

RESUMEN

La proteína tumoral controlada traduccionalmente (TCTP, por sus siglas en inglés) o p23, forma parte de una amplia familia de proteínas presentes en todos los eucariontes descritos a la fecha a la cual se le atribuyen múltiples funciones dependiendo del organismo y etapa de desarrollo. Este gen y sus productos han sido bastante estudiados usando como modelo en células animales, pero se sabe mucho menos en otros sistemas. En plantas se ha descrito un gen para TCTP en Arabidopsis, *AtTCTP1*, el cual está involucrado en la regulación del desarrollo de la planta, sugiriéndose un papel a nivel mitótico, presentando expresión casi constitutiva. Sin embargo, Arabidopsis presenta otro gen codificante para TCTP. Dicho gen, denominado *AtTCTP2* (At3g05540), ha sido reportado como un pseudogen.

En el presente trabajo mostramos evidencia que dicho gen no solo es funcional, sino que es esencial para la viabilidad de Arabidopsis. Se han obtenido tanto el patrón de acumulación de la proteína, como de expresión de la región promotora de *AtTCTP2*, resaltando la detección de señal en floema, lo que indicaría el transporte de la proteína o RNAm de este gen a larga distancia. Además, *AtTCTP2* es capaz de regenerar plantas de tabaco, en contraste con *AtTCTP1*. Además hemos encontrado que los niveles del RNAm para *AtTCTP2* se encuentran disminuidos en plantas heterocigotas para la mutación en este gen.

Por otra parte, injertos de plantas silvestres sobre plantas transformadas indican que el RNAm y la proteína de *AtTCTP2* son capaces de moverse larga distancia, y la presencia de *AtTCTP2* induce la formación de raíces adventicias. Finalmente, hemos realizado un estudio *in silico* en donde se analizaron las estructuras predichas de TCTPs en plantas en donde los resultados indican que existen dos familias, una tipo *AtTCTP1*, involucrada en regulación de la proliferación, y una tipo *AtTCTP2*, involucrada en diferenciación y regeneración de plantas.

ABSTRACT

The Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP), also known as p23, is part of a wide protein family present in all eukarya described to date to which multiple functions, depending of the organism and developmental stage, have been attributed. The TCTP gene and its products have been subject of several studies using animal cells as models. There is less information regarding TCTP from other systems. Arabidopsis harbors a TCTP gene, *AtTCTP1* (accession no. At3g16640) which is likely regulates plant development. An important role during mitosis has been suggested, having an almost constitutive expression.

Nevertheless, Arabidopsis harbors another *TCTP* gene, named *AtTCTP2* (At3g05540), which has been reported as pseudogene. In the present work we show evidence that this gene is not only functional but is essential for Arabidopsis viability. The protein accumulation pattern as well as the expression of the promoter region were obtained and analyzed, highlighting signal detection in phloem, which could indicate long distance transport of *AtTCTP2* protein and/or mRNA. More assays showed that *AtTCTP2* mRNA levels are decreased in heterozygous plants and that these are correlated to the phenotypes observed. Moreover we tested *AtTCTP2* capacity to regenerate tobacco plants when it is overexpressed into *A. rhizogenes*, in contrast to *AtTC1*, indicating functional differences between both TCTP genes from Arabidopsis.

On the other hand, we performed grafting experiments using transgenic tobacco expressing *AtTCTP2-GFP* and WT tobacco for testing long distance movement and the results make clear that *AtTCTP2* is capable of moving long distance from stock to scion and vice versa as protein and mRNA. Besides, aerial adventitious roots appearance indicated an important role of *AtTCTP2* in lateral root emergence.

Finally we have performed an *in silico* analysis of several plant TCTPs predicted protein structures, and the results helped us to propose the existence of two major groups: *AtTCTP1*-related, involved in proliferation, and *AtTCTP2*-related, involved in differentiation and ultimately plant regeneration.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 TCTP (Translationally Controlled Tumor Protein)

La Proteína Tumoral Controlada Traduccionalmente (TCTP, por sus siglas en inglés) fue descubierta hace más de 25 años por tres grupos, que, independientemente, estaban dedicados a investigar genes regulados traduccionalmente. Estos grupos nombraron a esta proteína P21 o P23 (Yenofsky *et al.*, 1982; Chitpatima *et al.*, 1988), Q23 (Thomas, 1986), y TCTP (Gross *et al.*, 1989). Esta última denominación de la proteína, TCTP, está basada en el hecho de que el cDNA fue clonado de un tumor de origen humano y de la observación de que TCTP es regulada a nivel traduccional (Gross *et al.*, 1989). Esto fue confirmado con estudios posteriores en donde se encontró que, efectivamente, TCTP es preferencialmente sintetizada en células en fase temprana de crecimiento de algunos tipos de tumores, pero que además se expresa en células en estado normal (Thiele *et al.*, 2000).

TCTP representa una gran familia de proteínas a la que se le ha atribuido un amplio espectro de funciones y cuyas diferentes actividades bioquímicas aún están siendo estudiadas y dilucidadas; además, su papel en el crecimiento y desarrollo aún sigue sin precisarse claramente. Sin embargo, la conservación evidente de algunas secuencias (consenso) y los altos niveles de expresión en diversidad de organismos indican que TCTP juega un rol esencial en importantes rutas bioquímicas y de señalización (Hinojosa-Moya *et al.*, 2008).

Diversos estudios llevados a cabo en células humanas y levaduras sugieren un rol de TCTP en la regulación del crecimiento celular y el control del ciclo celular, a través de la fosforilación (por Polo cinasas) y su interacción con proteínas regulatorias, como las proteínas MCL1 de las células mieloides con leucemia (Gachet *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2001; Yarm, 2002).

De manera interesante, se ha demostrado que TCTP controla la proliferación de la inhibición por apoptosis en ratones (Chen *et al.*, 2007) y que también regula la

proliferación celular, tamaño de los órganos y la apoptosis en *Drosophila* y ratón (Hsu *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2007). Estudios a principios de esta década han mostrado que TCTP posee capacidades de unión a tubulina en el citoesqueleto, tiene alta afinidad por el calcio, y es inducida en la apoptosis dependiente de vitamina D. Además, se asevera que la producción de TCTP no sólo es controlada a nivel traduccional sino que también ocurre a nivel transcripcional (Thiele *et al.*, 2000). TCTP ha atraído la atención de muchos grupos de investigación enfocados en problemas biológicos y médicos. Esto se debe a que los niveles de TCTP son altamente regulados en respuesta a una amplia gama de estímulos extracelulares, además de mostrar funciones regulatorias en importantes procesos celulares (apoptosis, crecimiento celular, organización de microtúbulos y por ende diferenciación celular, entre otros; Bommer y Thiele, 2004; Bommer *et al.*, 2012). Estudios de caracterización sobre todo en *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila* y humano, han relacionado a TCTP con la familia de pequeñas cheperoninas (MSS4/DSS4) que están involucradas en diversos procesos celulares como apoptosis, organización de microtúbulos, crecimiento celular y ciclo celular.

1.2 Estructura General de TCTP

Se han realizado estudios filogenéticos (Hinojosa-Moya *et al.*, 2008) y estructurales (Bommer y Thiele, 2004) en los que se han alineado secuencias de TCTP de diversas especies pertenecientes a los cinco principales reinos. Los resultados de estos análisis revelaron un alto grado de conservación entre TCTPs de diferentes reinos. Esto indica por un lado que las funciones bioquímicas de TCTP son altamente conservadas, pero por otro, que podría usarse como un “reloj molecular” para calibrar la divergencia entre los distintos tipos de eucariontes. Cabe mencionar en este punto que TCTP no se ha encontrado ni en árqueas ni en procariontes.

Estructura Primaria

En el estudio *in silico* llevado a cabo por Hinojosa-Moya en el 2008 se muestra el alineamiento de 5 especies representativas de cada uno de los reinos, observándose que

15 de aproximadamente 170 residuos están conservados (Figura 1). Sin embargo, el porcentaje de identidad (en aminoácidos) entre TCTPs de plantas y TCTPs del resto de eucariontes es superior al 40%, mientras que, entre TCTPs de plantas la similitudes rozan el 75-90% (Berkowitz *et al.*, 2008).

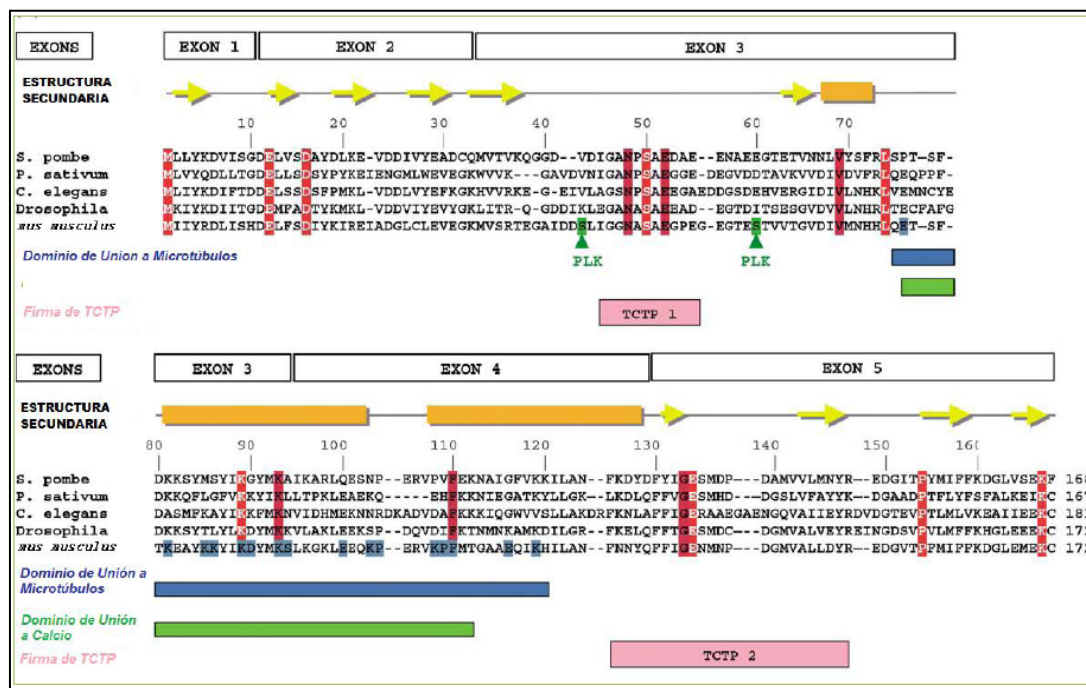


Figura 1. Alineamiento múltiple de las Estructura primaria de TCTPs pertenecientes a los cinco reinos. Se puede observar que los dominios de unión a túbulina (azul) y de unión a calcio (verde) están enclaustrados en prácticamente la misma región. Se identifican claramente los motivos que caracterizan a las proteínas de la familia de TCTP (Rosa) (Tomado de Hinojosa-Moya *et al.*, 2008).

Estructuras Secundaria y Terciaria

En la comparación de la estructura terciaria de TCTP se pueden distinguir los tres dominios representativos de esta proteína: el dominio de β -plegadas, el dominio de α -hélices y el asa flexible (Figura 2; Bommer y Thiele, 2004). En el dominio caracterizado por contener estructuras β -plegadas se encuentran agrupados la mayor parte de los residuos invariables, lo cual indica que esta región es importante para interacciones moleculares, debido a que el pliegue de este dominio muestra una importante similitud estructural con el plegamiento mostrado por las pequeñas chaperoninas Mss4 y Dss4 que han sido

asociadas a la forma libre de las Proteínas Rab (Thaw *et al.*, 2001). Por otra parte, el dominio helical contiene las regiones de unión a calcio y de unión a tubulina, las cuales son prácticamente las mismas; mientras que, en la región del asa flexible se observa una de las dos firmas específicas para TCTP (firma 1). Estos dos últimos dominios descritos son específicos para TCTP (Bommer y Thiele, 2004).

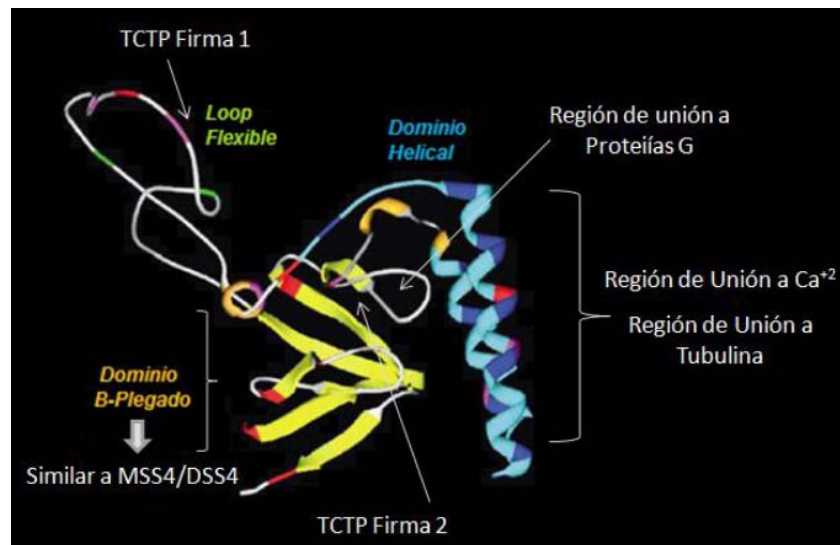


Figura 2. Estructura tridimensional consenso para TCTP (modificada de Bommer y Thiele, 2004).

La predicción de la estructuras primaria y tridimensional representativa para las TCTPs, basada en la estructuras 3D reportadas para *S. pombe* (Thaw *et al.*, 2001), indican sutiles diferencias en el dominio que forma el “bolsillo” que potencialmente interactúa con las Proteínas G, sobre todo en parásitos de vertebrados.

1.3 De la Estructura a la Función

Algunas de las funciones moleculares asociadas a regiones estructurales de la proteína claramente descritas para TCTP son la región de unión a tubulina (Gachet *et al.*, 1999) y la región de unión a calcio (Kim *et al.*, 2000). Ambos coinciden con el dominio helical, el cual representa la parte más básica de la molécula (Gachet *et al.*, 1999; Thaw *et al.*, 2001). Es interesante mencionar que los aminoácidos conservados en todas las TCTPs, al igual que la α -hélice H1, se encuentran agrupados rodeando la superficie de interacción con GTPasas. Por lo tanto, tomando en cuenta que TCTP presenta una alta homología estructural con

las pequeñas chaperoninas Mss4/Dss4, se le ha atribuido la propiedad de unión a GTPasas (reportado por Thaw *et al.*, 2001; Itzen *et al.*, 2006). Un gran número de investigadores (Boguski y MacCormick, 1993; Thaw *et al.*, 2001; Itzen *et al.*, 2006) basándose en la elucidación de la estructura de *S. pombe* y observando su alta similitud con la familia de pequeñas chaperoninas Mss4/Dss4, la cual se conoce interactúa con las subfamilia Rab de las Ras GTPasas. Además, se ha encontrado que TCTP puede interactuar también con la subfamilia Rheb de las Ras GTPasas (Hsu *et al.*, 2007). Sin embargo, análisis bioquímicos más recientes indican que TCTP carece de actividad de factor de recambio de guanín nucleótidos, por lo que, de ocurrir dicha interacción, debe ser indirecta (Rehmann *et al.*, 2008).

Las Proteínas Ras son proteínas G (específicamente pequeñas GTPasas) con actividad reguladora GTP-hidrolasa, que alternan dos conformaciones estructurales para actuar como “interruptores” moleculares en rutas de transmisión de señales celulares que controlan diferentes fenómenos como la proliferación, diferenciación, migración y adhesión celular; así como la apoptosis y la integridad del citoesqueleto entre otros. Las proteínas de subfamilia Rab, que pertenecen a la familia de pequeñas GTPasas (Ras), son proteínas periféricas de membrana, que actúan mediando el tráfico de vesículas a través de la membrana; mientras que, las proteínas de la subfamilia Rheb (homólogo enriquecido de Ras, por sus siglas en inglés) están involucradas en la regulación del ciclo celular a través de la ruta de la cinasa TOR, la cual regula distintas respuestas celulares en respuesta a estímulos externos, como insulina en animales (Berkowitz *et al.*, 2008). No obstante, análisis recientes sugieren que TCTP podría no estar relacionada directamente con esta ruta (Wang *et al.*, 2008). Esto hace necesario determinar con detalle cuál es el verdadero rol de TCTP en la regulación de la proliferación y diferenciación en eucariontes. Las firmas de TCTP representan los motivos de secuencia representativos para este tipo de proteínas, por lo que su presencia es esencial para determinar la pertenencia de AtTCTP1 y AtTCTP2 a la familia de TCTPs (la única divergencia encontrada en ambas estructuras es

la falta de la firma 2, ubicada en la región del asa flexible, por parte de At3g05540-AtTCTP2).

1.4 TCTP como una proteína multifuncional

La gran abundancia de funciones biológicas en las que está involucrada TCTP remarcan la importancia del estudio de sus genes codificantes y los productos de estos (ARNm y proteína) para conocer a fondo los mecanismos por los cuales TCTP ejerce su efecto; sin embargo, esto aún está lejos de estar definido. Aun así, a TCTP se le ha atribuido un papel importante en la regulación (positiva y/o negativa) de diversos procesos de vital importancia, los cuales podemos agrupar en funciones relacionadas con el desarrollo y crecimiento (Figura 3).

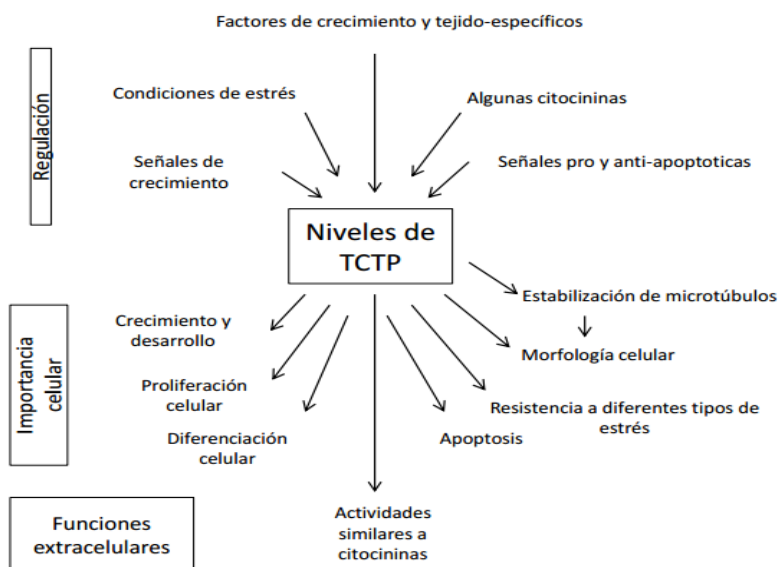


Figura 3. Regulación de los niveles de TCTP y su importancia en diferentes procesos celulares (modificada de Bommer y Thiele, 2004).

Diversos estudios han demostrado que TCTP interactúa con microtúbulos (MT) a través del dominio N-terminal de la proteína (Gachet *et al.*, 1999), además de estar asociada a estructuras de F-actina que conforman el citoesqueleto durante la interfase y la mitosis, que finalmente regulan la forma celular. Por otro lado, una de las versiones de TCTP en humano ha sido identificada en fluidos de pacientes en donde estimula la liberación de

histamina de basófilos (HRF, por sus siglas en inglés: factor liberador de histaminas) sugiriendo el papel de TCTP como una proteína no celular autónoma transportándose durante la respuesta alérgica aguda (MacDonald *et al.*, 2001).

Se ha propuesto a TCTP como un importante componente durante los cambios patológicos inducidos por parásitos y/o la supervivencia del parásito dentro del huésped, basándose en la identificación de TCTP en la secreción de organismos parasitarios durante la etapa de infección del hospedero, quizás como parte de su estrategia evasiva en contra de la respuesta inmune del huésped. Esto ha sido reportado a infecciones parasitarias como malaria (MacDonald *et al.*, 2001), *Brugia malayi* (Gnanasekar *et al.*, 2007) y *Ostertagia ostertagi* (Meyvis *et al.*, 2009).

También se ha sugerido que TCTP une calcio al mostrar evidencia *in vitro* e *in vivo* de unión a tubulina. De hecho, experimentos de inmunolocalización muestran que TCTP se asocia con microtúbulos durante el ciclo celular y que se une al huso mitótico. Además, la sobreexpresión de TCTP indujo modificaciones tanto en la morfología como en el crecimiento al afectar las propiedades de la red de microtúbulos (Gachet *et al.*, 1999).

Por otra parte, TCTP se expresa a niveles muy altos en varios tipos de cáncer y se ve significativamente reprimido durante la reversión tumoral (Tuynder *et al.*, 2004). De hecho, se ha demostrado que la expresión de TCTP regula negativamente a p53 y viceversa, mediante la inducción de la degradación provocada por la ubiquitin ligasa MDM2, revelando una retroalimentación recíproca entre TCTP y p53 (Amson *et al.*, 2011).

1.5 TCTP en plantas

Actualmente no se existe suficiente información precisa sobre las funciones de TCTP en plantas. Una serie de estudios muestran que TCTP se expresa de manera ubicua en prácticamente todas las especies de plantas, y en todas estas se le ha implicado o asociado con el control de diversos procesos fisiológicos (Tabla 1).

El primer estudio sobre TCTP en plantas fue llevado a cabo a principios de la década de 1990 cuando se aisló y clonó el cDNA para un homólogo a TCTP humana en alfalfa (*Medicago sativa*) y se sugirió que pertenecía a la misma familia de proteínas (Pay *et al.*, 1992). Posteriormente, ya se asociaba a TCTP con la división celular en coñas de raíces de *Pisum sativum* (Woo and Hawes, 1997), mientras que por otra parte, otros estudios mostraron que los niveles de expresión de TCTP variaban en respuesta a diferentes tratamientos que finalmente sugerían un rol en funciones como el fotoperiodismo y floración (Sage-Ono *et al.*, 1998), en el mantenimiento de la homeostasis de calcio (Ermolayev *et al.*, 2003) y respuesta a estrés por metales pesados (Wang *et al.*, 2012). La expresión de HbTCTP (TCTP de *Hevea brasiliensis*) es regulada por diversos tratamientos como daño mecánico, metil jasmonato, bajas temperaturas, altas concentraciones salinas, estrés oxidativo (con peróxido de hidrógeno), sequía y etileno, sugiriéndose que HbTCTP podría estar asociada con señalización hormonal y detonada por estrés (Li *et al.*, 2013; Liang *et al.*, 2009). Además, en *Brassica oleracea* se encontró la inducción de la expresión de BoTCTP en respuesta a altas temperaturas y altas concentraciones de cloruro de sodio, y se encontró que el silenciamiento de este gen afecta la absorción de potasio, sodio y calcio (Cao *et al.*, 2010). Asimismo, en uva (*Vitis vinífera*) ocurre un incremento en concentraciones de TCTP (como proteína) en respuesta al déficit salino e hídrico (Vincent *et al.*, 2007). Con respecto al estrés biótico, los niveles de TCTP (como proteína) se incrementaron en respuesta a la inoculación e infección con *Pseudomonas syringae* (Jones *et al.*, 2006) y *Erysiphe graminis* (Li *et al.*, 2010) indicando un papel en la respuesta de defensa de la planta a enfermedades causadas por algunos patógenos.

En otro contexto, se han sugerido una serie de roles para TCTP en diferentes organismos vegetales, sin embargo, estos resultan ser específicos y dependientes de la etapa de desarrollo, tejido y/o condiciones fisiológicas de la planta. Tal es el caso de *Jatropha curcas* en donde se detectaron altos niveles de expresión de JcTCTP en embriones y endospermo indicando un probable papel en el desarrollo de éste; pero además, JcTCTP mostró ser específica de ciertos tejidos como tallo, raíz y hoja, además de mostrar un

patrón de espacio-temporal de expresión (Qin *et al.*, 2010). En el caso de *Brassica oleracea* se sugirió que el retraso en el crecimiento vegetativo causado por el silenciamiento de BoTCTP podría ser debido a un decremento en los niveles de auxinas, pero además se veía afectada la resistencia a estrés (Cao *et al.*, 2010). Otro estudio, en palma de aceite (*Elaeis guineensis*), mostró que la transformación de callos embriogénicos con EgTCTP acelera su tasa de crecimiento y finalmente se obtienen un mayor número de células meristemáticas por callo; adicionalmente EgTCTP mostró actuar como una proteína modulada por calcio que podría estar controlando la progresión del ciclo celular pero no directamente el crecimiento celular (Nakkaew *et al.*, 2010). TCTP podría estar relacionada a la formación de raíces de almacenamiento en casava (*Manihot esculenta*) (De Souza *et al.*, 2004). En fresa, los niveles de TCTP se incrementan junto con la maduración del fruto y se expresa constitutivamente en tejidos vegetativos (López y Franco, 2006).

Por otro lado, TCTP ha sido detectada en savia de floema de *Ricinus communis* sugiriendo el movimiento a larga distancia de TCTP a través del tejido vascular (Barnes *et al.*, 2004). Adicionalmente, estudios llevados a cabo en calabaza (*Cucurbita maxima*) revelaron la presencia tanto de la proteína como transcrito de TCTP en elementos cribosos, indicando una función no autónoma celular y el movimiento a larga distancia de proteínas de floema (Aoki *et al.*, 2005; Hinojosa-Moya *et al.*, 2006).

1.6 TCTP de Arabidopsis

En Arabidopsis se encuentran dos genes que codifican para TCTP denominados AtTCTP1 (At3g16640) y AtTCTP2 (At3g05540). El primero de ellos ha sido ya estudiado y caracterizado parcialmente en cuanto a las probables funciones de sus productos. Se sugiere que AtTCTP1 tiene un efecto regulador positivo sobre el crecimiento mitótico al controlar específicamente la duración del ciclo celular, pero no en el crecimiento post-mitótico. En este mismo trabajo, al silenciarse específicamente este gen se encontró un retraso en el crecimiento y reducción del tamaño de la roseta e inflorescencia. Sin

embargo, con la interrupción de este gen no se pudo obtener semilla; y las plantas silenciadas sufrían un retraso severo del desarrollo y de la transición a floración (Brioudes *et al.*, 2010).

En un trabajo anterior, se reportó que AtTCTP1 se expresa a niveles altos en todos los tejidos y etapas de desarrollo, con aún más expresión en células en expansión y meristemáticas. El “knock-out” de *AtTCTP1* resultó en defectos en el gametofito masculino que curiosamente no presentaba problemas en la formación de polen pero sí durante la formación del tubo polínico. Además al silenciar este gen se observó un retraso en el crecimiento vegetativo, una reducción en la formación de raíces laterales y el desarrollo de raíces en general; adicionalmente, las plantas silenciadas presentaron elevados niveles endógenos de auxinas y una menor sensibilidad a la adición exógena de éstas, sugiriéndose que AtTCTP1 podría estar regulado por auxinas, las cuales son importantes reguladores de crecimiento en planta (Berkowitz *et al.*, 2008).

En un estudio más reciente, se mostró que al sobreexpresar a AtTCTP1 en *Arabidopsis* estas plantas resultaron ser tolerantes a sequía. La expresión de AtTCTP1 en células guarda permitió un eficiente cierre estomatal mediada por ABA. En este mismo estudio se demostró que AtTCTP1 interactúa con microtúbulos mediante unión a calcio y podría tener un papel en el cierre estomático mediado por ácido abscísico (Kim *et al.*, 2012).

En contraste, el otro gen codificante para TCTP en *Arabidopsis*, denominado AtTCTP2 (At3g05540) ha sido reportado como un pseudogen debido a que su expresión no pudo ser detectada en bases de datos y a que encontraron un fenotipo silvestre en líneas homocigotas en donde se interrumpió el gen (SALK_010334) (Berkowitz *et al.*, 2008). Sin embargo, en nuestro grupo de trabajo hemos encontrado que otra mutante en este gen, pero en donde el T-DNA se ha insertado en otra región del gen (un exón, mientras que en el caso anterior es en un intrón) el fenotipo es letal en etapas tempranas del desarrollo (Toscano-Morales *et al.*, 2015). También hemos realizado un estudio teórico en donde se compararon las secuencias de diferentes eucariontes cuyo genoma había sido

secuenciado hasta ese momento, encontrándose que para el caso de plantas existen especies con uno, dos o más genes para TCTP, mientras que para mamíferos existe un mayor número de genes de TCTP y también varias copias de pseudogenes (Hinojosa-Moya *et al.*, 2008). El estudio más reciente de nuestro grupo de trabajo (Gutiérrez-Galeano *et al.*, 2014) realizado específicamente en las TCTPs de plantas cuyo genoma ya ha sido secuenciado y anotado, sugiere fuertemente que se puede clasificar a las TCTPs en dos grandes grupos: las AtTCTP1-like (parecidas a AtTCTP1) y las CmTCTP (y AtTCTP2)-like (parecidas a CmTCTP y AtTCTP2), y a partir de estos se puede inferir su posible funcionalidad por homología con las dos versiones de TCTP de Arabidopsis (Berkowitz *et al.*, 2008) y Calabaza (Hinojosa-Moya *et al.*, 2013).

1.7 ¿Es AtTCTP2 un pseudogen?

Un pseudogen es denominado como una secuencia nucleotídica similar a un gen normal pero que no da como resultado un producto funcional o que ya no se expresa (Vanin, 1985). Los pseudogenes pueden llegar a ser resultado de la acumulación de mutaciones en un gen haciendo que sus productos (ARNm o proteína) no se generen, sin embargo, estos no son “esenciales” o importantes para la supervivencia o desarrollo del organismo. Por otro lado, aunque no codifiquen para proteína, el DNA de pseudogenes puede ser funcional e incluso tener un rol regulatorio tal como lo hacen otros tipos de DNA (Poliseno *et al.*, 2010). De acuerdo con Berkowitz *et al.* (2008) AtTCTP2 es un pseudogen, ya que su ARNm no es detectable por RT-PCR cuantitativo, y porque la mutante por inserción de T-DNA en este gen carece de fenotipo distinto al de plantas silvestres. Sin embargo no parecen ser suficientes estos argumentos para considerar verdaderamente a AtTCTP2 como un pseudogen. A continuación se describen diferentes tipos de pseudogenes hallados en genomas eucariontes, particularmente en animales:

-Pseudogenes procesados

Fragmentos de ARN mensajero de un gen pueden ser transcritos inversamente de manera espontánea e insertados en el ADN cromosómico (retro-transposición). Ya que estos

pseudogenes carecen de promotores (dependiendo de su sitio de inserción), normalmente no se expresan (Hirotsume *et al.*, 2003; Herron y Freeman, 2007).

-Pseudogenes duplicados o sin procesar:

Un suceso de duplicación genética puede significar que un genoma tenga dos copias de un gen cuando sólo necesita de una. Las mutaciones que inactiven una de las copias no serían, por tanto, seleccionadas en contra (e incluso podrían tener cierta ventaja selectiva estando inactivados). Además, la duplicación puede no ser completa, de manera que la copia puede tener un promotor incompleto (Hirotsume *et al.*, 2003).

-Persistencia de pseudogenes por selección natural:

Un gen puede dejar de ser funcional o inactivarse si una mutación se fija en la población. Esto puede ocurrir por selección natural; evidentemente si el pseudogen confiere alguna ventaja adaptativa al organismo que lo alberga, por deriva genética. Este es el mismo mecanismo por el que los genes sin procesar se inactivan (Hirotsume *et al.*, 2003). En el caso de deriva genética, la inactivación de un gen que resulta en un pseudogen es neutral en el fenotipo del organismo, por lo que no hay un efecto en la acumulación de mutaciones en dicho gen.

1.8 ¿Actúa TCTP en la ruta TOR?

Se ha propuesto a TCTP como una proteína perteneciente a la familia de Pequeñas Chaperoninas Mss4/Dss4, de las cuales se conoce su interacción con proteínas G (Ras, Rab, o Rheb). Se hace a continuación una somera descripción de estas proteínas que podrían interactuar con TCTP.

Superfamilia de las GTPasas (Ras GTPasas)

Las GTPasas son una superfamilia que posee en general dos funciones: intermediarios en las rutas de transducción de señales (generalmente asociadas a receptores transmembranales), y regulación de la traducción (usualmente a nivel de la iniciación y

elongación de ésta); o como elementos de reconocimiento de señales (localización de proteínas, transporte a nivel membrana y vesicular, actividad de cinasa o transferasa de fosfatos). Dentro de la superfamilia de las GTPasas podemos distinguir a las *Ras GTPasas*, las cuales forman un grupo numeroso de proteínas regulatorias monoméricas pequeñas homólogas a la proteína Ras (también llamadas pequeñas GTPasas) con un peso molecular de aproximadamente 21 KDa y, por lo general, sirven como interruptores moleculares para una gran variedad de rutas de transmisión de señales celulares. Dentro de estas podemos clasificar a las Proteínas Rab y Rheb Ras-GTPasas.

Mecanismo de las Ras GTPasas

Todas las GTPasas regulatorias tienen un mecanismo común que les regula (permite encender o apagar) la transducción de señales. Puesto que se trata de proteínas interruptoras que están activadas cuando poseen GTP en su estructura e inactivadas cuando se asocian a GDP, la actividad GTPasa es crucial para su regulación. Por ello, existen dos tipos de factores que intervienen en el intercambio: las GAPs, de las siglas en inglés de proteína aceleradora de la actividad GTPasa, que favorece la ruptura del enlace fosfodiéster del GTP a GDP, por lo cual inactiva a la proteína G (este cambio se efectúa con una simple hidrólisis del GTP por medio de la actividad intrínseca de la misma GTPasa, logrando pasar el interruptor al estado apagado); y las GEFs (por sus siglas en inglés de factor intercambiador de nucleótido de guanina), es un factor proteico que facilita el intercambio de GDP de la estructura de la proteína G por GTP, por lo cual la activa.

La inactivación de la GTPasa puede ser revertida por efecto de estas proteínas que causan que se disocie el GDP de la GTPasa, llevando a su asociación con una nueva molécula de GTP. Ello cierra el ciclo al estado activado de la GTPasa, el cual es el único estado en el que la GTPasa puede transducir una señal a una reacción en cadena “rio abajo” (Vernoud *et al.*, 2003).

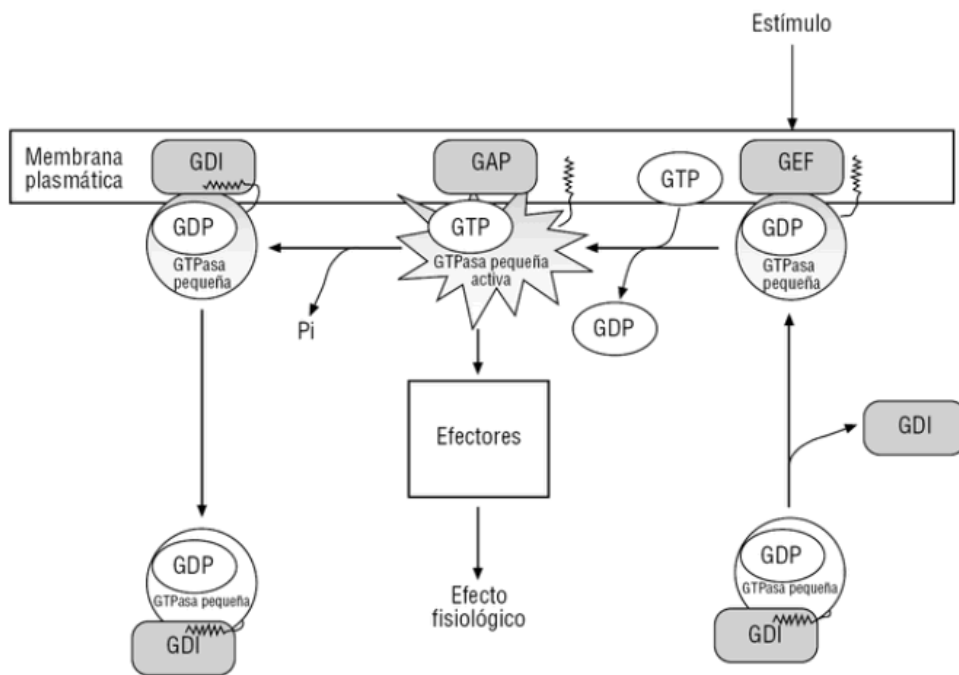


Figura 4. Ciclo de activación-inactivación de las GTPasa/s pequeñas. Los estímulos externos activan al factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF). Este factor: a) desplaza al inhibidor de la disociación de GDP (GDI), liberando el residuo isoprénico unido a la GTPasa pequeña que sirve para su anclaje a la membrana plasmática, y b) cataliza el intercambio de GDP por GTP en la GTPasa pequeña. La unión del GTP induce un cambio conformacional en la GTPasa pequeña, activándola y permitiendo el acoplamiento a sus efectores. La proteína activadora de la GTPasa (GAP) estimula la actividad GTPásica intrínseca de la GTPasa pequeña. La hidrólisis del GTP retorna a la GTPasa pequeña a su estado inactivo ligado a GDP y a GDI (tomado de Jalil *et al.*, 2005).

