de acuerdo a las recomendaciones del proveedor.

6.5 Electroforesis de DNA total

Se preparó agarosa al 1% p/v agarosa en amortiguador TBE 0.5% (Maniatis *et al.*, 1982). El DNA fue visualizado en el gel con un transiluminador de luz UV (Hoefler-Uvis-20).

6.6 Análisis bioinformáticos.

Se seleccionaron dos genes homólogos en *Arabidopsis* con números de acceso At5g36905 y At4g29090, a partir de la información proporcionada por Lucas y Lough del transcriptoma de savia de floema de calabaza (resultados no publicados; comunicación personal)

6.7 Obtención de Regiones Promotoras

Para la regiones potencialmente promotoras, se seleccionaron 1.5 kb utilizando el motor de búsqueda de TAIR (The *Arabidopsis* genome Initiative Resource, <http://www.Arabidopsis.org/tools/bulk/sequences/index.jsp>).

Dichas regiones contienen la región no traducida en 5' (5'UTR), aunque ésta no ha sido definida experimentalmente para estos genes. El marco de lectura genómico fue obtenido de manera semejante por medio de TAIR. Los sitios de restricción tanto del promotor como del marco abierto de lectura genómico fueron analizados por medio de la herramienta virtual de NEB cutter versión 2.0 de New England Biolabs (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>).

6.8 Búsqueda de genes RVT-Znf en el genoma de *Arabidopsis*

Se utilizó BLASTX para la búsqueda de genes que contienen el dominio RVT Znf (reverso transcriptasa con dedos de zinc) (<https://www.arabidopsis.org/tools/bulk/index.jsp>) usando la secuencia del gen At5g36905 como query el cual es el homólogo más cercano al transcrito encontrado en la savia de floema de *Cucurbita maxima* que contiene este dominio (Lucas resultados no publicados).

Se tomaron los primeros 10 genes de la búsqueda que contenían el E-value más alto y tomando en cuenta la presencia del dominio de reverso transcriptasa con dedos de zinc y el dominio de RNasa H. De acuerdo a

esto se encontraron los siguientes 5 genes (At4g29090, At3g24255, At2g02650, At3g09510 y At3g25270)

Adicionalmente se buscaron proteínas similares a las encontradas en Arabidopsis utilizando la base de datos UniProt utilizando como query el dominio de la RT At4g29090 llamado RVT-Znf (Reverso transcriptasa con dominio de unión a zinc (IPR026960). Se encontraron un total de 107 secuencias en Arabidopsis. En el caso de At5g36905 mucho de esos genes fueron anotados como retrotransposones o Pseudogenes, por lo cual para identificar esos que fueron funcionales se hizo otra búsqueda utilizando Genevestigator y AtGenExpress Visualization Tool. Finalmente el set de genes utilizados es presentado en la figura. Dominios y estructuras de los genes fueron obtenidas por medio de la base de datos de dominios conservados del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).

Se debe mencionar que el dominio RT con motif de dedo de zinc que definen este tipo de genes también se puede encontrar como zf-RVT en la base de datos Pfam (PF13966), sin embargo, esta base de datos no fue utilizado en nuestro análisis, ya que sólo 21 proteínas pudieron ser obtenidas, siendo un conjunto de genes muy pequeño.

6.9 Análisis de las secuencias

Las secuencias del gen pertenecientes a la superfamilia RVT-Znf en Arabidopsis fueron obtenidas de las bases de datos TAIR (<http://www.arabidopsis.org>) y UniProt (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR026960>). Sus números de acceso del Gdb se obtuvieron de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

6.10 Alineamiento y edición de las secuencias

Las secuencias fueron alineadas por medio del software ClustalX2 (Larkin et al. 2007). Las secuencias de la familia RVT-Znf en Arabidopsis fueron alineados utilizando los siguientes parámetros de alineamiento (pairwise op: 35, Ext: 0,7; Multiple op: 15, Ext: 0,3). La edición de las secuencias se hizo manualmente con Seaview 4 (Gouy et al, 2010). Secuencias de

Tabla 2 Mezcla para Reacción de PCR

Reactivo	Volumen (µl)
Buffer 10 x	2.5
dNTP's [2.5 mM]	2
Oligonucleótido directo [10µM]	0.5
Oligonucleótido reverso [10µM]	0.5
DNA [25 nM]	1
Taq polimerasa (TaKaRa)	0.15
Agua destilada y des-ionizada	17.35
Volumen final	25

6.13 Obtención de la construcción de la región de silenciamiento de At4g29090

Para comprobar si el gen era funcional se amplificó una región de 310 pb utilizando un gradiente de 50°C - 60°C. Con esta región se silenciará el gen, de tener función esto se manifestará en un fenotipo visible.

Tabla 3 Secuencia de oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen estructural de At4g29090 a partir de DNA genómico

Gen	Secuencia Dirección (5'-3')	Tamaño esperado (pb)
At4g29090	Directo ATGGCTCTACCAACTTATACAATGGCA Reverso CTAATGGTGCATTCAAAGGGTCAGA	310

Las condiciones para amplificar el fragmento de silenciamiento fueron las siguientes:

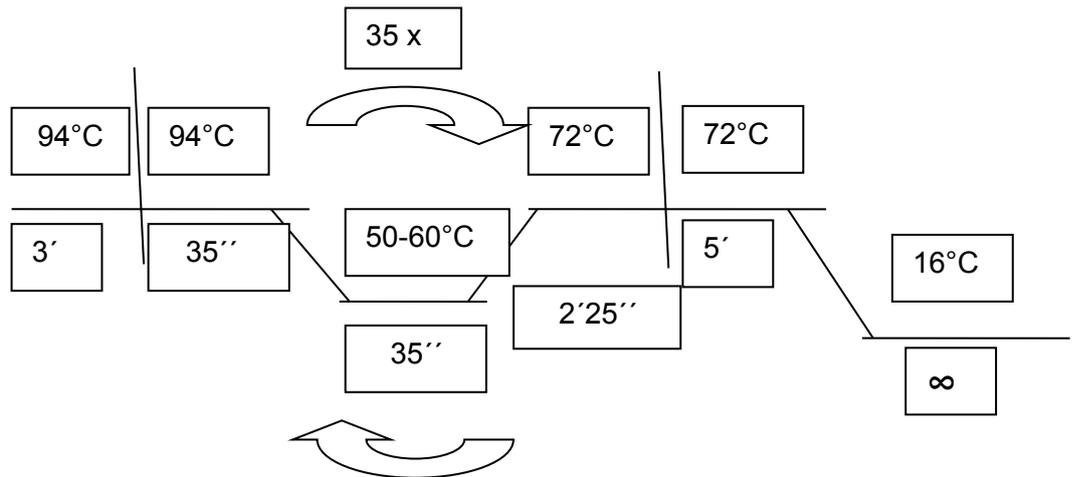


Figura 8 Programa de PCR para la amplificación del fragmento de silenciamiento de At4g29090

Tabla 4 Mezcla para Reacción de PCR

Reactivo	Volumen (μl)
Buffer 10 x	2.5
dNTP's [2.5 mM]	2
Oligonucleótido directo [10μM]	0.5
Oligonucleótido reverso [10μM]	0.5
DNA [25 nM]	1
Taq polimerasa (TaKaRa)	0.15
Agua destilada y des-ionizada	17.35
Volumen final	25

Tabla 5 Mezcla para Reacción de PCR

Reactivo	Volumen (µl)
Buffer 10 x	2.5
dNTP's [2.5 mM]	2
Oligonucleótido directo [10µM]	0.5
Oligonucleótido reverso [10µM]	0.5
DNA [25 nM]	1
Taq polimerasa (TaKaRa)	0.15
Agua destilada y des-ionizada	17.35
Volumen final	25

6.14 Ligación del producto de PCR al vector bacteriano

Se realizó una reacción de ligación entre el producto de PCR obtenido a mayor temperatura con el vector de clonación pCR/8GW/TOPO. La reacción se incubó a 22°C 16 por horas. El producto de la ligación fue utilizado para transformar células competentes de *E. coli* Match 1 (Invitrogen). Abajo se describe la composición de la ligación.

Tabla 6 Mezcla para Reacción de Ligación

Reactivo	Volumen (µl)
Producto de PCR	2
Solución salina	1
Vector pCR8GWTOPO	0.5
Agua destilada y desionizada	2.5
Volumen total	6

6.15 Transformación de células competentes

Se prepararon células químicamente competentes de *E. coli* Mach 1 como se describe en Sambrook y Russell (2001). Se agregó el plásmido recombinante y se transformaron por choque térmico, manteniéndolas 20 minutos en hielo e incubándolas después a 42° durante 50 segundos. Inmediatamente después se agregó medio SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, glucosa 20 mM, pH 7.0) y fueron incubadas durante 1h a 37°C a 225 rpm. Las células transformadas fueron crecidas en placas de medio TB suplementadas con el agente selectivo [espectinomicina (Pfizer)]. Las cajas fueron incubadas a 37°C durante 16 horas.

6.16 Análisis de restricción

Todas las enzimas de restricción usadas se obtuvieron de New England Biolabs. Para las digestiones se emplearon de 1-4 µl de DNA de cada clona, 0.30 µl de EcoRI, 2 µl de amortiguador NEB 3 10X, 0.22 µl de RNasa a 1mg/ml y lo necesario agua para un volumen final de 20 µl. Estas reacciones se incubaron a 37°C, durante 16 horas

Tabla 7 Mezcla para Digestión con EcoRI

Reactivo	Volumen (µl)
<i>DNA</i>	4
EcoRI	0.36
<i>Amortiguador NEB 3 10X</i>	2
<i>H2O</i>	13.5
Total	20

Se realizó un análisis *in silico* que nos permitiese mediante el uso de enzimas de restricción distinguir aquellas clonas que tuvieran el fragmento en la orientación correcta las cuales posteriormente se utilizaron para subclonar en el vector de expresión en plantas (pBGWFS7 en el caso del promotor de 1.5 Kb y pB7GWIWG2 (II) para el caso de silenciamiento). En la figura 9 se muestran dichos vectores.

6.17 Vectores usados en este proyecto

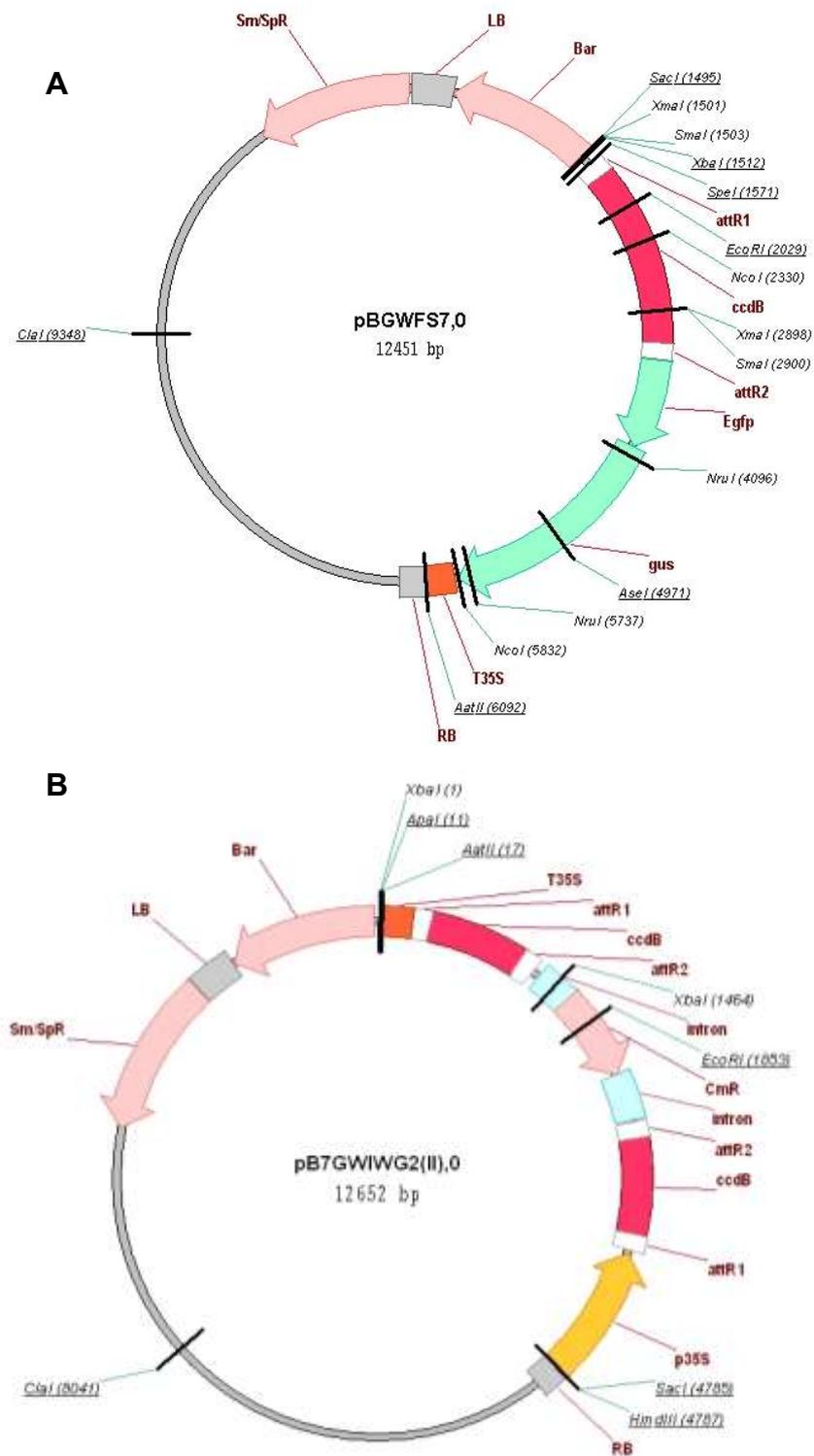
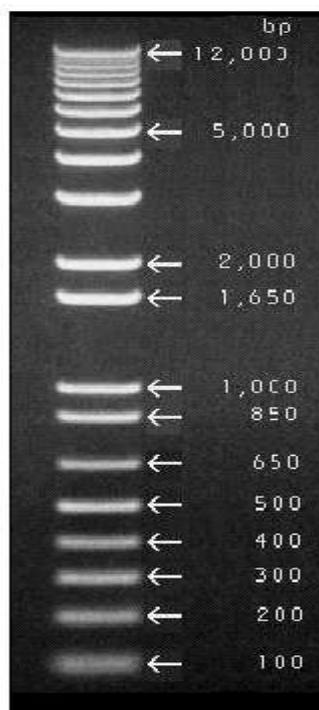


Figura 9 Vectores de Expresión en Plantas. A) Vector pBGWFS7.0 para análisis del promotor B) Vector pB7GWIWG2 (II).0 para silenciamiento

6.18 Marcador de peso molecular usado en todos los geles

El marcador de peso molecular usado en este trabajo fue el Ladder 1Kb Plus adquirido de Invitrogen



1 Kb PLUS DNA LADDER
0.7 µg/lane
0.9% agarose gel

6.19 Conservación de las cepas

Las cepas conteniendo las construcciones de interés se conservaron con glicerol al 15%. En primer lugar se cultivaron las células de *E. coli* Mach 1 durante 18 horas, se agrega 1 ml de medio de cultivo a cada tubo para conservar se centrifuga a 13, 000 rpm por un minuto se retiran 500 ml se resuspende y se agregan 500 ml de glicerol al 30% estéril.