Aunque la función biológica de TCTP no puede establecerse aún de manera precisa, parece clara la función de TCTP como modulador de la actividad GTPasa, si bien debe considerarse que dicha función ha sido establecida por evidencias genéticas y que por tanto podría ser indirecta. Tomando en cuenta lo descrito anteriormente, se ha propuesto la interacción de TCTP con las GTPasas-Ras. TCTP podría tener una doble función,, actuando ya sea como un GEF o como un Chaperón Libre de Nucleótidos de Guanina (Boguski y McCormick, 1993; Thaw *et al.*, 2001; Itzen *et al.*, 2006). Se ha sugerido que TCTP puede actuar GEF de otras proteínas G, como Rheb (Una GTPasa tipo Ras que fue descrita inicialmente en sistema nervioso central). Existen evidencias que Rheb y TCTP podrían ser parte de la ruta de señalización TOR (Mahfouz *et al.*, 2006) la cual regula el

desarrollo celular en respuesta a estímulos externos (hormonas como auxinas, en plantas) e internos (hambruna, falta de aminoácidos). (Hsu *et al.*, 2007).

1.9 Moléculas presentes en floema: proteínas y ARNm.

El floema forma parte del tejido vascular en plantas y es el encargado de servir como conductor para el transporte de fotoasimilados y otras sustancias. Este está constituido por: la célula acompañante, metabólicamente activa, asociada mediante plasmodesmos a los elementos cribosos, los cuales carecen de la mayor parte de los orgánulos, haciéndolos dependientes metabólicamente de las células acompañantes. El análisis del contenido de exudados de floema ha permitido sugerir que no únicamente fotosintatos circulan a través de él. Fitohormonas, tales como auxinas y citocininas, han sido encontradas en savia de floema (Jacqumard *et al.*, 2002; Corbesier *et al.*, 2003). En el caso de las proteínas que se encuentran presentes en floema, éstas se producen en la célula acompañante, por lo que deben ser transportadas al elemento criboso vecino a través de los plasmodesmos. Adicionalmente, es probable que proteínas transmembranales sean transportadas a través del retículo endoplásmico y por el flujo de membrana que alimenta a la de los elementos cribosos. Una parte importante de las proteínas solubles de tubos cribosos deben ser capaces de interactuar con los plasmodesmos que comunican la célula acompañante con el elemento criboso vecino (Xoconostle-Cázares y Ruiz-Medrano, 2005).

El proteoma de savia de floema de algunas especies vegetales ha sido reportado (Lin *et al.*, 2009; Rodríguez-Medina *et al.*, 2011). Cabe notar que una porción importante de éste consiste en proteínas que regulan el balance redox, y otras en la defensa contra ataque por daño mecánico. Asimismo, rutas metabólicas para la síntesis de alcaloides se encuentran en el proteoma de savia (Bird *et al.*, 2003). Lo anterior indica que las proteínas que se translocan por floema están involucradas en el mantenimiento del EC maduro, así como en la respuesta de defensa general (Lin *et al.*, 2009). No obstante, también se han encontrado proteínas involucradas en señalización y regulación general del crecimiento de plantas, como cinasas, ciclinas y factores de transcripción.

Un factor importante es la regulación de la dirección del movimiento de las proteínas de floema. Estudios han mostrado que una proporción importante de las proteínas es “retirada” del floema antes de llegar a tejidos consumidores fuertes, y otras se incorporan al flujo durante la translocación del floema. Más recientemente se realizaron experimentos en los que proteínas de calabaza que se mueven larga distancia en el floema fueron marcadas y reintroducidas en el floema de arroz, los resultados de estos indicaron que el flujo de éstas es pasivo en dirección al ápice, pero es regulado en dirección de la raíz (Aoki *et al.*, 2005). Lo anteriormente mencionado sugiere que el movimiento de las proteínas en el floema es parcialmente regulado.

Algunos trabajos han reportado diferentes especies de ARN en floema. Dentro de los primeros indicios de la presencia de ARN en floema se reportó una variedad de ARNs mensajeros en exudados de calabaza (Kühn *et al.*, 1997; Ruiz-Medrano *et al.*, 1999). Posteriormente se hallaron, en savia de calabaza, RNAs de bajo peso molecular correspondientes a RNAs interferentes, segmentos de transposones y otros, potencialmente microRNAs (Yoo *et al.*, 2004).

Proteínas que unen ARN tanto de bajo como alto peso molecular (Xoconostle-Cázares *et al.*, 1999; Ruiz-Medrano *et al.*, 1999; Yoo *et al.*, 2004) indican que éstas, así como ciertos ARNs, podrían formar parte de un sistema de intercambio de información en plantas a través del floema. Aunque es cierto que debe tenerse presente que muchos de estos ARNs han sido detectados previa retrotranscripción y amplificación enzimática, de tal forma que no se puede descartar contaminación de ARNs provenientes de tipos celulares aledaños que podrían encontrarse sólo a niveles basales (Sasaki *et al.*, 1998; Ruiz-Medrano, *et al.*, 1999). Es por esto que la localización de RNAs en elementos cribosos *in situ* debe ser un criterio adicional para asegurar que éstos se desplazan larga distancia por el floema (Xoconostle-Cázares y Ruiz-Medrano, 2005).

1.10 Movimiento célula-célula y a larga distancia de TCTP

Se ha descubierto que TCTP extracelular (secretada) está presente en diversos sistemas como en los sobrenadantes de cultivos celulares de macrófagos, o en los fluidos de lavados bronquio-alveolares o nasales durante reacciones alérgicas. La mayor parte de las proteínas secretadas poseen secuencias señal (líder) compuestas de 13 a 30 aminoácidos hidrófobos en su extremo N-terminal, que les permiten ser secretadas hacia el exterior celular por medio de la llamada Ruta Clásica, en la cual las proteínas son transportadas través del Retículo Endoplásmico y el Aparato de Golgi. Sin embargo, existen otras proteínas que a pesar de no poseer péptido señal son capaces de emerger de la célula por una denominada Vía No-Clásica, es decir, independientemente de la ruta por Retículo Endoplásmico y Aparato de Golgi. TCTP pertenece a este último grupo de proteínas que no poseen la señal de reconocimiento para su secreción celular y que por ende son secretadas sin pasar por el sistema de endomembranas, lo cual puede explicar la presencia de TCTP extracelular (Muesch, 1990). Aún no se ha definido como se secretan este tipo de proteínas, sin embargo se han propuesto varios mecanismos potenciales para esta secreción poco convencional dentro de los cuales están involucrados la secreción lisosomal y exosomal, transportadores residentes de membrana plasmática, y la globulación de membrana (Nickel, 2005).

En el caso de TCTP, existe poca evidencia del probable movimiento a larga distancia en forma de proteína y/o ARNm, sin embargo, ya se han encontrado indicios de la unión y probable interacción de TCTP a un homólogo CmPP16 en arroz, la cual es una proteína que transloca libremente proteínas y ARNm desde la célula acompañante hacia el elemento criboso (Aoki *et al.*, 2005), además de la presencia de TCTP en las bases de datos de proteoma de savia de calabaza (Lin *et al.*, 2009) y de los transcriptomas de exudados de floema de *Ricinus communis* y *Lupinus albus* (Doering-Saad *et al.*, 2006; Rodríguez-Medina *et al.*, 2011). Por otro lado, estudios en *Cucurbita máxima* y *Arabidopsis thaliana* sugieren que TCTP (CmTCTP y AtTCTP1) podrían estar transportándose a través de floema basándose en la localización de la proteína (Berkowitz *et al.*, 2008) y ARNm (Hinojosa-

Moya *et al.*, 2013). Más aún, un estudio más reciente encontró TCTP entre los ARNm que se transportaron desde *Arabidopsis* hacia la planta parasítica *Cuscuta reflexa* lo cual refuerza aún más la noción de que TCTP puede actuar como una señal móvil en planta, quizás como una proteína o ARNm no autónomo celular (Kim *et al.*, 2014).

1.11 Proteínas no Autónomas Celulares

En planta, la comunicación célula a célula está mediada por el transporte a través de plasmodesmos (PD) e involucra el movimiento de proteínas no autónomas celulares, llamadas NCAPs, por sus siglas en inglés. En general se conoce mucho de los plasmodesmos y el movimiento de macromoléculas debido a los diversos estudios enfocados en el entendimiento de la función de partículas de movimiento viral las cuales son definidas como factores inducidos por virus de plantas que interactúan con los PDs para mediar la propagación intercelular de la infección. Sin embargo, también está claro que los PDs son de vital importancia en procesos endógenos de la planta como transducción de señales, defensa o transporte de nutrientes. Ahora se conoce que los virus aprovechan la red intercelular de comunicación que soporta el transporte de una gran variedad de proteínas y complejos ribonucleoproteicos que poseen funciones no autónomas celulares en procesos fisiológicos y de desarrollo. Más aún la propagación exitosa de un virus parece estar en función de la habilidad de éste para contraatacar los mecanismos innatos de defensa de la planta. Tomando en cuenta esto, las proteínas de movimiento pertenecen a este grupo de proteínas que facilitan el transporte intercelular de macromoléculas que pueden tener una amplia gama de funciones celulares (Heinlein y Epel, 2004).

Por otro lado, para el transporte intercelular y a larga distancia es esencial la habilidad que poseen las proteínas de movimiento para incrementar el límite de exclusión de los plasmodesmos. En este sentido, se encontró que en plantas transgénicas expresando proteínas de movimiento se lograban movilizar por difusión moléculas (dextranos) de hasta 10 KDa mientras que en plantas silvestres no transformadas no existía transporte de

moléculas mayores a 1 KDa (Wolf *et al.*, 1989). Estudios posteriores nos brindan ejemplos del movimiento de diversas proteínas con capacidad de moverse célula a célula, las cuales se sugiere que actúan de manera no autónoma celular regulando el desarrollo de la planta. Tales son los casos de los factores de transcripción KNOTTED 1 (KN1) de maíz (Jackson *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 2002), DEFICIENS (DEF) de *Antirrhinum* (Mezitt y Lucas, 1996), GLOBOSA (GLO) (Kragler *et al.*, 1998), LEAFY (LFY) (Sessions *et al.*, 2000) y SHORT ROOT (SHR) (Helariutta *et al.*, 2000) en *Arabidopsis*. Existen proteínas con la habilidad para moverse intercelularmente como la Proteína de Floema 2 de *Cucurbita máxima* (CmPP2) (Balachandran *et al.*, 1997), CmPP16 (Xoconostle-Cázares *et al.*, 1999), CmPP36 (Xoconostle-Cázares *et al.*, 2000), y chaperonas Hsc70 (Aoki *et al.*, 2002).

Tomando en cuenta lo anteriormente mencionado, se ha sugerido un transporte macromolecular a través de plasmodesmos, tal es el caso de KN1 que se sabe que incrementa el tamaño del límite de exclusión de plasmodesmos de manera similar a las proteínas de movimiento virales (Lucas *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2002). Otro casos estudiados son el movimiento de CmPP16, verificado en injertos de calabaza y pepino, y de CmPP36 cuya expresión está confinada a células acompañantes (Xoconostle-Cázares *et al.*, 1999; Xoconostle-Cázares *et al.*, 2000). En este último ejemplo, se sugiere que es necesario el procesamiento proteolítico para que esta proteína, CmPP36, pueda entrar al flujo de translocación del floema para transportarse a larga distancia. Otro ejemplo, es la proteína NtNCAPP1, o *Nicotiana tabacum* NON-CELL AUTONOMOUS PATHWAY PROTEIN 1, que interactúa con CmPP16 entre otras proteínas no autónomas celulares (Lee *et al.*, 2003), en la que se encontró que al verse mutada se veía afectado el movimiento de CmPP16 y proteínas de movimiento virales al modificar la capacidad de incrementar el tamaño del límite de exclusión. Sin embargo, ésta proteína no se transporta intercelularmente, sino que reside en los plasmodesmos.

1.12 ARNs no Autónomos Celulares

El movimiento a larga distancia de ARNs en planta ha sido estudiado desde hace más de una década, y se ha logrado confirmar el movimiento célula a célula de RNAs endógenos y señales de silenciamiento de génico (Lucas *et al.*, 1995; Ruiz-Medrano *et al.*, 1999; Lucas *et al.*, 2001). Estos ARNs son capaces de transportarse al interactuar con ciertas proteínas formando complejos ribonucleoproteicos los cuales son translocados a través de plasmodesmos. En el caso de los virus, el transporte de ARN se ha adaptado al mecanismo endógeno de la planta para transportar sus genomas y así diseminarse por la planta huésped, (Xoconostle-Cázares *et al.*, 1999; Ham *et al.*, 2009)

Sin embargo, los trabajos que abordan la relación entre la función no autónomas celular de ARNs y la propagación de estos son escasos. Uno de los primeros trabajos sobre esto fue hecho en jitomate, en donde se realizaron injertos en los que el portainjertos era la mutante dominante denominada *Mouse ears (Me)* y el injerto era WT; en este estudio se detectó la acumulación del transcrito *Me* en el meristemo de los injertos WT lo cual se hizo evidente con el cambio en la morfología de estos últimos (Kim *et al.*, 2001).

Por otro lado, el transporte de señales de silenciamiento génico parece estar dado a través de plasmodesmos debido a que el silenciamiento no se propaga hacia células simplasmicamente aisladas (Voinnet *et al.*, 1998).

1.13 Probable papel de TCTP en la regulación de la proliferación celular en plantas

En los organismos multicelulares el alcanzar el tamaño correcto es fundamental, y requiere de la coordinación precisa de múltiples procesos, dentro de los cuales el crecimiento celular y la proliferación celular son vitales (Brioudes *et al.*, 2010). En el caso de TCTP existe un cúmulo de evidencias que apunta hacia el importante papel que juega esta proteína; un ejemplo claro fue descrito en ratones, en donde el knock-out de TCTP causó defectos en el desarrollo embrionario al verse interrumpida la proliferación celular

e inducirse excesivamente la apoptosis (Chen *et al.*, 2007). En *Drosophila*, la interrupción de la expresión de TCTP en ciertos órganos provocó la reducción en el tamaño de éstos ocasionados por una disminución en el número de células y defectos en el crecimiento celular (Hsu *et al.*, 2007).

En el caso de las plantas, TCTP ha sido involucrada en la regulación del crecimiento, específicamente controlando la división y expansión celular, esto al analizar líneas silenciadas de TCTP en *Arabidopsis* (*AtTCTP1-RNAi*), encontrándose además que ocurría una reducción en el número de células (de 20 a 30% menos densidad celular comparado con plantas silvestres) que no se vio reflejado en el tamaño total de la hoja debido a que en las plantas silenciadas se observó un incremento en el tamaño celular (Brioudes *et al.*, 2010). Sin embargo, al sobreexpresar *AtTCTP1* se observó un desarrollo normal, con cierto crecimiento acelerado comparado con plantas silvestres durante las primeras etapas de desarrollo, por lo cual se ha sugerido que *AtTCTP1* podría tener un rol en el control del crecimiento mitótico específicamente, pero no en el post-mitótico.

1.14 Probable papel de TCTP en la diferenciación celular

La diferenciación celular es un término muy amplio que indica básicamente el proceso por el cual algunas células sufren modificaciones en su expresión génica para poder adquirir la morfología y funciones específicas de un tipo celular. En el caso de las plantas, existen múltiples células totipotentes o pluripotentes las cuales tienen la capacidad de convertirse en cualquier tipo celular. Las zonas primordiales de crecimiento y diferenciación celular en plantas son los meristemos (apical, radicular, axilar) y obviamente la región cigótica donde se da lugar a la formación de embriones, sin embargo, prácticamente cualquier célula somática tiene la capacidad de redirigir su destino y reconvertirse en otro tipo celular. En el caso de *Arabidopsis*, como modelo de estudio en plantas, y en tomate se ha encontrado que los genes de la familia WOX están íntimamente relacionados con la organización de las células durante el desarrollo de la planta, específicamente en la formación de los haces vasculares en raíz y los brotes de los órganos laterales (Haecker *et al.*, 2004).

1.15 Embriogénesis somática y el posible papel de TCTP en el control de la embriogénesis

La embriogénesis somática implica el proceso por el cual las células somáticas sufren una reestructuración para generar células embriogénicas, lo cual implica que estas células pasan por una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que resultan en la formación de embriones no somáticos o no cigóticos capaces de regenerar plantas. Cabe mencionar que la embriogénesis somática puede ocurrir de manera directa cuando se diferencia directamente del explante sin pasar por la etapa de callo, o de manera indirecta después de haber pasado por la fase de callo (Sharp *et al.*, 1980).

La embriogénesis somática incluye una serie de eventos característicos que juntos agrupan una ruta de desarrollo única. Los eventos dentro de esta ruta inician con la desdiferenciación de las células somáticas (explante), la activación de la división celular, y la reprogramación fisiológica, metabólica y de expresión para dar paso a la proliferación como células embrionales (Yang y Zhang, 2010).

Por otro lado, se han logrado identificar algunos de los genes inducibles por hormonas cuya expresión ha sido relacionada con el control del desarrollo embrionario. Dentro de estos genes han resaltado aquellos que están formando parte de rutas de transducción de señales, como lo son las cinasas tipo-receptoras de embriogénesis, al parecer implicadas en la activación/represión de diversas cascadas de señalización durante la embriogénesis somática. Pero además, se han identificado diversos factores de transcripción (como BBM, LEC1 y LEC2) involucrados en la regulación del desarrollo de embriones somáticos (Yang y Zhang, 2010).

Para el caso de TCTP, existe evidencia antes descrita en donde se implica a esta proteína en las etapas tempranas de la embriogénesis, siendo esencial para el correcto desarrollo de los embriones. En este mismo trabajo (en *Arabidopsis*), se encontró que la interrupción completa del gen *AtTCTP1* retrasaba significativamente el desarrollo de los embriones evitando que estos “maduraran” hasta la fase de cotiledón generando por ende que las líneas mutantes homocigotas en donde se interrumpía este gen presentaran letalidad temprana (Brioudes *et al.*, 2010). Aunque en un trabajo anterior se reportó que la

inactivación del gen *AtTCTP1* generaba defectos en el tubo polínico impidiendo la fertilización del ovulo y por consecuencia evitando la formación de embriones homocigotos. En este mismo trabajo se mostró evidencia de microscopía confocal en donde se evidencia la alta acumulación de AtTCTP1-GFP durante las etapas tempranas de desarrollo del embrión, desde la etapa globular, hasta las últimas etapas de la embriogénesis (Berkowitz *et al.*, 2008).

1.16 Organogénesis *de novo* y el papel de su regulación hormonal

La alta plasticidad de las células vegetales las hace sumamente propensas a los cambios de destino celular una vez que han pasado la etapa de maduración embrional (van den Berg *et al.*, 1995). Los tratamientos con reguladores de crecimiento vegetales (hormonas) han surgido como una vía para la manipulación de las células somáticas (explantes) vegetales para dar lugar a nuevos órganos (De Smet *et al.*, 2007) y llegar incluso a producir embriones (Xu y Huang, 2013) o plantas completas (Su y Zhang, 2014).

Para ahondar en el estudio de la organogénesis se ha optado por el análisis de la formación de raíces laterales aprovechando la capacidad de inducir la formación primordios de raíces laterales (LRP, por su siglas en ingles) con una combinación de tratamientos con un inhibidor del movimiento de auxinas y el análogo sintético de estas, el ácido naftalen-acético (Himanen *et al.*, 2002). De manera interesante parece haber una relación directa entre la división celular del tejido vascular (específicamente en el xilema) y la formación de las raíces laterales en las cuales los primordios se desarrollan en el mismo eje que el xilema (Perianez-Rodríguez *et al.*, 2014). El método antes descrito fue usado para caracterizar proteínas involucradas en la formación post-embriónica de raíces laterales (De Rybel *et al.*, 2010), y para establecer la conexión entre las auxinas y el progreso del ciclo celular durante la formación de las raíces laterales (Himanen *et al.*, 2004). Estos dos últimos estudios, en conjunto, sugieren mecanismos comunes entre la organogénesis endógena y la inducida por hormonas vegetales (Perianez-Rodríguez *et al.*, 2014).

Por su parte, la formación de callos (masas proliferativas de células) ha sido utilizada como un modelo más para tratar de entender los mecanismos moleculares que operan durante la organogénesis *de novo* (Ikeuchi *et al.*, 2013). Sin embargo, en general cualquier célula vegetal necesita pasar por una reprogramación molecular de su desarrollo y crecimiento para poder dar paso a la organogénesis (Perianez *et al.*, 2014). En el caso de los callos, se ha demostrado que solo las células polares de xilema parecidas al periciclo pueden ser reprogramadas para formar callos mediante la inducción en medios de inducción de callo (conteniendo auxinas y citocinas) (Sugimoto *et al.*, 2010). Más aun, algunos estudios muestran que los callos generados de tallo, pétalos o raíces siguen una ruta de desarrollo radicular, incluso sobreexpresando genes enriquecidos en la formación del meristemo radicular (punta de la raíz) (Sugimoto *et al.*, 2010). De todo lo anteriormente mencionado se ha sugerido fuertemente que los pasos iniciales de la regeneración de plantas a partir de explantes están íntimamente ligados a la formación inicial de raíces laterales, básicamente compartiendo la misma programación genética.

1.17 Regeneración de plantas

La regeneración de plantas se puede dividir en varios tipos, cada uno manifestado en una variedad de formas: (1) La regeneración de un tejido escindido, (2) la regeneración *de novo* de un nuevo tejido o estructura de crecimiento, y (3) la regeneración de una planta completa a partir de una sola célula somática. El caso más estudiado es el de la regeneración *de novo* de plantas completas a partir de explantes en cultivo. En este tipo de regeneración se forman nuevos centros de crecimiento de plantas, los cuales desarrollan nuevas zonas meristemáticas que permiten el crecimiento de plantas individuales (Sugimoto *et al.*, 2011). La regeneración *de novo* puede ocurrir pasando primero por una fase de callo, en algunos casos a través del uso de reguladores de crecimiento como auxinas o citocinas para finalmente generar diversos tejidos e incluso embriones (organogénesis indirecta) (Street, 1977; Gautheret, 2003).

Desdiferenciación

Uno de los pasos más importantes durante la regeneración de plantas es la llamada “desdiferenciación”, que implica la capacidad de ciertas células perteneciente al algún tejido de retornar a un estado previo celular quiescente formando eventualmente callo. La formación del callo lleva a estas células a adquirir propiedades similares a células meristemáticas (sin morfología diferenciada), o al menos eso se pensaba (Street, 1977). Sin embargo, estudios más recientes han mostrado que los callos no están “desdiferenciados”, sino que tienen más similitud con tejido de raíces en cuanto al patrón de expresión génica y organización multicelular, esto incluso cuando han sido regenerados de órganos aéreos separados del linaje radicular desde las etapas más temprana de la embriogénesis. Aunado a lo anterior, el transcriptoma de callos es más similar al meristemo de raíz que al apical o a los tejidos embrionales (Atta *et al.*, 2009; Sugimoto *et al.*, 2010).

Transdiferenciación

Este término fue acuñado para definir el cambio irreversible de un tipo celular diferenciado a otro tipo celular también diferenciado (Okada, 1991). En plantas, la transdiferenciación parece ser el proceso por el cual algunos tejidos vegetales se regeneran, como se sugiere por Sena *et al.* (2009) después de haber realizados estudios durante la regeneración de la punta radicular. En este estudio se encontró que la velocidad de reespecificación (24 h) apunta hacia la transdiferenciación más que hacia desdiferenciación. Lo anterior se ve reforzado con la evidencia en *Arabidopsis*, en donde los linajes de raíz y meristemo se separan desde etapas muy tempranas de la embriogénesis (y casi nunca se interconvierten). Tomando en cuenta lo anterior, se podría hablar de otro evento de transdiferenciación cuando se inducen meristemas a partir de callos mediante la aplicación de citocininas (Sugimoto *et al.*, 2010).

Células meristemáticas

Como se ha descrito previamente, la regeneración puede llevarse mediante la formación de callo y este eventualmente diferenciarse en un tejido específico. Es así que en plantas, así como en muchos ejemplos de animales, la regeneración de algunos tejidos depende de

la población de células meristemáticas (células madre en animales) que dirijan a la regeneración de nuevo tejido por diferenciación (organogénesis indirecta), quizás primero pasando por embrión (embriogénesis somática indirecta), aunque también pudiendo darse directamente por transdiferenciación (organogénesis directa) sin haber pasado por la “desdiferenciación” (formación de callo). En este sentido las plantas poseen células meristemáticas maduras distribuidas a través de todos los tejidos vasculares diseminados por toda la planta, permitiendo así la “totipotencia” y plasticidad de las células vegetales (Sugimoto *et al.*, 2011).

2. ANTECEDENTES DIRECTOS

Mientras que la función de TCTP en animales y levaduras parece estar apuntando hacia la proliferación y diferenciación celular, su rol en plantas aún permanece poco claro. Estudios en calabaza mostraron la presencia, en floema, tanto de proteína como de transcritos de TCTP, revelando una función autónoma no celular (Rodríguez-Medina *et al.*, 2011). En tanto que otro estudio, mostró que la sobreexpresión de esta proteína (CmTCTP) en explantes de tabaco resultaba en organogénesis, lo cual es consistente con un posible rol en la regulación de la proliferación celular (Hinojosa-Moya *et al.*, 2006).

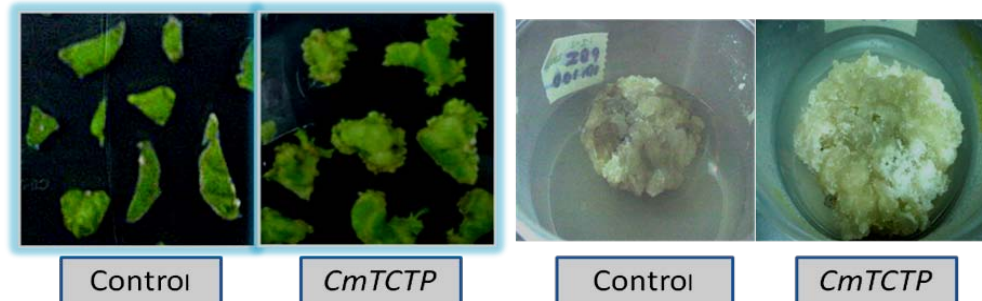


Figura 5. Explantes de tabaco y callos CmTCTP. En los recuadros azules (izquierda) se muestra el efecto de TCTP de calabaza sobre explantes de tabaco en comparación con el control (explantes sin CmTCTP), mientras que en los recuadros de la derecha se muestra como la sobreexpresión de CmTCTP dispara la proliferación celular en callos de tabaco. (Hinojosa-Moya *et al.*, 2006).

En bases de datos se encuentra descrito un gen para TCTP en *Arabidopsis*, *AtTCTP1* (At3g16640), homólogo de TCTP en *Drosophila*, el cual es prácticamente constitutivo y del que se afirma regula la respuesta de, y actúa en respuesta a auxinas (fitohormonas regulatorias del crecimiento). Además, los fenotipos observados por silenciamiento (menor tamaño y células más pequeñas de lo normal) sugieren que TCTP podría actuar como un Factor de Intercambio de Guanin-nucleótidos en la ruta de señalización de TOR (Blanco de Rapamicina, por sus siglas en inglés) (Berkowitz *et al.*, 2008), aunque esto no se ha demostrado del todo.

El genoma de *Arabidopsis thaliana* contiene otro gen para TCTP aún no caracterizado, el cual, de expresarse, lo hace a niveles muy bajos, según los datos obtenidos por microarreglos en el grupo de trabajo. Este gen, denominado *AtTCTP2* (At3g05540) se encuentra reportado en la base de datos del genoma de *Arabidopsis* (www.Arabidopsis.org), en donde sólo se relaciona a esta proteína con la familia de TCTPs y señalar una elevada semejanza con el gen *AtTCTP1*.

Berkowitz y colaboradores (2008) examinaron la función de TCTP de *Arabidopsis in planta*. Los resultados de este estudio indican que *AtTCTP1* se expresa en todos los tejidos de la planta, con una mayor expresión en tejido meristemático y células en expansión. En este trabajo identifican a TCTP1 como un importante componente en la regulación del crecimiento en plantas, tal vez como mediador de la actividad de TOR (con auxina como inductor). Además mediante *knockout* por inserción de T-ADN y Silenciamiento (por ARNi) génico (del gen At3g16640-*AtTCTP1*) observaron un fenotipo característico (deterioro del crecimiento del tubo de polen, disminución en el crecimiento vegetativo, hojas de pequeño tamaño, reducción en la formación de raíces laterales y afectaciones en el desarrollo de raíces), el cual concuerda con lo ya reportado en otros trabajos para TCTP en otros organismos, principalmente en *Drosophila*. Por otro lado, otro estudio (Brioudes *et al.*, 2010) indica que *AtTCTP1* está involucrado en la regulación del crecimiento mitótico, pero no en el postmitótico, y se confirmó que al silenciar este gen, se observa una

reducción en el tamaño de las plantas debido a defectos asociados a la regulación de la proliferación celular (Figura 7).

Sin embargo, en esta misma investigación se indica que el gen At3g05540, que codifica para AtTCTP2, es un pseudogen no funcional, basándose en los resultados nulos obtenidos al realizar RT-PCR cuantitativo en distintos tejidos de la planta (en los que no se detectaron transcritos) y en la ausencia de un fenotipo obvio en las mutantes por inserción de este gen (SALK_010334). Sin embargo, resultados previos de nuestro grupo sugerían que AtTCTP2 es un gen funcional. Debido a que se desconoce la localización celular y las funciones biológicas en las que podría estar involucrado AtTCTP2, se realizaron estudios en nuestro grupo de trabajo en donde se analizaron mutantes por inserción en este gen.

Las mutantes analizadas en nuestro grupo (SALK_045146) contienen una inserción de T-ADN en el segundo exón del gen *AtTCTP2* (Figura 6). Estas mutantes evidenciaron un fenotipo diferente del silvestre, caracterizado por ausencia de floración, necrosis en hojas iniciada en tejido vascular y proliferación temprana de tricomas en hojas. Cabe señalar que observamos que en las mutantes de T-ADN analizadas por Berkowitz y colaboradores (2008) la inserción se encontraba localizada en un intrón; esto resultaría, probablemente, en la pérdida del T-ADN en el transcrito maduro del gen *AtTCTP2* en la mutante y por tanto en un fenotipo silvestre. Esto explicaría la discrepancia entre los resultados de nuestro grupo y los de Berkowitz *et al.* (2008), al menos en cuanto al fenotipo de las mutantes. Es claro que el no poder detectarse un transcrito no es equivalente a que un gen nunca se exprese. Por lo tanto, analizando todo lo presentado se infiere que AtTCTP2 (ARNm y proteína) se expresa a niveles muy bajos, sin embargo, sí tiene una función biológica. Esta podría asemejarse más a TCTP de calabaza (CmTCTP) que también hemos caracterizado en nuestro grupo, es decir, que tanto el RNA como la proteína AtTCTP2 circulan a través del floema y podrían tener una función señalizadora a distancia.

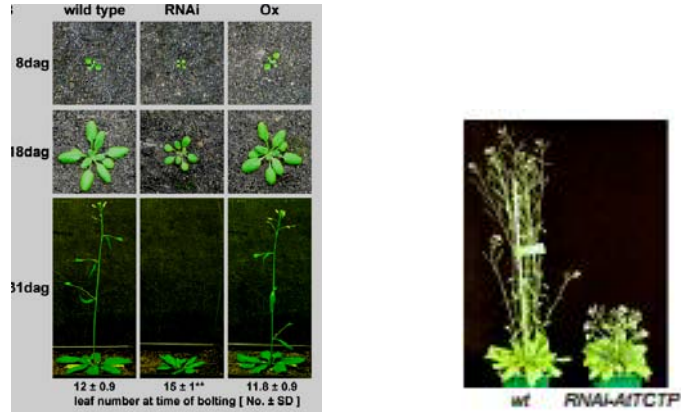


Figura 6. Silenciamiento y sobre-expresión de *AtTCTP1*. Fenotipos observados en plantas transgénicas donde se silenció o se sobreexpresó el gen *At3g16640*. (Berkowitz *et al.*, 2008; Brioudes *et al.*, 2010).

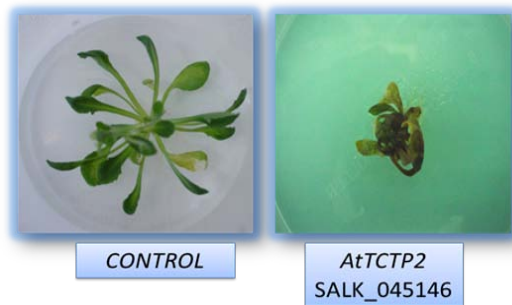


Figura 7. Plantas mutantes de T-ADN (línea SALK_045146). Fenotipo de la mutante en el gen *At3g05540-AtTCTP2* obtenido por una inserción de T-ADN en una región codificante para la proteína *AtTCTP2* (2° exón), comparado con un control (planta silvestre). (Hinojosa-Moya *et al.*, resultados no publicados).

3. JUSTIFICACIÓN

TCTP ha sido ampliamente estudiada en organismos eucariontes modelo, en donde se le relaciona, al menos en animales y levaduras, con la proliferación y diferenciación celular. Sin embargo, su rol en plantas aún permanece poco claro. De acuerdo con todo lo presentado aquí se infiere que AtTCTP2 (RNAm y proteína) se expresa a niveles muy bajos, pero que sin embargo, sí posee una función biológica, la cual podría asemejarse a lo reportado para CmTCTP (Hinojosa-Moya *et al.*, 2013), es decir, que tanto el ARN como la proteína AtTCTP2 circulan a través del floema, y por ende posea una función señalizadora a distancia, además de probablemente tener una función regulatoria en el crecimiento de *Arabidopsis* y en general en plantas. Por lo mencionado, creemos importante caracterizar dicho gen (At3g05540-AtTCTP2) con mayor detalle, evaluando el patrón de expresión y la localización de la proteína de fusión en plantas transgénicas de *Arabidopsis*. Además de caracterizar el papel de este gen en la regulación y desarrollo, los resultados de estos estudios nos indicarán si *AtTCTP2* tiene una función análoga a *CmTCTP*, y ayudará a aclarar su función en *Arabidopsis* y de manera más general, en plantas.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel de *AtTCTP2* (RNAm y/o Proteína) en el desarrollo de plantas.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1 Análisis fenotípico de plantas sobreexpresoras, silenciadas y mutantes nulas (*AtTCTP2* y *AtTCTP1*) e identificación de los patrones de acumulación de la proteína (*AtTCTP2* y *AtTCTP1*) a nivel celular (*Arabidopsis*).

4.2.2 Análisis de los sitios de expresión del gen *AtTCTP2* a nivel cuantitativo y de sitios de expresión.

4.2.3 Caracterización parcial del rol de *AtTCTP2* en el control del crecimiento y desarrollo en plantas.

4.2.4 Estudio del movimiento célula-célula y/o a larga distancia de *AtTCTP2* en forma de transcrito y/o proteína.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental planteada comprende 4 grupos de actividades principales que engloban los objetivos específicos señalados anteriormente. Cabe destacar que no poseen necesariamente un orden secuencial y por ende algunas de ellas fueron llevadas a cabo a la par.

5. 1 Análisis de plantas sobreexpresoras, silenciadas y mutantes nulas (knockout) de AtTCTP2.

5.2 Identificación de los patrones de acumulación de la proteína (AtTCTP2 y AtTCTP1) a nivel celular (*Arabidopsis*).

5.3 Análisis de la expresión del gen AtTCTP2.

5.4 Determinación del papel de AtTCTP2 en el control de la proliferación celular (crecimiento) y el la diferenciación (desarrollo) en plantas.

5.5 Estudio del movimiento célula-célula y/o a larga distancia de AtTCTP2 y AtTCTP1 se da en forma de transcrito y/o proteína.

5.6 Estudio *in silico* de posibles diferencias funcionales entre AtTCTP2 y AtTCTP1.

MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Análisis de la sobreexpresión, silenciamiento e interrupción de AtTCTP2

6.1.1 Crecimiento de plantas de *Arabidopsis* y *N. tabacum*

Las plantas (silvestres y/o transgénicas) fueron crecidas en el invernadero, en macetas negras especiales para *Arabidopsis*. Las semillas fueron sembradas, con ayuda de agarosa al 0.1%, sobre la superficie de una mezcla de tierra con la siguiente composición: tierra 40%, turba 40%, agrolita 20%. La maceta posteriormente fue cubierta con plástico transparente hasta la aparición de las plántulas, las cual fueron regadas con solución nutritiva (Miracle-Gro^{TR}) cada tercer día.