6.20 Subclonación por recombinación

Las subclonaciones fueron realizadas por medio de reacciones de clonasa, LR de acuerdo a las recomendaciones del proveedor (Invitrogen). Se recombinó el inserto con el vector de expresión binario pBGWFS7 (Plant Genetic Systems) para el análisis de expresión del promotor, y con el vector binario pB7GWIWG2(II).0 para el análisis de la

función del gen por silenciamiento, como se muestra en la siguiente reacción:

Tabla 8 Mezcla de reacción para la recombinación a vector de expresión

Reacción	Volumen (μ l)
Plásmido de entrada lineal (20-100ng/ml)	0.5
Clonasa LR	0.3
Amortiguador Tris pH 8 (1X, 10mM)	3.2
Vector binario (pGWFS7) 200-400ng/ \square l	1.0
Total	5.0

Antes de la reacción propiamente se linealizó el vector, con el fin de reducir el fondo al máximo (ya que el vector de entrada pCR/8GW/TOPO y el binario comparten el mismo marcador de selección). Posteriormente, se transformaron nuevamente células competentes de *E. coli* Mach 1 por choque térmico, se sembraron en medio selectivo con espectinomicina. Se seleccionaron de 7-10 clonas para la extracción de DNA plasmídico.

6.21 Transformación genética de células de *Agrobacterium tumefaciens*

Se transformaron células competentes de *Agrobacterium* C58C1 por el método de electroporación, y posteriormente se sembraron en medio selectivo con espectinomicina a 30°C durante 2h. Los parámetros del electroporador utilizado fueron los siguientes: Las colonias que crecieron en este medio fueron crecidas posteriormente en medio líquido e incubadas a 30°C por 48 horas. Después se realizó extracción de DNA plasmídico de dos clonas candidatas. Estas fueron analizadas por PCR para determinar la presencia del inserto (promotor y marco de lectura genómico).

6.22 Amplificación de la región promotora 1.5 Kb rio arriba del gen At5g36905

Se realizó la amplificación por PCR de la región promotora, de 1.5 Kb corriente arriba del gen que codifica para de la transcriptasa reversa, con los siguientes oligonucleótidos específicos.

Tabla 9 Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del promotor de 1.5 Kb rio arriba del gen AT5G36905

Gen	Secuencia dirección (5'-3')	Tamaño esperado (pb)
At5g36905	Directo GAGGTCCTCTTACGACGATCACGGTAC	1,500
	Reverso TCCCAAATACTTCCCAAATCACGTGT	

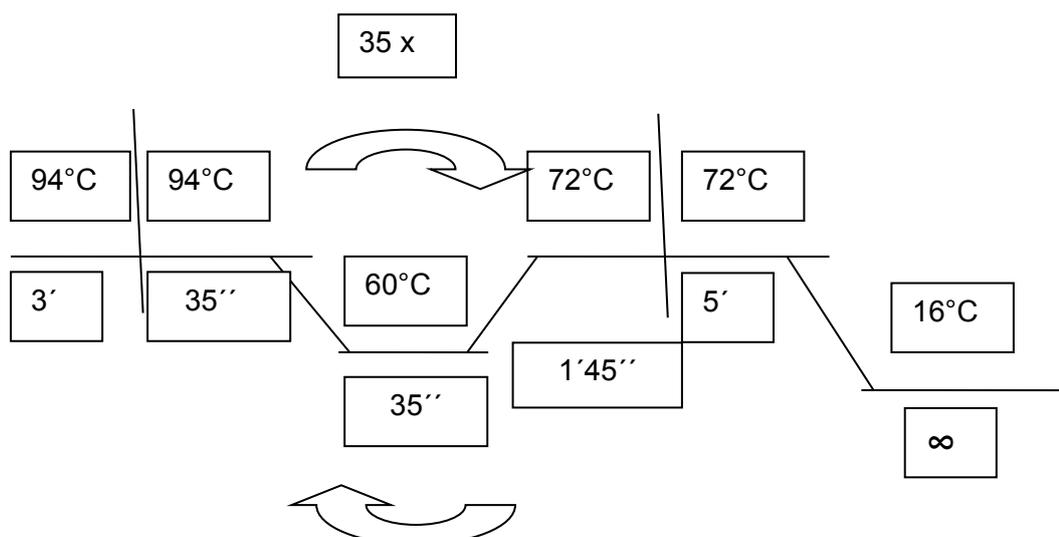


Figura 10 Programa de PCR para la amplificación de la región promotora de 1.5 Kb rio arriba del gen At5g36905

Tabla 10 Mezcla para Reacción de PCR

Reactivo	Volumen (µl)
Buffer 10 x	2.5
dNTP's [2.5 mM]	2
Oligonucleótido directo [10µM]	0.5
Oligonucleótido reverso [10µM]	0.5
DNA [25 nM]	1
Taq polimerasa (TaKaRa)	0.15
Agua destilada y desionizada	17.35
Volumen final	25

6.23 Obtención de la construcción del gen estructural At5g36905 fusionado a GFP

Para comprobar si el gen era funcional se amplificó la copia genómica utilizando un gradiente de 50°C - 60°C. Su correcto procesamiento manifestado por la presencia de fluorescencia en las plantas transgénicas nos indicaría la funcionalidad del gen.

Tabla 11 Secuencia de oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen estructural de At5g36905 a partir de DNA genómico

Gen	Secuencia Dirección (5'-3')	Tamaño esperado (pb)
At5g36905	Directo ATGCCTGCAAAAACGAATAAATAAGGAC Reverso GTACCATCTTTCTCTAATTGTCTCATT	2,387

Las condiciones para amplificar el marco de lectura genómico fueron las siguientes:

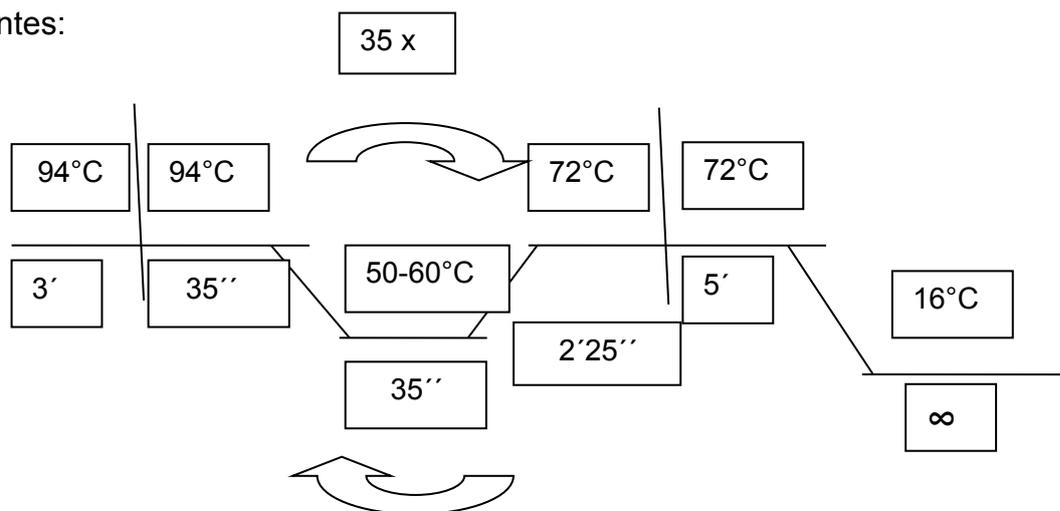


Figura 11 Programa de PCR para la amplificación del gen estructural At5g36905

Tabla 12 Mezcla para Reacción de PCR

Reactivo	Volumen (μl)
Buffer 10 x	2.5
dNTP's [2.5 mM]	2
Oligonucleótido directo [10μM]	0.5
Oligonucleótido reverso [10μM]	0.5
DNA [25 nM]	1
Taq polimerasa (TaKaRa)	0.15
Agua destilada y desionizada	17.35
Volumen final	25

6.24 Ligación del producto de PCR al vector bacteriano

Se realizó una reacción de ligación entre el producto de PCR obtenido a mayor temperatura con el vector de clonación pCR/8GW/TOPO. La

reacción se incubó a 22°C 16 por horas. El producto de la ligación fue utilizado para transformar células competentes de *E. coli* Match 1 (Invitrogen). Abajo se describe la composición de la ligación.

Tabla 13 Mezcla para Reacción de Ligación

Reactivo	Volumen (µl)
Producto de PCR	2
Solución salina	1
Vector pCR8GWTOPO	0.5
Agua destilada y desionizada	2.5
Volumen total	6

6.25 Transformación de células competentes

Se prepararon células químicamente competentes de *E. coli* Mach 1 como se describe en Sambrook y Russell (2001). Se agregó el plásmido recombinante y se transformaron por choque térmico, manteniéndolas 20 minutos en hielo e incubándolas después a 42° durante 50 segundos. Inmediatamente después se agregó medio SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, glucosa 20 mM, pH 7.0) y fueron incubadas durante 1h a 37°C a 225 rpm. Las células transformadas fueron crecidas en placas de medio TB suplementadas con el agente selectivo [espectinomicina (Pfizer)]. Las cajas fueron incubadas a 37°C durante 16 horas.

6.26 Análisis de restricción

Todas las enzimas de restricción usadas fueron de New England Biolabs. Para las digestiones se emplearon 4 µl de DNA de cada clona, 0.36 µl de EcoRI, 2 µl de amortiguador NEB 3 10X, 0.22 µl de RNasa a 1mg/ml y 13.5 µl de agua para un volumen final de 20 µl. Estas reacciones se incubaron a 37°C, durante 16 horas

Tabla 14 Mezcla para Digestión con EcoRI

Reactivo	Volumen (μl)
<i>DNA</i>	4
EcoRI	0.36
<i>Amortiguador NEB 3 10X</i>	2
<i>H2O</i>	13.5
Total	20

Se realizó un análisis *in silico* que nos permitiese mediante el uso de enzimas de restricción distinguir aquellas clonas que tuvieran el fragmento en la orientación correcta las cuales posteriormente se utilizaron para subclonar en el vector de expresión en plantas (pBGWFS7 en el caso del promotor de 1.5 Kb y pB7WG2 para el caso del gen estructural). En la figura 12 se muestran dichos vectores.

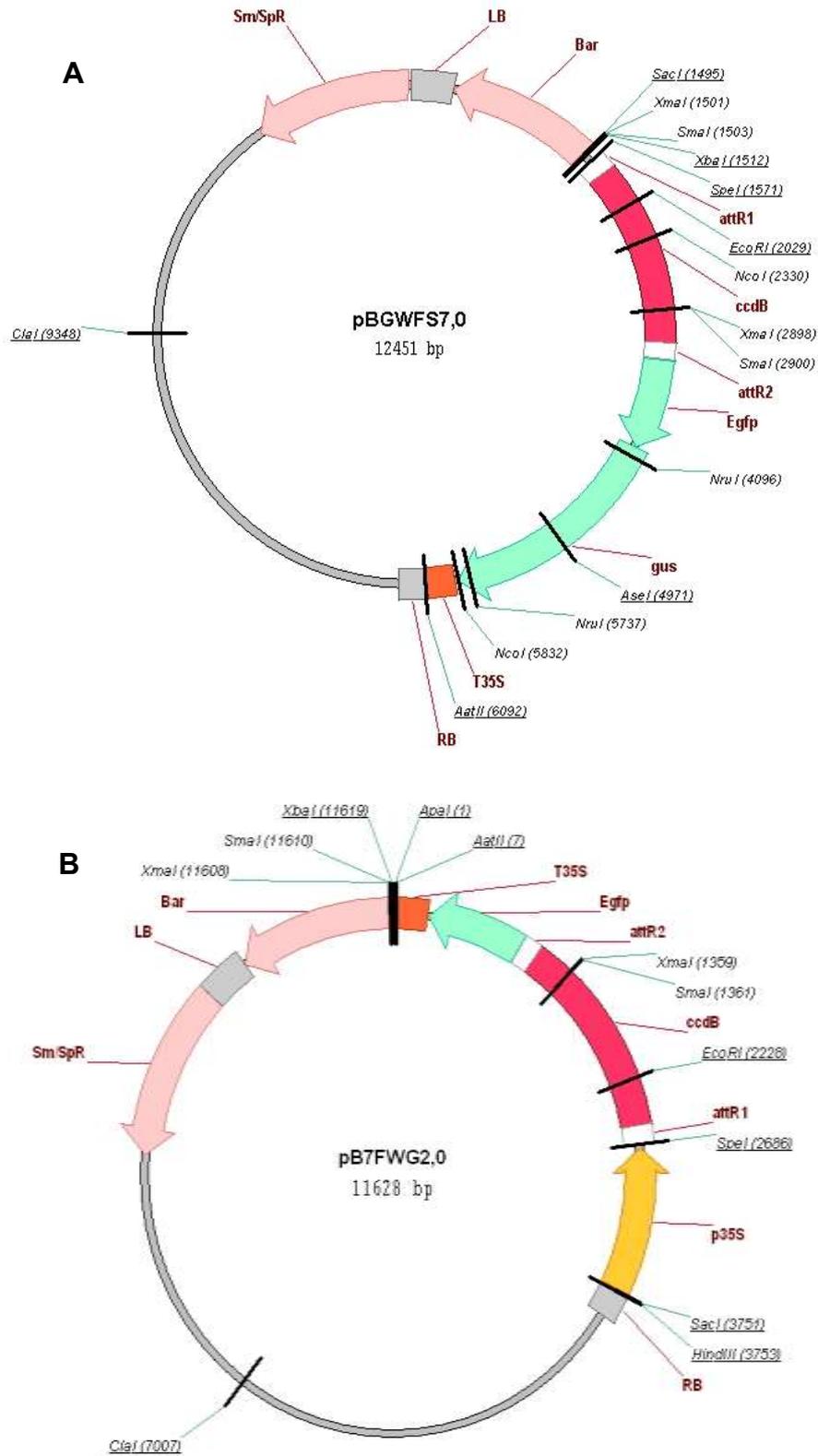


Figura 12 Vectores de Expresión para plantas. A) Vector pbgwfs7.0 para análisis del promotor B) Vector pB7FWG2.0 para análisis de gen estructural

Para estas digestiones se emplearon 2 μ l de DNA, 0.3 μ l de EcoRV, en el caso de la digestión para el promotor, y 0.3 μ l de EcoRV y BamHI para la digestión del gen estructural, 2 μ l de amortiguador NEB 2 10X, 0.2 μ l de amortiguador BSA 100X 0.5 μ l de RNasa y 15 μ l de agua para un volumen final de 20 μ l.

Tabla 15 Reacción de Digestión con EcoRV

Reacción	Volumen (μ l)
DNA	2
EcoRV	0.3
Amortiguador NEB 2 (10X)	2
Amortiguador BSA (100X)	0.2
RNasa [10 mg/ml]	0.5
H ₂ O	15
Total	20

Se secuenciaron clonas tanto del promotor como del gen estructural, la clona candidata número 1 y la clona 8, respectivamente. Ambas mostraron un **99% de identidad** y tras un análisis tipo BLAST realizado contra el genoma de *Arabidopsis*

Tabla 16 Reacción de Digestión con EcoRV y BamHI

Reacción	Volumen (μ l)
DNA	2
EcoRV	0.3
BamHI	0.3

Amortiguador NEB 2 (10X)	2
Amortiguador BSA (100X)	0.2
RNasa	0.5
H2O	14.7
Total	20

6.27 Conservación de las cepas

Las cepas conteniendo las construcciones de interés se conservaron con glicerol al 15%. En primer lugar se cultivaron las células de *E. coli* Mach 1 durante 18 horas, se agrega 1 ml de medio de cultivo a cada tubo para conservar se centrifuga a 13, 000 rpm por un minuto se retiran 500 ml se resuspende y se agregan 500 ml de glicerol al 30% estéril.