6.1.2 Extracción de ADN genómico y ARN total de plantas

Las muestras de tejido fueron recolectadas de plantas de aproximadamente 6 semanas de edad, a partir de hojas (ADN genómico) y tallo (ARN total) seccionadas con bisturí. El tejido fue pulverizado por crio-fractura con nitrógeno líquido usando un mortero y un pistilo (estériles) hasta obtener un polvo fino. La extracción fue hecha mediante los sistemas comerciales DNeasy y ARNeasy (QIAGEN, Hilden, Alemania), de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. La integridad de las muestras de ADN se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, mientras que en las muestra de ARN se realizó la separación electroforética en gel de agarosa 1.2 % en condiciones desnaturalizantes con formaldehído 2.2 M, empleando solución amortiguadora (MOPS 0.02 M, pH 7.0; acetato de sodio 8 mM; EDTA 1 mM, pH 8.0) a temperatura ambiente (Sambrook *et al.*, 2001). Los amplicones fueron visualizados con luz ultravioleta (254 nm), capturando y analizando la imagen con el sistema de fotodocumentación Gel Logic 2000 (cámara Kodak Digital Science DC40 y el programa Image Analysis Software v3.0, EUA). Por último, la concentración y pureza de las muestras de DNA genómico y RNA total se determinó mediante el espectrofotómetro NanoDrop[®] ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington), siguiendo las especificaciones del proveedor.

6.1.3 Síntesis de cDNA

Con el fin de obtener el Marco Abierto de Lectura (ORF, por sus siglas en inglés) de AtTCTP2 y AtTCTP1 se sintetizó ADNc (ADNc, por sus siglas en inglés) a partir del ARN total extraído de tejido perteneciente a tallo de plantas silvestres de Arabidopsis empleando la enzima reverso transcriptasa SuperScript™ III (Invitrogen), siguiendo las especificaciones del proveedor. Se utilizó 500 µg de ARN total, se adicionó 150 ng de oligonucleótidos adaptadores SMART y oligo daga, una de mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) a una concentración final de 0.5 mM cada uno y agua bidestilada estéril hasta completar 6.5 µL de volumen de reacción. La mezcla se incubó durante 10 min a 72 °C (para evitar la estructura secundaria se probó además a 80 °C); al cabo de este tiempo, la mezcla se transfirió rápidamente a hielo y se mantuvo por 5 min. Posteriormente, se agregó 2 µL de solución amortiguadora para la síntesis de primera cadena de ADNc (5X: Tris-Hall 250 mM, pH 8.3; KCl 375 mM; MgCl₂ 15 mM), 0.5 µL de DTT 0.1 M), 0.5 µL del inhibidor de RNAsas ARNseOUT™ de Invitrogen (40 U/µL) y 0.5 µL de la enzima SuperScript™ III (200 U/µL). La mezcla se homogenizó suavemente y se incubó a 50°C durante 60 min. Para inactivar la reacción, se incubó durante 15 min a 70°C.

6.1.4 Amplificación fragmentos de interés de TCTP de Arabidopsis

Para la amplificación de los fragmentos de interés se utilizó la ADN polimerasa TaKaRa ExHS (Takara Bio Inc.), siguiendo las especificaciones del proveedor. Los fragmentos a amplificar fueron: Prom-ORF AtTCTP2 (3 Kb), Locus genómico AtTCTP2 (1.5 Kb), ORF de AtTCTP2 y AtTCTP1 (456 y 507 pb), . Se realizó el diseño de los oligonucleótidos específicos para la amplificación de los genes de interés (Tabla Anexo 1). Para cada reacción de PCR se utilizó 1.0 µL de ADN genómico o ADNc, 2.5 µL de solución amortiguadora (10x) ExTaq de Takara Bio Inc. (concentración de Mg⁺² 20mM), 2 µL de mezcla de dNTP (2.5 mM cada uno), 1 µL de oligonucleótidos específicos (10 µM) directo y reverso, 0.1 µL de TaKaRa ExTaq ADN polimerasa (5 U/µL) y agua bidestilada estéril hasta completar un volumen de 25 µL. Las reacciones se incubaron en un termociclador Biometra (Goettingen, Alemania), en

donde se probaron distintos gradientes de temperatura para estandarizar las condiciones de reacción de PCR para la amplificación de todos los fragmentos de interés de TCTP de *Arabidopsis*. Los productos de las reacciones de amplificación se separaron en geles de agarosa al 1.0 % (conteniendo 1 μ L de Bromuro de Etidio por cada 100 mL de Gel de agarosa) y solución amortiguadora TBE (Tris 45 mM; ácido bórico 45 mM; EDTA 1 mM, pH 8.0). Posterior a la separación electroforética, los geles fueron visualizados con luz ultravioleta. Se capturó y analizó cada imagen con el sistema de documentación electroforética Gel Logic 2000 (Sambrook *et al.*, 2001).

6.1.5 Clonación de fragmentos de interés

6.1.5.1 Purificación de productos de PCR

Los amplicones fueron purificados utilizando el sistema comercial QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del proveedor. Esencialmente, después de realizar el perfil electroforético del producto amplificado, se separó el fragmento del gel de agarosa que contenía la banda deseada. A continuación se adicionaron 3 volúmenes de solución de solubilización (QG, la cual contiene tiocianato de guanidina), se incubó a 50 °C por 10 min, agitando vigorosamente cada 3 min (aprox.) de incubación, hasta que la agarosa gelificada se licuó en la solución. Posteriormente, se adicionó 1 volumen de Isopropanol por volumen de gel, la mezcla homogenizada se depositó en una columna plástica con membrana de sílica gel. Esta última se colocó en un tubo colector de 2 mL y se centrifugó a 13000 rpm durante 60 segundos. Después se eliminó el eluido y se colocó la columna en el tubo colector de 2 mL. Se añadieron 700 μ L de solución de lavado PE (que contiene etanol) y se centrifugó durante 1 min a 13000 rpm. Se eliminó el eluido y se centrifugó nuevamente durante 1 min para eliminar los restos de alcohol. Para eluir el ADN, se añadieron 32 μ L de agua bidestilada estéril en el centro de la columna y, después de esperar 1-2 min, se centrifugó durante 1 min a 13000 rpm para finalmente almacenar el eluido a una temperatura de -20°C, hasta su uso.



Figura 8. Mapa representativo del vector de clonación pCR8GWTOPO. Este vector contiene los sitios attL1 y attL2 que le permiten llevar ser usado como vector de entrada para llevar a cabo la eventual recombinación homóloga con un vector binario.

6.1.5.2 Obtención de plásmidos recombinantes a partir de productos de PCR

Los productos de PCR purificados fueron ligados al vector de clonación comercial pCR8GWTOPO (Invitrogen; Carlsbad, CA) atendiendo las indicaciones del proveedor. Se utilizaron 1-2 μL del producto de PCR purificado (dependiendo de la concentración), 0.5 μL de vector pCR8GWTOPO, 1 μL de solución salina y el resto de agua bidestilada estéril hasta llegar a un volumen final de 6 μL . Se agitó suavemente la mezcla con pipeteo y se incubó a 22°C (toda la noche/ 12hrs). Posteriormente, se utilizó el producto de la reacción para transformar células competentes de *Escherichia coli* (DH5 α , TOP 10 o Mach1; Invitrogen).

6.1.5.3 Preparación de células competentes

Colonias aisladas de *E. coli* (Mach 1 o DH5 α) fueron cultivadas en 10 mL de medio Luria-Bertani (LB; triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 200 mM, pH 7.0) en agitación constante a 37°C durante 16 h. Se tomó 5 mL del cultivo anterior, se inoculó 30 mL de medio LB y se incubó a 37°C hasta que alcanzó una densidad óptica (DO) de 0.3 (a 600 nm). Posteriormente, con 5 mL de este segundo cultivo se inoculó 200 mL de medio LB y se incubó en las mismas condiciones hasta que alcanzó una DO de 0.3 (a 600 nm). Se transfirió a tubos estériles de 50 mL y se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min a 4°C. La pastilla se resuspendió en 16 mL de solución 1 (RbCl 100 mM, MnCl₂ 50 mM, CaCl₂ 10 mM, glicerol 15% w/v, pH 5.8) y se incubó en hielo durante 45 min. Al cabo de este tiempo, las células fueron nuevamente compactadas centrifugando a 4000 rpm a 4°C durante 5 min. El botón celular se resuspendió en 5 mL de solución 2 [RbCl 10 mM, MOPS 10 mM, CaCl₂ 75 mM, glicerol 15% (w/v), pH 6.8] y se incubó en hielo por 10 min. Finalmente, se hicieron alícuotas de las células en suspensión de 50 μ L en viales estériles y se almacenaron a -70°C hasta su uso (Sambrook *et al.*, 2001).

6.1.5.4 Transformación de células competentes por choque térmico

A los viales con células competentes de *E. coli* se les adicionó 2 μ L del producto de ligación, se mantuvieron en hielo durante 20 min; posteriormente, las células fueron sometidas a un choque térmico incubándolas a 42 °C durante 53 s y trasladándolas al hielo inmediatamente después, donde se les adicionó 250 μ L de 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 se incubaron durante 1-2 horas a 37°C en agitación constante. Después, la suspensión fue distribuida y esparcida uniformemente en medio LB sólido suplementado con espectinomicina (100 μ g/mL). Las cajas fueron incubadas a 37°C toda la noche para posteriormente seleccionar las colonias candidatas a contener plásmidos recombinantes (Sambrook *et al.*, 2001).

6.1.5.5 Extracción de ADN plasmídico de E.coli por lisis alcalina

Básicamente se siguió el protocolo descrito por Sambrook *et al.*, 2001. A grandes rasgos, las colonias candidatas positivas fueron cultivadas en 3 mL de medio "Terrific Broth" (TB; triptona 1.2%, extracto de levadura 2.4%, glicerol 4 mL/L, KH₂PO₄ 17 mM, K₂HPO₄ 72 mM) con 100 μ g/mL de espectinomicina durante 16 h a 37°C en agitación constante (200 rpm). Las células fueron compactadas por centrifugación a 13000 rpm durante 1 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante por decantación. La pastilla fue resuspendida en 100 μ L de solución I (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM, pH 8.0), después a esa suspensión se añadieron 200 μ L de solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1%) y se incubó en hielo durante 10-15 min (aprox.) para permitir la lisis celular. Al cabo de este tiempo, se adicionaron 150 μ L de solución III (acetato de potasio 3M, ácido acético glacial 11%), se mezcló por inmersión y se incubó la mezcla por 5 min adicionales en hielo. Posteriormente, se centrifugó la suspensión a 13000 rpm durante 5 min a 4 °C y se transfirió el sobrenadante (sin restos celulares) a un tubo Eppendorf limpio. A continuación se precipitó el DNA con 2 volúmenes de etanol absoluto, mezclando ligeramente, para después mantener el tubo a -20 °C durante 30 min.

Consecutivamente, se centrifugó la mezcla a 13000 rpm por 5 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla fue lavada con 250 µL de etanol al 70% en dos ocasiones. La pastilla se secó a temperatura ambiente y el material fue resuspendido en 32µL de agua bidestilada estéril. Se agregó 1µl de RNAsa A (10 mg/mL). Se agregó 1µl de RNAsa A (10 mg/mL) y se incubó a 37°C por 1h. El material se almacenó a -20°C hasta su uso (Sambrook *et al.*, 2001). También se midió la concentración de cada uno de los plásmidos por espectrofotometría en el Nanodrop (ND-1000). Posteriormente se procedió a determinar la presencia del inserto mediante caracterización con enzimas de restricción y mediante reacciones de PCR con las condiciones estandarizadas anteriormente. Los plásmidos seleccionados fueron sometidos a reacciones de secuenciación en un secuenciador de capilar Genetic Analyzer ABI Prism (modelo 3100) y las secuencias obtenidas fueron editadas mediante el programa Gene Doc v2.7. Las secuencias se compararon por medio de los programas BLASTN y BLASTP con las bases de datos del banco de genes disponibles en Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés).

6.1.6 Análisis de restricción de clonas candidatas

Posterior a la extracción del DNA plasmídico de las clonas candidatas, se procedió a realizar análisis de restricción mediante digestiones con distintas enzimas de restricción para cada caso (Sambrook *et al.*, 2001). Básicamente se realizaron tres digestiones para cada construcción: la primera digestión fue realizada para determinar si el inserto se encontraba efectivamente en el plásmido recombinante extraído, la segunda fue llevada a cabo para determinar cuáles clonas candidatas poseían el plásmido recombinante con la orientación adecuada para llevar a cabo la recombinación en el vector binario, y la tercera digestión fue hecha para linealizar el plásmido elegido (de entre las clonas candidatas) para la recombinación con el vector para expresión en plantas (binario) (ver Tabla 1).

Tabla 1. Análisis de Restricción de ambas construcciones. Digestiones realizadas para determinar inserto, orientación y linealización de las construcciones del ORF Genómico y del Promotor 1.5 Kb upstream (upstream) del gen At3g05540 (*AtTCTP2*).

Reactivo	Todas (Inserto) Vol. μL	ORF /Stop (Orientación) Vol. μL	Prom-ORF AtTCTP2 (orientación) Vol. μL	Locus genómico AtTCP2 (orientación) Vol. μL	Todas (Linealización) Vol. μL
Buffer NEB (1,2,3)	2 (Buffer 3)	2 (Buffer 2)	2 (Buffer 2)	2 (Buffer 3)	2 (Buffer 2)
BSA	--	0.2	0.2	--	0.2
Agua	15.6	15.4	15.4	15.6	15.4
RNAasa	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
DNA Plasmídico	2	2	2	2	2
Enzima A	0.2 (EcoRI)	0.2 (EcoRV)	0.2 (XhoI)	0.2 (EcoRI)	0.2 (XhoI/EcoRV)
Enzima B	--	--	--	--	--

6.1.7 Subclonación en vector de expresión en planta

Se realizó la reacción de recombinación de los plásmidos linealizados del paso anterior en los vectores de expresión: pB7FWG,0 (expresión endógena), pB7FWG2,0 (sobreexpresión), y pBGW1WG2 II,0 (silenciamiento) (Ver figura 8). Para esto se llevaron a cabo mezclas de reacción conteniendo: 1 μ L de vector de expresión, 2 μ L de plásmido lineal, 0.5 μ L de enzima LR Clonasa (Invitrogen) y 2.5 μ L de agua bidestilada estéril. Estas mezclas fueron incubadas a 22 °C toda la noche para posteriormente realizar la transformación de células competentes de *E. coli* (DH5 α y TOP10) utilizando la mezcla de reacción anterior mediante choque térmico, y después se sembró en medio selectivo con espectinomicina de donde surgieron clonas candidatas para la extracción de ADN plasmídico. Finalmente estas clonas fueron sometidas a una comprobación por PCR punto final utilizando los oligonucleótidos específicos descritos en la Tabla S1, y siguiendo las condiciones descritas (Tabla 2).

Tabla 2. Condiciones de PCR punto final para comprobación de presencia de insertos

Reactivo		Volumen (μ L)	Programación utilizada		
Buffer 10 x		1.25	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (m:s)
dNTP's		1	1	94	4:00
Oligo Directo (5')		0.25	2	94	0:35
Oligo reverso (3')		0.25	3	56-60	0:35
DNA Molde		0.5 (20 ng/ μ L)	4	72	0:30-3:00
Taq polimerasa (TAKARA™)		0.08	5	72	7:00
Agua destilada estéril		9.17	6	16	----
Volumen final		12.5			

} 30X

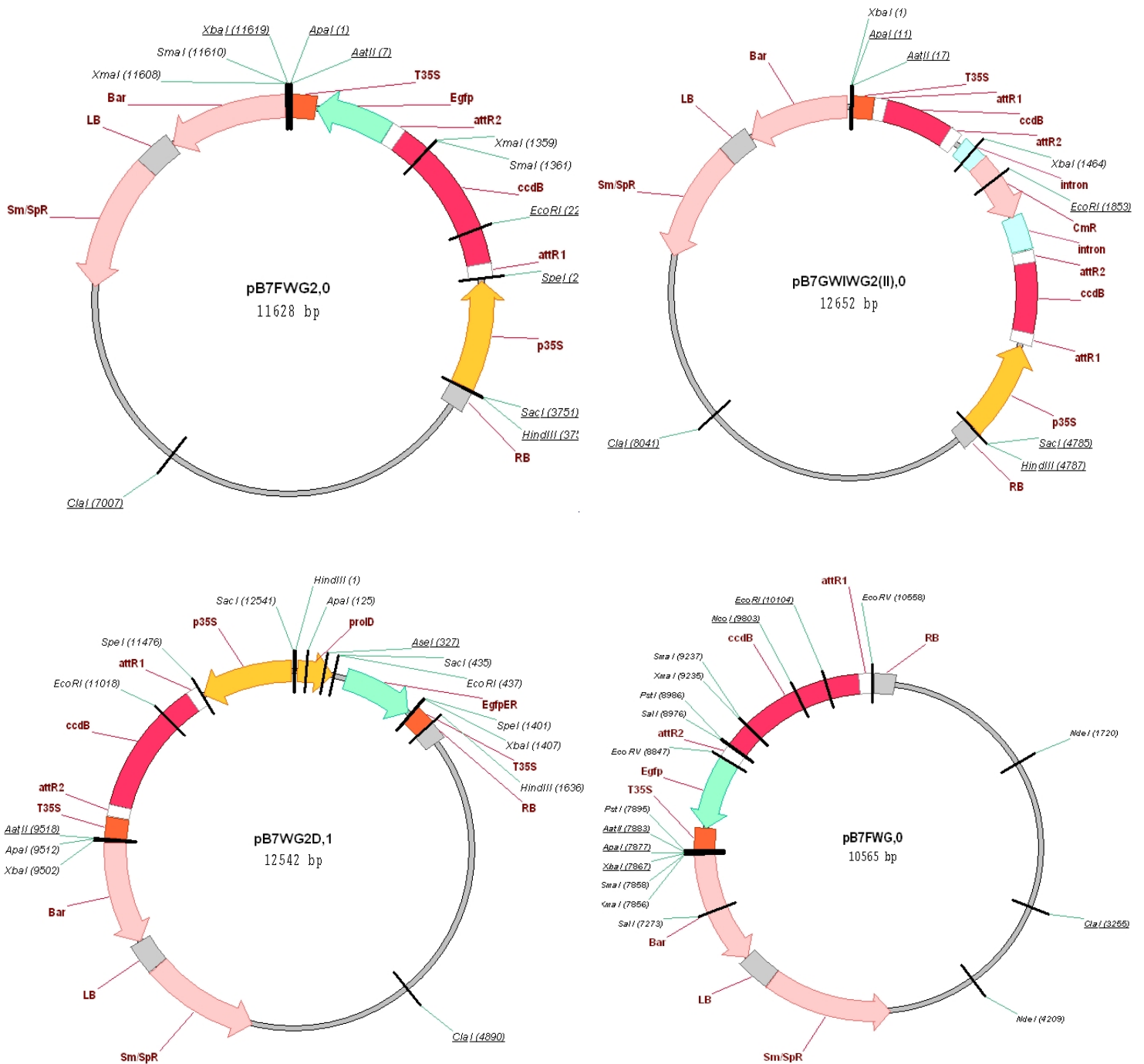


Figura 9. Vectores de expresión usados para sobre-expresar (pB7FWG2,0; pB7WG2D,1), silenciar [pB7GWIWG2(II),0], y determinar la expresión endógena de AtTCTP2 (pB7FWG,0).

6.1.8 Transformación por electroporación

A partir de los plásmidos recombinantes obtenidos anteriormente (purificados de ser necesario) se realizó la transformación de células electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* (C58C1) o de *Agrobacterium rhizogenes* (K599). Para esto se agregó 1-2 μL de plásmido al vial con las células competentes (mantenidas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ antes de la transformación), se tomó todo el volumen del vial y se trasladó éste hacia la celda de electroporación de 1mL (la cual se mantuvo en hielo durante 15 min antes de la transformación). Después se colocó, conteniendo la mezcla, dentro del electroporador para poder así dar el choque eléctrico (1800 mV). Inmediatamente se agregaron 500-1000 μL de medio SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl_2 10 mM, glucosa 20 mM, pH 7.0) a la celda de electroporación, y se trasladó toda esta mezcla a un tubo Eppendorf estéril para incubarla durante 2-3 hrs a 28°C . Finalmente, transcurrido este tiempo, se inocularon placas con medio sólido YEB con espectinomicina ($100\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$), las cuales fueron incubadas a 28°C durante 48 horas (aprox.) para obtener clonas candidatas de *Agrobacterium (tumefaciens* β *rhizogenes)* conteniendo la construcción deseada. Como último paso, se realizó la comprobación de la presencia de cada uno de los insertos en las clonas candidatas mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos específicos para cada de una de las construcciones (Tabla 1).

6.1.9 Obtención de plantas transgénicas de Arabidopsis (Inmersión Floral)

Se llevó a cabo por el método modificado denominado “Floral Dip” o “Inmersión Floral” (Clough y Bent., 1998). Este método aprovecha la circunstancia que *A. tumefaciens* puede infectar óvulos, y, por tanto, transferirles T-DNA. Por otra parte, el amortiguador contiene sacarosa, como fuente de carbono para *Agrobacterium*, y citocinas, para inducir proliferación de células vegetales. Se generaron céspedes de *A. tumefaciens* en cajas de medio sólido LB con espectinomicina ($28^{\circ}\text{C}/48\text{ hrs}$), estos fueron resuspendidos en 30 mL de Buffer de Inmersión Floral (5% sacarosa, 0.02% Silwet L77, 10 mg/L de Benzilaminopurina [BAP]). Se centrifugó a 6,000 rpm/ $4\text{ }^{\circ}\text{C}/10\text{ min}$. Se removió el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en otros 30 mL de Buffer de Inmersión Floral

(FD, por sus siglas en inglés). Después se resuspendieron en otros 270 mL de Buffer FD y se colocaron en un charola contenedora (previamente desinfectada). Se sumergió cada planta en esta mezcla de *A. tumefaciens* con Buffer FD durante 40-60 segundos (procurando embeber bien las flores jóvenes) y después colocadas horizontalmente en charolas amplias (desinfectadas), cubiertas con paños de papel humedecidos. Estas fueron mantenidas en reposo en cámara de crecimiento (20 °C aprox.) durante 2 días. Transcurrido este tiempo las plantas fueron trasladadas al invernadero, y están siendo regadas con solución nutritiva fertilizante (Miracle-Gro®).

6.1.10 Selección de líneas transgénicas

Las semilla primaria recolectada de la transformación de Arabidopsis es sembrada en macetas plásticas especiales (Arabipot®) conteniendo la mezcla: 40% tierra, 40% turba, 20% agrolita, usando herbicida (Glufosinato de amonio) como marcador de selección de las plantas transgénicas haciendo aplicaciones cada semana durante un mes después de haber germinado. Estas semillas primarias son sembradas masivamente ya que el método de transformación utilizado posee una eficiencia del 2-3 %. Para el caso de selección de líneas transgénicas *in vitro*, este se hizo en medio MS conteniendo 25 µM de glufosinato de amonio (PPT-Fluka), en donde las semillas sembradas fueron previamente esterilizadas en una solución de cloro al 10% (10 minutos), pasadas a etanol al 70% (1 min) y finalmente lavadas 4-5 veces con agua estéril, para ser incubadas en cámara de crecimiento (24°C; fotoperiodo 16:8; 35-50% humedad) durante 2 a 4 semanas para poder observar las plantas resistentes.

6.1.11 PCR punto final para detección de transgén

La comprobación del estado transgénico de las plantas seleccionadas con herbicida fue mediante la amplificación del gen reportero GFP (720 pb aproximadamente) para el caso de las construcciones de sobreexpresión y de expresión endógena, de un fragmento del intrón en las construcciones de silenciamiento, o de una región del promotor 35S en el caso de la versión de sobreexpresión sin GFP (STOP). Para cada una de las líneas transformantes se llevó a cabo la extracción de DNA genómico mediante criofractura con

nitrógeno líquido y siguiendo antes descrito (Sambrook *et al.*, 2001), finalmente este DNA fue usado como molde para amplificar a las regiones descritas anteriormente para cada caso usando oligonucleótidos específicos especificados en la tabla 1.

6.1.12 Análisis Fenotípico

Una vez habiendo seleccionado las líneas transgénicas para cada construcción (sobreexpresión, silenciamiento y expresión endógena), se le dio seguimiento a algunos de los parámetros fenotípicos como: área foliar, longitud de raíces y porcentaje de germinación para cada línea a analizar. Para esto se contaron con líneas F2 o F3 de cada una las líneas de sobreexpresión, expresión endógena y de silenciamiento. El análisis visual fue hecho con una cámara digital Sony Cybershot DSC-W300 (13.6 mega pixeles) con lente 3x (35-105mm) Carl Zeiss Vario-Tessar f/2.8-5.5; las imágenes fueron analizadas con el programa ImageJ (rsb.info.nih.gov/ij/) que nos permitió realizar las determinaciones fenotípicas antes mencionadas.

6.1.13 Genotipificación de línea SALK_045146

La caracterización genética de la línea mutante SALK en donde el gen *AtTCTP2* está interrumpido implicó la detección del T-DNA en uno o dos de los alelos del genoma diploide de cada uno de las plantas analizadas, para poder así definir si éstas son hererocigotas, homocigotas, o silvestres y por ende relacionar los fenotipos observados con el fondo genético en cada uno de los individuos. Para esto, como primer paso se extrajo DNA genómico de cada uno de las muestras a analizar siguiendo el protocolo descrito en el inciso 6.1.2 de este documento. Posteriormente se llevaron a cabo reacciones de PCR punto final (2 por muestra) utilizando los oligonucleótidos específicos LP y RP para flanquear que flanquean la región del gen *AtTCTP2* (LP y RP), además del oligonucleótido LBb1 para detectar la inserción del T-DNA (Figura 10; Tabla suplementaria 1). Finalmente los productos de PCR fueron definidos por electroforesis en gel de agarosa (1%) para especificar como: plantas heterocigotas aquellas en donde se observan ambos productos (450 pb y 1 Kb), plantas homocigotas en donde solo existe un amplicón de 450

pb, mientras que las plantas silvestres son aquellas en donde solo se amplificó una banda de 1Kb.



Figura 10. Esquema general de genotipificación de AtTCTP2. En azul se muestra el marco de lectura abierto (ORF) de AtTCTP2 dentro del cual se detectaría la inserción de T-DNA (en verde). Dentro de las regiones que flanquean al ORF (en gris) se encuentran los sitios en donde los oligonucleótidos LP y RP (en rojo), y dentro del T-DNA se muestra el sitio de reconocimiento del oligonucleótido Lbb1 (en amarillo).

6.1.14 Determinación de número de inserciones por ddPCR

En este ensayo se realizó la cuantificación de la variación del número de copias de la inserción de T-DNA (35S) respecto a un control endógeno unicopia (HMG) mediante el equipo de PCR digital (ddPCR, Droplet QX100 BioRad™). Se siguieron las especificaciones del proveedor y el protocolo descrito por Mazaika y Homsyet (2014). A grandes rasgos, la mezcla de reacción fue realizada en un volumen total de 20 μ L conteniendo concentraciones finales de sonda y oligonucleótidos de 250 nM y 900 nM respectivamente (ver tabla suplementaria 1), 10 μ L de supermix 2X (ddPCR supermix para sondas), 1 μ L de DNA genómico (0.5 ng totales) y agua para completar el volumen total. El DNA genómico fue previamente digerido con la enzima de restricción EcoRI (NEB). Las mezclas (20 μ L) fueron cargadas en cartuchos para ddPCR (de 8 pozos) en donde se colocó además el aceite mineral (especial para ddPCR) para así generarse las nanogotas (10,000-20,000 gotas). Estas últimas fueron trasladadas a placas de PCR, las cuales fueron selladas y es aquí en donde se llevaron a cabo las nano-reacciones (una por cada gota) para poder llevar a cabo la reacción dúplex (detección de fluoroforos FAM y HEX). El programa utilizado siguiendo las instrucciones del proveedor (BioRad) fue: 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de 94°C por 30 segundos- 56°C por 1 min, y finalmente una extensión de 98°C por 10 min. Por último, las reacciones fueron llevadas al contador de nano-gotas, y los resultados analizados por el software QuantaLife de BioRad™.

6.1.15 Medición de actividad fotosintética

La actividad fotosintética fue monitoreada en varias plantas de la línea T-DNA SALK_045146 así como en plantas silvestres de *Arabidopsis* mediante el uso del equipo portátil de fotosíntesis LI-6400XT (LI-COR, USA) al cual se le adaptó la cámara especial para *Arabidopsis* (whole plant rosette chamber LI-COR). Este equipo permitió la medición en tiempo real de la capacidad fotosintética ($\mu\text{molCO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) al relacionar la asimilación de CO_2 por parte de las plantas con respecto al área foliar calculada anteriormente mediante el programa ImageJ^R (ver inciso 6.1.12). Las condiciones utilizadas fueron: 120 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de intensidad lumínica con una concentración de CO_2 de referencia de 500 μM .

6.2 Identificación del patrón de acumulación de la proteína fusionada a GFP

6.2.1 Construcciones analizadas fenotípicamente

Para poder analizar los sitios de acumulación de la proteína se probaron las diferentes construcciones antes descritas, las cuales fueron elaboradas siguiendo el protocolo secuencial descrito en el apartado 6.1 de este documento. En la figura 11 se muestra una representación de las construcciones obtenidas para analizar los sitios en donde se acumula AtTCTP2-GFP dentro de la célula; se ensayó con la región promotora endógena de AtTCTP2 y con el promotor fuerte 35S para dirigir la expresión del locus genómico de AtTCTP2, mientras que por otro lado también se sobreexpresó (con 35S) el marco de lectura abierto de este gen.

A grandes rasgos, se generaron los amplicones de interés utilizando los oligonucleótidos, en donde el primer reverso no contenía codón de paro para poder así generar eventualmente la proteína de fusión (Tabla suplementaria 1). Estos productos fueron clonados en el vector pCR8GWTOPO, replicados en *E. coli*, y los plásmidos resultantes fueron analizados por enzimas de restricción y posteriormente subclonados a los vectores de expresión en planta pB7FWG y pB7GFW2 (Figura 9) en donde una vez más fueron replicados en *E. coli* para obtener los plásmidos candidatos que fueron analizados por PCR

para finalmente seleccionar los positivos y transformar células competentes de *A. tumefaciens* que sirvieron de vehículo para llevar a cabo la transformación genética de plantas silvestres de *Arabidopsis*. La selección de las plantas transgénicas se realizó siguiendo la metodología descrita en el inciso 6.1.10 de este documento, mientras que para algunos casos se llevó a cabo la cuantificación del número de inserciones siguiendo el protocolo descrito en el inciso 6.1.14 de este documento.

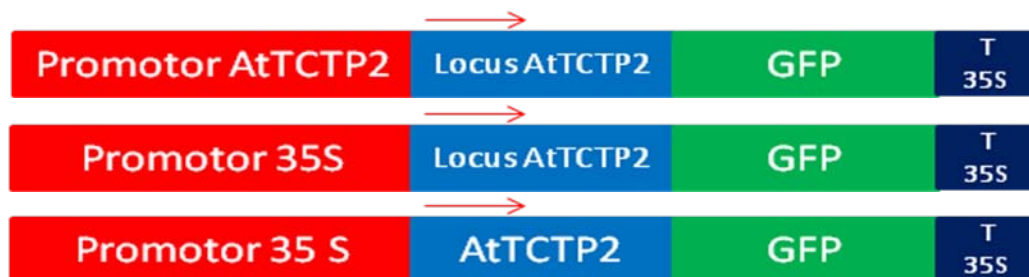


Figura 11. Construcciones genéticas diseñadas para detección del patrón de localización de AtTCTP2 fusionada a GFP. Los vectores binarios usados fueron el pB7FWG2 y el pB7FWG.

6.2.2 Preparación de muestras para microscopia confocal

Para los análisis de microscopia confocal se tomaron muestras de tejido (en algunos casos en distintas etapas de desarrollo) de diferentes partes de la planta (hoja aérea, hoja de roseta, peciolo, raíz y tallo). Estos tejidos fueron sumergidos durante 5 días a 4 °C con una solución de lavado (para retirar pigmentos) cuya composición porcentual es: 50% etanol, 20% glicerol, 20% agua y 10% ácido láctico. El tejido fue retirado de la solución de lavado y trasladado a una solución de 50% glicerol en donde se mantuvo hasta el momento de realizar los cortes. Los cortes en hojas (apical, basal, transversal-medio, longitudinal-vena central), peciolos (longitudinal y transversal), tallos (transversal), y raíces (longitudinal) fueron realizados con navajas de acero inoxidable especiales para microscopía (Electron Microscopy SciencesTM). Se efectuó el montaje de los tejidos en glicerol al 50%, entre un porta y un cubreobjetos (20x50 mm) sobrepuestos (Corning) fijados con esmalte.

6.2.3 Análisis de fluorescencia por Microscopía Confocal

Las imágenes fueron tomadas en los Microscopios Confocal TCS-SPE y TCS-SP8 Marca Leica (Objetivos 20X, 40X, 63X: ACS 1.15 IMMAN), y el Multifotónico TCS-SP5/MO-TANDEM Marca Leica (Objetivos 20X y 40X: HCxPLAPO λ -blue IMM UV 0.7 A.N.), el cual posee un Laser Tisaph 200M 2X (resolución: 1024 x 1024 píxeles), utilizando longitudes de excitación de 515nm/ 580 nm onda y de detección de 525-550nm/600-680 nm para GFP y la clorofila (auto-florescencia) respectivamente. Finalmente las imágenes fueron tratadas y analizadas con el software Leica Las AF.

6.3 Análisis de la expresión del gen *AtTCTP2*

6.3.1 Obtención de plantas transgénicas en la región promotora de *AtTCTP2*

La construcción de la región promotora de *AtTCTP2* dirigiendo la expresión de los genes reporteros *uidA* y *gfp* se llevo a cabo siguiendo la metodología descrita en el apartado 6.1 de este documento. A grandes rasgos, se amplificó el fragmento de interés (1.5 Kb) utilizando oligonucleótidos específicos (Tabla suplementaria 1) empleando DNA genómico de plantas silvestres de *Arabidopsis* como molde. El amplicón fue clonado en el vector de entrada pCR8GWTOPO, se verificó su presencia y orientación, para posteriormente ser linealizado para su subclonación por recombinación homologa en el vector binario de expresión en planta, pBGWFS7. Este fue utilizado para transformar *E. coli*. Finalmente se verificó por PCR la presencia del inserto de interés en la construcción y se transformaron células competentes de *A. tumefaciens* (C58C1), en las que se identificó la presencia del inserto una vez más, para en último lugar con la cepa de la clona elegida llevar a cabo la transformación de plantas jóvenes de *Arabidopsis* por el método de Inmersión floral (Clough y Bent, 1998).

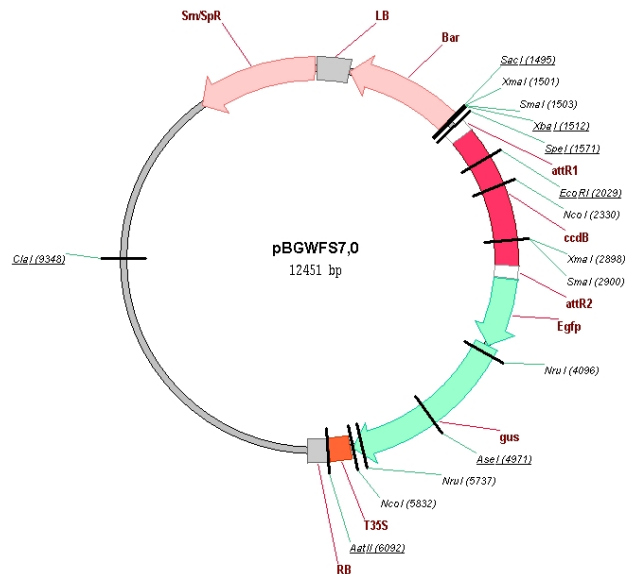


Figura 12. Esquema del vector de expresión **pBGWFS7**. Usado para el análisis de la región promotora de **AtTCTP2**.

6.3.2 Análisis por microscopia multifotónica de la región promotora de *AtTCTP2*

La selección de las líneas con la construcción para análisis de la región promotora con herbicida se realizó en suelo, para la progenie primaria (F0), y después *in vitro* para las líneas F2, tal como se describe en el inciso 6.1.10 de este documento. Una vez seleccionadas las líneas, se extrajeron muestras de tejido (hoja y peciolo) semanalmente a partir de la tercera semana después de la germinación, con el fin de observar desde etapas tempranas la expresión de *AtTCTP2*. Finalmente se llevó a cabo la metodología para analizar el tejido por microscopía confocal, tal como se describe en el apartado 6.2 de este documento.