6.28 Subclonación por recombinación

Las subclonaciones fueron realizadas por medio de reacciones de clonasa, LR esencialmente como ha sido descrito por el proveedor (Invitrogen). Se recombinó el inserto con el vector de expresión binario pBGWFS7 (Plant Genetic Systems) para el análisis de expresión del promotor, y con el vector binario pB7FWG2 para el análisis de expresión del marco de lectura, y con el vector en plantas preparando la siguiente reacción:

Tabla 17 Mezcla de reacción para la recombinación a vector de expresión

Reacción	Volumen (µl)
Plásmido de entrada lineal (20-100ng/ml)	0.5
Clonasa LR	0.3
Amortiguador Tris pH 8 (1X, 10mM)	3.2

Vector binario (pGWFS7) 200-400ng/□l	1.0
Total	5.0

6.29 Transformación genética de *Arabidopsis*

Se transformaron plantas silvestres de *Arabidopsis* por el método de inmersión floral esencialmente como ha sido descrito por Clough y Bent (1998). Plantas con inflorescencia formadas recientemente (3-4 semanas después de la germinación) fueron podadas con el fin de generar más inflorescencias y, por extensión, más flores inmaduras, que son las estructuras transformadas *Agrobacterium*. Posteriormente se obtuvieron céspedes de *Agrobacterium* transformada con las construcciones de interés. Las células fueron cosechadas y resuspendidas en un medio que contenía bencil aminopurina (BAP), un detergente no iónico como surfactante, silwett (Lehle), y sacarosa al 15%. Las plantas fueron sumergidas brevemente en la suspensión bacteriana, y se dejaron en invernadero hasta la recolección de semillas. Estas fueron germinadas en medio MS con el agente selectivo, el herbicida glifosato FLUKA-45521; SIGMA-ALDRICH). Se cosecharon las semillas (F1) y se sembraron nuevamente para obtener la segunda generación (F2) de plantas transgénicas. La F1 y las siguientes generaciones fueron analizadas para actividad de GUS por histoquímica como se muestra a continuación.

6.30 Análisis de expresión de GUS.

Para determinar expresión de GUS, se tomaron plánulas, órganos o tejidos de *Arabidopsis*, y se incubaron a 0 a 4 °C, al vacío en solución de GUS (0.5 mM) con el sustrato X-gluc (Research Organics). Se incubaron a 37°C por 72 horas, y se destiñeron con lavados sucesivos de ácido acético: etanol, 3:1 y acetona:metanol , (3:1 in en ambas soluciones). Finalmente las muestras se montaron con glicerol al 50% y fueron observadas en un microscopio de disección Nikon SMZ745T (Nikon México). Las imágenes fueron obtenidas con una cámara Nikon usando el software NIS-Element.

Tabla 18 **Solución de GUS**

0.5 M Na ₂ PO ₄ pH 7	10 ml
Tritón X 20 20%	250 µl
EDTA 1M pH8	100 µl
Ferrocianuro 100 mM	250 µl
Ferricianuro 100 mM	250 µl
X-gluc (en 1ml de DMF)	0.025 g
Agua	39 ml
Total	50 ml

6.31 Tratamiento hormonal

Plántulas de Arabidopsis fueron sumergidas en medio MS 1X (Murashige y Skoog, 1962) y 1% de sacarosa, más el regulador del crecimiento respectivo durante 16 horas en cuarto de crecimiento antes mencionado. Todos los reguladores de crecimiento fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), y se utilizaron en las siguientes concentraciones: 1 y 30 µM de ácido 3-indolacético (auxina); 1 y 10 µM de ácido abscísico; 1 y 10 µM de kinetina (citocinina); 1 y 10 µM, GA3 (ácido giberélico); 100 nM y 1 µM de ácido salicílico y el control tratado con MS 1X y 1% sacarosa. Las concentraciones de hormona fueron seleccionados de acuerdo a Weigel y Glazebrook (2002) y la base de datos AtGenExpress (Goda et al., 2008).

6.32 RT-PCR cuantitativa (QRT-PCR)

Se utilizaron pools de 3 a 6 plántulas de Arabidopsis, en cada caso se obtuvieron dos muestras biológicas y dos réplicas técnicas. ARN total fue extraído a partir de estas muestras. La cuantificación se hizo por medio de RT-PCR utilizando un kit comercial siguiendo las recomendaciones del fabricante (KAPA SYBR Fast universal de un solo paso qRT PCR-Kit; KAPA Biosystems, Wilmington MA). La plataforma utilizada fue One Step Plus (Applied Biosystems, Waltham MA) para

este análisis. Se aplicó el método $\Delta\Delta CT$ para determinar las cantidades relativas de los transcritos correspondientes (Livak y Schmittgen, 2001).

7 RESULTADOS

7.1 Extracción de ADN genómico

La extracción fue hecha mediante el kit comercial DNeasy (QIAGEN), de acuerdo a las recomendaciones del proveedor.



Figura 13 ADN total de *A. thaliana*. Gel de agarosa 0.8%. Carril 1, marcador de peso molecular, 1 Kb plus, carril 2, ADN total de *A. thaliana*

7.2 Obtención de la región promotora de 1.5 Kb rio arriba del gen At4g29090

Se diseñaron oligonucleótidos, como se muestra en materiales y métodos y con ellos se realizó la amplificación por PCR de la región promotora, de 1.5 kb corriente arriba del gen que codifica para de la reverso transcriptasa At4g29090 como se muestra en la figura.

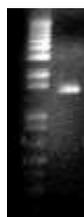


Figura 14 Amplificación del promotor por PCR. Gel de agarosa 0.8%. Carril 2. Amplicón de 1.5 Kb de la región promotora del gen que codifica para la reverso transcriptasa At4g29090. Carril 1, marcador de peso molecular, 1 Kb plus.

La banda obtenida fue purificada y ligada al vector de clonación bacteriano pCR/8GW/TOPO (Invitrogen). La mezcla de ligación fue utilizada para transformar células competentes; mismas, que fueron crecidas en medios selectivos para la posterior purificación de ADN plasmídico y se muestra en la siguiente figura.

Todas las enzimas de restricción utilizadas fueron adquiridas de New England Biolabs (NEB) a menos que se indique de otra forma.

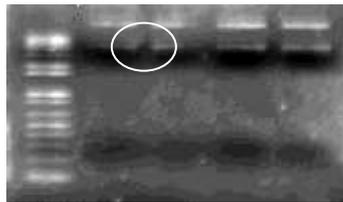


Figura 15 Extracción de ADN plasmídico. Gel de agarosa 0.8%. Carriles 2-5 ADN plasmídico de la ligación del vector de clonación pCR/8GW/TOPO con el producto de PCR de 1.5 Kb. Carril 1 escalera 1Kb plus.

7.3 Análisis con enzimas de restricción del fragmento de 1.5 Kb

El ADN de los plásmidos purificados fue digerido con la enzima de restricción EcoRI, la cual libera al inserto. La digestión de estos plásmidos produjo dos bandas, una de 2.8 Kb, correspondiente al tamaño del vector pCR/8GW/TOPO y una de menor tamaño, correspondiente al promotor de 1.5 Kb. Verificando que los plásmidos antes obtenidos contienen el inserto de interés.

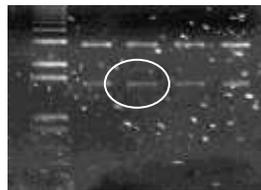


Figura 16 Análisis de restricción de plásmidos recombinantes. Gel de agarosa al 0.8%. Carriles 2-5 fragmento de 1.5 Kb y vector de clonación pCR/8GW/TOPO. Carril 1 escalera 1 Kb plus.

Una vez comprobada la presencia de los insertos, se procedió a analizar la orientación de éstos con respecto al vector. Para este análisis se digirió el vector conteniendo al inserto con la enzima XbaI



Figura 17 **Análisis de la orientación de los insertos en vector de clonación.** Gel de agarosa 0.8%. Carril 2-5 plásmido digerido con XbaI. Carril 1 escalera 1 Kb plus.

Se seleccionó la clona 3 para la posterior reacción de recombinación con el vector de expresión en plantas pBGWFS7,0

7.4 Subclonación por recombinación y verificación de la presencia del fragmento de 1.5 Kb en el vector de expresión

El vector pBGWFS7,0 se utilizó para posteriormente dirigir la transcripción de los genes reporteros EGFP-GUS, con el terminador T35S.

Previo a la subclonación el vector de entrada fue linealizado, debido a que tanto éste vector como el vector de destino cuentan con resistencia para el mismo antibiótico utilizado como marcador de selección. El vector lineal se muestra en la siguiente figura.



Figura 18 **Linealización del plásmido recombinante en vector de clonación.** Gel de agarosa 0.8%. Carril 2 plásmido linealizado con XhoI. Carril 1 escalera 1 Kb plus.

Nuevamente se re-extrajo el ADN genómico esta vez obteniendo exclusivamente al vector de expresión en plantas como se muestra a continuación.



Figura 19 **Análisis electroforético de la extracción de ADN plasmídico del promotor del gen At4g29090 en el vector de expresión pGWFS7.** Gel de agarosa al 0.8%.

Carriles 2-8 vector de expresión pBGWFS7. Carril 1 escalera 1Kb

Posteriormente se comprobó la presencia del inserto, digiriendo con la enzima EcoRI, en el vector de expresión, se puede observar que sólo la clona 5 poseía el inserto.

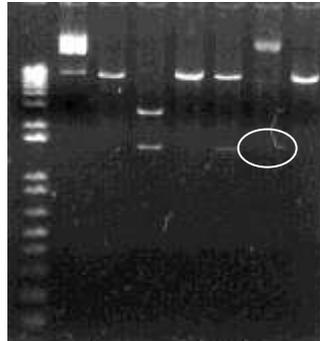


Figura 20 Verificación del promotor del gen *At4g29090* en el vector de expresión **pBGWFS7**. Gel de agarosa al 0.8%. Carriles 2-8 vector de expresión pBGWFS7. Carril 1 escalera 1Kb.

7.5 Transformación de *A. tumefaciens*

Debido a que *Agrobacterium tumefaciens* es capaz de infectar flores inmaduras en dicotiledóneas con una alta eficiencia, se transformaron células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1, y posteriormente se extrajo su ADN plasmídico para comprobar presencia del inserto. Un gel de agarosa con los perfiles electroforéticos de estos plásmidos se muestra en la figura.

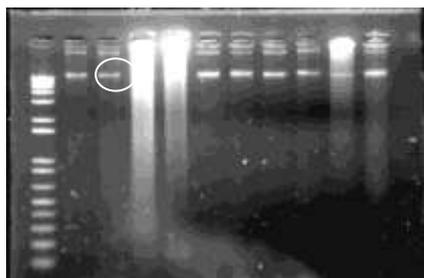


Figura 21 Análisis electroforético de la extracción del ADN plasmídico del gen **At4g29090** en el vector de expresión pBGWFS7 en *Agrobacterium*. Gel de agarosa al 0.8%. Carriles 2-11 vector de expresión pBGWFS7. Carril 1 escalera 1Kb

Se comprobó inserto en *Agrobacterium*, todas las clonas seleccionadas resultaron positivas, la comprobación se hizo por digestión del ADN con la enzima de restricción EcoRI. Se escogió la clona 1 para transformar plantas silvestres de *Arabidopsis* por inmersión floral.

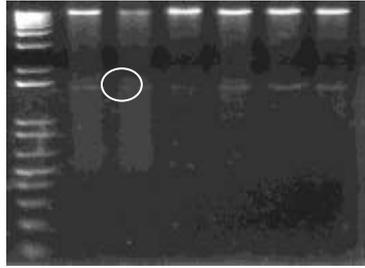


Figura 22 Verificación del inserto del promotor del gen At4g29090 en el vector de expresión pBGWFS7 en *Agrobacterium tumefaciens*. Gel de agarosa al 0.8%. Carriles 2-7 vector de expresión pBGWFS7. Carril 1 escalera 1Kb

7.6 Obtención de la región de silenciamiento de 310 pb del gen At4g29090

Se diseñaron oligonucleótidos que comprenden la región 5' del gen empezando por el codón de inicio de At4g29090, como se muestra en materiales y métodos y con ellos se realizó la amplificación por PCR de la región de silenciamiento de 310 pb del extremo 5' del gen que codifica para la reverso transcriptasa At4g29090.

Se realizó la amplificación por PCR de la región de silenciamiento, de 310 pb del gen que codifica para la reverso transcriptasa At4g29090 utilizando ADN genómico de plantas silvestres como molde.

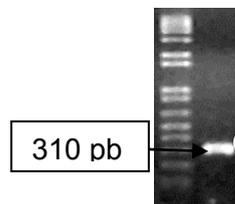


Figura 23 Amplificación de la región de silenciamiento por PCR. Gel de agarosa 0.8%. Carril 2, amplicón de 310 pb correspondiente a la región de silenciamiento del gen que codifica para la reverso transcriptasa At4g29090. Carril 1, marcador de peso molecular, 1 kb plus.

Se realizó una reacción de ligación entre el producto de PCR obtenido a mayor temperatura con el vector de clonación pCR/8GW/TOPO. Se transformaron células competentes, se seleccionaron seis clones y se les extrajo el ADN plasmídico que se muestra a continuación.

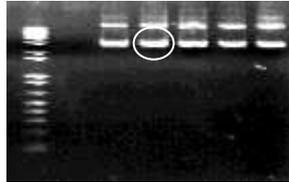


Figura 24 Extracción de ADN plasmídico del vector de clonación. Gel de agarosa 0.8%. Carriles 2-7 ADN plasmídico de la ligación del vector de clonación pCR/8GW/TOPO con el producto de PCR de 310 pb. Carril 1 escalera 1kb plus.

El ADN de los plásmidos purificados fue digerido con la enzima de restricción EcoRI, la cual flanquea los insertos clonados en este vector. Las clonas 4 y 6 fueron positivas, e seleccionó la clona 4.

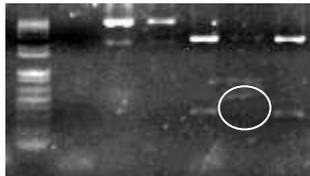


Figura 25 Análisis de restricción de plásmidos recombinantes. Gel de agarosa al 0.8%. Carriles 2-5 fragmento de 1.5 Kb y vector de clonación pCR/8GW/TOPO. Carril 1 escalera 1 Kb plus.

Se sub-clonó en el vector binario para silenciamiento pB7GWIWG2(II), el cual al ser transcrito genera una horquilla de RNA de doble cadena que es reconocida por la maquinaria de silenciamiento de la planta.

Se linealizó el vector de entrada previamente, ya que ambos vectores contienen el mismo antibiótico de selección.



Figura 26 Linealización del plásmido recombinante en vector de clonación. Gel de agarosa 0.8%. Carril 2 plásmido linealizado. Carril 1, escalera 1 Kb plus

Se extrajo el ADN plasmídico de cuatro clonas candidatas, sólo las clonas 1 y 4 contenían al vector de expresión

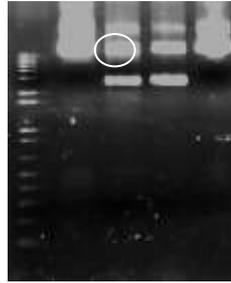


Figura 27 **Análisis electroforético de la extracción de ADN plasmídico de la región de silenciamiento del gen At4g29090 en el vector de expresión pB7GWIWG2(II).** Gel de agarosa al 0.8%. Carriles 2-11 vector de expresión pBGWFS7. Carril 1 escalera 1Kb

Se comprobó inserto por PCR en la clona 1 (primer carril: clona 1; segundo carril: plásmido vacío; tercer carril: marcador de peso molecular.). la clona 1 resultó positiva.



Figura 28 **Verificación del promotor del gen At4g29090 en el vector de expresión pB7GWIWG2(II).** Gel de agarosa al 0.8%. Carril 2 vector con inserto. Carril 3 vector sin inserto. Carril 1 escalera 1Kb.

Se transformaron células electro-competentes y de igual manera se procedió a extraer el ADN plasmídico

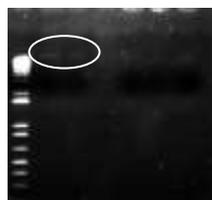


Figura 29 **Verificación de la presencia de la región de silenciamiento de At4g29090 en el vector de expresión pB7GWIWG2(II) en Agrobacterium.** Gel de agarosa al 0.8%. Carriles 2-7 vector de expresión pBGWFS7. Carril 1 escalera 1kb.

Se comprobó la presencia del inserto de dos clonas por PCR con oligos específicos.