6.3.3 Detección histoquímica de la actividad de β -glucuronidasa

Siguiendo el protocolo descrito por Weigel y Hazelbrook (2002), para este ensayo se tomaron plantas transgénicas expresando la construcción con la región promotora de *AtTCTP2* (1.5 Kb río arriba del codón de paro) 4-8 semanas después de la germinación para llevar a cabo los estudios histoquímicos de detección de la actividad de la proteína GUS codificada por el gen *uidA*. Dicha actividad se hace evidente con detección visual de un subproducto de la hidrólisis de color azul violáceo. Se ensayó con diferentes tejidos (raíces, hojas de roseta, hojas caulinares, tallo e inflorescencias) que fueron seccionados e

incubados a 37°C (12-16 horas) en Buffer GUS (Weigel y Hazelbrook, 2002) para finalmente examinar los tejidos tratados con un estereoscopio (National Instruments™), coleccionar y analizar las imágenes con una cámara Motic (Motic, <http://www.motic.com/> Motic, Vancouver, Canada). La reacción de GUS fue considerada negativa cuando no se detectó tinción de tejido después de 24 horas.

6.3.4 Análisis de las líneas genéticas por q-RT-PCR Tiempo Real

Este análisis se llevó a cabo con el fin de cuantificar los niveles endógenos de expresión del gen *AtTCTP2*, así como de su homólogo, *AtTCTP1*, en diferentes tejidos de plantas silvestres de *Arabidopsis*. Por otro lado, este protocolo también fue requerido para la determinación de los niveles de expresión de *AtTCTP2* y 1 en líneas mutantes de T-DNA (SALK_045146) y en líneas de silenciamiento de *AtTCTP2* y 1 comparados con los niveles de transcrito encontrados en plantas silvestres de *Arabidopsis* crecidas en las mismas condiciones.

6.3.4.1 Diseño de oligonucleótidos para q-RT-PCR

Para poder cuantificar el transcrito de *AtTCTP2* en plantas silvestres de *Arabidopsis* se diseñaron oligonucleótidos que se alinean en la región 3'UTR de este gen, pero además abarcan las primeras bases del marco abierto de lectura de este. Mientras que para la detección específica de *AtTCTP1* y *18S* se utilizaron los oligonucleótidos reportados por Berkowitz *et al.*, 2008 (Tabla suplementaria 1).

6.3.4.2 Extracción de ARN total de Arabidopsis

Se realizó la extracción de ARN total a partir de diversos tejidos representativos de la planta (raíz, hoja de roseta, tallo, hoja caulinar, y ápice) en plantas silvestres de *Arabidopsis* de 20 y/o 45 días de edad (RNeasy Kit), esto para el caso de la detección de los niveles endógenos de *AtTCTP2* y 1. Por otro lado, en los casos de las líneas knock-out (SALK_045146) y de silenciamiento la extracción fue hecha a partir de "pools" de secciones de tejido o de plántulas completas, dependiendo de los tamaños de las muestras.

6.3.4.3 q-RT PCR en Tiempo Real

La cuantificación por q-RT PCR tiempo real se realizó en el equipo Corbett Research RG-3000. Primero se estandarizaron las concentraciones del ARN total extraído, para dejarlos a una concentración 50 o 100 ng/ μ L, para posteriormente realizar las mezclas de reacción, siguiendo las especificaciones del proveedor (OneStep-qRT KapaTM), y llevar a cabo la corrida de q-RT PCR Tiempo Real (**Tabla 3**). Se llevaron a cabo 3 replicas técnicas y un mínimo de 3 replicas biológicas para cada una de las muestras analizadas. Finalmente se utilizó el método de $\Delta\Delta$ CT (Livak y Schmittgen, 2001) para relacionar los valores de CT de cada condición (Tejido/ knockout o silenciamiento) con respecto al control (Hoja/ WT), homogenizando los valores con el gen endógeno (18S o actina) para cada uno de los casos.

Tabla 3. Mezcla de reacción y condiciones para la q-RT PCR de AtTCTP2, AtTCTP1 y 18S

Reactivo	AtTCTP2/ AtTCTP1 (16 Rx's) (μ L)	18S (12 Rx's)(μ L)
Agua DEPC	53.6	40.2
SYBR	80	60
Oligo Directo (5') 10Mm	3.2	2.4
Oligo reverso (3') 10mM	3.2	2.4
Enzima (mezcla de Reverso Transcriptasa y ADN polimerasa)	4	3
ARN (Total) molde	(1x16)	(1x12)
Volumen final	160	120

Pasos del proceso	Temp($^{\circ}$ C)	Tiempo
Condiciones síntesis de ADNc	42	10 min
Desactivación de RT	95	5 min
Condiciones (40 ciclos) por ciclo	Desnaturalización	5 seg
	Alineamiento	20 seg
	Elongación	5 seg
Prueba de desnaturalización de oligos	55-99	-1 $^{\circ}$ c /min

6.3.4.4 Determinación de variación transcripcional con distintos efectores hormonales y abióticos

Este procedimiento se basó en el protocolo descrito por Nemhauser y colaboradores en el 2006. Básicamente, las plantas silvestres para este ensayo fueron crecidas por 15 días en medio sólido MS (1X; 2% sacarosa) en una cámara de crecimiento con condiciones controladas (25°C; 50% humedad; 120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) hasta obtenerse al menos 4 hojas verdaderas en cada planta. 3 plantas silvestres por cada tratamiento (con 3 replicas biológicas) fueron colectadas y sumergidas en medio MS líquido (1X; 2% sacarosa) durante 3 horas en condiciones controladas de temperatura e intensidad de luz (25°C; 50% humedad; 120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$). El medio MS líquido para cada tratamiento contenía las hormonas vegetales: cinetina (citocinina), ácido indol-acético (auxina), ácido giberélico (giberelinas), ácido abscísico (ABA), brasinólidos (brasinoesteroides); y por otro lado sales y condiciones como: manitol, polietilenglicol, cloruro de sodio, cloruro de potasio, nitrato de potasio, fosfato de sodio e incubación en frío (4°C). Una vez pasado el tiempo de incubación las plantas fueron removidas del medio, y el tejido fue inmediatamente transferido a tubos eppendorf y congelado en nitrógeno líquido para llevar a cabo la extracción de ARN total a partir de este tejido. Estas muestras de RNA fueron usadas como moldes para realizar la determinación de los niveles de transcritos de AtTCTP2, AtTCTP1 y 18S (control normalizador) en las diferentes condiciones ensayadas siguiendo el protocolo descrito en la sección 6.3.4 de este documento. La razón de cambio fue determinada relacionando los niveles de expresión calculados para cada tratamiento con respecto al control silvestre sin tratamiento utilizando el método ~~ACT~~ (Livak y Schmittgen, 2001). 3 réplicas biológicas fueron ensayadas para cada tratamiento así como 3 réplicas técnicas en cada caso.

6.4 Identificación del papel de AtTCTP2 en el control de la proliferación celular y el desarrollo en plantas

6.4.1 Ensayos de Proliferación Celular

En esta serie de experimentos se buscó determinar si AtTCTP2 es capaz de estimular la proliferación celular. Para lograr lo anterior, se utilizaron como modelo callos de tabaco (línea NT1) transformados con construcciones conteniendo el locus genómico y marco abierto de lectura de AtTCTP2 (AtTCTP1 y CmTCTP como comparativos). Los ensayos preliminares (con el locus genómico de AtTCTP2 y CmTCTP ORF sobreexpresados) fueron realizados por el Dr. José Luis Cabrera (CINVESTAV-Irapuato). Los cultivos en suspensión de células NT1 fueron crecidos y mantenidos en medio NT, el cual está compuesto de sales MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con inositol (100 mg/L), tiamina (1mg/L), fosfato de potasio (180 mg/L), 2-4 ácido diclorofenoxiacético (2 mg/L) y sacarosa (30 g/L), llevado a un pH de 5.8. Los cultivos fueron mantenidos a 26 °C en obscuridad y agitación orbital constante y subcultivados en intervalos de 7 días. El volumen de células sedimentadas (VCS) fue medido en 10 mL de cultivo después de 30 min de asentamiento. El número de células y la viabilidad de estas fueron determinados por tinción con azul de tripano en un hemocitometro. Las muestras con el mismo VCS fueron resuspendidas en medio NT por 4 días, al término de los cuales se tomaron 5 mL para recolectar las células de tabaco en papel filtro (Whatman No.1, 5.5 cm). 24 horas antes del bombardeo los filtros fueron colocados en cajas Petri (Phoenix Biomedical, Ontario, CAN) conteniendo medio NT1 suplementado con manitol y sorbitol (0.2M de cada uno) para incrementar la eficiencia de transformación. Los plasmidos conteniendo las construcciones control y de sobreexpresión fueron purificados usando el kit comercial Plasmid Midi Kit (Qiagen) siguiendo las especificaciones del proveedor previamente al bombardeo. Por otro lado, la preparación de los microproyectiles fue realizada de acuerdo al protocolo descrito por Tomes y colaboradores (1995) y modificado por Cabrera-Ponce *et al.* (1997). Las células fueron bombardeadas, usando el equipo de biobalística PDS-1000/con bomba de helio

(Bio-Rad, Hercules, CA) siguiendo las instrucciones del proveedor, a una distancia de 7 cm a partir del final del barril de la pistola de partículas. 24 horas posterior al bombardeo, los filtros fueron transferidos a medio NT por 15 días para comenzar con la selección en medio NT suplementado con 0, 100, 200 y 300 mg/L de espectinomicina. Finalmente el peso seco de los callos fue determinado al tiempo “cero”, para después ser medido cada 7 días por un periodo de 3 semanas.

6.4.2 Ensayos de Cultivo *in vitro* de raíces/Organogénesis

Este ensayo fue realizado para obtener raíces transgénicas con *AtTCTP2* y así determinar el patrón de acumulación de esta proteína fusionada a GFP, con respecto a *AtTCTP1*. Sin embargo, también resulta interesante el poder identificar diferencias no solo a este nivel, sino a nivel morfológico y/o fenotípico.

6.4.2.1 Obtención de células transformadas de *Agrobacterium rhizogenes*

Como ya se contaba con las construcciones del locus genómico de *AtTCTP2* y el marco abierto de lectura de *AtTCTP1*, se decidió hacer los ensayos preliminares con estas dos. Se procedió, entonces, a la transferencia de los plásmidos de sobreexpresión para ambos genes a células competentes de *Agrobacterium rhizogenes* (cepa K599) por electroporación. Las clonas candidatas fueron sometidas a extracción de ADN plasmídico y analizadas por PCR para confirmar la presencia del inserto.

6.4.2.2 Transformación de hojas de *N. tabacum* con construcciones en *A. rhizogenes*

Se crecieron plantas de *N. tabacum* en una mezcla de suelo, turba y agrolita (2:2:1), regadas cada 2 días con solución nutritiva. A partir de plantas de aproximadamente 30 días fueron sustraídas las hojas notablemente vigorosas abarcando el peciolo (2-3 cm), las cuales fueron desinfectadas (usando cloro comercial 10%) y lavadas con agua estéril, para dejarlas listas para la transformación. Previamente se preparó medio Murashige y Skoog (MS) utilizando la mezcla comercial Gibco^{MR} sin suplementación con hormonas

(composición por litro de medio: 4.49 gr sales de Gibco, 10 gr de sacarosa, 2.5 gr GelRite, pH 5.8), y fue gelificado en condiciones de esterilidad en envases plásticos (estériles). A la par con lo anterior, se crecieron (a 27 °C durante 36 horas) las cepas de *A. rhizogenes* en medio líquido LB (suplementado con espectinomicina) conteniendo las construcciones de sobreexpresión del locus genómico de *AtTCTP2* y ORF de *AtTCTP1* (con GFP en fase), y además el control (vector vacío y/o cepa de *A. rhizogenes* 599 sin transformar). La inoculación con las suspensiones de *A. rhizogenes* se realizó (en condiciones de esterilidad) con la ayuda de jeringas para insulina, procurando hacer las punciones en tres sitios sobre la vena central de las hojas, para finalmente colocar las hojas inoculadas con el peciolo incrustado en el medio MS para que la hoja pudiera seguir absorbiendo nutrientes. Los envases fueron sellados y colocados en estantes con iluminación constante donde fueron supervisados para evitar contaminación del medio por un periodo mínimo de 30 días. Las plantas regeneradas fueron transferidas a suelo estéril, regadas y mantenidas en cámara húmeda por dos semanas (bolsas transparente selladas) para mantener la turgencia y las bajas concentraciones de CO₂ antes de ser trasladadas a invernadero.

6.4.2.3 Ensayo de capacidad autoregenerativa de *AtTCTP2*

Con el fin de determinar la capacidad de regeneración de tejido completo de plantas transgénicas de tabaco sobreexpresando *AtTCTP2* se decidieron tomar de 5 plantas regeneradas al menos 3 hojas como explantes. Estos fueron trasladados a medio MS basal sin suplementación alguna de reguladores de crecimiento vegetal bajo condiciones constantes de fotoperíodo (16:8- luz: oscuridad) y temperatura (25°C). Transcurridos 21-28 días en incubación se extrajo DNA genómico a partir del tejido regenerado en cada uno de los casos, para finalmente realizar la detección de GFP (transgén) y 18S (control) para identificar la presencia o ausencia del transgén.

6.4.2.4 Selección de progenie de plantas de tabaco regeneradas

Las plantas regeneradas fueron mantenidas en condiciones de invernadero hasta completar su desarrollo. A partir de éstas se obtuvo progenie (semillas F1), que fue sometida a selección con herbicida tal como se describe en el inciso 6.1.10 y confirmación de presencia del transgén por PCR. A partir de estas plantas seleccionadas se obtuvieron líneas F2, de las cuales se sembraron aproximadamente 50 semillas para cada una de las líneas a evaluar, esto se hizo directamente en suelo (ver sección 6.1.1).

6.5 Estudio del movimiento a larga distancia de AtTCTP2 y AtTCTP1 en forma de proteína y/o transcrito

6.5.1 Movimiento a larga distancia (Agroinoculación de *Arabidopsis* y/o *Nicotiana benthamiana*)

Aprovechando la selección y obtención de líneas independientes de tabaco sobreexpresando a AtTCTP2, las cuales fueron confirmadas por PCR punto final, se decidió realizar una serie de injertos de plantas transgénicas con plantas silvestres de tabaco para poder analizar la capacidad de movimiento a larga distancia de AtTCTP2 fusionada a GFP.

6.5.1.1 Obtención de injertos de tabaco

Los injertos de tabaco fueron llevados a cabo usando una combinación de métodos descritos por Palauqui y colaboradores (1997) e Imlau y colaboradores (1999). A grandes rasgos, los portainjertos fueron decapitados a una altura de 20-25 cm sobre el suelo y se les realizó un corte longitudinal a la parte externa de la corteza del tallo para producir una pequeña cavidad rectangular. Para los injertos se seleccionaron las partes apicales de las plantas (conteniendo de 2 o 3 hojas de 0.5 a 1 cm de diámetro) para ser escindidas, en la parte del tallo se realizaron cortes para dejar este con forma de cuña a manera de que pudieran embonar en la cavidad de los portainjertos y así facilitar el contacto del tejido vascular de ambos componentes de los injertos. Una vez puestos en contacto los injertos y

el portainjertos estos fueron sostenidos con parafilm y mantenidos en bolsas plásticas (conteniendo un poco de agua) por 7-10 días en cámara de crecimiento para evitar la pérdida de turgor y la desecación de las muestras. Una vez pasado este tiempo, las bolsas fueron removidas y mantenidas por otros 7 días en cámara de crecimiento en fotoperiodo de día largo (16:8). Finalmente las plantas fueron trasladadas a invernadero donde se mantuvieron por 2-3 semanas antes de realizar los ensayos posteriores para determinar el movimiento del ARNm o de la proteína. Las muestras de tejido para la extracción de ARN y proteína fueron tomadas a partir de las hojas cercanas al ápice, en el caso de los injertos, y de hojas completamente extendidas cercanas a la región basal de los portainjertos. Las muestras fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y posteriormente conservadas en ultracongelación (-80°C) para su posterior uso.

6.5.1.2 RT-PCR para detección de *AtTCTP2-GFP*

Se realizó la extracción del ARN total para cada una de las muestras siguiendo el protocolo descrito por el proveedor del kit comercial RNAeasy (QIAGEN). Las concentraciones finales de todas las muestras extraídas fueron normalizadas a una misma concentración (50 ng/μL) y usadas como moldes para llevar a cabo reacciones en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR, por sus siglas en inglés) utilizando el kit comercial SYBR FAST One-Step qRT-PCR (KAPA Biosystems™, Wilmington, MA). La mezcla de reacción general para la detección de *GFP* y *18S* fue hecha según se reporta en la tabla 3 y las condiciones de las RT PCRS se muestran en la tabla 4. Finalmente los amplicones *GFP* (720 pb) y *18S* (152 pb) fueron visualizados en geles de agarosa al 1 %.

Tabla 4. Mezcla de reacción y condiciones para RT PCR de *GFP* y *18S*

Pasos del proceso		Temp(°C)	Tiempo
Condiciones síntesis de ADNc		42	10 min
Desactivación de RT		95	5 min
Condiciones (40 ciclos) por ciclo	Desnaturalización	95	5 seg
	Alineamiento	60	30 seg
	Elongación	72	20 seg

6.5.1.3 Cuantificación del movimiento del ARNm de AtTCTP2-GFP

Los niveles de expresión de *GFP*, *AtTCTP2*, *BAR*, *NtTCTP* y *18S* fueron determinados siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.3.4. A grandes rasgos, se extrajo ARN total de cada una de las muestras antes descritas y se llevaron a la misma concentración (100 ng/ μ L). Se siguieron las instrucciones del proveedor del kit comercial KAPA SYBR FAST Universal One-Step qRT-PCR, usando los primers específicos descritos en la tabla suplementaria 1. Las reacciones de qRT PCR tiempo real fueron incubadas en el equipo Rotor Gene 3000 (Corbett Research, Australia) usando las condiciones descritas en el inciso 6.3.4.3. Para verificar que no se amplificaran productos adicionales en la reacción se realizaron las curvas de disociación. Cada muestra fue analizada por triplicado, en donde la expresión del gen 18S en cada caso fue usado como control endógeno para la normalización de la expresión. La cuantificación fue llevada a cabo utilizando el método $\Delta\Delta$ CT (Livak y Schmittgen, 2001) relacionando la expresión de *GFP*, *AtTCTP2*, *BAR*, *18S* y *NtTCTP* entre las muestras transgénicas (portainjerto/injerto) y las muestras recíprocas (injerto/portainjerto). Para la cuantificación del movimiento del ARNm se tomaron en cuenta *GFP* y *AtTCTP2*, el control negativo de movimiento fue *BAR*, mientras que la determinación de *NtTCTP* sirvió para descartar falsos positivos para *AtTCTP2*; en todos los casos la normalización de la expresión fue hecha respecto a *18S*.

6.5.1.4 Visualización fenotípica de raíces adventicias

Se removieron las calzas de parafilm de cada uno de los injertos a partir de los 30 días después de haber realizado los injertos. Inmediatamente después, se realizó el registro visual de la aparición de raíces adventicias adyacentes a la zona de unión del injerto mediante una cámara digital Sony Cybershoot DSC-W300 (13.6 megapíxeles) con lente 3X Carl Zeiss Vario-Tessar f/2.8-5.5.

6.5.1.5 Detección inmunohistoquímica del movimiento de la proteína (Western-Blot)

El ensayo de Western-blot fue llevado a cabo siguiendo el protocolo descrito por Hinojosa-Moya y colaboradores (2013). En resumen, se realizó la extracción de proteína total a partir de tejido (hojas cercanas al ápice del injerto/hojas cercanas a la base del portainjerto) macerado en nitrógeno líquido, se homogenizó en buffer de extracción de proteína y se centrifugó (13,000 rpm/2min). La concentración de proteína fue determinado por espectrofotometría (Thermo Scientific NanoDrop 1000TM), y todas fueron homogenizadas a la misma concentración. Posteriormente, las muestras fueron mezcladas con Buffer desnaturante 2X y tratadas térmicamente (90°C/ 2 min) y sometidas a SDS-PAGE (12%). Las proteínas totales fueron transferidas a membranas de PVDF (WhatmanTM) a 100 V por 1 hora, se incubó la membrana por 2 horas con solución de bloqueo (PBS1X, leche descremada 5%, 0.1% Tween-20) seguido de lavados con PBS 1X, para después incubar toda la noche a 4°C con el anticuerpo policlonal contra GFP (dilución 1:2000-PBS 1X, 5% leche descremada, 0.1% Tween-20). Las membranas fueron lavadas 5 veces durante una hora (PBS 1X, 0.1% Tween-20) e incubadas con el anticuerpo secundario IgG acoplado a HRP (Santa Cruz Biotechnology, CA) con una dilución 1:5000 en PBS 1X-leche descremada 2.5% durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente después de 5 lavados (1 hora) con PBS 1X la señal de actividad peroxidasa de HRP fue detectada con ayuda del kit de luminiscencia Amersham Prime Western Blotting Kit Reaction (ECL-GE HealthcareTM, EE.UU.) y revelada en placas fotográficas Hyperfilm (ECL-GE HealthcareTM).

6.5.1.6 Detección de fluorescencia de AtTCTP2-GFP por microscopía confocal

Las muestras de injertos y portainjertos fueron montadas según el protocolo descrito en el inciso 6.2.2 y las imágenes fueron tomadas en los Microscopios Confocal TCS-SPE y TCS-SP8 Marca Leica (Objetivos 20X, 40X, 63X: ACS 1.15 IMMAN), y el Multifotónico TCS-SP5/MO-TANDEM Marca Leica (Objetivos 20X y 40X: HCxPLAPO λ -blue IMM UV 0.7 A.N.), el cual posee un Laser Tisaph 200M 2X (resolución: 1024 x 1024 pixeles), utilizando longitudes de excitación de 515nm/ 580 nm onda y de detección de 525-550nm/600-680

nm para GFP y la clorofila (auto-florescencia) respectivamente. Finalmente las imágenes fueron tratadas y analizadas con el software Leica Las AF.

6.5.2 Ensayo de movimiento célula-célula (Ensayo de rescate de tricomas)

6.5.2.1 Amplificación de fragmentos no traducibles

En trabajo previo ya se habían obtenido plásmidos conteniendo las construcciones de los marcos de lectura abiertos (ORFs) de AtTCTP2, AtTCTP1, la versión no traducible de CmTCTP (denominada CmTCTP Mut) y la versión modificadas de estas (denominadas Sint). Sin embargo para la amplificación de los fragmentos no traducibles de AtTCTP2 y 1, se diseñaron los oligonucleótidos específicos conteniendo un codón de paro al inicio de la secuencia del cebador directo (Tabla suplementaria 1). Se utilizó la ADN polimerasa TaKaRa ExHS (Takara Bio Inc.), siguiendo las especificaciones del proveedor. Para cada reacción de PCR se usaron 1.0 μ L de ADN plasmídico, 2.5 μ L de solución amortiguadora (10x) ExTaq de Takara Bio Inc. (concentración de Mg⁺² 20mM), μ L de mezcla de dNTP (2.5 mM cada uno), 0.5 μ L de oligonucleótidos específicos (10 μ M) directo y reverso, 0.1 μ L de TaKaRa Ex TaqTM ADN polimerasa (5 U/ μ L) y agua bidestiladaéñst hasta completar un volumen de 25 μ L. Las reacciones fueron incubadas en un termociclador Biometra (Goettingen, Alemania). Los productos de la reacciones de amplificación se separaron en geles de agarosa al 1.0 % (conteniendo 1 μ L de Bromuro de Etidio por cada 100 mL de Gel de agarosa) y solución amortiguadora TBE (Tris 45 mM; ácido bórico 45 mM; EDTA 1 mM, pH 8.0). Posteriormente, los geles fueron visualizados con luz ultravioleta y analizados con el sistema de documentación electroforética Gel Logic 2000 (Sambrook *et al.*, 2001).

6.5.2.2 Subclonación en vector de rescate de tricomas

En este caso, no fue necesaria la linealización de las construcciones, por lo que se procedió a purificar los plásmidos mediante columna (Kit QIAgen^{MR}) y a verificar su integridad por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %. Las construcciones en total son: AtTCTP2

STOP(ORF), AtTCTP2 Sint, AtTCTP2 Mut, AtTCTP1 STOP(ORF), AtTCTP1 Sint, AtTCTP1 Mut, AtTCTPCm (AtTCTP1 con cambios en aminoácidos para parecerse a CmTCTP). Se hicieron las reacciones de recombinación de los plásmidos del paso anterior en el vector de expresión en planta para el ensayo de rescate de tricomas PCCL702 -Gateway (donado por el Dr. William Lucas, UC Davis). Para esto se realizó una mezcla de reacción que contenía: 1 μ L de vector, 1 μ L plásmido, 0.5 μ L de enzima LR Clonasa (Invitrogen, USA) y 2.5 μ L de agua bidestilada estéril. Esta mezcla se incubó a 22 °C por 18 horas.

6.5.2.3 Ensayo de rescate de mutantes deficientes en la formación de tricomas

Este ensayo consiste en la complementación funcional de mutantes en el gen *glabrous* (*gl1*,) el cual codifica para un factor de transcripción esencial para la iniciación de tricomas. Las construcciones básicamente consistieron de el promotor de la pequeña subunidad de Rubisco, cuya expresión está restringida al mesófilo (generalmente no generan tricomas) y estomas (estructuras simplasmicamente aisladas), dirigiendo la expresión ya sea de los marcos de lectura abiertos de *glabrous* y TCTP (AtTCTP2 y AtTCP1), de las versiones en donde se modificaron ambos ORFs, o de las versiones no traducibles (con codón de paro al inicio del ORF) de AtTCTP2 y AtTCTP1, para generar una proteína de fusión o un transcrito cuya capacidad de movimiento sea visible indirectamente mediante el rescate del fenotipo silvestre, caracterizado por la presencia de tricomas en la epidermis (Ver figura 14).



Figura 13. Esquema general de las construcciones para el Ensayo de Rescate de Tricomas. En azul se representa al promotor de la subunidad pequeña de Rubisco, en verde al gen reportero GFP, en rojo al marco abierto de lectura del gen *glabrous*, y en amarillo al de las diferentes versiones de TCTP que se probarán (AtTCTP2 locus genómico, AtTCTP2 ORF, AtTCTP1 ORF y CmTCTP). El símbolo en morado representa el codón de paro al inicio del marco abierto de lectura de TCTP.

Se transformaron plantas mutantes *gl1* con cada una de las construcciones antes señaladas mediante el protocolo de Inmersión Floral (Clough y Bent, 1998). Se seleccionaron las líneas transgénicas por resistencia a higromicina, y se analizó tejido de hoja con estereoscopio para poder visualizar la presencia de tricomas en epidermis, tal como se muestra en el esquema de la figura 14. Durante el análisis por microscopía de las líneas transgénicas se hará el conteo del número de tricomas por hoja y cuántas líneas presentan la complementación del fenotipo, en comparación con plantas silvestres. En el caso de las versiones traducibles, si la proteína de fusión (GFP-GL1-TCTP) es capaz de moverse del mesófilo a la epidermis, observaríamos la presencia de tricomas en epidermis, lo cual sería indicativo de la capacidad de transporte (o movimiento) intercelular a corta distancia, ya sea de AtTCTP2 (locus genómico y/u ORF), AtTCTP1 y/o CmTCTP. Para las versiones no traducibles, en dado caso que se observe el mismo efecto sería atribuible a la capacidad de estos transcritos de transportarse intercelularmente desde el mesófilo hacia la epidermis. Mientras que para las versiones sintéticas se analizaría si los cambios en secuencia, y por ende estructurales, de alguna forma también afectan la capacidad de la proteína de moverse célula a célula.

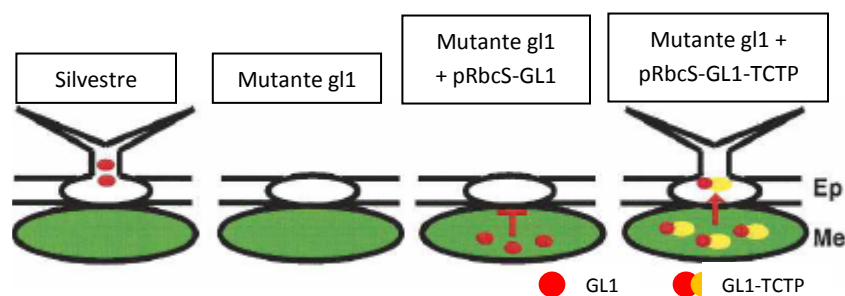


Figura 14. Esquema general de Ensayo de Rescate de Tricomas. En rojo se representa la proteína GL1 y en amarillo a TCTP. Tomado de Kim *et al.*, 2005.

6.6. Análisis *in silico* de probables diferencias funcionales entre AtTCTP2 y AtTCTP1

En esta etapa se buscó dilucidar si existía alguna diferencia a nivel de secuencias nucleotídicas, aminoácidas o de estructura que nos permitiera asociar probables diferencias funcionales entre los productos génicos de ambos genes codificantes para TCTP en Arabidopsis, y a su vez hacer una comparación con TCTPs de otros organismos vegetales para tratar de encontrar algún patrón que sugiriera un reparto del trabajo entre las diferentes versiones de TCTP en planta.

6.6.1 Obtención de secuencias de TCTP

Las secuencias de proteínas usadas en este análisis fueron tomadas de la base de datos de Phytozome (<http://www.phytozome.net/>). Como punto de partida, se obtuvo la secuencia nucleotídica de CmTCTP traducida a aminoácidos (numero de acceso en DQ304537) de la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/>). Posteriormente se realizó un BLAST usando la secuencia de proteica de CmTCTP como molde y comparándola respecto a todas las secuencias encontradas en Phytozome. Basados en esta búsqueda, las secuencias representativas de varias especies de plantas fueron seleccionadas para los estudios posteriores. Las secuencias que divergieron de la consenso, y que probablemente fueron artefactos de secuenciación fueron desechados para subsecuentes análisis.

6.6.2 Determinación de identidad y similitud de las secuencias proteicas de TCTP

Las secuencias aminoácidas de TCTP seleccionadas fueron ingresadas al programa MatGAT versión 2.01 (Matrix Global Alignment Tool) para calcular la similitud e identidad entre secuencias (<http://bitincka.com/ledion/matgat/>). La serie de parejas alineadas (mostrada como matriz de distancia) fue inferida usando la matriz BLOSUM62 (primer gap=10, extensión de gap= 2). El análisis involucró 59 secuencias de aminoácidos. Los valores fueron expresados como porcentaje de similitud e identidad entre las secuencias

analizadas comparadas contra AtTCTP1 (At3g16640) de *Arabidopsis thaliana* y CmTCTP de *C. máxima*.

6.6.3 Análisis filogenético de secuencias aminoacídicas de TCTP

Las secuencias de aminoácidos escogidas fueron alineadas con el programa MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle>) usando el método de perfil (Edgar, 2004). El programa ProtTest versión 2.4 (Abascal *et al.*, 2005) fue usado para la selección del modelo de evolución proteica que mejor se acomodó con el set de secuencias. Los análisis evolutivos fueron llevados a cabo con el programa PhyML 3.0 (Guindon *et al.*, 2010) y el programa de análisis genético evolutivo MEGA versión 5 (Tamura *et al.*, 2011). LA reconstrucción genética evolutiva (mostrada como un dendograma) fue inferida usando el método evolutivo LG+G y los siguientes parámetros: número de categorías de sustitución=4, parámetro de forma $\gamma=0.642$ y 1000 replicas de búsqueda bootstrap con opciones de búsqueda heurística. Las ramas (branches) con menos del 60% de bootstrap se colapsaron. El árbol filogenético fue enraizado con la secuencia de TCTP de *Cyanidioschyzon meroleae* que pertenece al grupo de las algas rojas. El análisis involucró las 59 secuencias antes descritas.

6.6.4 Análisis de regiones promotoras de TCTP

Las secuencias 1 Kb “rio arriba” de cada uno de los 59 genes fueron obtenidas de Phytozome (<http://www.phytozome.net/>). La lista de genes y las especies de donde se obtuvieron estas regiones está enlistada. Cada uno fue clasificado de acuerdo con su similitud a nivel de estructura con AtTCTP1 o AtTCTP2 (o CmTCTP). Aunque cabe mencionar, que en los casos en los que los genes no han sido caracterizados, sus regiones 5'UTR no han sido definidas, y se tomó la región 1 Kb rio arriba del codón de inicio para ser analizada. Los análisis del promotor fueron llevados a cabo usando el software MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme/meme.html>; Bailey *et al.*, 2006) con los siguientes settings: una o más ocurrencias por secuencia y 10 como largo base de los motifs. Basándose en análisis de secuencia, usando ALIGNANCE, así como la inspección visual de los sets de

promotores, se determinó que los repetidos CT/GA estaban presentes más de una vez en las secuencias analizadas upstream y que los modelos ZOOPS and OOPS no se emplearon. Como modelo de fondo las secuencias fueron usadas y también analizadas con MEME (<http://www.bioinformatics.org/sms2/about.html>). Los motifs fueron representados gráficamente con el programa WEBLOGO (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>). Como modelos de fondo, las secuencias ingresadas fueron analizadas usando el algoritmo MEME.

6.6.5 Obtención de estructuras predictivas 3D de TCTP

Las secuencias proteicas completas fueron seleccionadas de la base de datos Phytozome (<http://phytozome.net>) y refinadas a través de la comparacion con la base de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Las secuencias de aminoácidos fueron sometidas al programa-servidor automatico de modelado proteico por homología SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>), este servidor construye un modelo para cada proteína de interés usando como moldes proteínas homólogas cuyas estructuras han sido experimentalmente determinadas (Arnold *et al.*, 2006; Kiefer *et al.*, 2009). Por ultimo, la aplicación Swiss PDB Viewer (<http://www.expasy.org/spdbv/>) fue usada para visualizar las estructuras predictivas 3D (Guex *et al.*, 1997).

7. RESULTADOS

Los resultados serán presentados de acuerdo con el orden mostrado en la sección de objetivos específicos. Sin embargo, varios fueron obtenidos y analizados de manera no secuencial, algunos de ellos llevados a cabo al mismo tiempo. Por otra parte, se debe mencionar que en esta sección se presentará la obtención de las construcciones genéticas presentando únicamente las imágenes de los geles electroforéticos con los que fueron comprobadas las construcciones mencionadas.

7.1 Análisis molecular y fenotípico de la sobreexpresión, silenciamiento e interrupción de AtTCTP2 (At3g05540) en Arabidopsis.

7.1.1 Análisis de la sobreexpresión de AtTCTP2 en Arabidopsis

Para esta fase ya se contaba con las construcciones de sobreexpresión del locus genómico de AtTCTP2-GFP y del ORF de AtTCTP1, por lo que nos dedicamos a obtener el ORF de AtTCTP2.

7.1.1.1 Obtención del marco de lectura abierto (ORF) de AtTCTP2

Primero se extrajo ARN total de hoja y tallo de plantas silvestres de *Arabidopsis*, este fue sometido a electroforesis para corroborar su integridad y entonces ser usado para sintetizar ADNc.

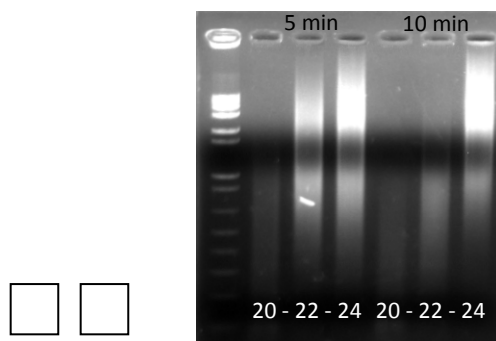


Figura 15. ARN total de *Arabidopsis* y LD-PCR a partir del ADNc. Las letras indican el tejido H (hoja) y T (tallo) del cual se extrajo el ARN total. Los números en blanco indican los ciclos de amplificación del ADNc y arriba se indica en negro el tiempo que se trató el ADNc a 72°C.

Después se diseñaron y mandaron sintetizar oligonucleótidos (ORF-UTR AtTCTP2) para amplificar una porción de los otros además del marco abierto de lectura de AtTCTP2. Estos se probaron mediante una PCR punto final utilizando ADN genómico como molde.