Figura 30 Verificación del promotor del gen **At4g29090** en el vector de expresión **pB7GWIWG2(II)** en **Agrobacterium**. Gel de agarosa al 0.8%. Carriles 2 y 3 vector con inserto. Carril 4 vector sin inserto. Carril 1 escalera 1kb.

7.7 Análisis de la expresión de los promotores de At4g29090 y At5g36905 por el ensayo de GUS

Se transformaron plantas por inmersión floral y se analizó la primera generación de semillas transformadas, es decir, las semillas de las plantas transformadas fueron cosechadas y seleccionadas en suelo usando glufosinato de amonio como agente selectivo, cada planta seleccionada se trató como una línea independiente, en total obtuvimos 2 plántulas resistentes para At5g36905 y 2 plántulas resistentes para At4g29090. Para el caso del análisis de plantas adultas se obtuvieron 4 líneas resistentes para At5g36905.

Se observaron patrones de expresión muy similares para ambos genes, en tricomas, ápice, peciolos, en toda la longitud del tallo y la raíz. No observamos expresión específica de tejido vascular salvo en raíz.

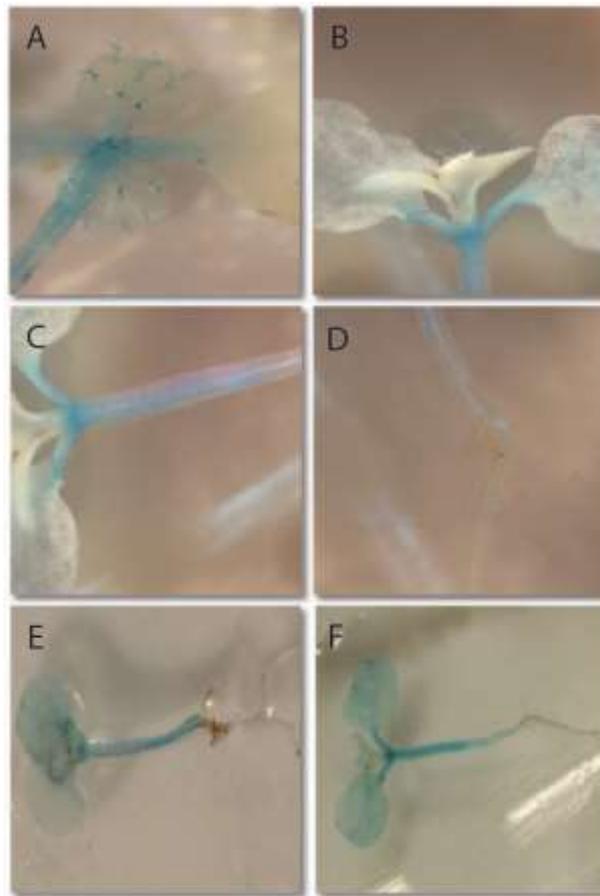


Figura 31 **Expresión del promotor en Plántulas de Arabidopsis Transformadas con las Construcciones pAt5g36905:GFP-GUS y pAt4g29090:GFP-GUS.** A) Tricomas. B) Ápice. C) Tallo. D) Raíz. E) Plántula completa At4g29090. F) Plántula completa de At5g36905.

Se analizaron órganos en plantas adultas de Arabidopsis para At5g36905 donde se observó expresión específica en tejido vascular en vena central y venas secundarias en hojas de roseta, también verificó expresión del promotor en flor específicamente en carpelo y en silicuas. No pudimos observar expresión en ningún otro órgano o tejido, aunque no se analizaron raíces.

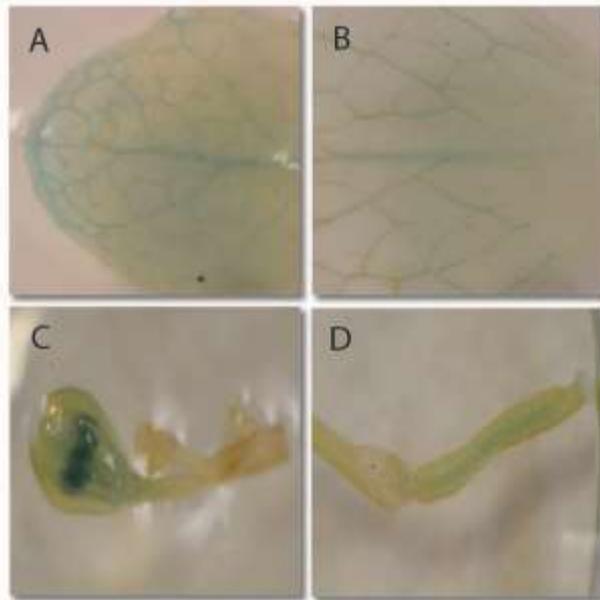


Figura 32 Expresión del promotor en Órganos de Plantas Adultas Transformadas con las Construcciones pAt5g36905:GFP-GUS. **A) Vena central y Venas secundarias. B) Vena central y Venas secundarias. C) Carpelo. D) Silicua.**

7.8 Análisis de la expresión de diferentes genes en Arabidopsis con similitud a reverso transcriptasas bajo diferentes reguladores de crecimiento por qRT-PCR

Se obtuvieron un total de 31 genes con similitud a reverso transcriptasas en Arabidopsis con el dominio de RVT-Znf, de éstas se tomaron un total de 6 genes At5g36905, At4g29090, At3g09510, At3g02650, At3g25270 y At2g19100 y se midieron sus niveles de expresión bajo 2 diferentes

concentraciones de 6 de los principales reguladores de crecimiento en plantas auxinas (IAA), ácido abscísico, brasinoesteroides, ácido giberélico (GA₃), citocininas y ácido salicílico durante 16 horas.

En el caso del tratamiento con GA₃ se observó represión significativa en ambas concentraciones ensayadas a GA₃ 10 μM se reprimieron At4g29090 y At3g09510; con GA₃ 1 μM se reprimieron de manera significativa, At2g02650 y At3g25270 y At2919100.

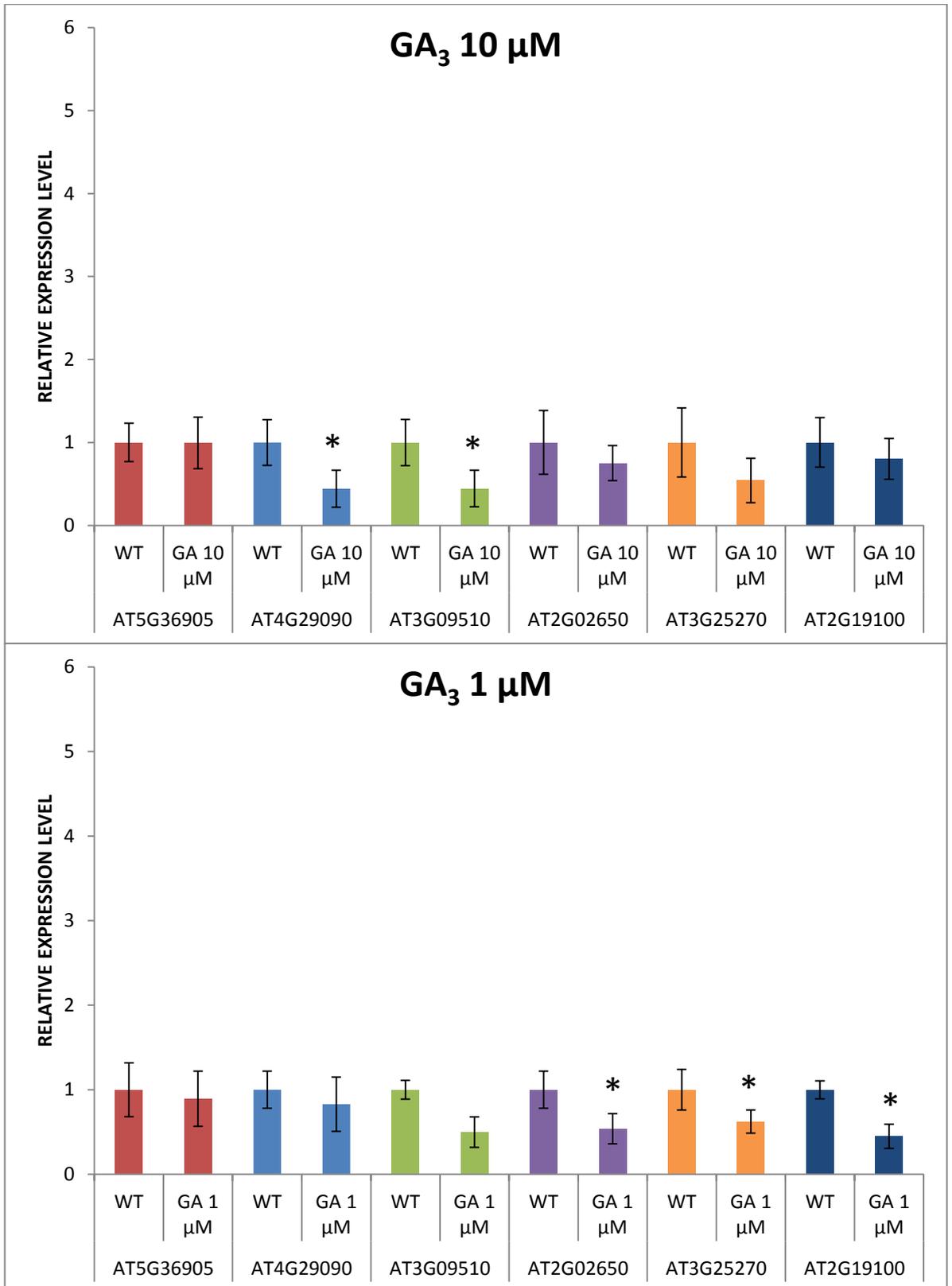
Con el tratamiento con IAA se observó respuesta significativa sólo a la menor concentración de IAA 1 μM, donde se indujeron de manera significativa todos los genes analizados; mientras que no hubo diferencias significativas en ningún gen a 30 μM de IAA.

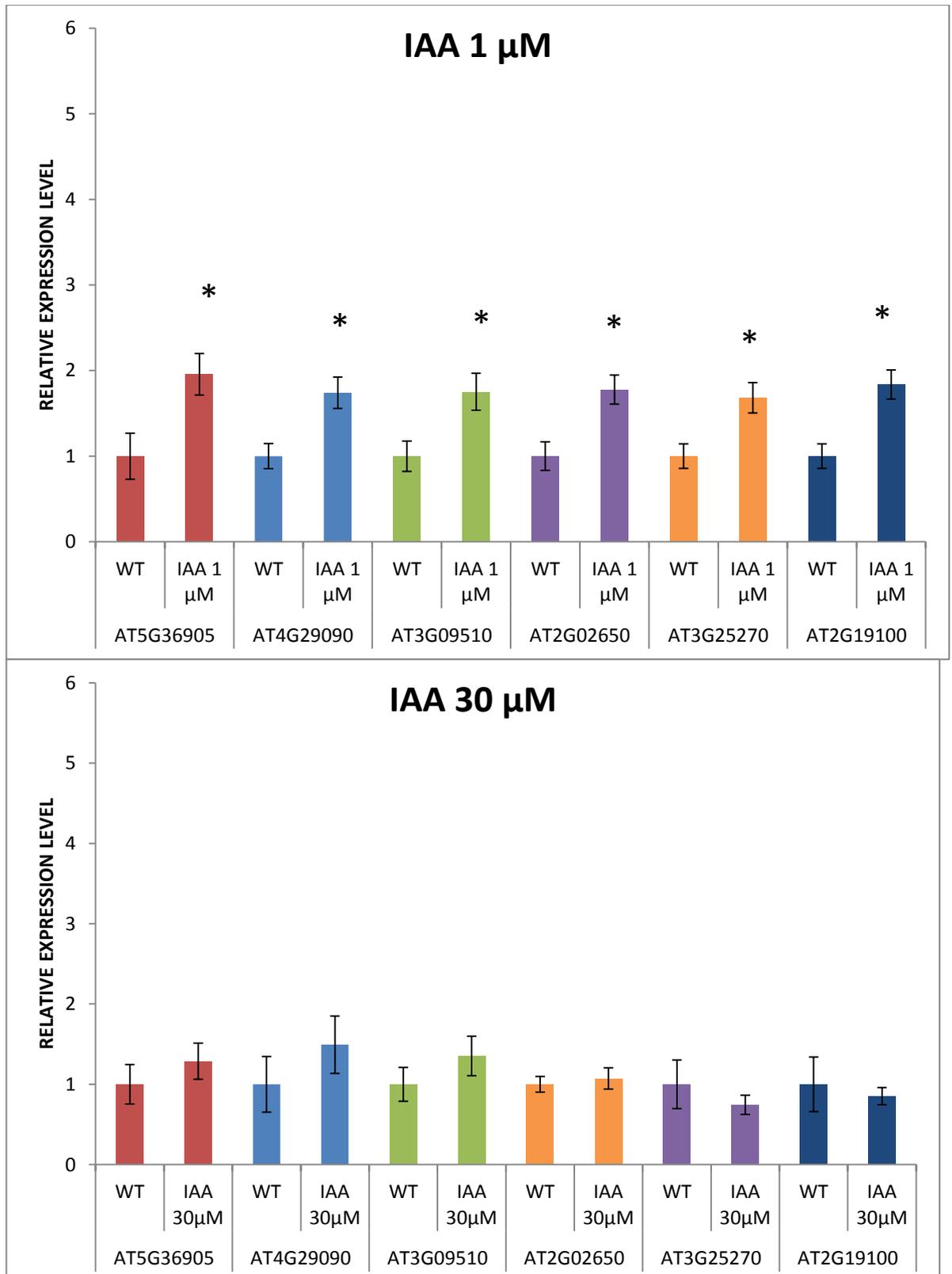
Con el tratamiento con SA se observaron tendencias opuestas a las diferentes concentraciones. De todos los genes tratados con SA 1 μM, sólo At4g29090 fue inducido significativamente; con el tratamiento con SA 100 nM, a diferencia de lo observado con la concentración mayor, se observó represión significativa en At5g36905, At2g02650 y At3g25270 y At2919100.