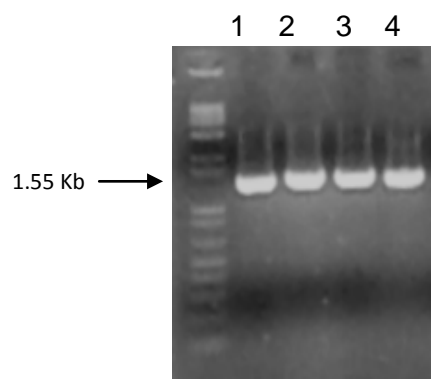


Figura 16. Prueba por PCR de oligonucleótidos diseñados (ORF-UTR AtTCTP2). Se realizó un gradiente de temperatura: (1) 54°C, (2) 57°C, (3) 60 °C y (4) 63°C. El tamaño del amplicón es de alrededor de 1.55 Kb pues equivale al locus genómico de AtTCTP2.

Se llevó a cabo una PCR punto final para obtener el marco abierto de lectura (ORF) del gen At3g05540 (AtTCTP2) a partir de las muestras de cDNA obtenidas. Se amplificaron varios fragmentos con tamaños entre 470 y 530 pb aproximadamente. Estos fueron productos de PCR fueron purificados y ligados cada uno al vector de clonación PCR8GWTOPO.

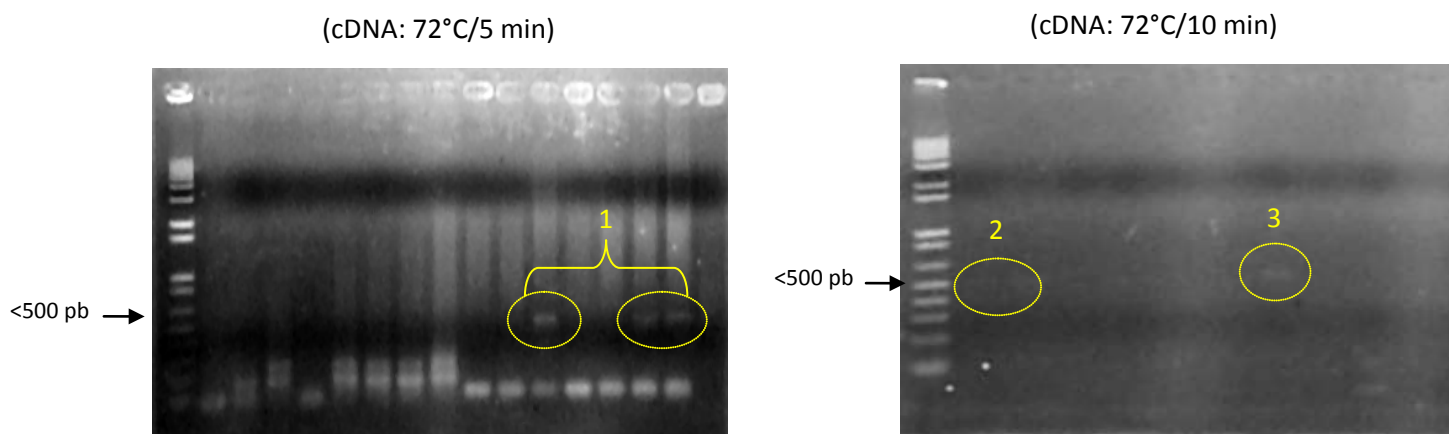


Figura 17. Amplificación del ORF AtTCTP2. Utilizando los oligonucleótidos ORF-UTR AtTCTP2 se amplificaron bandas con tamaños alrededor de los 500 pb, señaladas en los óvalos amarillos y denominados 1, 2 y 3 tal como se muestra.

Se corroboró la clonación de los distintos amplicones en el vector, a través de la digestión con la enzima de restricción EcoRI de las clonas candidatas de cada una de las ligaciones hechas.

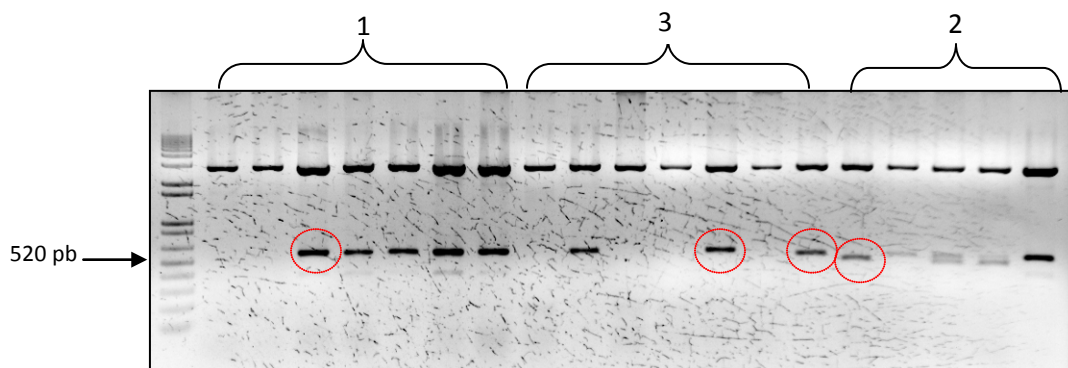


Figura 18. Digestión de verificación de inserto en los plásmidos de clonas candidatas. Se observa la presencia de una serie de insertos de distinto tamaño, pero todos de alrededor de 500 -520 pb.

Debido a que AtTCTP2 y AtTCTP1 tienen tamaño semejante, se procedió a realizar un patrón de digestión que nos ayudase a determinar cuáles de estas clonas poseía el ORF de AtTCTP2. Para esto se digirieron los plásmidos que resultaron positivos a la presencia de inserto junto con un plásmido que se sabía contenía como inserto el ORF de AtTCTP1. El ORF de AtTCP2 posee sitio interno para EcoRV mientras que AtTCTP1 no posee sitio interno para esta enzima. Solo una clona mostró el patrón de restricción esperado para AtTCTP2.

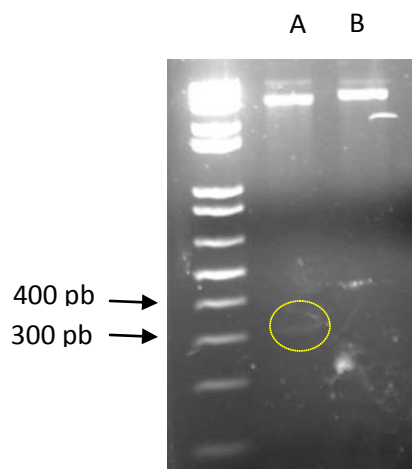


Figura 19. Digestión (orientación) de clona positiva a el ORF AtTCTP2 con EcoRV. Se observa la liberación de un inserto de alrededor de 320 pb (circulo amarillo) en la muestra A (ORF AtTCTP2), lo cual concuerda con lo esperado para AtTCTP2, mientras que en la muestra B (ORF AtTCTP1) se muestra la linealización del plásmido, pero no así la liberación de algún fragmento.

Tomando en cuenta lo anterior podríamos aseverar que en esta clona contamos con el marco abierto de lectura de AtTCTP2. Sin embargo, está en la posición invertida para subclonar en el vector binario correspondiente, por lo que procedimos a amplificar de nuevo a AtTCTP2 a partir de este plásmido para posteriormente ligarlo al vector de clonación. Las nuevas clonas fueron digeridas con EcoRV para verificar la presencia del inserto y la orientación.

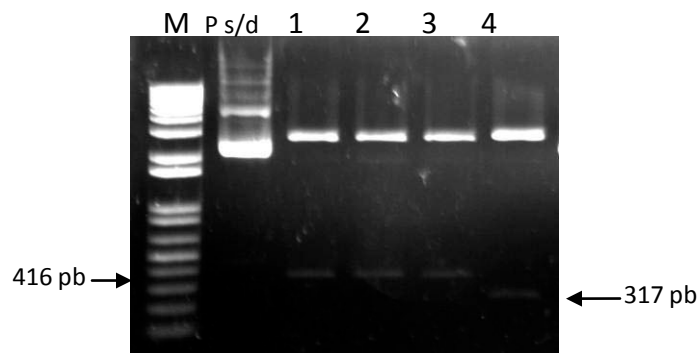


Figura 20. Digestión con EcoRV de nuevas clonas candidatas AtTCTP2 ORF. En el primer carril (sin tomar en cuenta al marcador de peso molecular) se observa uno de los plásmidos sin ser digerido (Ps/d), mientras que en los carriles 1-4 se muestran los cuatro plásmidos digeridos, de los cuales solo el numero 4 mostró una orientación negativa (317 pb) mientras que los tres restantes si la presentaron (416 pb).

Se seleccionó una de las clonas anteriores y se subclonó en el vector de sobre-expresión (pB7FWG2). Se obtuvieron nuevas clonas, a las cuales se les realizó escrutinio por PCR, para corroborar la presencia del inserto. Posteriormente se llevó a cabo la introducción de este plásmido binario a células de *A. tumefaciens* y la subsecuente corroboración del inserto por PCR.

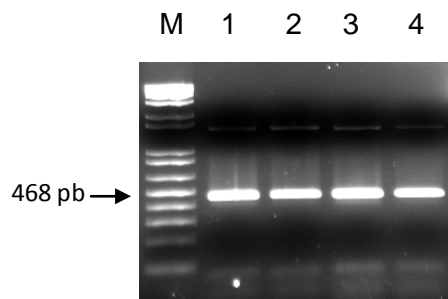


Fig. 21. Comprobación por PCR de inserto AtTCTP2 ORF en plásmidos binarios. En los carriles marcados con el 1 y 2 se muestra la presencia del inserto en dos plásmidos binarios en *E. coli*

mientras que en los carriles 3 y 4 se observa la comprobación del inserto en plásmidos extraídos de *A. tumefaciens*.

7.1.1.2 Análisis fenotípico y molecular de la sobreexpresión de *AtTCTP2*

Se analizaron los fenotipos de al menos 5 líneas distintas de plantas F2 o F3 de cada unas de las construcciones de sobreexpresión, y no se observaron diferencias fenotípicas obvias en comparación con plantas silvestres.

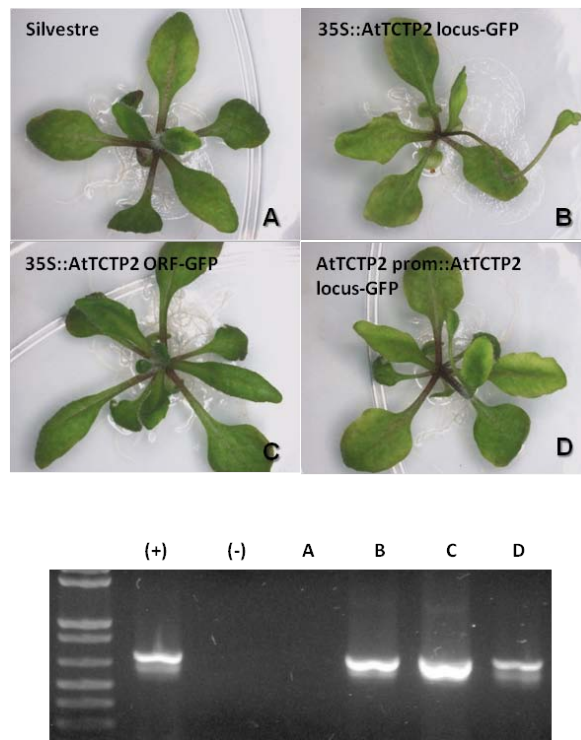


Figura 22. Fenotipos de sobreexpresión de *AtTCTP2GFP*. (Arriba) Comparación fenotípica de plantas representativas de la sobreexpresión de *AtTCTP2-GFP* en diferentes versiones comparadas con plantas silvestres: A= silvestre, B=35S::locus, C=35S::ORF y D= *AtTCTP2* prom:: locus. (Abajo) Gel electroforético mostrando la presencia del transgén GFP en las plantas transgénicas (B-D) y su ausencia en la planta silvestre (A). El control positivo usado fue el vector pB7FWG2 y el negativo fue una muestra sin molde NTC.

7.1.2 Análisis del silenciamiento de *AtTCTP2* en *Arabidopsis*

Básicamente se siguió la metodología descrita en la sección 6.1 de este documento para generar las construcciones de silenciamiento tanto de *AtTCTP2* como de *AtTCTP1* utilizando los oligonucleótidos reportados en la Tabla S1. Como ya hemos mencionado,

estos genes son muy parecidos en secuencia, por lo tanto se buscaron regiones suficientemente divergentes entre ambos genes para llevar a cabo el silenciamiento específico de AtTCTP2 y AtTCTP1, mediante repetidos invertidos. Por lo tanto se eligió trabajar con la región 3'UTR de ambos genes (221 pb y 207 pb respectivamente). Se amplificaron las regiones 3'UTR para ambos genes (Figura 23).

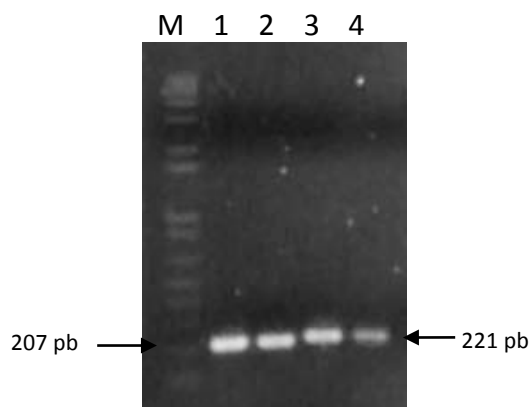


Figura 23. Amplificación de las regiones 3'UTR. En los carriles marcados 1 y 2 se muestran los amplicones de la región para silenciamiento de AtTCTP1 (55 y 60 °C respectivamente), mientras que en los carriles 3 y 4 se observan los de AtTCTP2 (55 y 60°C respectivamente).

Estos amplicones fueron clonados y transferidos a *E. coli*. Se extrajo ADN plasmídico de las clonas candidatas. Se determinó la presencia de ambos insertos en los plásmidos recombinantes de las clonas candidatas mediante digestión, para el caso de AtTCTP2 3'UTR, y PCR para el de AtTCTP1 3'UTR.

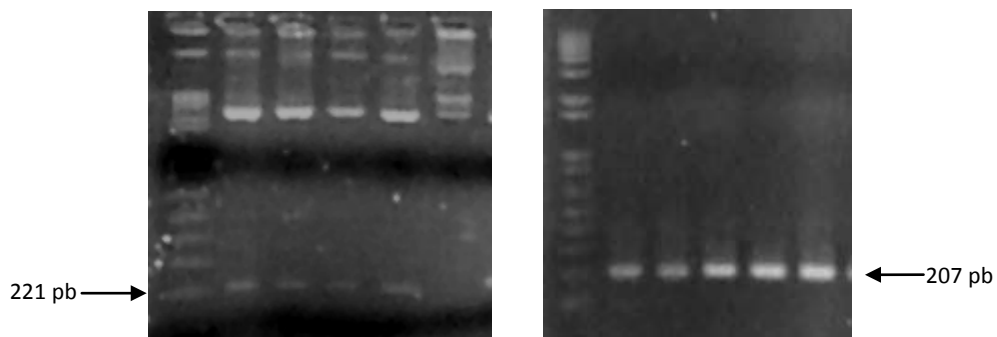


Figura 24. Verificación de insertos de silenciamiento. A la izquierda podemos la comprobación del inserto AtTCTP2 3'UTR (221 pb) por digestión con EcoRI y a la derecha por PCR para AtTCTP1 3'UTR (207).

No fue necesario determinar la orientación de los insertos, por lo que se procedió a la linealización de los plásmidos elegidos para dar paso a la subclonación de estos en el vector de silenciamiento (pB7GW1WG2). Este vector posee dos sitios de recombinación, por lo que al ligarse aquí los fragmentos de silenciamiento se generarán repetidos invertidos que serán aprovechados por el sistema de silenciamiento génico de la planta para detectar y abatir la expresión de ambos genes. Se determinó la presencia de los insertos en los plásmidos conteniendo las construcciones de silenciamiento mediante PCR punto final y/ digestiones.

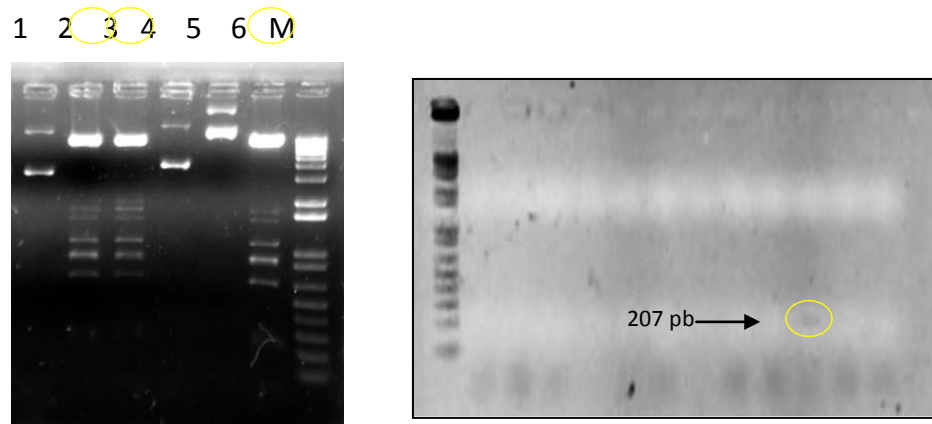


Figura 25. Digestión de verificación de inserto en clonas para silenciamiento. A la izquierda se observa la comprobación del inserto para el silenciamiento de AtTCTP2 mediante digestión enzimática con EcoRI, las muestras 2,3 y 6 presentaron el patrón de restricción esperado. A la derecha podemos ver que solo una clona de 12 candidatas evidenció el amplicón de silenciamiento de AtTCTP1 (círculo amarillo) mediante PCR.

Finalmente se llevó a cabo la transferencia de las construcciones de silenciamiento a células de *A. tumefaciens* (C58C1), a partir de las cuales se extrajo nuevamente ADN plasmídico para usarlo como molde para llevar a cabo reacciones de PCR para verificar la presencia de los fragmentos de interés en las cepas elegidas para transformar plantas silvestres de *Arabidopsis*. Actualmente estamos por realizar esta transformación para obtener líneas transgénicas en donde esté silenciado tanto *AtTCTP2* como *AtTCTP1*.

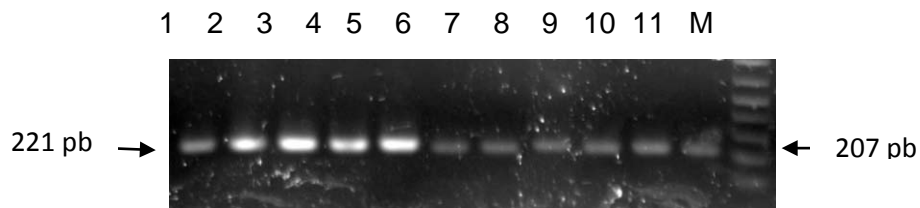


Figura 26. Comprobación por PCR de insertos de silenciamiento en *A. tumefaciens*. En los carriles marcados del 1 al 5 se muestra la presencia del inserto de silenciamiento de AtTCTP2 los plásmidos extraídos de *A. tumefaciens*. Mismo caso con los de AtTCP1 (carriles 6 al 11).

Una vez obtenidas las construcciones de silenciamiento de AtTCTP2 y AtTCTP1 en *A. tumefaciens* se procedió a transformar plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana* mediante el método de inmersión floral (Clough y Bent, 1998).

La semilla proveniente de las transformadas primarias (F0) fueron sembradas en suelo conteniendo herbicida (glufosinato de amonio) para poder realizar la selección asistida de las plantas conteniendo la construcción de interés.

Sin embargo, solo se pudo obtener una línea por construcción. Por lo que una vez más la semilla F1 fue sembrada, esta vez, *in vitro* en medio MS conteniendo 25 μ M de glufosinato de amonio (FLUKA) para llevar a cabo la selección de las transformantes.

Las pocas plantas aisladas fueron confirmadas por PCR y trasplantadas a suelo estéril para eventualmente obtener la semilla F2. Las líneas analizadas fenotípica y molecularmente fueron provenientes de esta última generación F2 (Figura 27). Cabe mencionar que la comparación se realizó en plantas crecidas *in vitro* en medio MS basal (sin suplementación).

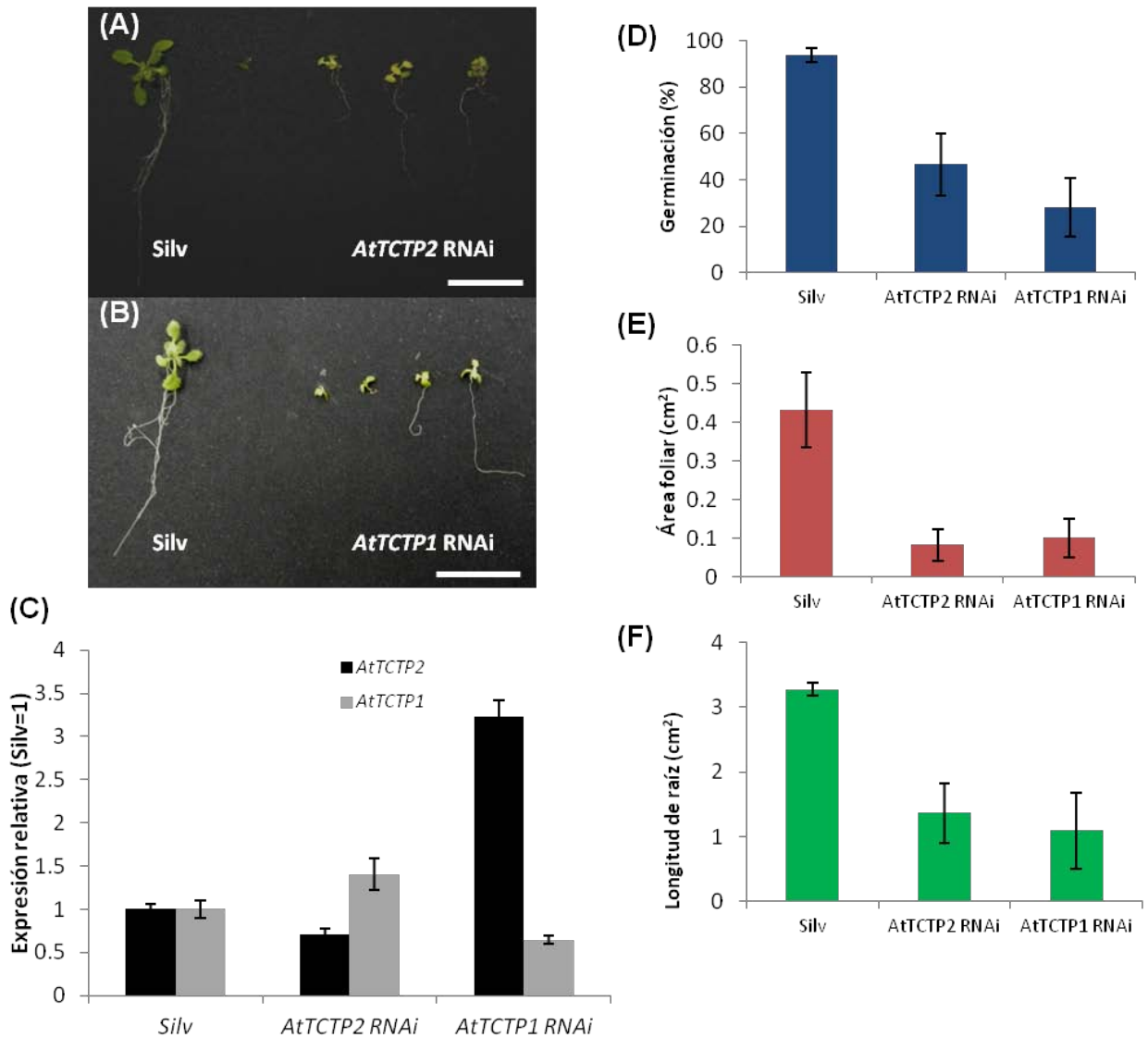


Figura 27. Análisis fenotípicos y moleculares de líneas silenciadas de *AtTCTP2* y *AtTCTP1*. (A-B) muestran la comparación fenotípica de 4 plantas de la línea de silenciamiento de *AtTCTP2* (A) y *AtTCTP1* (B) comparadas con plantas silvestres a los 15 ddg. Barra de tamaño=2cm. (C) Cuantificación del transcrito *AtTCTP2* (negro) y de *AtTCTP1* (gris) en plantas silvestres (control) y líneas de silenciamiento de *AtTCTP2* y *AtTCTP1*. Los parámetros como (D) Porcentaje de germinación, (E) área foliar y (F) longitud de raíz fueron medidos para cada línea de silenciamiento y comparados con plantas silvestres. Se usaron 5 plantas por réplica, con un total de 4 replicas n=20.

7.1.3 Análisis del knock-out (interrupción) de AtTCTP2 en Arabidopsis

En este caso se obtuvieron las semillas de la línea SALK_045146 (en donde el T-DNA se encuentra ubicado en uno de los exones del marco de lectura abierto de AtTCTP2) (Figura 10) del Arabidopsis Stock Center, Universidad Estatal de Ohio. EE.UU. Las semillas recibidas son F2 o F3, y siguiendo las instrucciones del proveedor, se crecieron en suelo para poder trabajar con la progenie de éstas.

Una vez analizadas fenotípicamente las plantas fueron genotipificadas para determinar cuáles eran homo u heterocigotas. Como se puede observar en la figura 28, existe un fenotipo letal en las plantas homocigotas (-/-) mientras que en heterocigosis (+/-) parece haber un amplio rango de fenotipos.

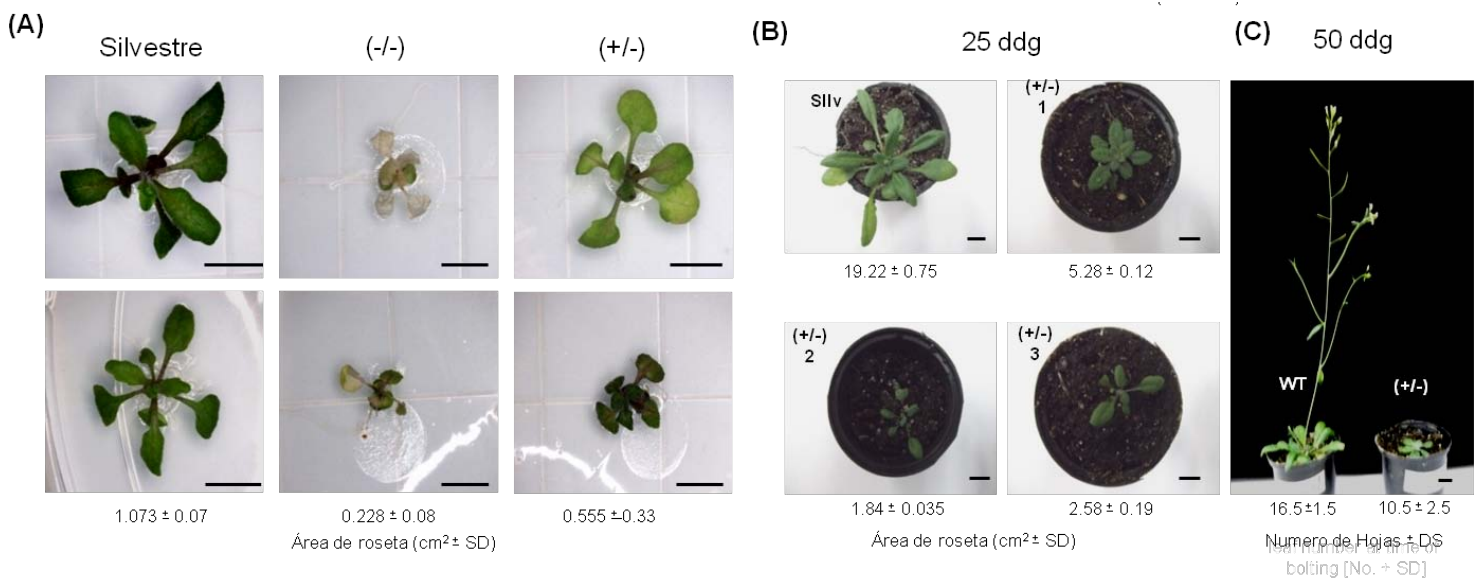


Figura 28. Análisis fenotípico de línea SALK_045146. Se observó fenotipo severo en mutantes homocigotas y heterocigotas en donde está interrumpido el marco de lectura abierto de AtTCTP2 (At3g05540). (A) Comparación fenotípica de plantas silvestres, homocigotas (-/-) y heterocigotas (+/-) crecidas in vitro bajo condiciones estándar (10 ddg). (B) Comparativo de varias líneas heterocigotas (+/-) respecto a silvestres crecidas en suelo durante 25 ddg. (C) Se observa que un retardo más evidente a los 50 ddg. Las barras de tamaño representan 0.5 cm (A) y 1 cm (B-C).

Tomando en cuenta la observación anterior se decidió analizar varias de estas líneas heterocigotas con el fin de cuantificar los transcritos *AtTCTP2* y *AtTCTP1*, y así definir si los fenotipos observados estaban asociados solo a la interrupción parcial de *AtTCTP2* y no de su homólogo en *Arabidopsis* (Figura 29). Se observa la relación directa entre los niveles de expresión de *AtTCTP2* y el fenotipo observado, mientras que los niveles de *AtTCTP1* incluso aumentan, por lo que se descarta que éste se haya inactivado en las mutantes para *AtTCTP2*.

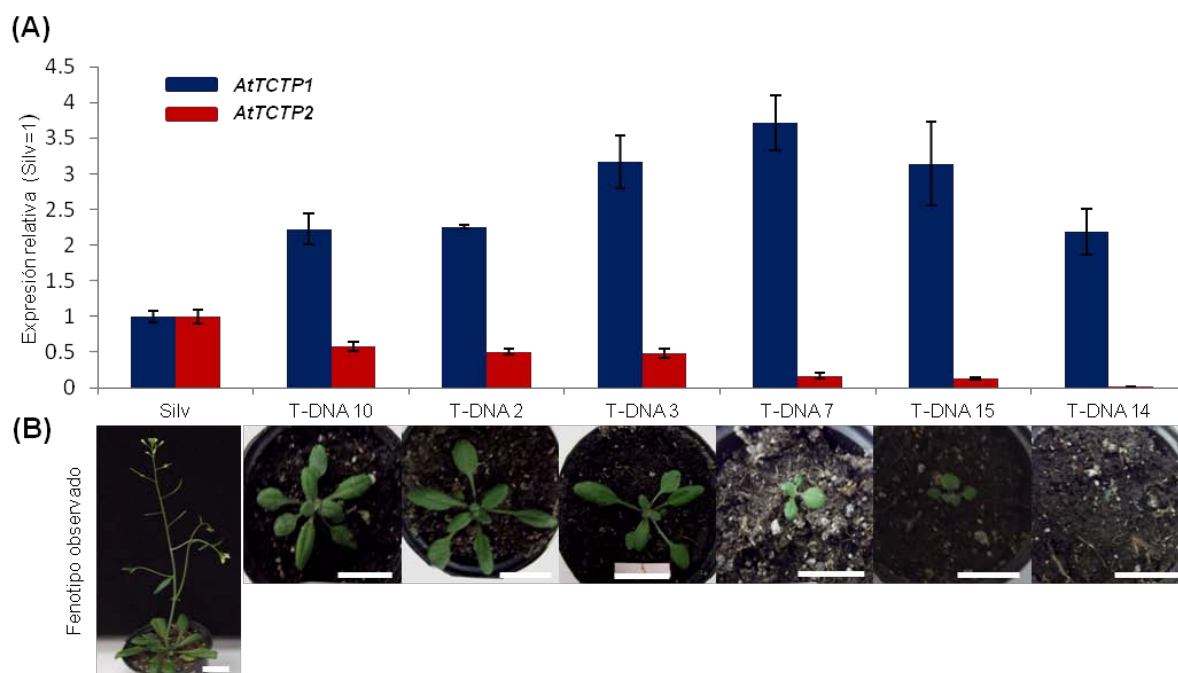


Figura 29. Los fenotipos de mutantes insercionales heterocigotas (SALK_045146) están asociados con los niveles de expresión de *AtTCTP2*. (A) Detección mediante q-RT PCR en tiempo real de los niveles transcripcionales de *AtTCTP2* y *AtTCTP1* en varias líneas (+/-) de la línea de knockout del gen *AtTCTP2* usando como molde ARN total extraído de cada una de estas. (B) La severidad del fenotipo de las mutantes heterocigotas es presentado en orden de acuerdo al área foliar / tamaño de las plantas y coinciden directamente con los niveles de *AtTCTP2* como transcrito. Tanto el análisis fenotípico como la cuantificación por q-RT PCR fueron hechos 25 ddg. Barra de tamaño= 2 cm.

Finalmente, con el fin de complementar el análisis de la interrupción del gen *AtTCTP2*, se decidió realizar la determinación del número de copias en líneas heterocigotas mediante ddPCR o PCR digital.

Esto nos permitió identificar si existía alguna otra mutación adicional a la establecida desde un principio. Tal como se muestra en la figura 30, solo se detectó una copia en la línea (+/-) analizada por lo que se descarta que los fenotipos observados estén asociados a la interrupción de algún otro gen o región regulatoria importante. Asimismo se midió en tiempo real los niveles de asimilación de CO₂ de las plantas (+/-) respecto a silvestres (Figura 31) encontrándose que no se vio afectada significativamente la capacidad fotosintética de las primeras, lo cual a grandes rasgos indica que el estado fisiológico de las plantas heterocigotas se mantiene similar al de las plantas silvestres, y no se vio afectado por la mutación en uno de los alelos para TCTP.

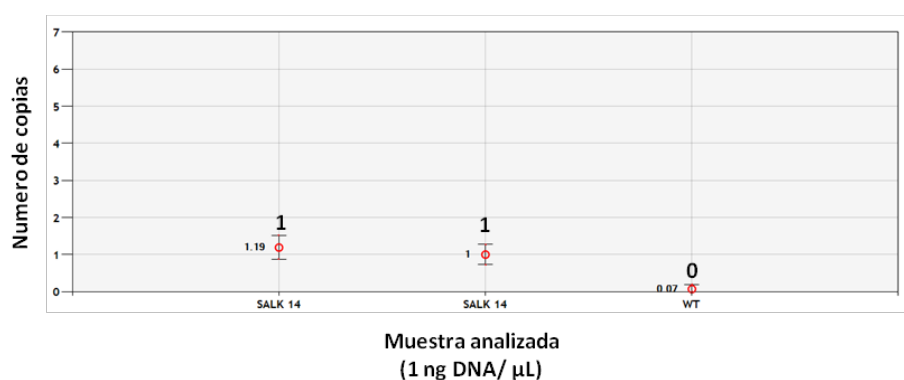


Figura 30. Determinación de número de copias en línea (+/-) SALK_045146. El DNA molde fue digerido y diluido para ser usado para la reacción dúplex en donde se utilizaron las sondas contra 35S y HMG (como control unicopia) cuya fluorescencia fue detectada en los canales FAM y HEX respectivamente.

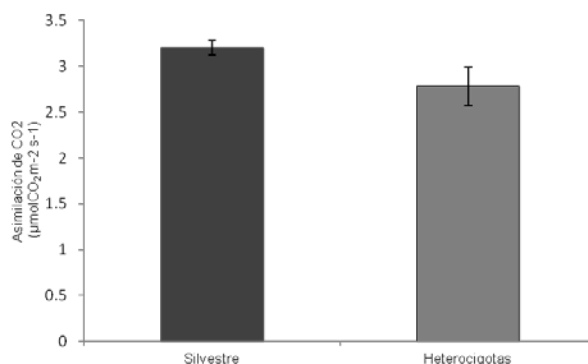


Figura 31. Cuantificación de la asimilación de CO₂ de líneas (+/-) vs silvestres. Se realizaron al menos 3 replicas técnicas de medición de la capacidad fotosintética por cada replica biológica, y se tomaron en cuenta al menos 10 replicas biológicas, dando un total de n=30 para cada caso. DS +/-

7.2 Identificación de los sitios de acumulación de la proteína de fusión AtTCTP2-GFP a nivel celular en Arabidopsis.

Como habíamos mencionado antes, ya contábamos con la construcción de sobreexpresión del locus genómico de AtTCTP2, y con la construcción de sobreexpresión de AtTCTP1; asimismo pudimos obtener la de sobreexpresión del marco de lectura abierto de AtTCTP2.. Por lo anterior, decidimos obtener una última construcción en donde tendríamos a la región promotora 1.5Kb río arriba de AtTCTP2 dirigiendo la expresión del locus genómico de este mismo gen fusionado a GFP.

7.2.1 Obtención de construcción Prom AtTCTP2::Locus genómico AtTCTP2-GFP

Se amplificó, mediante PCR punto final, el fragmento de 3 Kb (aproximadamente) el cual abarca el promotor (1.5Kb río arriba) y locus genómico de AtTCTP2 (1.5 Kb aprox.) usando los oligonucleótidos descritos en la tabla S1 (5' Prom AtTCTP2 y 3' ORF AtTCTP2 nonstop). Este amplicón fue clonado en el vector pCR8GWTOPO y analizado por restricción (para determinar presencia de inserto y orientación).