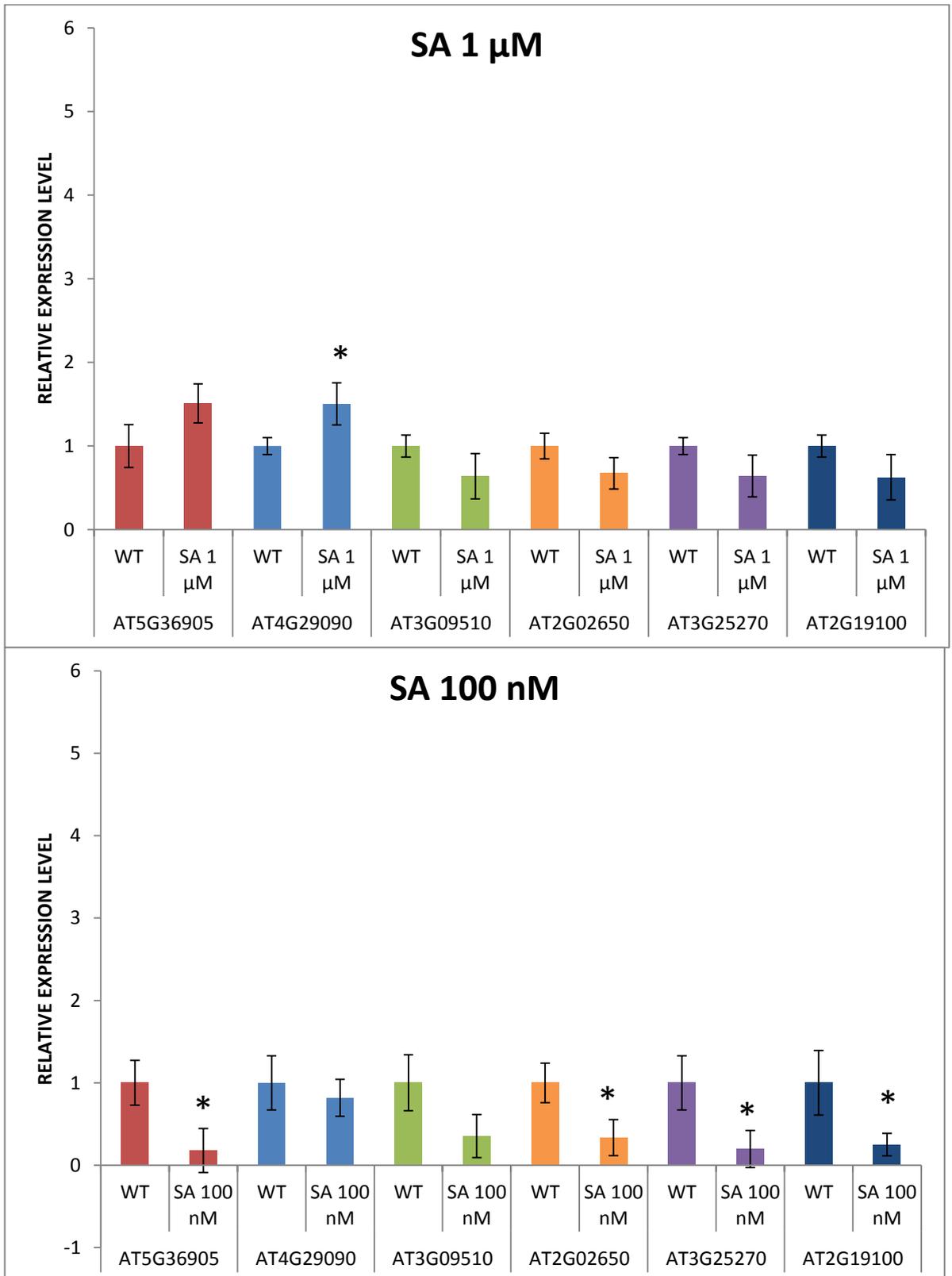
Con cinetina se observó inducción significativa en las dos concentraciones probadas y a valores considerables en ciertos genes; a 10 μM, se indujo At5g36905 alrededor de tres veces del valor del control; mientras que, a la concentración más baja de 1 μM se indujeron de manera significativa todos los genes analizados, con la excepción de At2g19100 que fue el único gen reprimido con este tratamiento; y At4g29090 fue inducido cerca de 6 veces el valor del control no tratado.

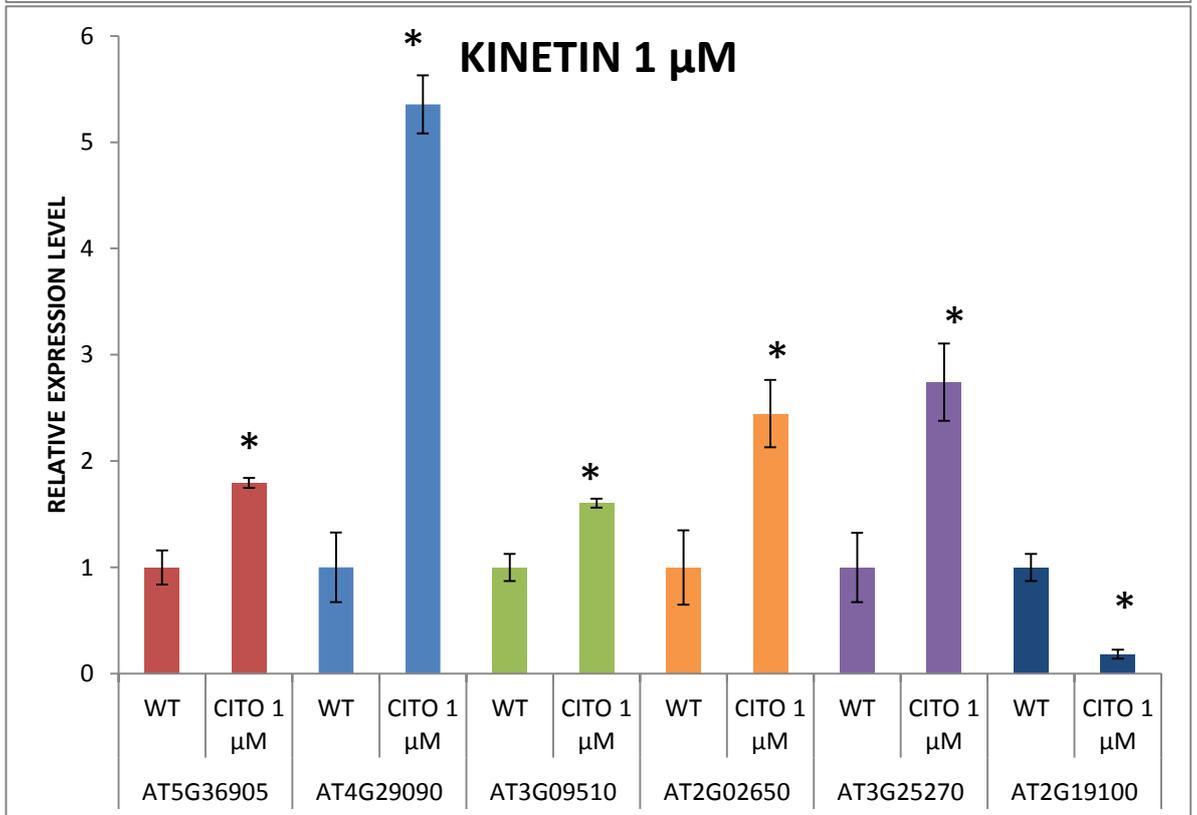
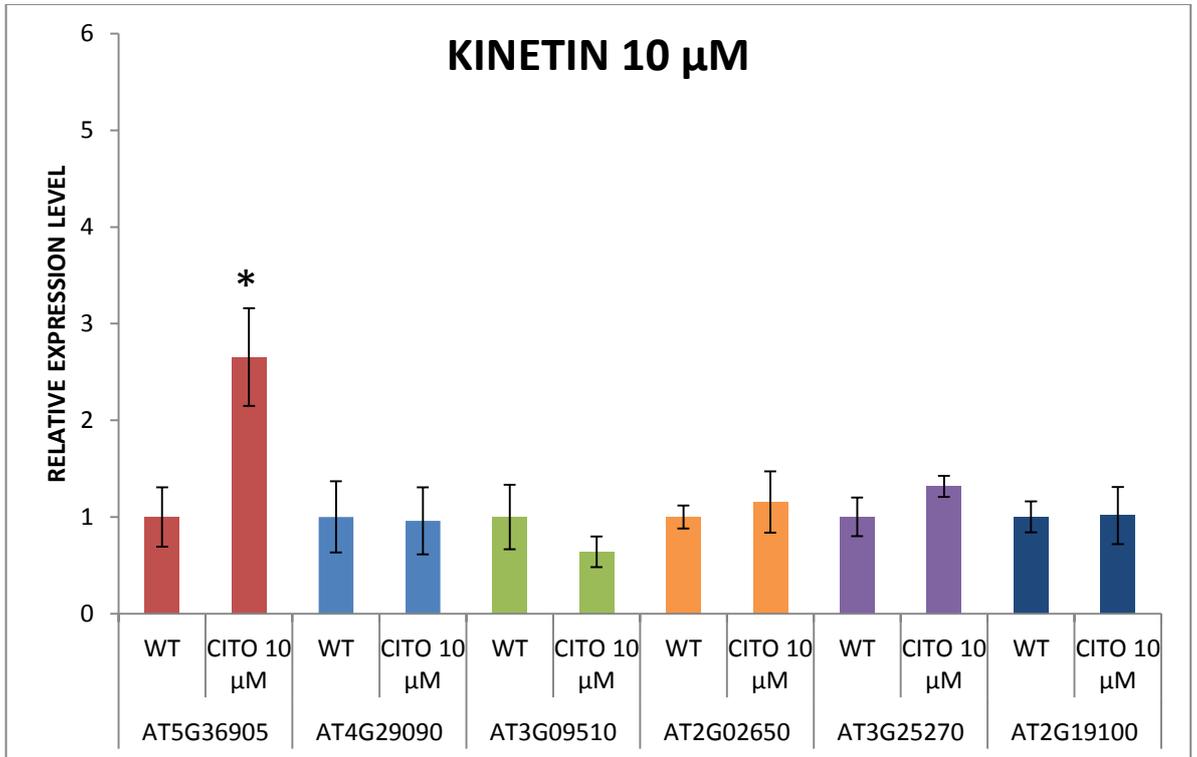
Finalmente, en el tratamiento con ABA se observó respuesta significativa sólo a la menor concentración, de manera muy parecida a lo observado con IAA. A esta menor concentración de ABA 1 μM, y de nuevo de manera semejante a lo observado con IAA, se observó inducción significativa en todos los genes analizados con excepción de At3g25270 el cuál no mostró diferencias significativas. A la mayor concentración de

ABA 10 μM no se observaron diferencias significativas en ningún gen analizado.









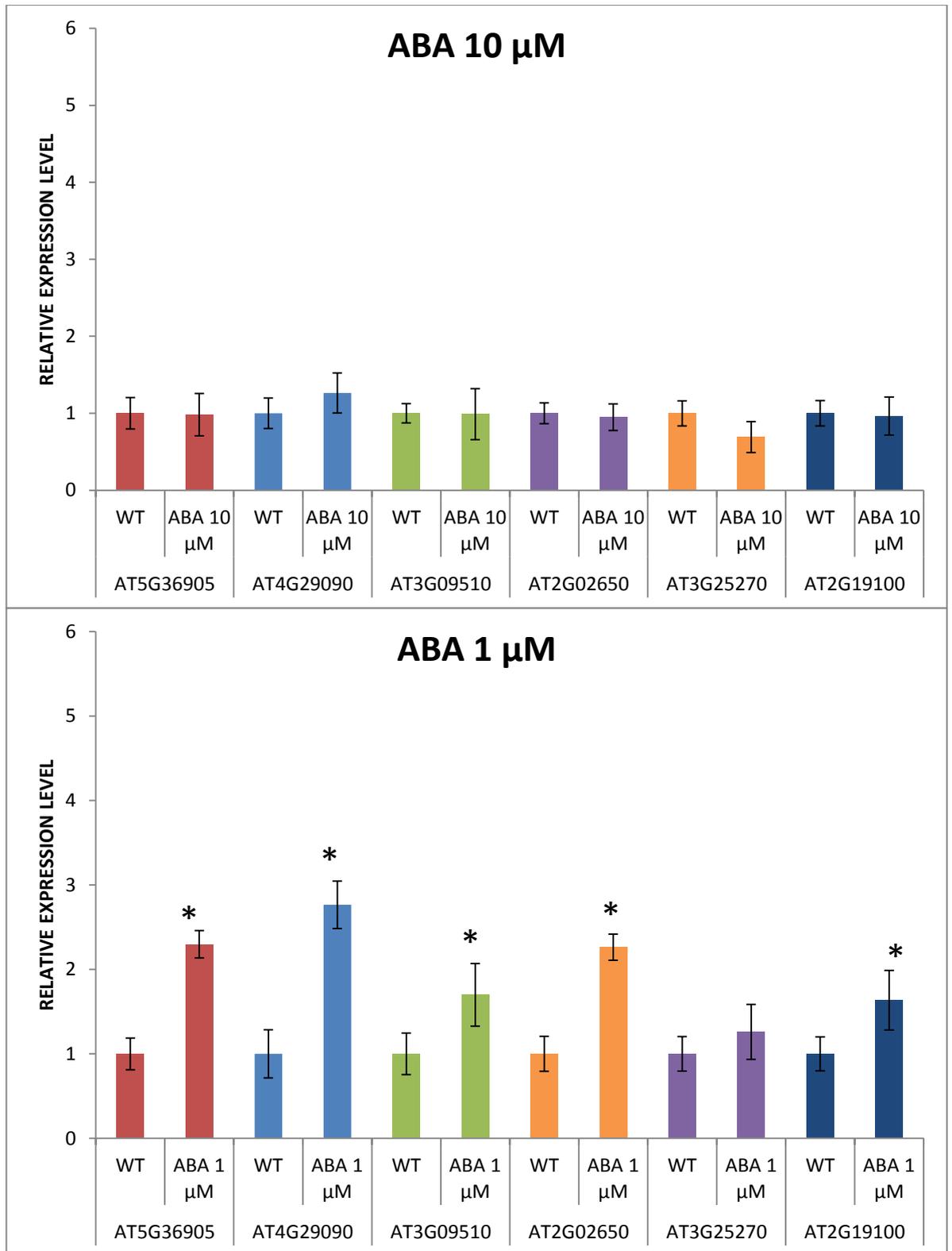


Figura 33 Análisis por qPCR de 6 genes de Arabidopsis conteniendo el dominio de RVT-Znf. Plántulas de Arabidopsis fueron sumergidas en medio MS 1X, 1% sacarosa

más la respectiva concentración y tipo de hormona durante 16 h en cuarto de crecimiento concentración y tipo de hormona: 3-Acido-indol acético (Auxina) 1 and 10 μ M. Cinetina (citocinina) 1 y 10 μ M. GA₃ (ácido giberélico). Ácido abscísico 1 and 10 μ M. Ácido salicílico 100 nM and 1 μ M.

7.9 Los genes con el dominio de RVT-Znf muestran características de genes endógenos.

A partir de las características de At5g36905 y At4g29090, identificamos un set de genes en Arabidopsis con el dominio de RVT-Znf, un dominio de reverso transcriptasa inusual con un motif de dedos de zinc del tipo CCHC que incluye un ácido glutámico conservado entre la segunda cisteína y la histidina, el cual no se ha observado en ningún otro motif de dedos de zinc de éste tipo, (Figura 34).

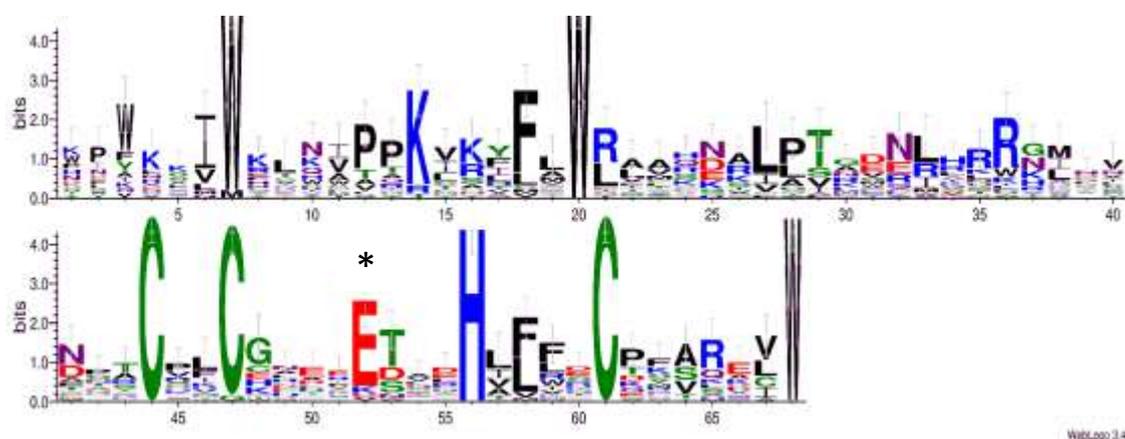


Figura 34 Dominio de RVT-Znf en plantas. Las secuencias fueron obtenidas de TAIR e InterPro. Fueron alineadas usando ClustalX2 y editadas manualmente con Seaview 4. La secuencia consenso fue generada usando Weblogo 3. El ácido glutámico único de este dominio está marcado con un asterisco.

Dentro de las características de estos genes encontramos que poseen regiones regulatorias potencialmente funcionales y sus marcos abiertos de lectura parecen no estar interrumpidos; algunos de ellos también poseen intrones, al igual que genes eucariotas; más aún, el gen At3g24255 incluso muestra variantes de splicing *in silico*. En un análisis estructural se pudo comprobar que la gran mayoría de estos genes carecen de otros dominios típicos de elementos transponibles como el de la integrasa o la cubierta, volviendo a estos genes incapaces de actuar en la replicación de elementos transponibles y muchos de ellos inclusive

muestran dominios de genes eucariotas como el dominio de exo-endo fosfatasa, el motif eucariota de dedos de zinc CCHC 4, el dominio DUF 4283 y el dominio de protein cinasa (PKc). Figura (35).

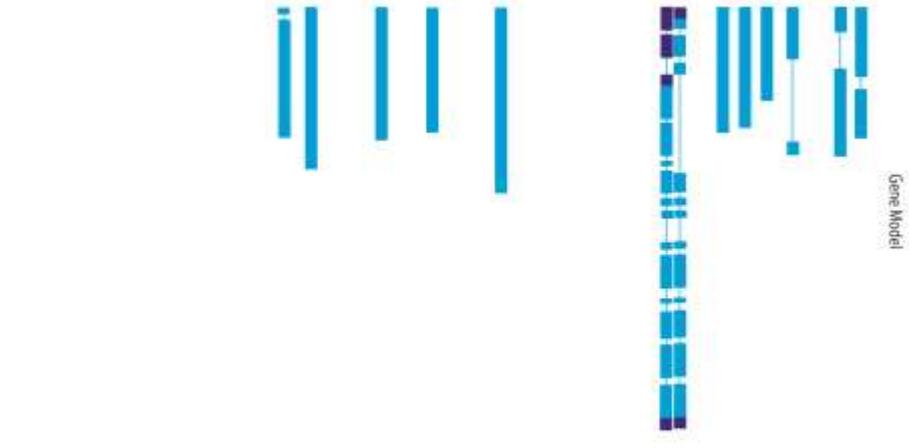
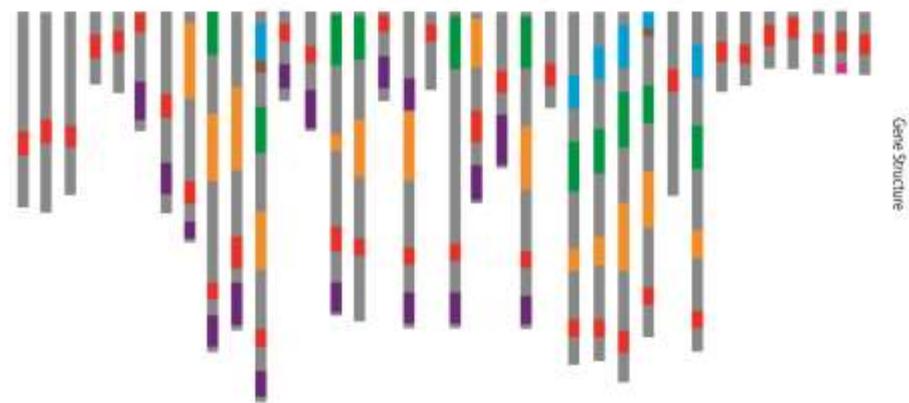
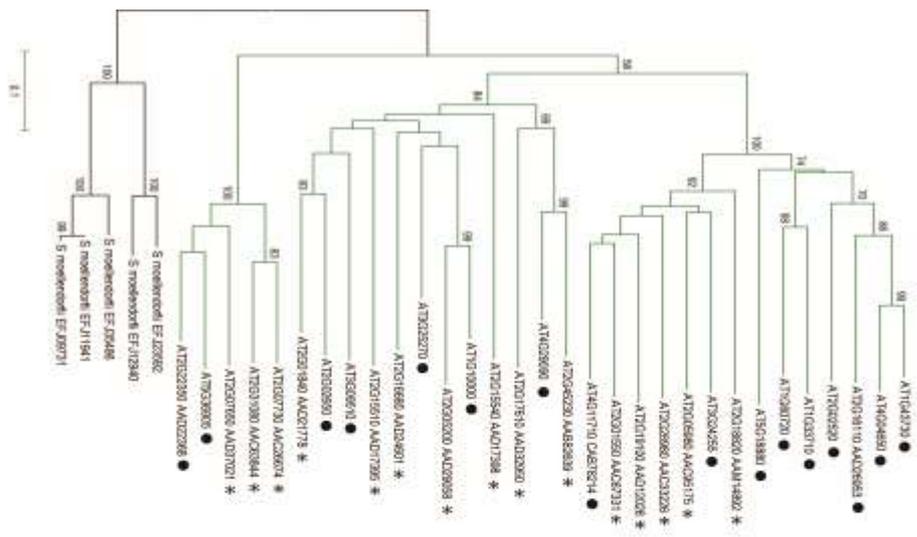


Figura 35 Genes de *Arabidopsis* conteniendo el dominio de RVT-Znf. El total de 36 secuencias de aminoácidos analizadas fueron obtenidas como se describe en materiales y métodos. Fueron alineados usando ClustalX2, editados manualmente usando Seaview4. La historia evolutiva fue inferida por el método de neighbor-joining. Las distancias evolutivas fueron computadas usando el método de distancia-p. Ambos análisis fueron realizados en MEGA 6. Se muestran los valores de bootstrap (1000 réplicas) mayores a 50%. Cinco secuencias de *Selaginella moellendorffii* fueron usadas como outgroup. Los modelos de genes fueron obtenidos de la base de datos de TAIR. At5g36905, At2616110, At4g11710 y At2g22350 no se muestran ya que aparecen como retroposones en TAIR. Las estructuras de los genes y sus dominios fueron obtenidos usando la base de datos de dominios conservados del NCBI.

7.10 Los genes conteniendo el dominio de RVT-Znf están sobre-representados en plantas.

Los homólogos de los genes con dominio de RVT-Znf en otras especies fueron obtenidos como se detalla en materiales y métodos utilizando la base de datos de InterPro (IPR026960; <http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR026960/taxonomy>). Se pudieron identificar genes con este dominio en varios taxa eucariontes, aunque son mucho más abundantes en plantas, (Tabla 19). De hecho, el dominio de RVT-Znf está presente en Viridiplantae desde el musgo *Physcomitrella patens* y la planta vascular primitiva *Selaginella moellendorffii* hasta angiospermas. Este dominio está altamente representado en traqueofitas (plantas con tejido vascular) representando cerca del 89% de todos los genes reportados.

Tabla 19 dominio RVT-Znf en diferentes grupos taxonómicos. El número de genes en diferentes grupos taxonómicos fueron obtenidos de la base de datos de InterPro.

Grupo taxonómico	Número de proteínas	Porcentaje del total
Amoebozoa	1	0.031 %
Opisthokonta	350	10.73%
Rhizaria	1	0.031 %
Viridiplantae	2910	89. 21 %
Total	3262	100 %

7.11 Análisis de genes conteniendo el dominio de RVT-Znf de Arabidopsis por bases de datos de microarreglos y anotaciones GO (Gene Ontology).

Se obtuvieron datos preliminares sobre la expresión y expresión de los genes conteniendo el dominio de RVT-Znf en Arabidopsis, (tabla 20).

Tabla 20 Localización subcelular y anotaciones GO de genes conteniendo el dominio RVT-znf. Los datos fueron obtenidos de la base de datos de TAIR.

Gen potencialmente endogenizado	Localización sub-celular	Se expresa en	Se expresa durante	Se involucra en
At1g43730				
At4g04650	estroma			Respuesta a frío
At2g16110		hipocótilo, meristemo apical		
At2g02520	Mitocondria	Estructura colectiva de la hoja, estambre,	LP0.2 etapa de dos hojas visibles, pétalo en etapa de diferenciación y expansión.	
At1g33710				
At1g60720				
At5g18880	Núcleo			
At3g24255	Núcleo	Célula guarda		
At4g11710				
At4g29090	Mitocondria			
At1g10000		hoja caulinar, estructura colectiva de la hoja, cotiledón, flor, célula guarda, hipocótilo, meristemo en inflorescencia, ápice de la hoja, pétalo, peciolo, célula espermática, polen, semilla, sépalo, meristemo apical,	LP.02etapa de dos hojas visibles, LP.04, etapa de cuatro hojas visibles, LP.06 etapa de seis hojas visibles, LP.10 etapa de diez hojas visibles, LP.12 etapa de doce hojas visibles, etapa de	

			floración, etapa de embrión maduro, etapa de embrión cotiledonario	
At3g25270	Núcleo			
At3g09510	Mitocondria			
At2g02650	Mitocondria	Células espermáticas		
At5g36905				
At2g22350				
Gen potencialmente endogenizado	Localización sub-celular	Se expresa en	Se expresa durante	Se involucra en
At1g43730				
At4g04650	estroma			Respuesta a frío
At2g16110		hipocótilo, meristemo apical		
At2g02520	Mitocondria	Estructura colectiva de la hoja, estambre,	LP0.2 etapa de dos hojas visibles, pétalo en etapa de diferenciación y expansión.	
At1g33710				
At1g60720				
At5g18880	Núcleo			
At3g24255	Núcleo	Célula guarda		
At4g11710				
At4g29090	Mitocondria			
At1g10000		hoja caulinar, estructura colectiva de la hoja, cotiledón, flor, célula guarda, hipocótilo, meristemo en inflorescencia, ápice de la hoja, pétalo, peciolo, célula espermática, polen, semilla, sépalo, meristemo apical,	LP.02 etapa de dos hojas visibles, LP.04, etapa de cuatro hojas visibles, LP.06 etapa de seis hojas visibles, LP.10 etapa de diez hojas visibles, LP.12 etapa de doce hojas visibles, etapa de floración, etapa de embrión maduro, etapa de embrión cotiledonario	
At3g25270	Núcleo			
At3g09510	Mitocondria			
At2g02650	Mitocondria	Células espermáticas		

At5g36905				
At2g22350				

Para identificar posible co-expresión de este set de genes, ya sea en ciertos tejidos u órganos o bajo ciertos estímulos, utilizamos la base de datos de Genevestigator (Zimmermann et al. 2004; Hruz et al. 2008). Del total de 107 genes encontrados en Arabidopsis con este dominio, 34 se encontraron en la base de datos de Genevestigator, indicando que al menos algunos de estos genes son transcripcionalmente activos. Se utilizó un agrupamiento jerárquico usando el análisis de correlación de Pearson determinar expresión tejido específica en estos genes. Encontramos que muchos de estos genes se expresan a niveles altos, expresados como el porcentaje de expresión potencial (PEP); en inflorescencia, específicamente en polen (80-100%), así como en floema (80-100%). Figura 36.

Dataset: 105 anatomical parts (sample selection: AT-SAMPLES-0)
 34 genes (gene selection: AT-GHES-0)

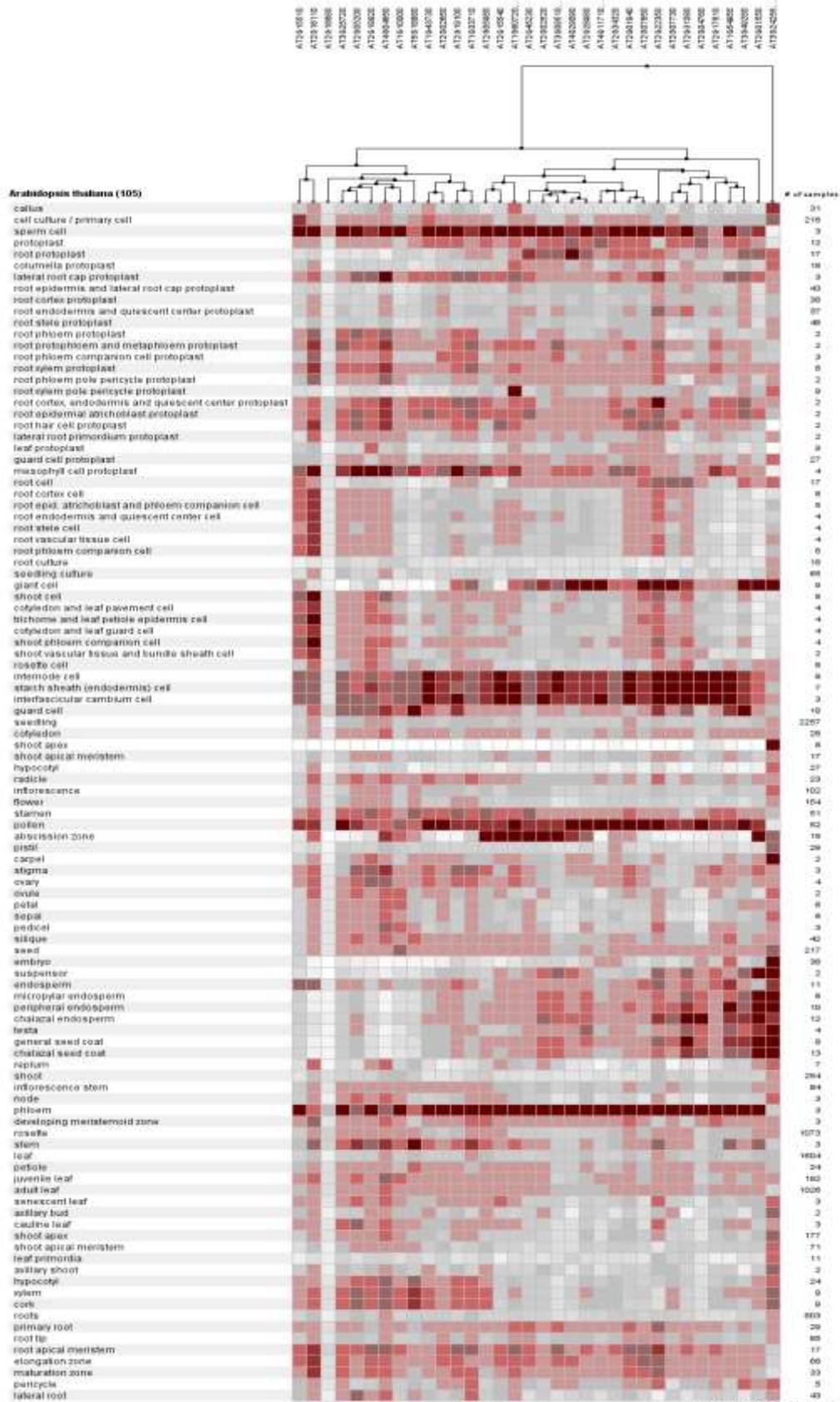


Figura 36 Análisis por microarreglos de genes con el dominio de RVT-Znf en Arabidopsis. **105 partes anatómicas de 34 genes de Arabidopsis fueron analizadas por la correlación de Pearson en la base de datos de Genevestigator.**

7.12 Análisis filogenético de elementos transponibles conteniendo dominio de reverso transcriptasa y de genes con dominio de RVT-Znf.

Los genes conteniendo el dominio RVT-Znf en Arabidopsis y otras especies en plantas, entre otras, pueden tratarse de endogenizaciones y de ser así deben tener un elemento transponible parental, del cual derivaron; para poder elucidar cual pudo ser el elemento transponible del cual se originaron utilizamos el dominio de RVT-Znf para inferir su historia evolutiva y posible origen. Con esta estrategia ha sido posible determinar el origen de la telomerasa la cual según análisis filogenéticos evolucionó a partir de retroposones del tipo no-LTR (Nakamura & Cech, 1998). Se construyó una filogenia usando todos los retroelementos conocidos, incluyendo retrovirus, para-retrovirus (caulimovirus de plantas y hepadnavirus de animales), grupo II de intrones, retrones bacterianos, telomerasas de plantas y animales, retroposones de tipo LTR de los grupos gypsy y copia y por último los genes de interés conteniendo el dominio RVT-Znf de Viridiplantae y Metazoa (Figure 37). La historia evolutiva inferida en este trabajo concuerda de manera general con la evidencia existente en la materia en la que se propone que los elementos transponibles conteniendo reverso transcriptasas se dividen en dos ramas o grupos principales uno compuesto por agentes virales y retroposones de tipo LTR y la otra rama compuesta por la telomerasa, elementos transponibles de tipo no LTR, intrones del grupo II y retrones bacterianos (Xiong y Eickbush 1990). De hecho los dos grupos descritos anteriormente se observan en la filogenia inferida en este trabajo aunque con pequeñas diferencias. Los genes conteniendo el dominio de RVT-Znf forman un grupo monofilético con las secuencias de Viridiplantae y Metazoa agrupadas. Usando el mejor modelo evolutivo el dominio de RVT-Znf se agrupo en un clado trifurcado junto con el grupo II de intrones y los retroposones del tipo no LTR.