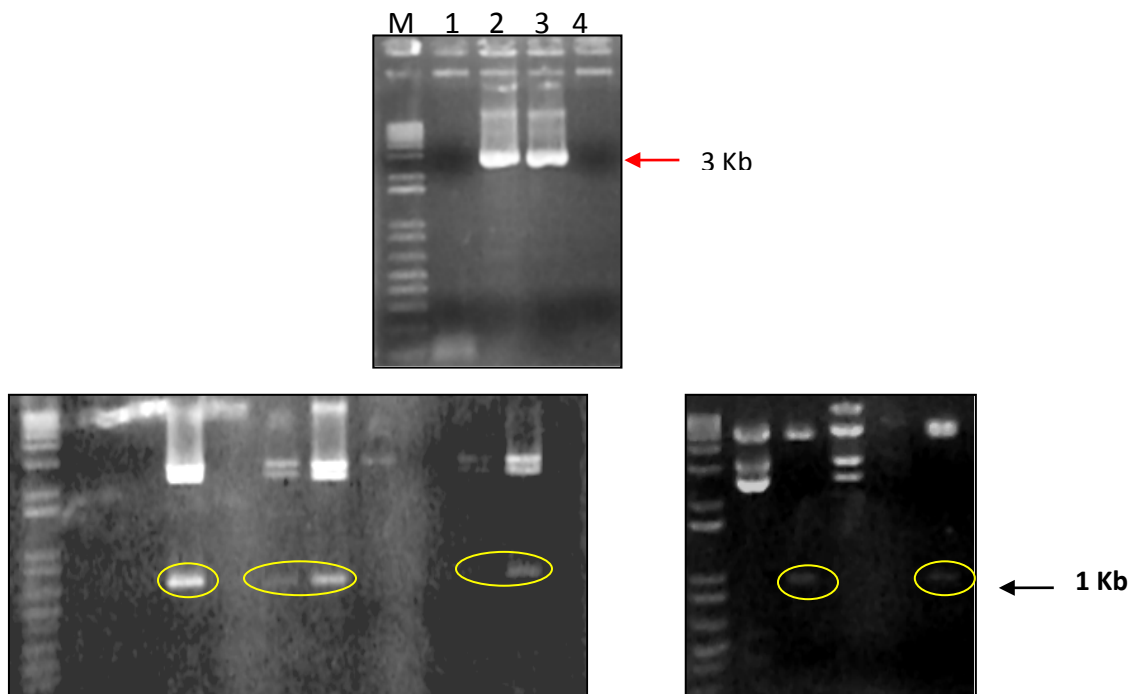


Figura 32. Gel electroforético de amplificación del fragmento Prom-locus genómico AtTCTP2 y análisis de restricción de este amplicón clonado. Arriba se muestra la amplificación del fragmento de 3Kb. Abajo a la izquierda se observa el escrutinio de 10 clonas candidatas, de las cuales solo 5 presentaron el patrón de bandeado esperado de la digestión con EcoRI. Abajo a la derecha se muestra la digestión de los 5 plásmidos anteriores con EcoRV para identificar aquellos plásmidos con la orientación positiva, solamente 2 de estos plásmidos presentaron esta orientación.

Se seleccionó uno de estos plásmidos para linealizarlo, purificarlo y llevar a cabo la subclonación en el vector para expresión endógena pB7FWG,0 (ver Figura X) el cual no posee ningún promotor, y permitirá que el promotor endógeno de AtTCTP2 dirija la expresión del gen de AtTCTP2 fusionado al gen reportero GFP. Posteriormente se realizó la transformación de *A. tumefaciens* con el plásmido conteniendo la construcción.

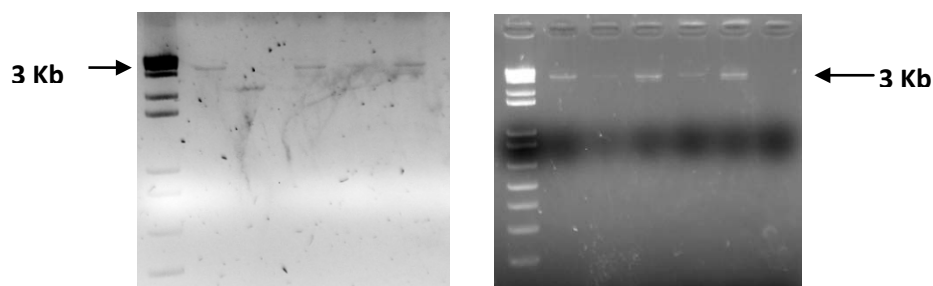


Figura 33. Comprobación por PCR de inserto en vector binario. En el gel electroforético de la izquierda podemos ver el inserto en el vector de expresión en 4 de las 5 clonas de *E. coli*. A la derecha tenemos la comprobación de la construcción en las 5 clonas de *Agrobacterium* sometidas a PCR.

7.2.2 Análisis de los patrones de acumulación de AtTCTP2-GFP

Para llevar a cabo la detección de los sitios de acumulación de AtTCTP2 se compararon las distintas versiones de sobreexpresión de AtTCTP2 (locus y ORF) cuya expresión estaba dirigida por el promotor 35S, la versión de expresión endógena que utilizó al promotor de AtTCTP2, y la de sobreexpresión de AtTCTP1. En todos los casos la presencia de una fusión de TCTP con GFP permitió el análisis de tejido de las plantas transgénicas (F2 o F3) mediante microscopía confocal.

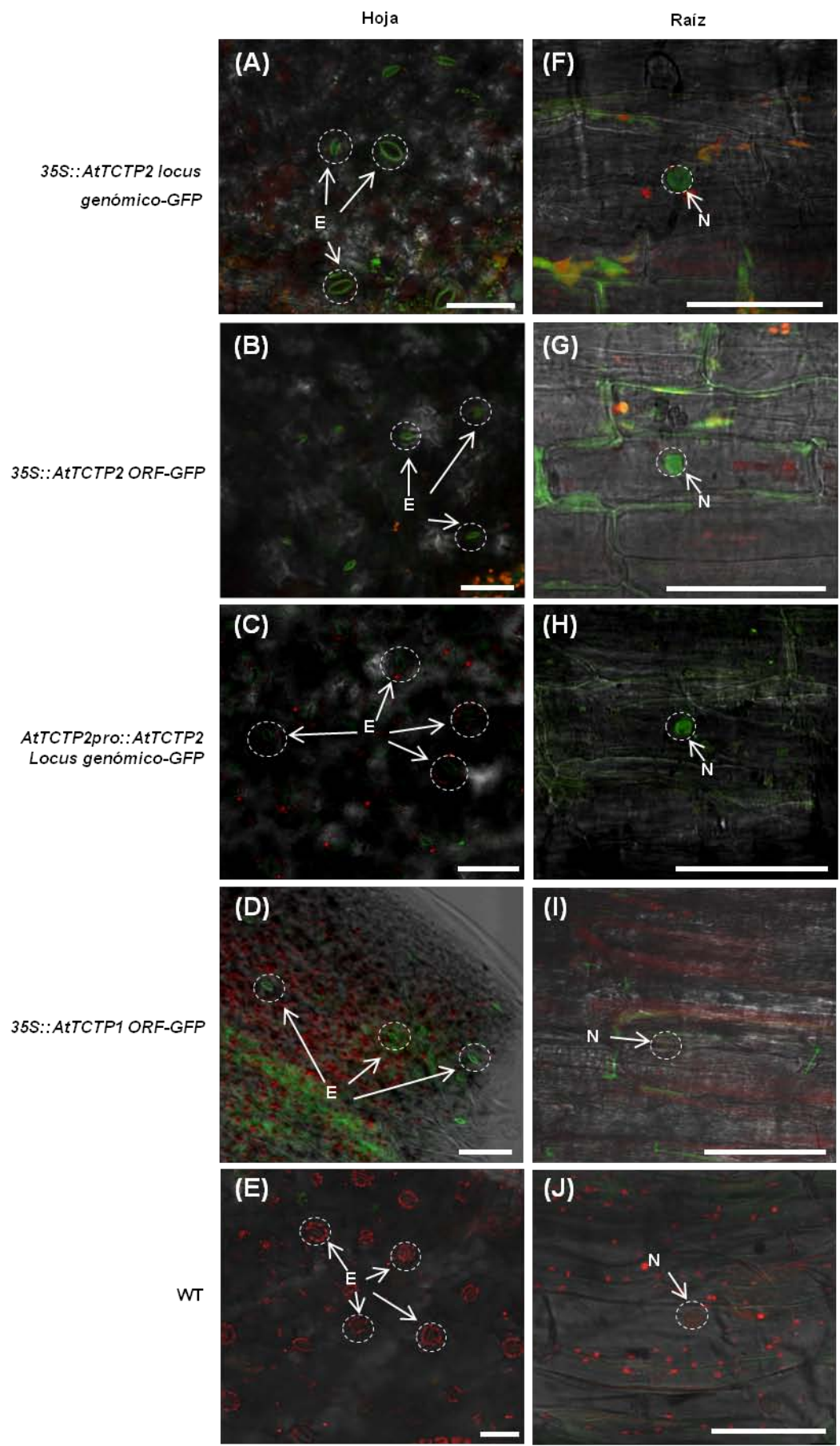


Figura 34. El patrón de acumulación de AtTCTP2-GFP indica el correcto procesamiento del transcrito AtTCTP2. Los sitios de acumulación de AtTCTP2-GFP en las líneas transgénicas (A, F) 35S::AtTCTP2 locus-GFP, (B, G) 35S::AtTCTP2 ORF-GFP, (C, H) AtTCTP2prom::AtTCTP2-GFP y (D, I) 35S::AtTCTP1 ORF-GFP coinciden en tejido de hoja observándose acumulación específica en estomas y núcleo. Sin embargo, el patrón de acumulación difiere en tejido de la región media de raíces, en donde AtTCTP2-GFP (en sus diferentes versiones) está presente en núcleo (F-H) en contraste con AtTCTP1-GFP (I) el cual no se encontró. (E, J) Controles silvestres de hoja y raíz respectivamente. Barras de tamaño= 50 μ M

7.3 Caracterización de la expresión del gen *AtTCTP2*

Se decidió analizar tanto el patrón de expresión de *AtTCTP2* a través de toda la planta (sitios donde se genera el ARNm), así como la cuantificación la expresión de este gen en diferentes tejidos de plantas silvestres.

7.3.1 Identificación de patrón de expresión de *AtTCTP2 Prom::GFP-GUS* por microscopía confocal

Se aprovechó que ya se contaba con la construcción de análisis de la región promotora de *AtTCTP2*, ya descrita dirigiendo la expresión de GFP y GUS. Esta proteína de fusión GFP-GUS fue detectada por microscopía confocal de GFP, mientras que GUS provee un tamaño tal a la proteína reportera que impide el transporte libre a través de plasmodesmos. Se observó la acumulación de GFP-GUS en floema principal e interconectante principalmente (Figura 35).

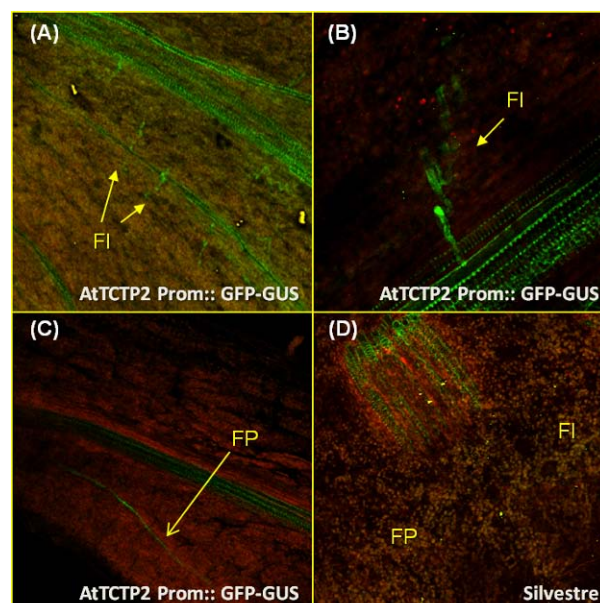


Figura 35. Patrón de expresión de la región promotora de AtTCTP2. Se analizaron 3-4 muestras biológicas de 3 líneas F1/F2 contiendo la construcción de análisis de la región promotora. (A-B) Se observa la presencia de señal en lo que parece ser Floema Interconectante (FI). (C) En algunos casos se observó la señal en el Floema Principal (FP). (D) En el control silvestre se detectó señal fluorescente basal.

7.3.2 Análisis de los sitios de expresión de la región promotora de *AtTCTP2* a nivel tisular

Se determinaron el patrón de expresión de la región promotora de *AtTCTP2* mediante análisis histoquímico utilizando el sustrato cromógeno X-Gluc.

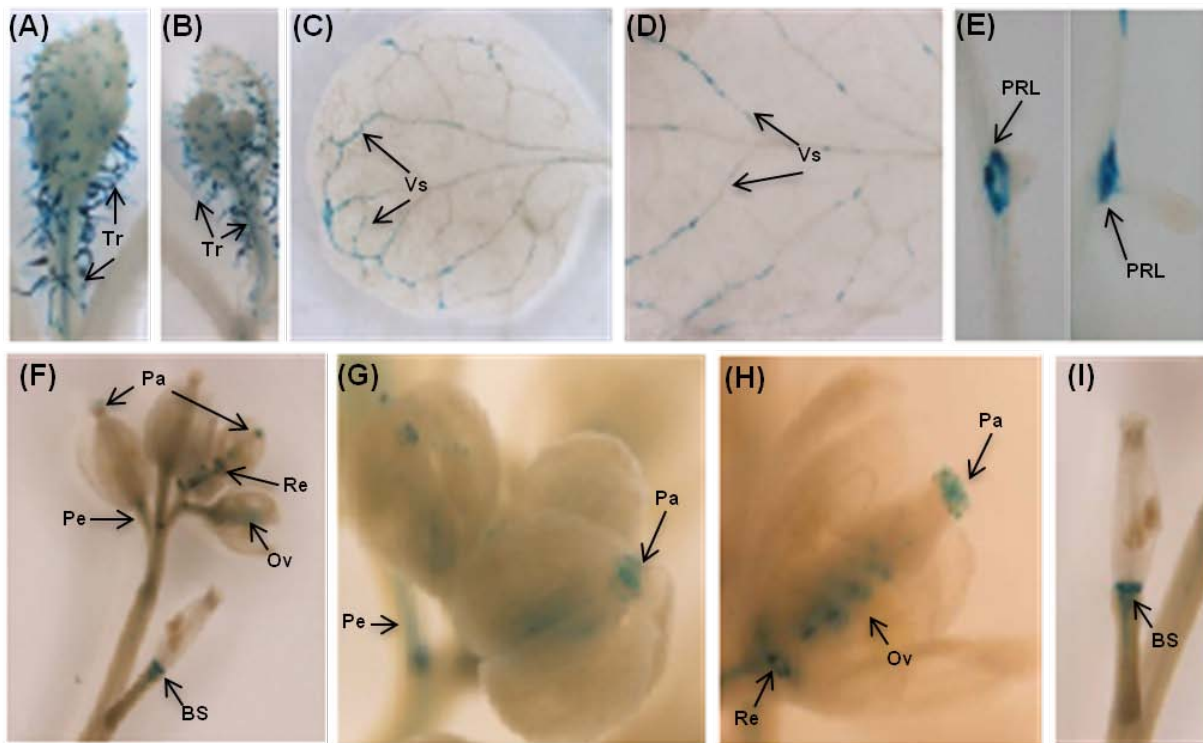


Figura 36. La región promotora de *AtTCTP2* muestra un patrón de expresión distintivo. El análisis histoquímico de tejidos de *Arabidopsis* expresando la región 1.5 Kb río arriba de codón de inicio de *AtTCTP2* dirigiendo la expresión de GFP-GUS. La actividad de GUS fue detectada en tricomas (Tr) en hoja de (A) roseta y (B) caulinares; (C-D) en venas secundarias (SV); (E) además en primordios de raíces laterales (PRL) durante la formación de éstas. (F) La señal fue encontrada en flores, (G-H) particularmente en papillas (Pa), óvulos (Ov), receptáculos (Re) y pedúnculos (Pe); así como en (I) la base de silículas (BS), pero no en pétalos.

7.3.3 Cuantificación de los niveles endógenos de expresión de *AtTCTP2* en plantas silvestres de *Arabidopsis*.

Se midieron los niveles de ARNm tanto de *AtTCTP2* como de *AtTCTP1* en los diferentes tejidos de plantas silvestres de *Arabidopsis*. Los niveles de *AtTCTP2* en comparación con los de *AtTCTP1* son muy bajos, sin embargo se mantienen en un nivel por encima del basal, e inclusive hay tejidos (como tallo u hoja caulinar) en donde los niveles son altos si se les compara con la expresión en hoja de roseta. Para *AtTCTP1* se observaron niveles del transcrito relativamente homogéneos entre todos los tejidos.

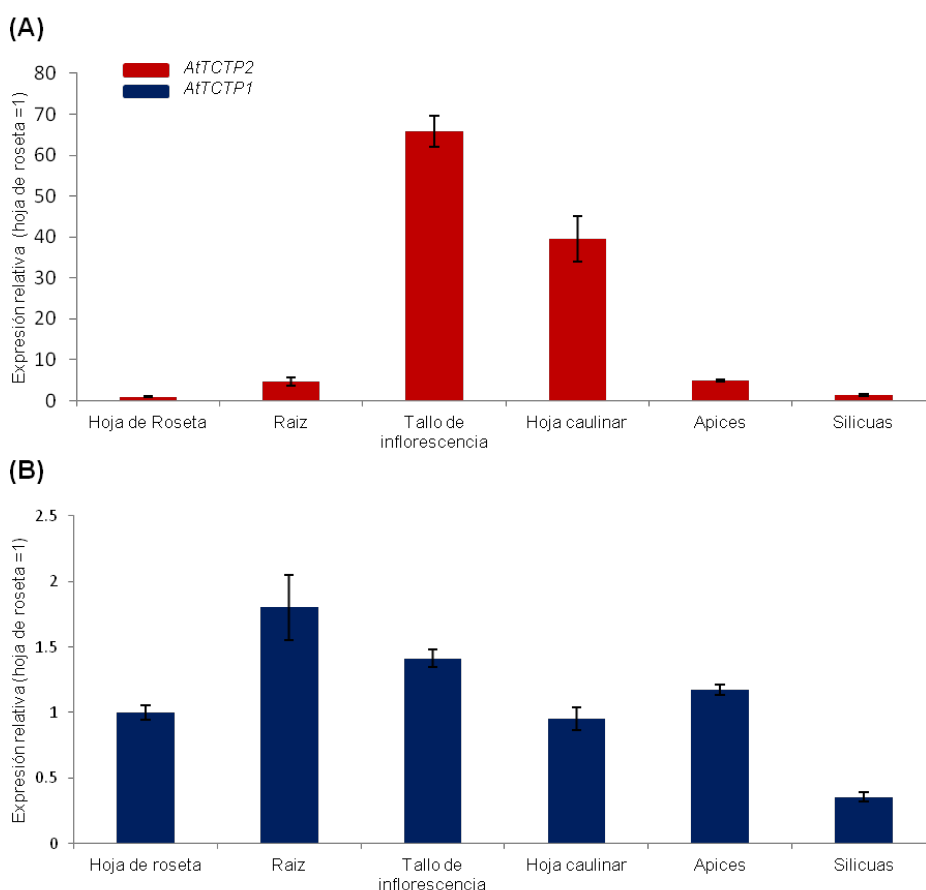


Figura 37. Análisis cuantitativo de la expresión de *AtTCTP2* y *AtTCTP1* en diferentes tejidos. El ARNm de *AtTCTP2* se acumula a niveles más altos en tallos de inflorescencia y hojas caulinares, mientras que para *AtTCTP1* los niveles fueron similares en todos los tejidos. La cuantificación de ambos transcritos en cada tejido fue relativa a la expresión en hoja y primero normalizada contra el gen de referencia (18S); tres replicas técnicas por muestra y tres muestras biológicas fueron usadas por cada tejido analizado \pm DE.

7.3.4 Análisis cuantitativo de las variaciones en niveles de expresión de *AtTCTP2* y *AtTCTP1* bajo tratamiento térmico.

Tomando en cuenta los niveles de expresión tan bajos de *AtTCTP2*, se decidió analizar si la estructura secundaria del ARN podría ser la razón de la pobre detección de este transcrito. Por tal motivo, una vez extraídos los pools de ARN de cada muestra, se llevaron a una misma concentración y se separaron en 2. Una muestra de ARN no fue tratada, mientras que la otra fue tratada térmicamente previa a la detección por qRT-PCR tiempo real. La comparación cuantitativa de ambas muestras nos sugiere que el transcrito *AtTCTP2* posee una estructura secundaria intrincada que le impide normalmente ser detectado.

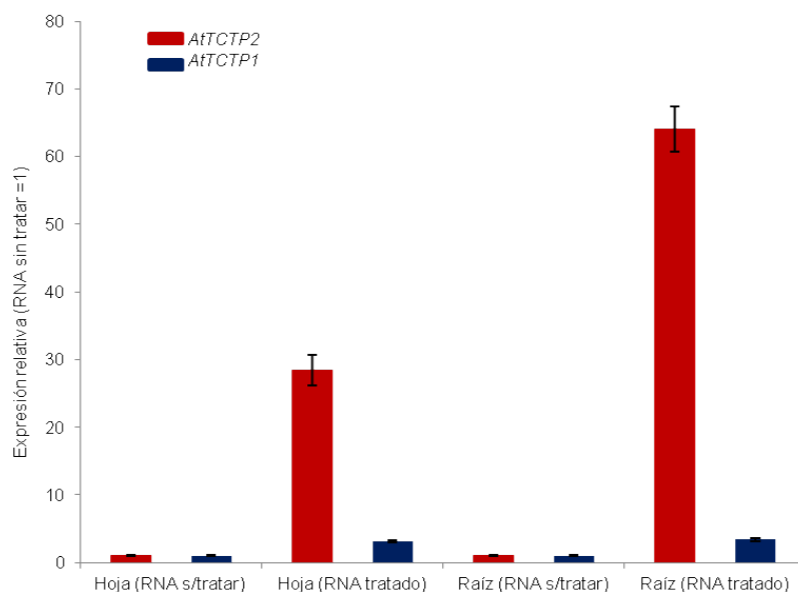


Figura 38. El ARNm de *AtTCTP2* posiblemente posee un alto grado de estructura secundaria. Se extrajo ARN total de diferentes muestras de plantas (hojas y raíces) y se trató este ARN a 72°C durante 10 min para inmediatamente ser sometidas a qRT-PCR para la cuantificación de *AtTCTP2* y *AtTCTP1* y comparar estos con las muestras de ARN de las mismas muestras sin tratamiento térmico. Los niveles de *AtTCTP2* incrementaron 28 veces en hojas y 64 veces en raíces después del tratamiento térmico del ARN, en contraste con el incremento de solo 3 veces para *AtTCTP1* en ambas muestras de tejido. Se llevaron a cabo 3 replicas técnicas por cada una de las 3 replicas biológicas analizadas \pm DE.

7.3.5 Identificación de perfiles de respuesta transcripcional de AtTCTP2 y AtTCTP1 bajo distintos inductores externos.

Se complementaron los ensayos de cuantificación con la determinación de las variaciones en expresión de ambos genes de TCTP en Arabidopsis para poder identificar si existían diferencias en la respuesta transcripcional ante diversos inductores. Se sugiere que la transcripción de AtTCTP2 se reprime mientras que la AtTCTP1 se induce o se mantiene en respuesta a los inductores hormonales. Mientras que respecto a los demás inductores las respuestas son variables. Sin embargo, en general podemos indicar que ambos genes presentan diferentes perfiles de respuesta transcripcional (Figura 39).

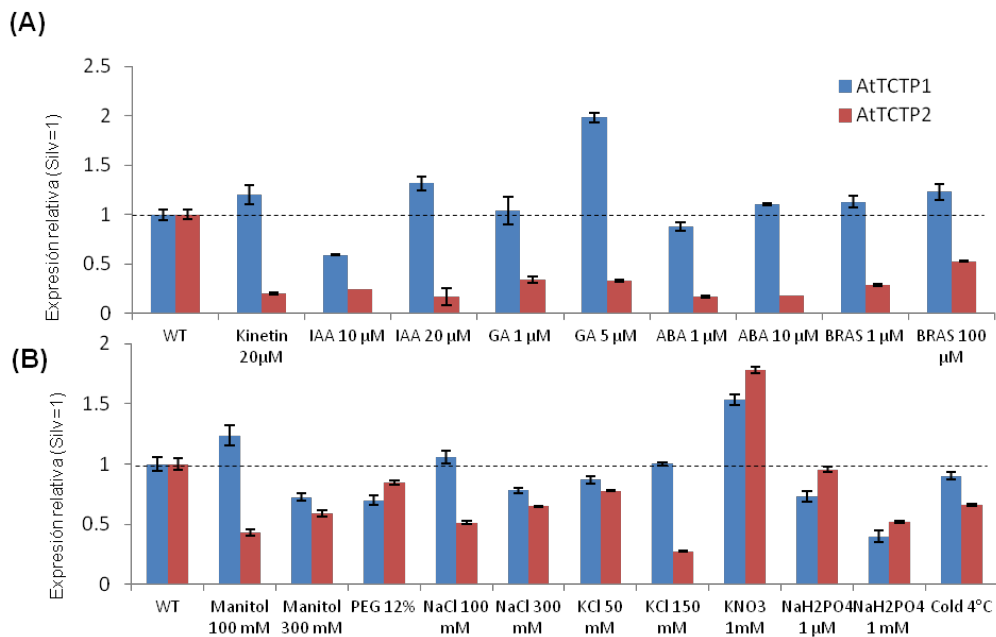


Figura 39. Efecto de diferentes tratamientos sobre los niveles de ARNm de AtTCTP2. La respuesta transcripcional fue determinada por qRT-PCR en tiempo real. (A) Niveles de ARNm de AtTCTP2 (rojo) y AtTCTP1 (azul) en respuesta a la adición exógena hormonal [Kinetin (citocinina), IAA (auxina), GA (giberelina), ABA (ácido abscísico), BRAS (brasiñoesteroide)]. (B) Niveles transcripcionales de AtTCTP1 Y AtTCTP2 en respuesta a varios sustratos exógenos [manitol (estrés osmótico) y PEG (sequía)], sales [NaCl, KCl (estrés salino)], nutrientes minerales [NaH₂PO₄-concentración de fosfatos] y frío [4°C (estrés por bajas temperaturas)]. En casi todos los casos, se probaron dos diferentes concentraciones y se llevaron a cabo 3 réplicas biológicas independientes por muestra (pools de 3 plantas); cada muestra fue analizada por triplicado (replicas técnicas) y los resultados graficados junto con la desviación estándar (\pm DE).

7.4 Descripción y análisis del papel de AtTCTP2 en la proliferación y diferenciación celular.

7.4.1 Cinética de crecimiento de callos de tabaco transformados con 35S::AtTCTP2-GFP

Se llevó a cabo la cinética de crecimiento, en peso seco, de los callos de tabaco (línea NT1) transformados con la construcción de sobreexpresión de AtTCTP2-GFP comparados con los callos control (vector vacío). Durante las primeras dos semanas no se encontró diferencia significativa alguna entre ambos. Sin embargo, hacia la tercera semana se observó un incremento en el peso de los callos transgénicos respecto a los callos control de aproximadamente 25-30 %. Lo anterior sugiere que AtTCTP2 induce de alguna forma la acumulación de biomasa, lo cual de manera indirecta sugiere asociación con la proliferación celular.

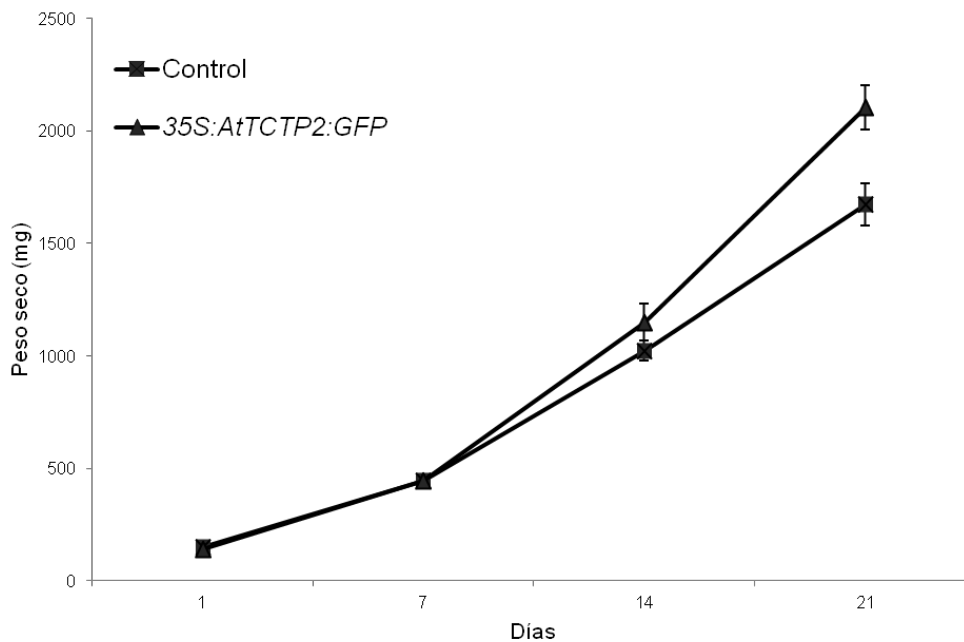


Figura 40. AtTCTP2 induce la acumulación de biomasa en callos de tabaco (NT1). La cinética de crecimiento en peso seco fue seguida por 21 días después de la transformación con ambas construcciones (35S::AtTCTP2-GFP; control) tomando un total de 30 callos por cada una. En cada punto se eligieron 6 callos aleatoriamente para establecer cada uno de estos. Desviación estándar esta además graficada en cada punto (\pm DE).

7.4.2 Análisis de la capacidad de inducción de regeneración de plantas de tabaco mediante AtTCTP2.

Este ensayo fue diseñado para identificar de las dos versiones de TCTP de Arabidopsis cuál era capaz de inducir diferenciación celular. Los resultados del ensayo de regeneración de plantas indican que al transformar los explantes de tabaco con una construcción que sobreexpresa a AtTCTP2 se regeneran 40% de los explantes transformados mientras que la versión de sobreexpresión de AtTCTP1 se comportó como el control (*A. rhizogenes*-K599) induciendo únicamente raíces. Las versiones no traducibles de ambas TCTP (35S::stop AtTCTP2 ORF-GFP y 35S::stopAtTCTP1 ORF-GFP) no indujeron la regeneración de plantas (Tabla 5).

Tabla 5. Porcentajes de regeneración inducidos por la sobreexpresión de AtTCTP2 comparada con AtTCTP1.

<i>Construcción</i>	<i>% de Regeneración [regeneradas/explantes]</i>	<i>Numero de eventos transgénicos por explante</i>
<i>Control (K599)</i>	<i>0% [0/350]</i>	<i>0</i>
<i>35S:AtTCTP2 locus-GFP</i>	<i>40% [140/350]</i>	<i>4.5 + 0.5</i>
<i>35S:AtTCTP1 ORF-GFP</i>	<i>0% [0/350]</i>	<i>0</i>
<i>35S:stopAtTCTP2 ORF-GFP</i>	<i>2% [2/100]</i>	<i>0</i>
<i>35S:stopAtTCTP1 ORF-GFP</i>	<i>1%[1/100]</i>	<i>0</i>

Los fenotipos observados en las plantas regeneradas fueron prácticamente los mismos observados en plantas silvestres. No se observó alguna aberración o malformación en estas plantas regeneradas (Figura 41).

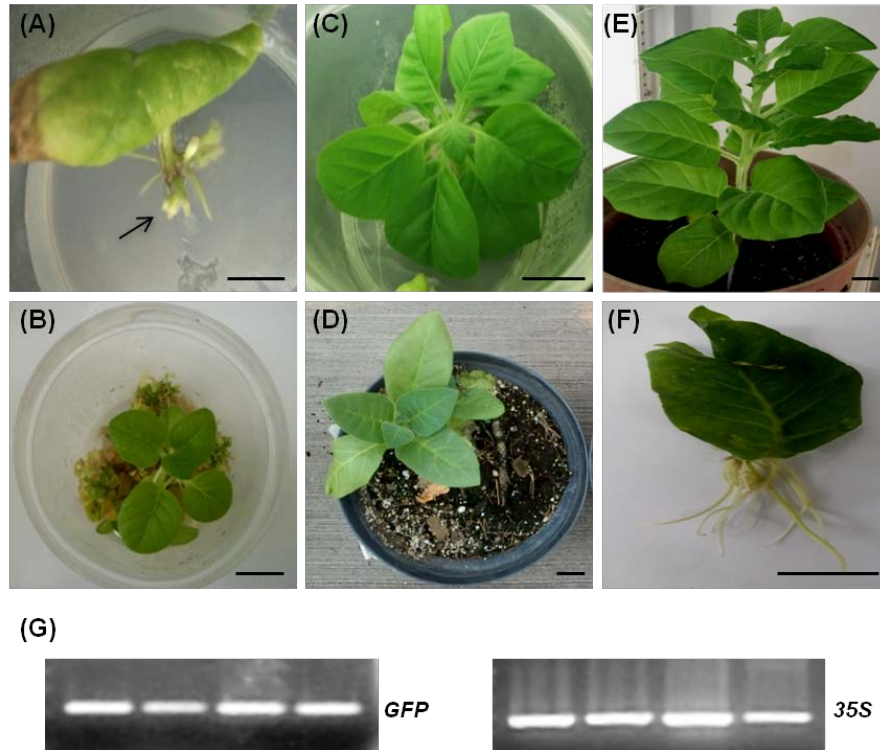


Figura 41. La inoculación de explantes de tabaco con *A. rhizogenes* conteniendo a *AtTCTP2* induce la regeneración de plantas. Imágenes representativas de la regeneración de tabaco a los (A) 15, (B) 30 y (C) 45 días después de la transformación de los explantes con la construcción de sobreexpresión de *AtTCTP2* contenida en *A. rhizogenes*. Por otro lado, se muestran los ejemplos representativos de plantas regeneradas trasplantadas a suelo a los (D) 50 y (E) 90 días posteriores a la transformación de los explantes. (F) *A. rhizogenes* conteniendo a *AtTCTP1* solo indujo la generación de raíces pero no regeneración de plantas. Barras de tamaño= 2cm. (G) PCR punto final para detección de la presencia de los transgenes GFP y 35S en las plantas representativas.

Por otro lado, una vez que se había determinado la capacidad de *AtTCTP2* de inducir la diferenciación celular para dar paso a la regeneración de plantas completas de tabaco se decidió probar con diferentes versiones de sobreexpresión de *AtTCTP2*, en las que se utilizó a 35S como promotor constitutivo fuerte para dirigir la expresión del locus genómico y el marco de lectura abierto (ORF) fusionados o no a GFP. Se encontró que no existían diferencias significativas entre las diferentes versiones de *AtTCTP2* probadas (Figura 42). Aunque al analizar la progenie de estas, se encontró un aumento de tamaño en las primeras etapas de desarrollo mientras que hacia las etapas posteriores el crecimiento se equiparó en todos los casos (Figura 43).

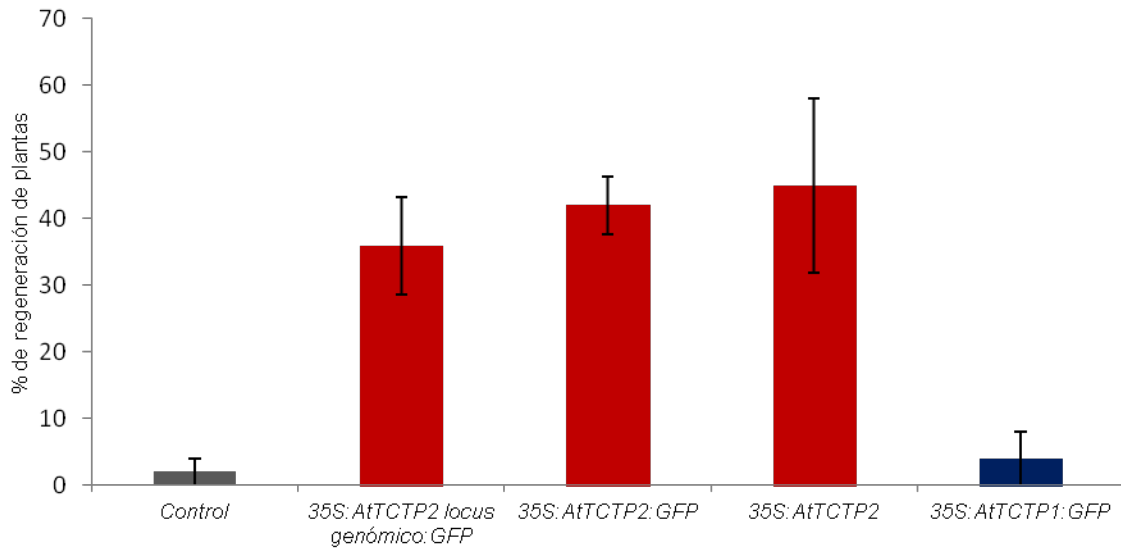


Figura 42. Capacidad regenerativa de diversas versiones de sobreexpresión de AtTCTP2. El ensayo fue llevado a cabo en 3 eventos de transformación independientes para un total de al menos 100 explantes (n=100). El porcentaje de regeneración fue cuantificado 30 días después de la transformación graficándose este porcentaje \pm DE.