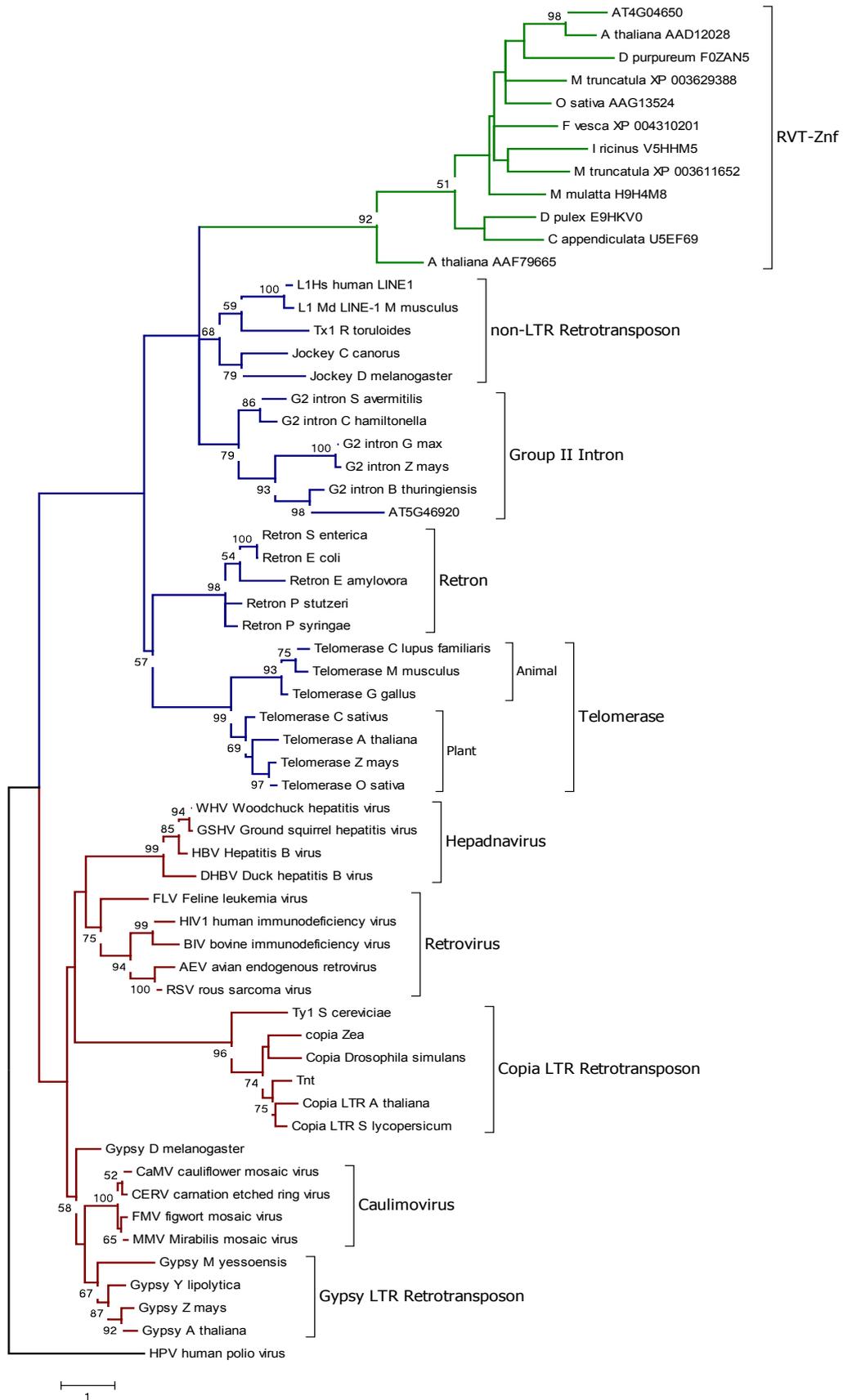
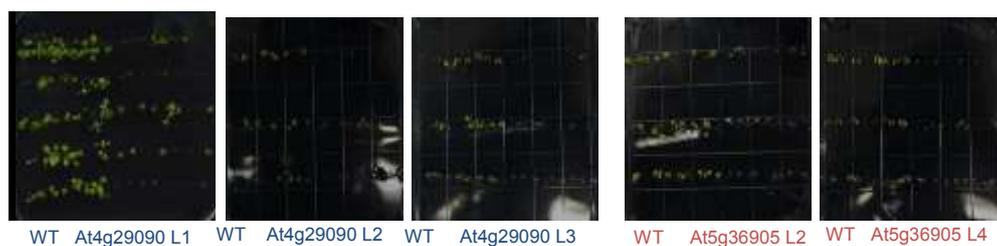
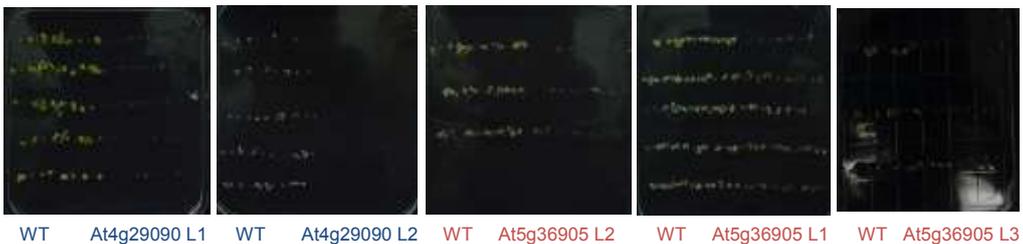


Figura 37 Origen de los genes con dominio de RVT-Znf. El total de 60 secuencias de amino ácidos analizadas fueron obtenidas a partir de las bases de datos del NCBI e InterPro, fueron alineadas usando ClustalX2 y editadas manualmente usando Seaview, el mejor modelo evolutivo, WAG+F+G y la reconstrucción filogenética fueron realizadas usando MEGA 6. Se muestran los valores de bootstrap (100 réplicas) mayores a 50. Su usó una RNAp-RNAd (HPV) como outgroup.

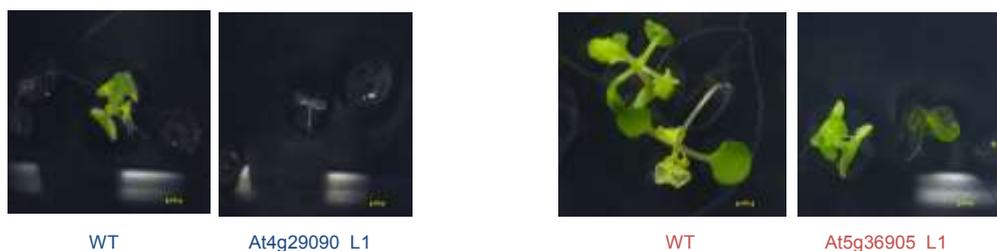
7.13 Análisis Fenotípico del resultado del *Knockout* de ambos genes

Se sembraron semillas de diferentes líneas mutantes en medio MS 1X sin sacarosa para observar fenotipo. Desde la primera semana se observó un fenotipo semejante de retraso en el desarrollo en ambos genes. Se analizaron 4 líneas para At4g29090 (SALK_023866) y 4 líneas para At5g36905 (SALK_049922) y en todas ellas se obtuvieron resultados reproducibles. Las mutantes de At4g29090 además mostraron menor tasa de germinación comparado con plantas silvestre.

A)



B)



C)

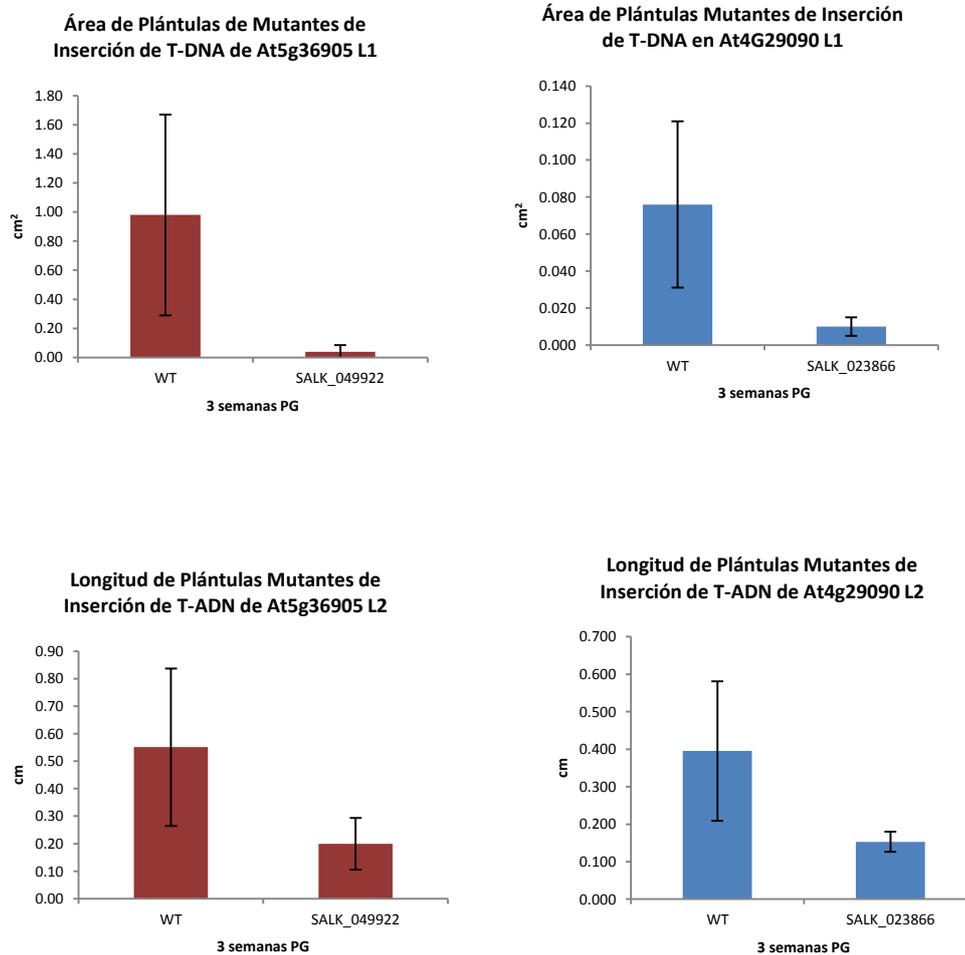


Figura 38 Análisis fenotípico de mutantes de inserción de T-DNA homocigotas para At5g36905 y At4g29090. A) y B) Fenotipo de diferentes líneas mutantes estratificadas 2-4 días, crecidas en cámara de crecimiento con fotoperiodo a días largos en medio MS 1X sin sacarosa. C) Área y longitud de diferentes líneas mutantes estratificadas 2-4 días, crecidas en cámara de crecimiento con fotoperiodo a días largos en medio MS 1X sin sacarosa.

Para continuar caracterizando estos genes decidimos analizar mutantes de inserción de T-ADN donde estos genes se encuentran interrumpidos. Las mutantes de inserción de T-DNA de ambos genes se crecieron durante 1 semana aproximadamente en medio MS 0.5X en cuarto de crecimiento y posteriormente se trasladaron a placas suplementadas

con diferentes tipos de estrés abiótico y hormonas durante 2 semanas más, en la búsqueda de algún fenotipo. Los diferentes tipos de estrés probados fueron: frío (4°C, 2 días), estrés hídrico (PEG 8%), estrés salino y osmótico (NaCl 50 mM y 100 mM; KCl 50mM; Manitol 200 mM), auxinas (IAA 10 µM), citocininas (cinetina µM), ácido abscísico (10 µM); de esta primera búsqueda sólo *la mutante* mostró fenotipo y sólo bajo un estrés salino de 100 µM. Se observa una menor tolerancia a estrés salino, donde las plántulas de SALK_049922 se mostraron cloróticas y con un menor tamaño en comparación con plantas silvestres o líneas SALK_023866.

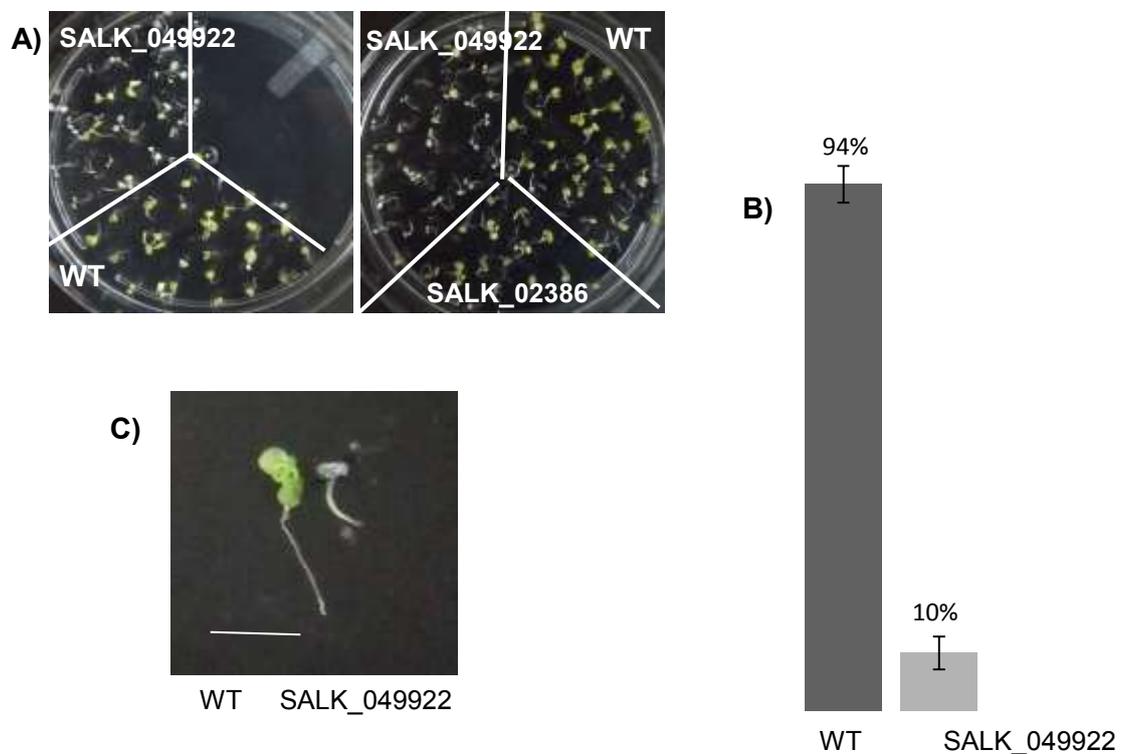


Figura 39 La mutante de inserción de T-ADN muestra una menor tolerancia a estrés salino. **A)** Fenotipo de plántulas de *rt1* de 3 semanas de edad crecidas en medio MS 0.5X con NaCl 100 mM. **B)** Fenotipo de plántulas de *rt1* crecidas en medio MS 0.5X con NaCl 100 mM. **C)** Porcentaie de supervivencia de plántulas crecidas en

También observamos una respuesta reducida a ABA en germinación, de nuevo sólo en las mutantes de T-DNA homocigotas en At5g36905 en un barrido de concentraciones de 0.25 a 1 µM, donde a mayor concentración de hormona se podía observar una mayor tasa de germinación en estas

mutantes comparadas con plantas silvestres, como se muestra en la figura 40.

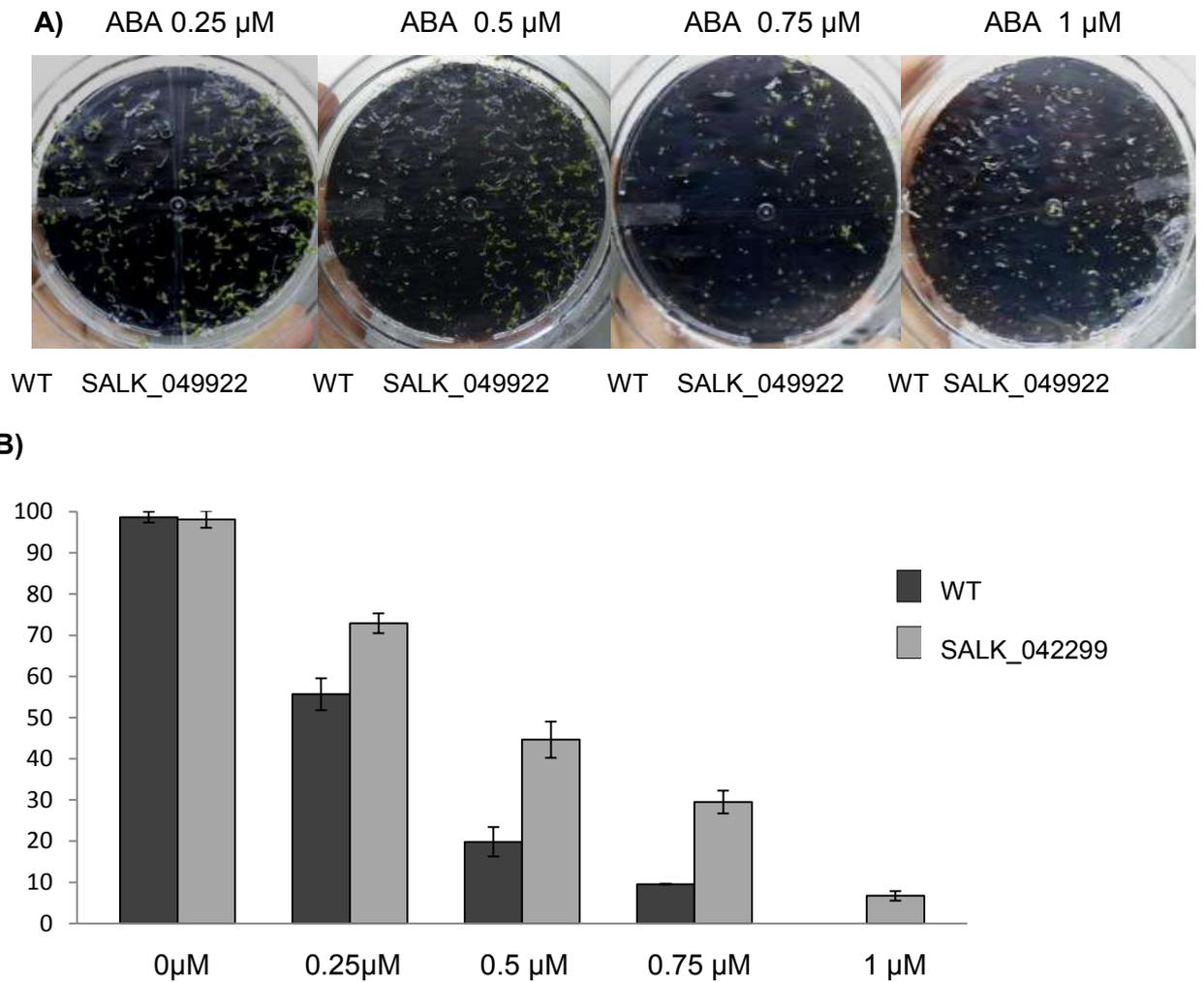


Figura 40 **Porcentaje de germinación de *rt1* bajo diferentes concentraciones de ABA.**

A) Fenotipo de semillas SALK_049922 en MS 0.5X, bajo diferentes concentraciones de ABA.

B) Grafico de germinación de SALK_049922 bajo diferentes concentraciones de ABA.

8 DISCUSIÓN

Es muy claro a la fecha que los diferentes elementos transponibles y especialmente retroposones no son sólo elementos parásitos sino que pueden tener funciones importantes para los organismos que los hospedan, este es también el caso para plantas, su papel en la evolución de sus organismos hospederos está bien documentada funcionando esencialmente como generadores de variación y regiones regulatorias, pero también aunque a una menor tasa como generadores de nuevos genes (Volff, 2006). En este trabajo analizamos un nuevo set o familia de genes con dominio de reverso transcriptasa del tipo RVT-Znf en *Arabidopsis*, caracterizando estos genes encontramos que están solo presentes en eucariotas y sobrerrepresentados en Viridiplantae, especialmente en el grupo de traqueofitas, aunque también existen representantes en otros grupos, estos están en mucho menor número, su diversificación y abundancia en plantas y especialmente en plantas vasculares, podría sugerir que esta familia de genes pudo tener un papel en la evolución de plantas y su transición a la tierra; en análisis bioinformáticos por microarreglos, donde observamos expresión tejida específica en floema también sugiere que pudieron ser innovaciones en este tejido que ayudaron a la diversificación de plantas terrestres, o funcionar como molecular señales en el flujo de translocación del floema (Lucas *et al.* 2001, 2004).

Análisis filogenéticos utilizando el dominio de reverso transcriptasa RVT-Znf nos permitió inferir que estos genes se pudieron originar a partir de retroposones del tipo no LTR, o bien , de intrones del grupo II; sin embargo, análisis estructurales de esta familia de genes en *Arabidopsis* apunta a que el escenario más probable sea el primero, dado que en muchos de estos genes de *Arabidopsis* se pueden observar otros dominios propios de retroposones de tipo no LTR, como el dominio de reverso transcriptasa mismo, y no se pudieron observar elementos

reconocibles del grupo II de intrones, por lo que podemos concluir que estos genes evolucionaron a partir de un retroposón del tipo no LTR.

A su vez estos genes en *Arabidopsis* poseen además de este dominio de RT atípico, otros dominios propios de genes eucariotas importantes como el de protein cinasa (PKc), que se sabe están involucrados en una gran variedad de rutas de señalización, o un motif de unión a ácidos nucleicos muy parecido del tipo CCHC4, muy parecido al que se encuentra insertado dentro del dominio de RTV-Znf, entre otros; además de que carecen de dominios característicos de elementos transponibles como el dominio de RNasa H, lo que les impediría cumplir su función como una RT de TE funcional, pudiendo funcionar más bien en el procesamiento de ácidos nucleicos como por ejemplo: unión, transporte, degradación o síntesis, etc., o incluso en interacciones proteína-proteína, en *Arabidopsis*.

Debido a que varios de los transcritos de estos genes se encontraron en las bases de datos de microarreglos, indicando que algunos de estos genes son transcripcionalmente activos, y pueden tener una función como genes endogenizados, decidimos probar si estos genes son en verdad funcionales y tienen un papel en el desarrollo de *Arabidopsis*, de ser así, estos deberían responder a los principales reguladores de crecimiento. Análisis por pCR nos permitió verificar

Los tratamientos con reguladores del crecimiento demostraron que estos genes son regulados de manera coordinada bajo diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento, por ejemplo con auxinas a 1 μ M todas las hormonas se indujeron de manera significativa, al igual bajo 100 nM de ácido salicílico casi todos los genes se reprimieron de manera significativa; bajo cinetina 1 μ M, todos los genes también fueron inducidos, excepto por At2g19100, que es reprimido de manera significativa bajo estas condiciones, con el tratamiento con ácido abscísico 1 μ M también todos los genes se indujeron excepto por At3g25270, que no mostró cambios significativos. Todo lo anterior indica que además de expresarse de manera coordinada de manera tejido específica y también se expresan de manera coordinada por diferentes

reguladores de crecimiento, lo que sugiere que estos genes pueden actuar de manera controlada por el huésped y pueden tener funciones redundantes en Arabidopsis.

Análisis de los promotores de At5g36905 y At4g29090 demostraron que estos promotores son funcionales y ambos genes presentan básicamente el mismo patrón de expresión en etapas tempranas, en tricomas, raíz, hidátodos, tallo y ápice, indicando de igual manera que con los otros análisis bioinformáticos y por qPCR una función redundante. At5g36905 pudo también ser analizada en etapa adulta donde se expresó en concordancia de nuevo con los análisis bioinformáticos, en tejido vascular en hoja de roseta; además de en flor, específicamente en carpelo.

Los análisis con mutantes homocigotas de inserción de T-DNA donde estos genes se encuentran interrumpidos, demostraron que estos genes tienen fenotipo parecido en etapas tempranas en Arabidopsis, teniendo una menor tasa de germinación que plantas silvestres y un menor tamaño en general, medido en área y longitud. Las mutantes homocigotas de At5g36905 también mostraron fenotipo bajo estrés abiótico, en respuesta a estrés salino, donde las mutantes mostraron ser hipersensibles a 100 mM de NaCl. Es necesario sin embargo, para tener de manera completa estos ensayos evaluar si la sobreexpresión de este gen confiere o no mayor tolerancia a este estrés en Arabidopsis o bien, el silenciamiento también muestra hipersensibilidad. Así como llevar a cabo ensayos de complementación y utilizar controles hipersensibles a NaCl como *sos1*, *sos2* o *sos3*, disponibles en ABRC. Las plantas mutantes para At5g36905 también tuvieron fenotipo ante ácido abscísico durante germinación, las plantas silvestres mostraron dormancia característica en respuesta a esta hormona; sin embargo, las plantas mutantes parecen ignorar esta señal, ya que no muestran dormancia o la presentan de manera reducida. Para completar estos ensayos también se deben evaluar plantas silenciadas y sobreexpresoras; además de usar controles mutantes deficientes en señalización a ABA como *abi3* disponible en ABRC.

9 PERSPECTIVAS

Aunque la actividad bioquímica de estos genes o el dominio de RVT-Znf no ha sido evaluada y sería muy importante evaluar esta actividad, asumimos que puede tener un papel en el procesamiento de ácidos nucleicos y la interacción de proteína-proteína. También se desconoce si estos genes poseen una función de reverso transcriptasa. Estos análisis propuestos darían luz sobre la función y patrones de acumulación de sus posibles productos o sustratos; así como su capacidad de unión o modificación de ácidos nucleicos. Así como análisis genéticos y moleculares más detallados para determinar su función en Arabidopsis.

En resumen, se puede concluir que los miembros de esta familia muy probablemente son endogenizaciones que derivaron de retroposones del tipo no LTR, son transcripcionalmente activos y su expresión es regulada de manera coordinada por diferentes reguladores del crecimiento y a nivel tejido específico, sugiriendo que pudieron haber adquirido funciones reguladas por la planta para su desarrollo. Por último puede proponerse que esta familia pudo haber emergido como una innovación durante la colonización de la tierra por las plantas pudiendo tener un papel potencialmente significativo.

10 BIBLIOGRAFIA

1. Abbondanzieri E.A., Gregory B, Jason W.R., Jennifer X. Zhang, Stuart F.J. Le G, y Xiaowei y Zhuang. (2008). Dynamic binding orientations direct activity of HIV reverse transcriptase. *Nature*. 453: 184-190.
2. Autexier C, Lue NF. (2006). The structure and function of telomerase reverse transcriptase. *Annu Rev Biochem*. 75:493-517.
3. Baldauf S. L.,Palmer J. D. (1990). Evolutionary transfer of the chloroplast *tufA* gene to the nucleus. *Nature*.344:262-265
4. Capy P., Gasperi G., Biémont C., Bazin C. (2000) Stress and transposable elements: co-evolution or useful parasites?. *Heredity*. 85 (Pt 2):101-6.
5. Chan S.W. (2008). Inputs and outputs for chromatin-targeted RNAi. *Trends Plant Sci*. 13: 383-389.
6. Clough S.J. Bent A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 16: 735-743
7. Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE (2004) WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Research*, 1188-1190.
8. Dimitri P. (2007). Constitutive heterocromatin and transposable elements in *Drosophila melanogaster*. *Genetica*. 100: 85-93
9. Greider CW, Blackburn EH. (1989). A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 26;337 (6205): 331-7.
10. Jacobo M.A., Arnold E. (1991). HIV-reverse transcription structure-function relationships. *Biochemistry*. 30: 6351-6356.
11. Kapitonov V.V. & Jurka J. (2008). A universal classification of eukaryotic transposable elements implemented in Repbase. *Nature Reviews Genetics*. 9, 411-412. Doi:10.1038/nrg2165-c1
12. Kumar A, Bennetzen JL. (1999). Plant retrotransposons. *Annu Rev Genet*. 33: 479–532.
13. Lewin B. *Genes*. IX. Jones and Bartlett Publishers, Boston. EE.UU. 2008. ISBN 9780763740634
14. Luan D.D., Korman M.H., Jakubczak J.L., and Eickbush T.H. (1993). Reverse transcription of R2Bm RNA is primed by a nick at the chromosomal target site: a mechanism for non-LTR retrotranscription. *Cell*. 72: 595-605.
15. Lucas WJ, Yoo BC, Kragler F (2001). RNA as a long-distance information macromolecule in plants. *Nature reviews*, 2:849-857.

16. Lucas WJ, Lee JY (2004). Plasmodesmata as a supracellular control networks in plants. *Nature reviews*, 5:712-726.
17. McClintock B., (1951). Chromosome organization and genic expression. *Cold Spring Harbor Symposia. Quantitative Biology*. 16: 13- 47.
18. McDonald, J.F., Matyunina, I.V., Wilson, S., Jordan, J.K., Bowen, N.J. y Miller, W.J. (1997). LTR retrotransposons and the evolution of eukaryotic enhancers. *Genetica*, 100: 3-13.
19. Moenne A., Bégu D., Jordana X. (1996). A reverse transcriptase activity in potato mitochondria. *Plant Mol Biol*. 31(2):365-72.
20. Nakamura T. M. & Cech T. R. Reversing time: Origin of telomerase. (1998). *Cell*, Vol. 92, 587–590,
21. Nugent J. M. *et al* .(1991). RNA-mediated transfer of the gene *CoxII* form the mitochondrion to the Nucleus during Flowering Plant Evolution. *Cell* 66:473-481
22. Oshima K., Hamada M., Terai Y. and Okada N. (1996). The 30-ends of tRNA-derived short interspersed repetitive elements are derived from the ends of long interspersed repetitive elements. *Mol. Cell. Biol*. 16: 3756–3764.
23. Pouteau S., Grandbastien M.A., Boccara M. (1994). Microbial elicitors of plant defense responses activate transcription of a retrotransposon. *Plant J*. 5: 535–542
24. Rigourd M., Goldschmidt V., Brulé F., Casey D.M., Ehresmann B., Ehresmann C. y Marquet R. (2003). Structure function relationships of the initiation complex of HIV-1 reverse transcription: the case of mutant viruses using tRNA^{His} as primer. *Nucleic acids Res*. 31: 5764-5775.
25. Ruiz-Medrano R, Xoconostle-Cázares B, Lucas WJ. (1999). Phloem long-distance transport of CmNACP mRNA: implications for supracellular regulation in plants. *Development*. 126(20):4405-19.
26. Sambrook J., Russell D.W., (2001). *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor N. Y.
27. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, and Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 *Molecular Biology and Evolution*. 30: 2725-2729.
28. Voff J. N. (2006). Turning junk into gold: domestication of transposable elements and the creation of new genes in eukaryotes. *BioEssays*. 28:913–922.
29. Wahleithner J.A., MacFarlane J.L., Wolstenholme D.R. (1990). A sequence encoding a maturase-related protein in a group II intron

of a plant mitochondrial nad1 gene. Proc Natl Acad Sci. 87(2):548-52.

30. Weiner A.M. (2002). SINEs and LINEs: the art of biting the hand that feeds you. Curr Opin Cell Biol. 14(3):343-50.
31. Xiong Y & Eickbush TH. (1990) Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. The EMBO Journal 9:10.3353-3362