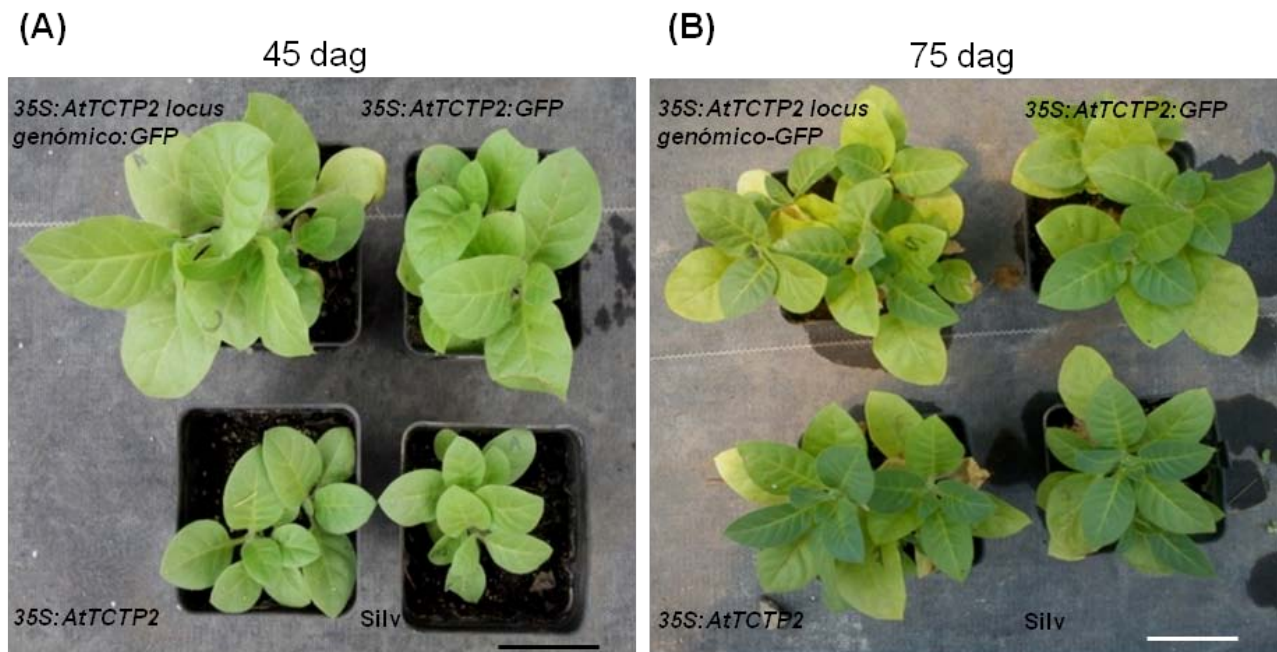


Figura 43. Análisis fenotípico de la progenie (F1) de líneas sobreexpresoras de AtTCTP2 en tabaco. (A) Plantas analizadas 45 ddg mostraron un tamaño superior comparadas con plantas silvestres crecidas en las mismas condiciones (invernadero). (B) Sin embargo, en plantas con 75 ddg, el tamaño de las plantas de las líneas transgénicas era comparable al control silvestre. Barra de tamaño= 5cm.

Como ensayo adicional se analizó la capacidad del tejido regenerado de diferenciarse a su vez en nuevo tejido, por sí solo. Para este ensayo se tomaron explantes de tejido recién regenerado y fueron transferidos a medio basal (sin reguladores de crecimiento) donde al cabo de 3 semanas se analizó la diferenciación y regeneración de nuevo tejido. De manera interesante, solo las hojas conteniendo al transgén tuvieron la capacidad de inducir la formación de nuevo tejido (Figura 44).

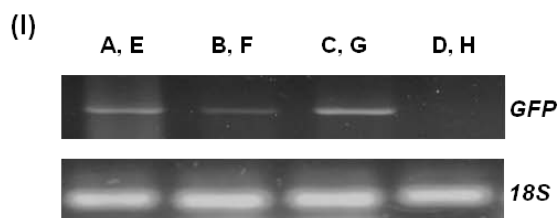
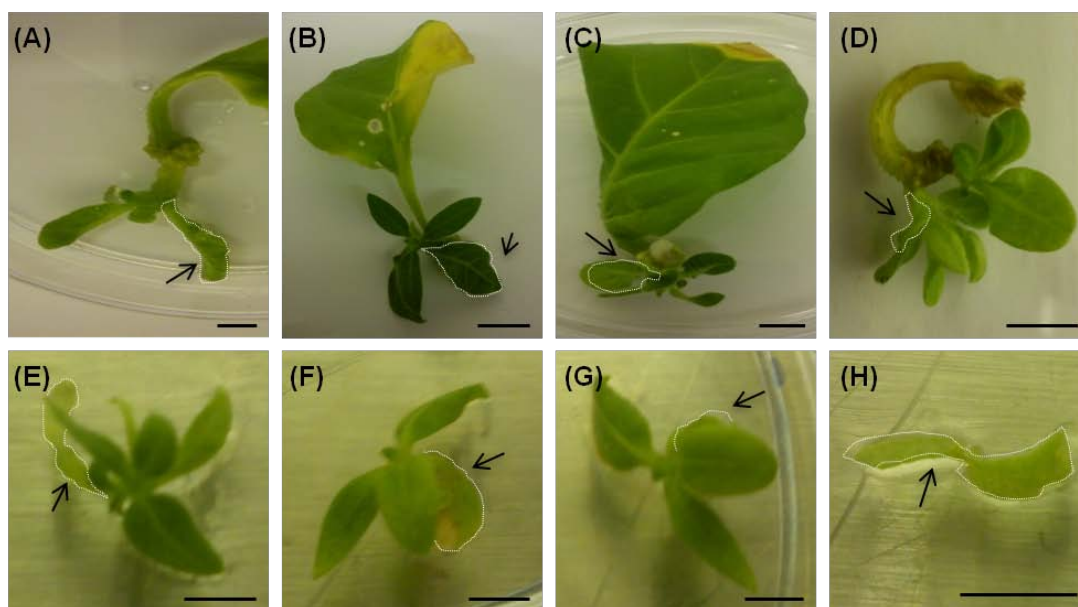


Figura 44. Autoregeneración de tejido en tabaco ocurre solo en presencia de la expresión de AtTCTP2. (A-D) Imágenes representativas de la regeneración de plantas 21 días después de transformar los explantes de tabaco con una construcción de sobreexpresión de AtTCTP2. Explantes seleccionados y transferidos a medio fresco están señalados en su circunferencia (blanco). (E-H) Fenotipos observados a los 21 días de incubación de los explantes, en donde solo 3 de 4 (en promedio) fueron capaces de regenerar. (I) Detección de transgenes por PCR punto final usando. Barras de tamaño= 1 cm.

7.4.3 Efecto de las modificaciones estructurales sobre la capacidad regenerativa.

Tomando en cuenta las diferencias a nivel de localización celular y de función entre ambas TCTP de Arabidopsis se decidió explorar el motivo de estas diferencias. Partimos de las diferencias a nivel de secuencia de aminoácidos, en donde la diferencia más notable entre ambas proteínas es una región de 13 aa que posee AtTCTP1 pero no AtTCTP2. Eventualmente se diseñaron genes sintéticos en las que se intercambió esta región de AtTCTP1 hacia AtTCTP2, y se realizaron versiones de sobreexpresión de estas. Finalmente se volvieron a realizar ensayos de regeneración encontrándose que al modificar a AtTCTP2 (agregándole la región de 13 aa) esta disminuyó su porcentaje de regeneración mientras que, en caso contrario, al modificar a AtTCTP1 (quitándole este fragmento de 13 aa) los niveles de regeneración pasaron de ser nulos a estar en un 13% en promedio (Figura 45).

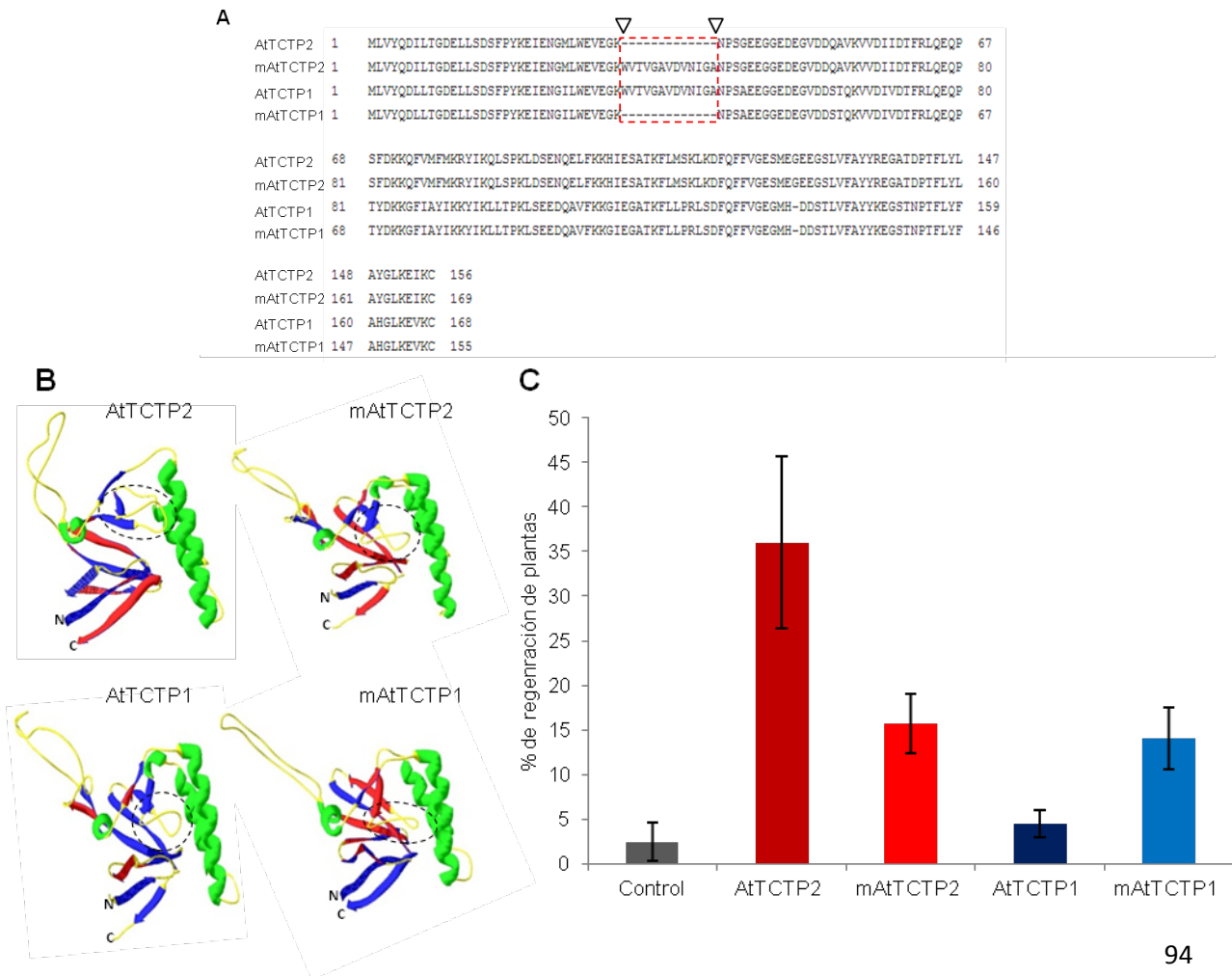


Figura 45. Intercambio de regiones aminoacídicas entre AtTCTP2 y AtTCTP1 alteró la capacidad de regeneración de ambas. (A) Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de AtTCTP2 y AtTCTP1 en sus diferentes versiones (endógena y modificada). La principal diferencia es la región de 13 aa marcada en un recuadro rojo, esta región fue intercambiada entre AtTCTP1 y AtTCTP2 para generar las versiones modificadas. (B) Estructuras predictivas 3D de las versiones (endógenas y modificadas) de AtTCTP2 y AtTCTP1 usando un modelo comparativo mediante el servidor automatizado para modelado por comparación estructural SWISS-MODEL. En los óvalos se muestra donde están localizadas las modificaciones estructurales entre las cuatro versiones. (C) La capacidad de regeneración se ve alterada cuando se modificaron ambas TCTP de Arabidopsis. La transformación se llevo a cabo con las 4 versiones antes descritas de TCTP, realizando 3 réplicas biológicas con 30 explantes por replica ($n=90$) \pm DE.

Como ensayo complementario se realizó la detección de los sitios de acumulación de las diferentes versiones de TCTP fusionadas a GFP en las versiones endógenas (Figura 46), así como en las versiones modificadas mAtTCTP2 y mAtTCTP1 (Figura 47).

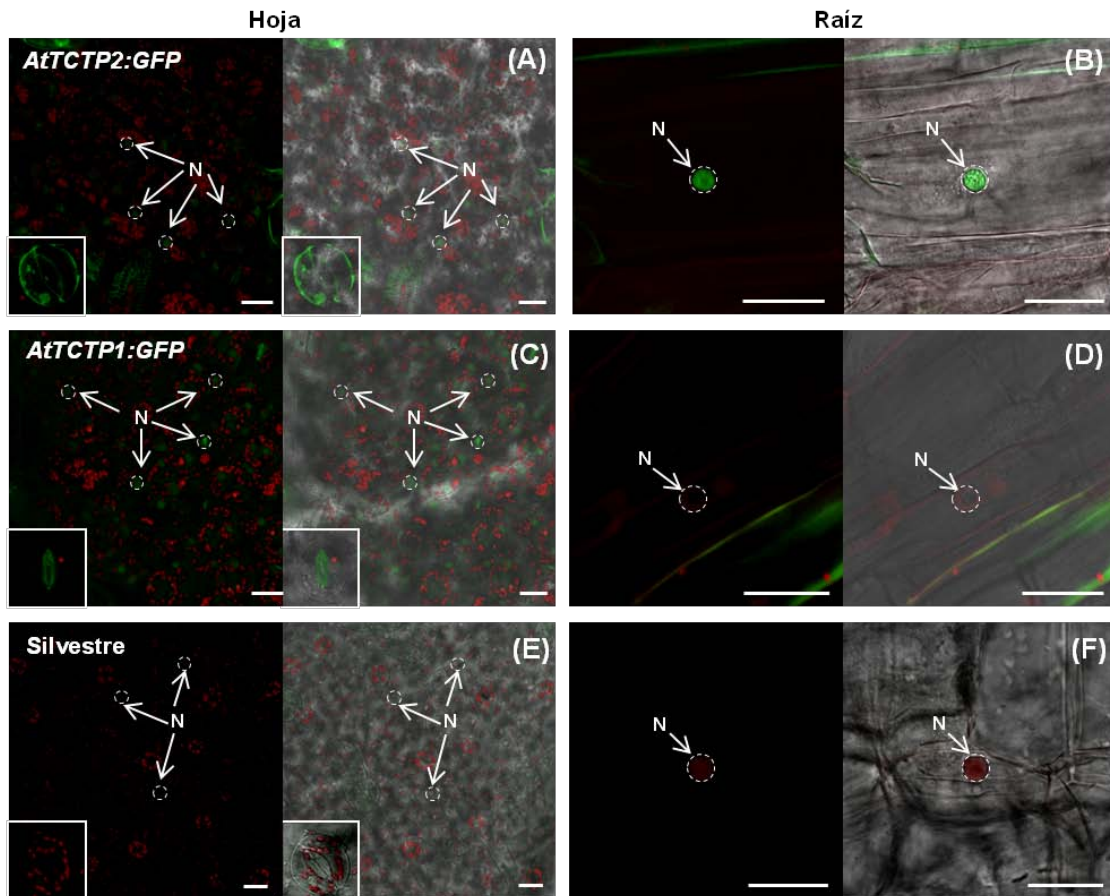


Figura 46. Patrones de localización celular de AtTCTP2 y AtTCTP1 en plantas regeneradas de tabaco. Las plantas regeneradas conteniendo las versiones endógenas de AtTCTP2 y AtTCTP1 fueron analizadas por microscopía confocal. (A-C) AtTCTP2-GFP y AtTCTP1-GFP se acumulan en estomas (esquina inferior izquierda) y núcleos (N) en hojas. (B-D) Mientras que en raíces se encontró la señal de (B) AtTCTP2-GFP asociada a núcleo, pero no la de (D) AtTCTP1-GFP. (E-F) Los controles silvestres no muestran fluorescencia en los tejidos antes descritos. Barra de tamaño= 25 μ m.

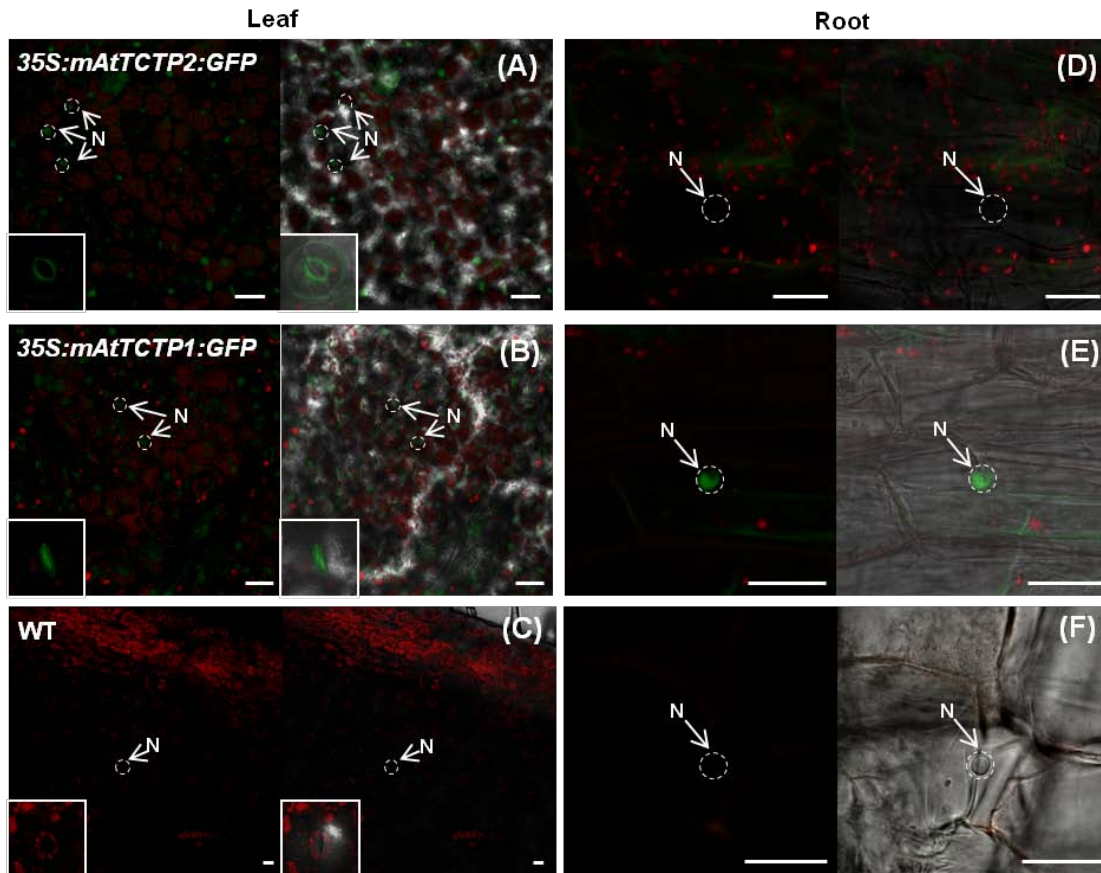


Figura 47. Los patrones de acumulación de las versiones modificadas de AtTCTP2 y AtTCTP1 se ven alterados en tejido de raíz. Las plantas regeneradas con las versiones modificadas de ambas versiones de TCTP de Arabidopsis fueron analizadas por microscopia confocal en tejido vegetativo. (A-B) La señal de GFP en hojas fue detectable principalmente en núcleo de mesófilo (flechas) y estomas (parte inferior izquierda) para ambas versiones modificadas. (D-E) En raíces el patrón de localización cambió con respecto a las versiones no modificadas (Figura 46), en donde mAtTCTP2 perdió su localización nuclear mientras que mAtTCTP1 mostró acumulación en núcleo. (C y F) Controles silvestres de ambos tejidos vegetativos (hoja y raíz). Barras de tamaño= 25 μ m.

Finalmente, como complemento a los estudios de localización se cuantificó la cantidad de núcleos conteniendo la señal de GFP en tejido de raíz para cada una de las líneas analizadas (Figura 48). La cuantificación de la señal de fluorescencia en núcleos refuerza lo observado en las imágenes de microscopia confocal.

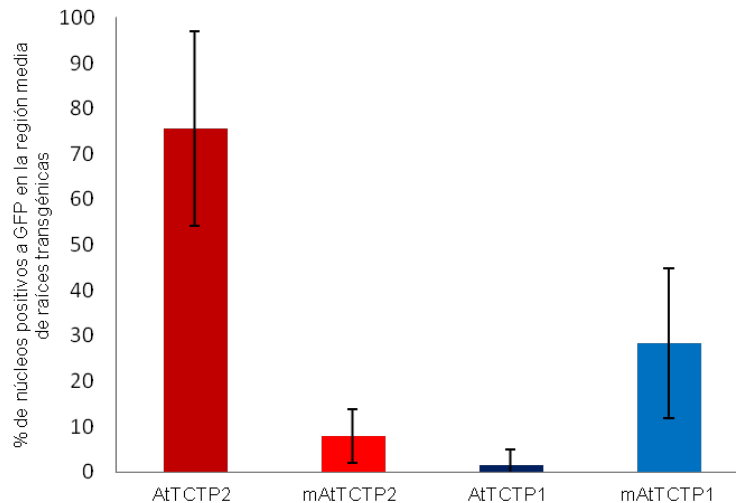


Figura 48. Cuantificación de núcleos de raíz expresando GFP en plantas de tabaco regeneradas. La visualización y conteo de los núcleos fue hecha en 3 diferentes secciones visuales para cada muestra de región media de raíz; se examinaron 3 raíces por muestra y 3 muestras biológicas por construcción, para dar un total de $n=27 \pm$ DE.

7.5 Estudio del movimiento a larga distancia de AtTCP2 en forma de ARNm y/o proteína.

Con estos estudios se buscó identificar si AtTCP2 poseía la capacidad de movimiento a larga distancia. Lo anterior debido a que la evidencia del análisis de los sitios de expresión y localización mostraba la presencia en tejido vascular, y por ende sugería el posible transporte de AtTCP2.

7.5.1 Análisis de la capacidad de movimiento a larga distancia de AtTCTP2 mediante hetero-injertos de tabaco.

Se injertaron plantas silvestres de tabaco en plantas transgénicas, y viceversa, con el fin de determinar si AtTCTP2 fusionado a GFP se transporta a larga distancia en forma de ARNm y/o proteína.

7.5.1.1 AtTCTP2 se mueve a larga distancia en forma de ARNm

Se extrajo ARN total de muestras de portainjertos e injertos para llevar un ensayo de RT-PCR y así poder identificar el movimiento del transcrito AtTCTP2-GFP. Los resultados indican que el transcrito *AtTCTP2-GFP* es capaz de transportarse a larga distancia preferentemente desde el portainjerto al injerto (Figura 49). Además se realizó la cuantificación del movimiento del transcrito en muestras representativas de injertos mediante qRT-PCR en tiempo real, encontrándose que se mueve del 7-10% del transcrito, pero con menos del 2-3% no se pudo detectar el movimiento por RT (Figura 50).

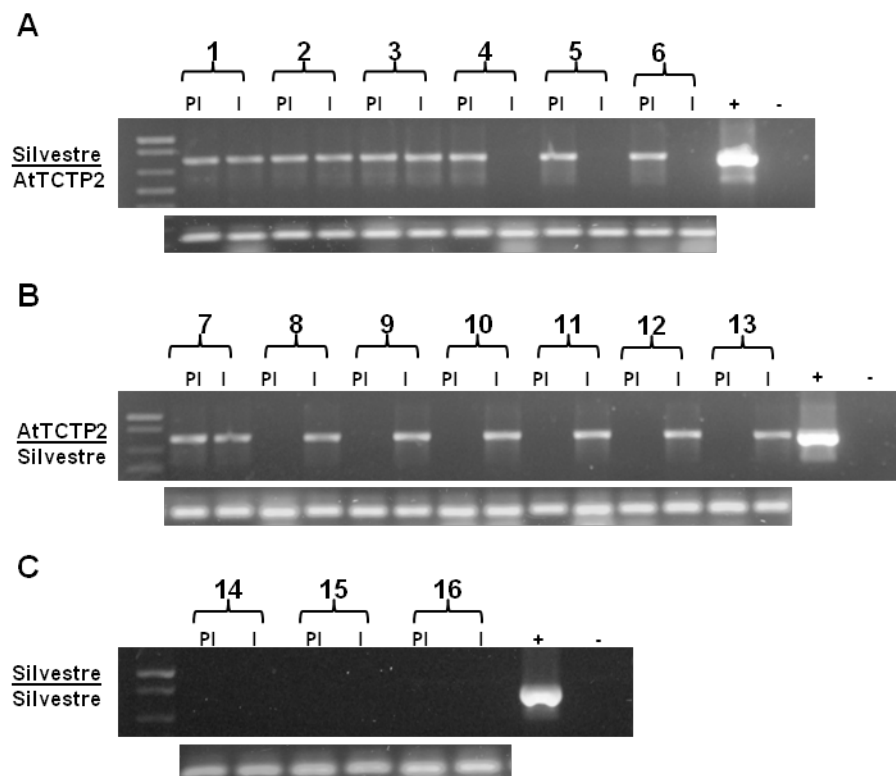


Figura 49. RT-PCR para detección del movimiento a larga distancia de *AtTCTP2-GFP* en injertos de tabaco. Se extrajeron muestras de ARN total a partir portainjertos (PI) e injertos (I) [transgénicos o silvestres] y se realizó la detección de la presencia del transcrito *AtTCTP2-GFP* mediante RT-PCR usando oligonucleótidos específicos para GFP. (A) En los heteroinjertos *AtTCTP2/silvestre* se detectó al transcrito en los injertos silvestres en la mitad de los heteroinjertos. (B) En los heteroinjertos *silvestre/AtTCTP2* solo se pudo detectar al transcrito en uno de los 7 casos analizados. (C) Los controles fueron homoinjertos *silvestre/silvestre*, en los cuales no se detectó señal tanto para portainjertos como injertos. Se utilizó a 18S como control interno para determinar la calidad del ARN extraído.

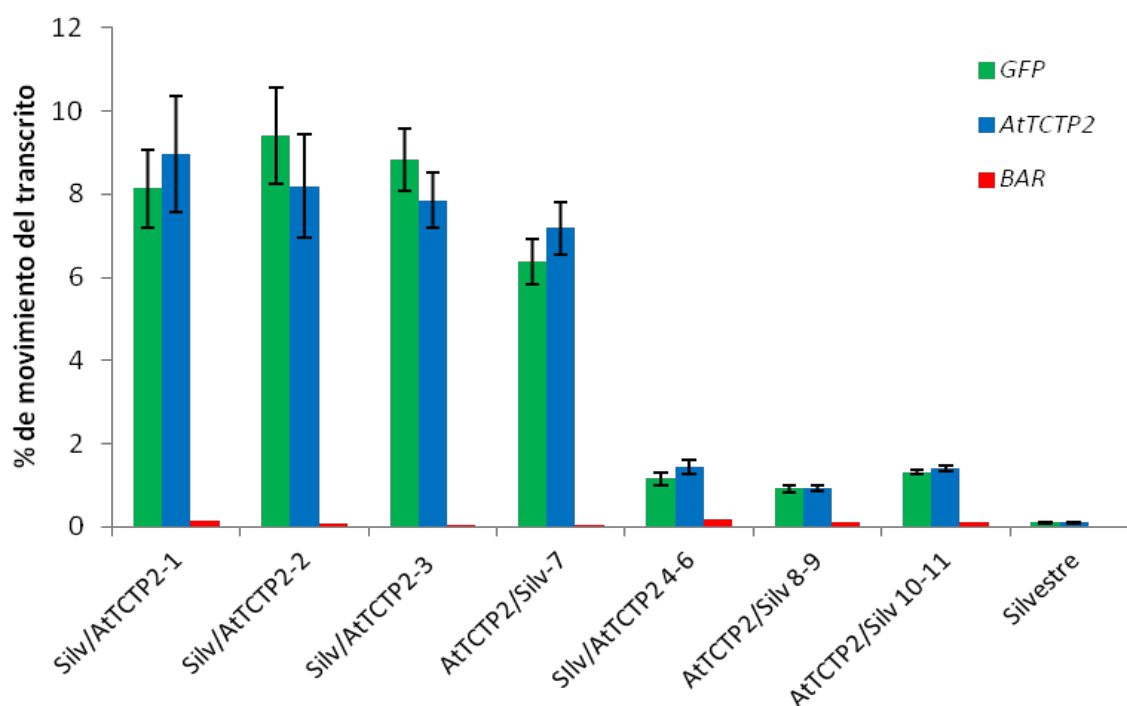


Figura 50. Cuantificación del movimiento a larga distancia de *AtTCTP2-GFP* en injertos de tabaco. Usando las mismas muestras de ARN total extraídas anteriormente, se les llevo a cada una a una concentración establecida (100 ng/ μ L) para ser usadas como templados para llevar a cabo la cuantificación de la expresión en cada muestra mediante qRT-PCR en Tiempo Real. Se realizó la detección de GFP (verde) y *AtTCTP2* (azul) por separado a pesar de estar fusionados; BAR (rojo) fue usado como control interno negativo para el movimiento del ARN; 18S fue usado como gen endógeno de referencia. El porcentaje de movimiento de cada transcrito fue calculado relacionando los cambios en la expresión (determinada por el $\Delta\Delta Ct$) entre los componentes transgénico y silvestre de cada ejemplo de injerto. Se realizaron 3 replicas técnicas en cada uno de los casos \pm DE.

7.5.1.2 AtTCTP2 se transporta a larga distancia en forma de proteína

Por otro lado, se evaluó la capacidad de movimiento de AtTCTP2-GFP en forma de proteína en los mismos ejemplos de injertos. Primero se llevó a cabo la inmunodetección mediante Western-blot de la proteína de fusión usando un anticuerpo específico contra GFP, pudiéndose encontrar la señal de AtTCTP2-GFP (50kDa) en la contraparte silvestre (injerto o portainjerto) [Figura 51]. Además, se identificó el patrón de acumulación de AtTCTP2-GFP en las muestras que dieron positivo al ensayo de western-blot para corroborar la presencia de la proteína de fusión (Figura 52). Ambos ensayos muestran la capacidad de AtTCTP2 de transportar a larga distancia en forma de proteína en muchos de los casos en donde el ARNm no lo hizo (Tabla 6).

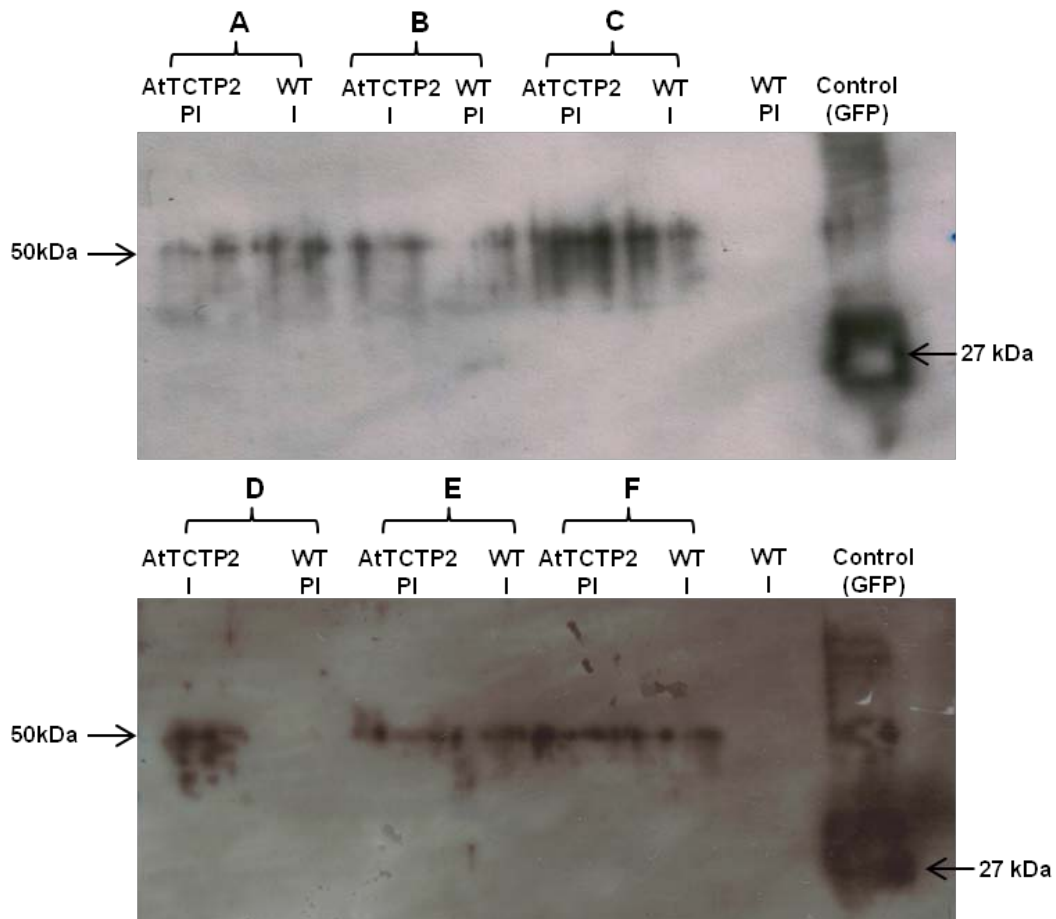


Figura 51. Capacidad de movimiento a larga distancia de *AtTCTP2-GFP* en injertos de tabaco. Se llevó a cabo un ensayo de Western blot utilizando anticuerpos específicos para GFP, que está fusionada a *AtTCTP2* en muestras de portainjerto e injertos para cada heteroinjerto analizado. (A, C, E y F) Ejemplos del movimiento de la proteína de fusión (50KDa) desde el portainjerto transgénico al injerto silvestre. (B) Único ejemplo de transporte a larga distancia desde el injerto transgénico al portainjerto silvestre. (D) Ejemplo representativo de la falta de movimiento del injerto transgénico al portainjerto silvestre. Como control negativo se usaron muestras de homoinjertos silvestre (WT) /silvestres (WT). El control positivo usado fue proteína GFP purificada con una etiqueta de histidinas (27 KDa).

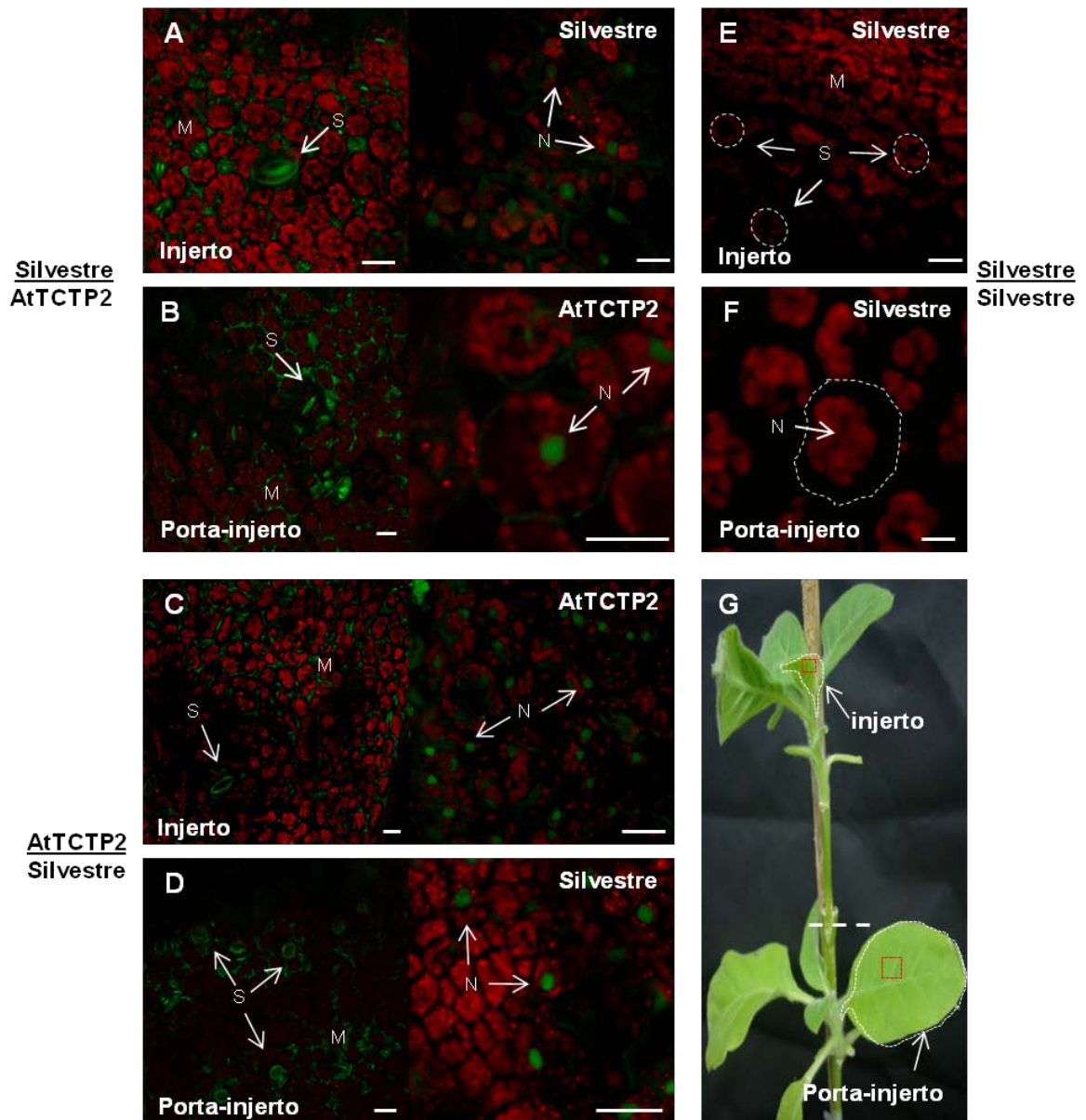


Figura 52. Identificación de los sitios de acumulación de AtTCTP2-GFP en heteroinjertos de tabaco. Mediante microscopia confocal se llevo a cabo la detección de la fluorescencia asociada a GFP fusionada a AtTCTP2. (G) Las detecciones se hicieron en hojas jóvenes cercanas a los meristemas apicales (en injertos) y en hojas bien desarrolladas (de portainjertos) para cada heteroinjerto estudiado. (A-B) Heteroinjertos WT/AtTCTP2 en donde la proteína de fusión fue identificada en ambos portainjertos e injertos en todos los casos (Tabla 6). (C-D) Heteroinjertos AtTCTP2/WT en los cuales solo se detectó señal en tanto en portainjertos como en injertos pero solo en 4 de los 7 heteroinjertos analizados. En todos los casos se observó el mismo patrón, caracterizado por la detección de señal en estomas [E], mesófilo [M] y núcleos [N]. (E-F) Homoinjerto silvestre/silvestre como controles negativos para descartar la autofluorescencia del tejido examinado. Barras de tamaño= 25 μ m.

7.5.1.3 AtTCTP2 induce la formación de raíces aéreas

Aunado a los estudios de detección del transporte del ARNm y proteína se observó la aparición de raíces secundarias en los sitios cercanos a la región de contacto de los heteroinjertos (Figura 53). Cabe recalcar que la aparición de estas raíces aéreas solo se observó en aquellos injertos en donde se detectó el movimiento de la proteína de fusión AtTCTP2-GFP (Tabla 6). Por otro lado, el patrón de localización de AtTCTP2-GFP en la raíces transgénicas y aéreas fue básicamente el mismo, específicamente en núcleos y primordios de raíces laterales (Figura 54).

Tabla 6. Cuantificación del movimiento de AtTCTP2 (ARNm y Proteína)

Tipo de Injerto	Detección de ARNm (RT-PCR)	Detección de proteína (microscopía confocal)	Aparición de raíces aéreas
AtTCTP2-GFP / WT	3/6	6/6	6/6
WT / AtTCTP2-GFP	1/7	4/7	4/7
WT / WT	0/3	0/3	0/3

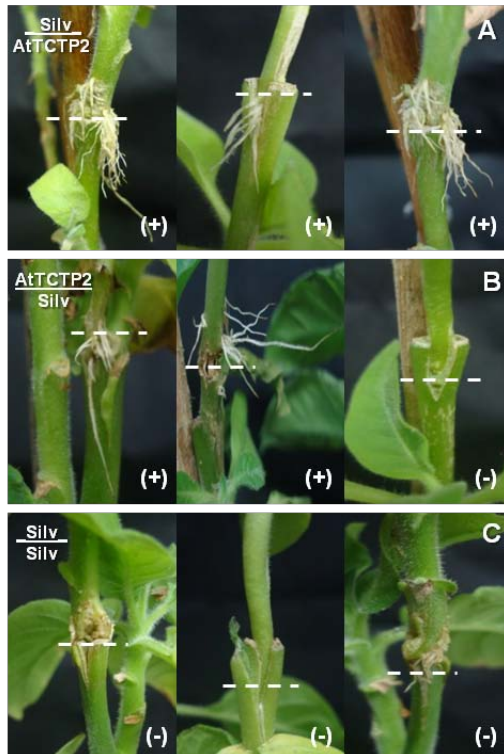


Figura 53. Aparición de raíces adventicias asociadas al transporte a larga distancia de AtTCTP2. Imágenes representativas tomadas previas a la recolección de tejido para extracción de ARN total, proteína, y microscopía confocal a los 30 días después de realizar los injertos. (A) Heteroinjertos WT/AtTCTP2 mostraron la aparición de raíces aéreas adventicias en todas las muestras, lo cual es consistente con la detección de la proteína por Western blot (Tabla 6). (B) Heteroinjertos AtTCTP2/WT en donde se muestran ejemplo positivos y negativos de la aparición de las raíces aéreas. En las muestras donde no se observó presencia de raíces tampoco se detectó la proteína. (C) Homoinjertos silvestre/silvestre control.

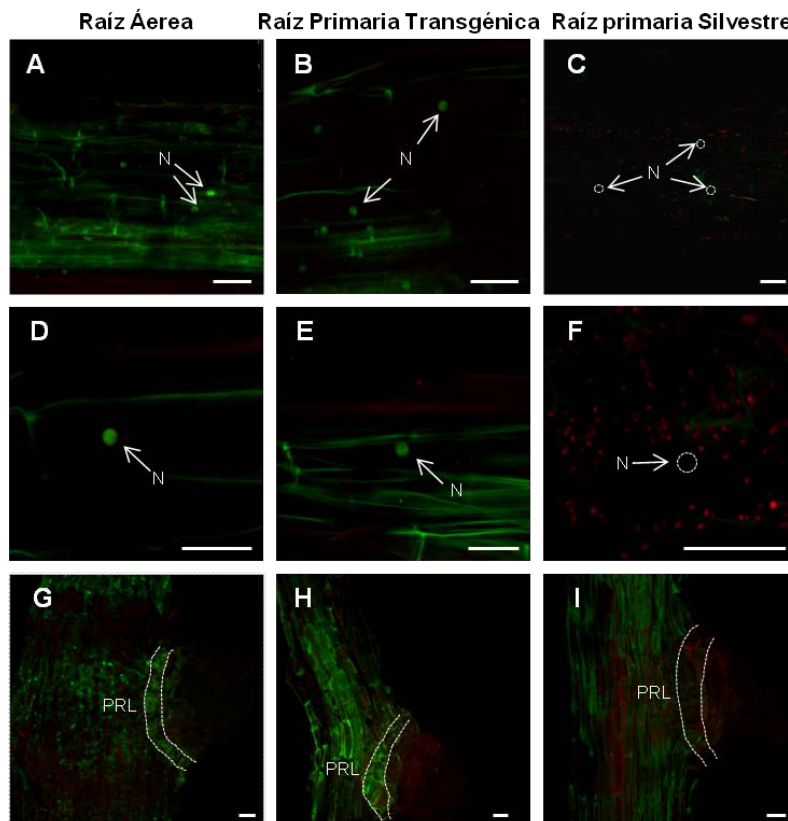


Figura 54. Comparación de patrones de localización de AtTCTP2-GFP entre raíces aéreas adventicias y raíces primarias transgénicas. La detección de la señal fluorescente de GFP fue hecha por microscopia confocal. (A-B, D-E) La localización nuclear (N) de AtTCTP2-GFP fue recurrente en todos los casos a diferencia de (C,F) los controles silvestres. (G-H) La proteína de fusión se detectó en primordios de raíces laterales (PRL), (I) a diferencia del control silvestre. Barras de tamaño= 50 μ .

7.6 Análisis *in silico* de las divergencias estructurales de TCTP vegetales

Tomando en cuenta las diferencias a nivel funcional entre AtTCTP2 y AtTCTP1, y relacionando esto con los resultados de los estudios de caracterización molecular de AtTCTP2, surgió la hipótesis de que en los organismos vegetales en donde existía más de un gen codificante para TCTP habría un “reparto del trabajo”. Es decir, se sugiere la especialización de funciones de esta proteína multifuncional, basándonos en lo encontrado en las funciones encontradas para Arabidopsis (Toscano-Morales *et al.*, en revisión) y Calabaza (Hinojosa-Moya *et al.*, 2013), así como en las diferencias a nivel estructural. Básicamente se propuso la clasificación de los genes TCTP en plantas en dos grandes grupos: el clado AtTCTP1 y el clado CmTCTP, en donde podría inferirse la función de estas a partir esta clasificación grupal. Primero se estableció como criterio de selección de secuencias, solamente usar en donde el genoma de la planta estaba secuenciado (Phytozome), y se depuraron estas mediante comparaciones con otras bases de datos (BLAST NCBI), resultando un total de 59 secuencias (Figura 55)



Figura 55. Número de secuencias de TCTP por especie vegetal analizada.

El primer enfoque para analizar estas secuencias fue el analizar filogenéticamente las secuencias de aminoácidos que conforman a las diferentes TCTP de diversos grupos vegetales, con el fin de obtener información evolutiva. Para este caso se utilizó la secuencia de la alga roja *C. merolae*, el cual representa una secuencia derivada de eventos tempranos de ramificación, como grupo foráneo (outgroup) usado para enraizar al árbol. Sin embargo, el árbol filogenético resultante no se pudo resolver satisfactoriamente, encontrándose demasiadas politomías.

Es por esta razón se decidió analizar la región promotora de genes codificantes para TCTP en plantas, específicamente de los clados AtTCTP1 y CmTCTP, para identificar motifs comunes en sus secuencias. Ambas promotores mostraron dos motifs similares, pero difirieron en uno de los motifs encontrados (Figura 56).

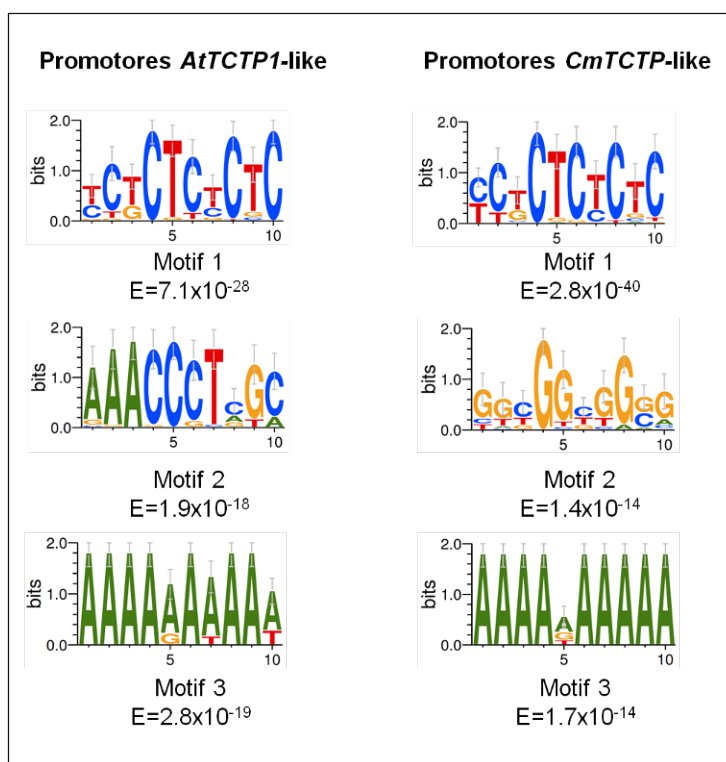


Figura 56. Análisis por medio del algoritmo MEME de promotores de TCTP de plantas. Secuencias consenso identificadas en las regiones promotoras de los clados AtTCTP1 y CmTCTP. Se muestran solo 3 motifs con los menores valores de E.

Por otro lado se analizaron las estructuras predictivas 3D de AtTCTP1 y CmTCTP, en donde finalmente se encontraron sutiles diferencias a nivel de la región bolsillo previamente reportada como importante para la probable interacción de TCTP con proteínas G, involucradas en la regulación de cascadas de señalización controlando funciones de proliferación y diferenciación celular (entre otras). Tomando en cuenta esto, se generaron las estructuras predictivas 3D de cada una de las 59 TCTPs elegidas para este estudio, encontrándose que la modificación de la estructura en forma de bolsillo antes descrita se hallaba en varias de las secuencias analizadas (Figura 57). Finalmente, esta última observación nos permitió clasificar a las diferentes TCTPs vegetales en dos grandes grupos: el clado AtTCTP1 y el clado CmTCTP.

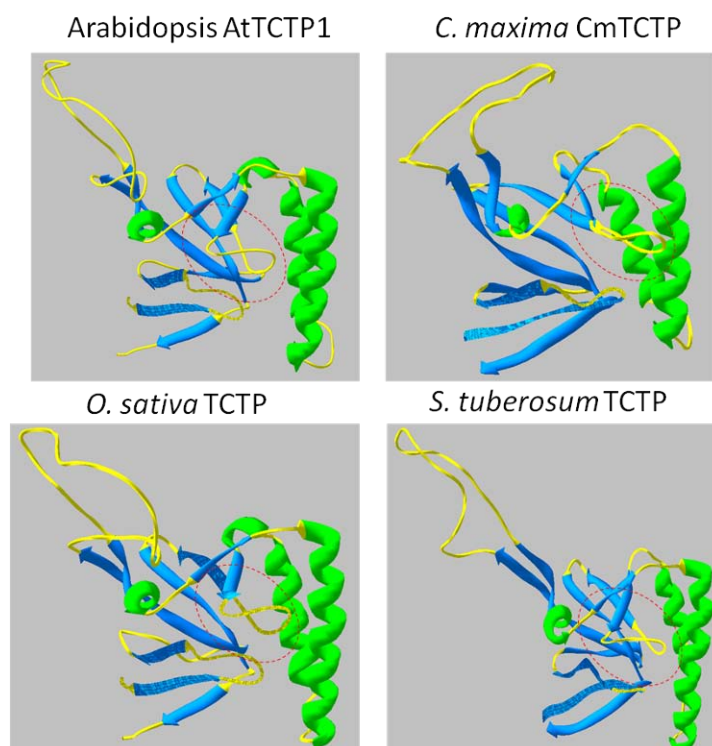


Figura 57. Comparación estructural de TCTPs vegetales. La estructura en forma de bolsillo (líneas rojas) es el sitio divergente entre varias de las versiones de TCTP analizadas, incluyendo a AtTCTP1 y CmTCTP (Arriba). (Abajo) Se muestran dos ejemplos (arroz y papa) de la clasificación estructural propuesta. La TCTP de arroz (OsTCTP) es más similar estructuralmente a AtTCTP1 mientras que la versión de TCTP de papa (StTCTP) es más similar a CmTCTP.

Tabla 7. Clasificación estructural de TCTP en plantas

Organismo	Clado AtTCTP1	Clado CmTCTP
<i>C. subellipsoidea</i>	C-169_65285	
<i>C. meroleae</i>	CMQ113C	
<i>P. patens</i>	*XP_001758666	*XP_001757363
<i>S. moellendorffi</i>	179722	
<i>O. sativa</i>	Os11g43900	
<i>B. distachyon</i>	Bradi4g10920	
<i>S. bicolor</i>	XP_002453140	
<i>Z. mays</i>	GRMZM2G108474_T01	
<i>S. italica</i>	Si026772m	
<i>A. coerulea</i>	Aquca_003_00740	Aquca_017_00176 ; Aquca_035_00202
<i>P. virgatum</i>		Pavirv00039226m
<i>S. tuberosum</i>		PGSC0003DMT400063579
<i>S. lycopersicum</i>	Solyc01g099780.2	
<i>M. guttatus</i>	Migut.G00151	Migut.N02086
<i>V. vinifera</i>	GSVIVT01017723001	GSVIVT01031135001
<i>C. sinensis</i>	1.1g030941m	
<i>C. clementina</i>	Ciclev10006071m	Ciclev10002699m
<i>G. raimondii</i>	Gorai.005G060700	Gorai.007G300300 ; Gorai.013G126000
<i>T. halophila</i>	BAJ33998	10022380m
<i>B. rapa</i>	Bra022172	Bra001637
<i>A. lyrata</i>	XP_002885160	XP_002884515
<i>G. max</i>		Glyma10g29240 ; Glyma09g04950
<i>P. vulgaris</i>		Phvul.007G197200; Phvul.009G248700
<i>M. truncatula</i>	Medtr1g083350; Medtr6g071090	
<i>F. vesca</i>	mrna06814.1-v1.0-hybrid	
<i>M. domestica</i>		MDP0000164046
<i>P. persica</i>	ppa009639m	
<i>C. sativus</i>	Cucsa.253020	Cucsa.181820
<i>C. melo</i>	Melo3c006670p1	Melo3C015297P1
<i>C. lanatus</i>	Cla021747	Cla005200
<i>C. máxima</i>	N.D.	ABC02401
<i>P. trichocarpa</i>	Potri.005G024800; Potri.008G226500	Potri.010G013400
<i>L. usitatissimum</i>	Lus10033959	
<i>R. communis</i>	29726.m004052 ; 30128.m008835	
<i>M. esculenta</i>	Cassava4.1_025245m	cassava4.1_017738m ; cassava4.1_017756m

8. DISCUSION

8.1 AtTCTP2 no es un pseudogen

Como ya se ha mencionado antes, Arabidopsis posee dos genes codificantes para TCTP , AtTCTP1 y AtTCTP2, de los cuales AtTCTP1 (At3g16640) ya ha sido caracterizado molecularmente y funcionalmente (Berkowitz *et al.*, 2008; Brioudes *et al.*, 2010). Sin embargo, en estos dos estudios se denostó a AtTCTP2 (At3g05540), catalogándolo como un pseudogen debido a que fallaron en detectar al transcrito mediante ensayos de qRT-PCR, y a que la mutante de T-DNA que analizaron (SALK_010334) no mostró algún fenotipo evidente. No obstante lo anterior, los resultados mostrados en este trabajo indican lo contrario. Es decir, no solo AtTCTP2 no es un pseudogen, sino además es un gen cuyos productos son de vital importancia para el correcto desarrollo de Arabidopsis, y en general en plantas.

Los pseudogenes por definición no se expresan, o no generan productos funcionales, y por ende puede considerárseles como no esenciales para el desarrollo del organismo. Tomando en cuenta esto, y la clasificación de los pseudogenes descrita en el apartado 1.7, no se le puede considerar a AtTCTP2 como un pseudogen procesado puesto que este posee una región promotora propia con ciertos motifs similares a la región promotora de AtTCTP1 (Figura 56); tampoco es un pseudogen duplicado puesto que al parecer se necesita de ambas copias de TCTP en Arabidopsis para tener un desarrollo normal (Figuras 6 y 7); y finalmente tampoco puede considerársele un pseudogen producto de la selección natural o deriva genética debido a que esto implicaría que la inactivación de AtTCTP2 no genera ningún fenotipo, y en realidad ocurre lo contrario (Figuras 7, 28A).

Aunado a lo antes mencionado, pruebas irrefutables de que AtTCTP2 se expresa y genera productos fueron: la amplificación y clonación del marco de lectura abierto a partir de ARN, carente de intrones (Figuras 15-21), el correcto procesamiento del locus genómico de AtTCTP2 usando un promotor fuerte como 35S y el endógeno (Figura 34), la

determinación de los sitios de expresión de la región promotora (Figuras 35 y 36) y la cuantificación de los niveles endógenos del transcrito (Figura 37A). Además la evidencia funcional descrita en los ensayos de regeneración de plantas indica que la sobreexpresión de AtTCTP2 en explantes de tabaco induce la diferenciación y eventualmente la regeneración de plantas completas de tabaco, haciendo evidente la funcionalidad de los productos de este gen. Y por si fuera poco, los ensayos de movimiento a larga distancia indican que los productos de este gen son capaces de transportarse a larga distancia. Toda la anterior evidencia nos permite asegurar categóricamente que AtTCTP2 (At3g05540) no es un pseudogen.

8.2 AtTCTP2 es un gen esencial para el correcto desarrollo en Arabidopsis

Uno de los indicios que llevaron a pensar que AtTCTP2 era un pseudogen fue el análisis de la línea mutante insercional SALK_010334, la cual tiene la peculiaridad de poseer la inserción del T-DNA en un intrón dentro del marco de lectura abierto, por lo que parecería esta una explicación del por qué no se observó un fenotipo marcado. Por nuestra parte, ya se contaba con análisis previos de otra línea de interrupción del gen AtTCTP2, SALK_045146, en donde el T-DNA se insertó en un exón de este gen (Figura 7).

En el presente estudio se llevó a cabo el análisis *in vitro* de la línea de knock-out SALK_045146, en donde se encontró un fenotipo letal en las mutantes homocigotas el cual estaba caracterizado por el retraso en el desarrollo y eventual necrosis de la planta, mientras que las líneas heterocigotas presentaban también un retraso en el crecimiento en muchos de los casos pero sobrevivían (Figura 28). De manera interesante, al hacer el mismo estudio fenotípico comparativo en suelo, no se pudo identificar ninguna planta homocigota y se observó una amplia gama de fenotipos en las líneas heterocigotas, las cuales estaban caracterizadas principalmente por cierto grado de retraso en el desarrollo (menor tamaño del área de roseta y menor número de hojas (Figura 28B y 28C).

De manera interesante, al cuantificar los niveles de expresión de *AtTCTP2* y *AtTCTP1* en varias de las líneas heterocigotas con esta variedad de fenotipos, se encontró una relación inversa entre los niveles de transcrito *AtTCTP2* y el fenotipo observado. Es decir, a menor cantidad del ARNm de *AtTCTP2* se observaba un fenotipo más severo. Y aunado a esto, los niveles de expresión de *AtTCTP1* en estas mutantes nunca disminuyeron, sino que incluso aumentaron. Lo anterior revela que la severidad de los fenotipos observados está asociada directamente a los niveles de *AtTCTP2*, y no se ven afectados por alguna modificación en la expresión de *AtTCTP1* (Figura 29).

Con el fin de descartar que los fenotipos descritos anteriormente estuvieran asociados a alguna otra mutación se realizó la cuantificación del número de copias usando DNA genómico de plantas heterocigotas de la línea SALK_04514 y como control el DNA genómico de plantas silvestres. Los resultados de este estudio indican que en las líneas heterocigotas solo hay una inserción de T-DNA a diferencia de las líneas silvestres en donde no se detectó ninguna (Figura 30), pero que a pesar de que en algunas de estas plantas heterocigotas se observa retrasos en el crecimiento no se ve afectado su estado fisiológico general (Figura 31).

Finalmente para evaluar el papel de *AtTCTP2* en el desarrollo se obtuvieron líneas de silenciamiento de ambos genes de TCTP de *Arabidopsis*. De manera interesante, en ambos casos observamos fenotipos severos al disminuir los niveles de expresión de *AtTCTP2* y *AtTCTP1* en un 40% y 55% aproximadamente. Curiosamente, *AtTCTP1* se sobreexpresa en la línea de silenciamiento de *AtTCTP2*, y viscerversa, sugiriendo que la planta de alguna forma intenta compensar la ausencia de una versión con la sobreexpresión de la otra.

Los resultados de los análisis del knockout y knockdown de *AtTCTP2* nos brindan suficiente información para aseverar que este gen y sus productos génicos son fundamentales para el correcto desarrollo en *Arabidopsis*.

8.3 Los sitios de expresión y acumulación de AtTCTP2 sugieren su transporte por el tejido vascular.

Al analizar la región promotora de AtTCTP2 dirigiendo la expresión de GFP-GUS mediante microscopias confocal se observa claramente la expresión de AtTCTP2 en tejido vascular, específicamente en floema principal así como interconectante (Figura 35). Esto se corroboró al analizar el patrón de expresión de esta construcción mediante la reacción histoquímica para detectar la actividad de GUS en venas secundarias. Además se encontró un patrón peculiar caracterizado por la detección de señal en tricomas, pedúnculos, papillas, receptáculos y óvulos, esta última indicando un rol probable en la embriogénesis. Aunado a esto se detectó señal específicamente en la región basal que está dando lugar al primordio de la raíz lateral (Figura 36).

Por otro lado, nos pareció importante identificar los patrones de acumulación de la proteína. Para esto se probaron con diferentes versiones de AtTCTP2 (locus y ORF) usando el promotor 35S o el propio promotor endógeno de AtTCTP2. Curiosamente en todos los casos se encontró el mismo patrón de localización caracterizado por la presencia de AtTCTP2-GFP en estomas, tricomas y mesófilo en hojas, así como en núcleo en raíz, mientras que para AtTCTP1-GFP no se observó señal nuclear en raíz (Figura 34). Resulta interesante la presencia de AtTCTP2 en núcleo a diferencia que AtTCTP1, sobre todo si se toma en cuenta que ninguna versión de TCTP contiene señal de localización nuclear (Kuchler y Thorner, 1992), lo cual nos permite especular que probablemente las pequeñas diferencias a nivel de estructura entre ambas TCTP de Arabidopsis influyen la interacción de estas con otras proteínas o moléculas provocando que AtTCTP2 interactúe con proteínas con destino nuclear, mientras que esto no sucede con AtTCTP1.

8.4 AtTCTP2 podría estar regulado transcripcional y traduccionalmente

Tomando en cuenta lo anterior, resulta interesante el hecho que incluso al utilizar al promotor endógeno de AtTCTP2 se reveló el mismo patrón de localización que al usar el promotor de sobreexpresión 35S. Así mismo, usando este último promotor para

sobreexpresar al locus genómico o el marco de lectura abierto de *AtTCTP2* fusionado a GFP se observó la acumulación de la proteína de fusión AtTCTP2-GFP en los mismos sitios. En conjunto estos resultados indican que probablemente *AtTCTP2* sea regulado postranscripcionalmente o traduccionalmente (Figura 34).

Por otro lado, basándonos en lo antes reportado (Berkowitz *et al.*, 2008), se realizaron ensayos de cuantificación de *AtTCTP2* y *AtTCTP1* mediante qRT-PCR en tiempo real para determinar los niveles endógenos de ambos transcritos. Para lo anterior se diseñaron oligonucleótidos específicos que abarcaran una parte de la región 3'UTR de ambos genes puesto que esta es una región bastante divergente. Los resultados indican que, a pesar de que los niveles de expresión de *AtTCTP2* son muy bajos respecto a *AtTCTP1* (Atgene expression tool), la acumulación de este transcrito es detectable en plantas silvestres de *Arabidopsis*. Los tejidos en los que se detectó mayor concentración de *AtTCTP2* fueron el tallo de inflorescencia y la hoja caulinar con niveles 60 y 40 veces superiores que en hoja de roseta, mientras que en raíces, ápices y silicuas los niveles del transcrito se mantuvieron similares a los del control de hoja de roseta (Figura 37); en contraste los niveles de *AtTCTP1* fueron similares entre todos los tejidos, tal como ya ha sido reportado (Berkowitz *et al.*, 2008).

A pesar de que los niveles de expresión de *AtTCTP2* en general son muy bajos, ya contábamos con evidencia indicando la vital importancia de los productos de este gen para el correcto desarrollo en *Arabidopsis*, como ha sido descrito para *AtTCTP1*. Sin embargo, este último gen sabemos que se expresa en todos los tejidos a altos niveles mientras que, curiosamente, *AtTCTP2* se expresa apenas a niveles muy bajos. Tomando en cuenta esto decidimos someter algunas muestras de ARN a un tratamiento térmico previo a la cuantificación por qRT-PCR en tiempo real, y encontramos que éste indujo un incremento en la detección de *AtTCTP2* respecto a las mismas muestras sin tratar. Se sugiere que el tratamiento térmico estimuló que la estructura secundaria del ARN de *AtTCTP2* adquiriera una forma menos intrincada y esto a su vez provocó que este estuviera más disponible para la detección del transcrito, observándose incrementos de

hasta 60 veces del transcrito en las muestras tratadas térmicamente respecto a las no tratadas (Figura 38). Lo anterior sugiere que probablemente la intrincada estructura secundaria de *AtTCTP2* sea el motivo principal por el cual sus niveles de expresión son tan bajos, pero que además indica la regulación a nivel transcripcional de este gen.

8.5 Existen diferencias funcionales entre ambos genes codificantes para TCTP en Arabidopsis. AtTCTP2 está relacionado a la regulación de la diferenciación celular al inducir la regeneración de plantas de tabaco

De las múltiples funciones asociadas con TCTP las que resaltan más son el papel que juega esta proteína en la regulación del crecimiento y desarrollo en eucariontes en general. TCTP en plantas no es la excepción, en donde se sabe que está involucrada en la regulación mitótica de la proliferación celular, pero al parecer no se le asocia con el crecimiento post-mitótico (Brioudes *et al.*, 2010). Tomando en cuenta lo anterior se evaluó la capacidad de *AtTCTP2* de inducir proliferación celular mediante una cinética con callos de tabaco de una línea incapaz de diferenciarse para formar nuevo tejido, encontrándose solo un 30% de incremento en la acumulación de biomasa hacia la tercer semana de la cinética, lo cual indica que al sobreexpresar a *AtTCTP2* también es capaz de inducir proliferación celular como su homólogo *AtTCTP1*, aunque no con la misma potencia que este último (Figura 40).

Por otro lado, para evaluar el efecto de *AtTCTP2* sobre la diferenciación celular se realizaron diversos ensayos de transformación de explantes de tabaco con versiones de sobreexpresión de *AtTCTP2* utilizando como vehículo de transformación a *Agrobacterium rhizogenes* (K599). De manera inesperada, todas las versiones de sobreexpresión de *AtTCTP2* promovieron la diferenciación de nuevo tejido hasta regenerar plantas completas de tabaco a diferencia de la versión de sobreexpresión de *AtTCTP1* la cual actuó como el control solamente induciendo la formación de raíces (Tabla 5).

Otro dato interesante fue que las plantas de tabaco regeneradas poseían el transgén, y a su vez dieron lugar a plantas completas con fenotipos aparentemente silvestres (Figura

41). Además la capacidad de regeneración de plantas no se vio alterada significativamente con las diferentes versiones de AtTCTP2 (Figura 42). Aunque cabe mencionar que al analizar la progenie de las plantas regeneradas, estas parecían tener un mayor tamaño que los controles silvestres durante las primeras etapas de desarrollo mientras que en etapas posteriores el tamaño de estas equiparó al de las plantas silvestres (Figura 43). Curiosamente esto concuerda con lo reportado para AtTCTP1 (Berkowitz *et al.*, 2008) y con los fenotipos de sobreexpresión de AtTCTP2 en *Arabidopsis*, en donde no se observan diferencias en cuanto a tamaño y fenotipo respecto a los controles silvestres (Figura 22). Otro resultado interesante provino del ensayo de las hojas de las plantas regeneradas, las cuales al ser escindidas y traspasadas a medio basal *in vitro*, estas promovieron la diferenciación de nuevo tejido por su cuenta, es decir, se dio la auto-regeneración a partir de tejido somático (Figura 44) lo cual sugiere que AtTCTP2 podría tener alguna función importante en la regulación de la embriogénesis somática.

Entonces, se puede aseverar que AtTCTP2 promueve la proliferación celular aunque a niveles muy inferiores a lo reportado para AtTCTP1 (Briudes *et al.*, 2010) y la versión de calabaza CmTCTP (Hinojosa-Moya *et al.*, 2013). Por su parte AtTCTP2 es capaz de inducir la diferenciación celular hasta regenerar plantas completas de tabaco tal como ha sido reportado para CmTCTP (Hinojosa-Moya *et al.*, 2013) a diferencia de AtTCTP1. Tomando en cuenta lo anterior, y sabiendo las diferencias en la respuesta transcripcional de los promotores AtTCTP2 y AtTCTP1 (Figura 39) se sugiere que existe un “reparto” del trabajo entre las dos versiones de TCTP de *Arabidopsis*, teniendo a los productos de AtTCTP1 asociados a la regulación de la proliferación celular (crecimiento mitótico) mientras que los productos de AtTCTP2 apuntan mayormente hacia la regulación de la diferenciación celular (desarrollo post-mitótico).

8.6 Existe una relación estrecha entre la estructura-localización y la función de ambas TCTP de *Arabidopsis*.

Ahora bien, habiendo evidencia clara de la existencia de diferencias funcionales entre ambas versiones de TCTP se decidió analizar cuáles podrían ser algunos de los factores preponderantes para que esto suceda. Para esto, realizamos análisis *in silico* identificando dentro de la secuencia de aminoácidos de ambas proteínas las diferencias más importantes, y encontramos que básicamente es una región de 13 aminoácidos que se encuentra en AtTCTP1 pero no en AtTCTP2, mientras que el resto de la secuencias de ambas proteínas son muy similares (Figura 45A).

Debido a esto, se diseñaron versiones modificadas de ambos genes y se mandaron sintetizar estos nuevos genes (mAtTCTP2 y mAtTCTP1), en donde le había sido removida esta región de 13 aminoácidos a AtTCTP1 e insertada a AtTCTP2. Posteriormente se obtuvieron las estructuras predictivas 3D de las versiones endógenas y modificadas de ambos genes, y curiosamente se predijo que las versiones proteicas modificadas tendrían estructuras más similares a su contraparte, es decir, la versión modificada de AtTCTP1 se parecería a la versión endógena de AtTCTP2 y viceversa (Figura 45B).

Teniendo estas predicciones a la mano, se realizaron las construcciones de sobreexpresión de estas versiones modificadas de ambos genes, y se realizaron nuevos ensayos de regeneración junto con las versiones endógenas. De manera interesante, la versión modificada de AtTCTP2 solo indujo la regeneración de un 15% de los explantes a diferencia de la versión endógena que supero el 35%, mientras que la versión modificada de AtTCTP1 sorprendentemente indujo un 13 % de regeneración en promedio a diferencia de la versión endógena que solo fue capaz de inducir menos de un 3% de regeneración de plantas de tabaco (Figura 45C).

Por su parte también se analizó la localización de ambas proteínas fusionadas cada una con GFP, encontrándose un mismo patrón de acumulación en hojas (núcleo, estomas y mesófilo) pero no así en tejido de raíz, en donde solo se detectó a AtTCTP2-GFP en núcleo y no a AtTCTP1-GFP (Figura 46). Sin embargo, en las versiones modificadas el patrón de

acumulación en raíces se vio modificado, encontrándose ahora a mAtTCTP1-GFP en núcleo y no a mAtTCTP2-GFP (Figuras 47 y 48).

Si relacionamos las pequeñas diferencias a nivel de estructura de las proteínas y de localización celular, así como a nivel de respuesta transcripcional antes diferentes estímulos, principalmente reguladores hormonales de crecimiento (Figura 39) podemos dar cierto sentido a las diferencias funcionales que encontramos en ambos genes codificantes para TCTP de Arabidopsis. Los resultados de las versiones modificadas de ambas TCTP refuerzan aún más la noción de la estrecha relación que hay entre la estructura-localización de las TCTP y la función que ejercen.

8.7 Se puede predecir la función de diversas TCTP vegetales al comparar las estructuras predictivas 3D de estas.

Habiendo encontrado cierta evidencia relacionando las estructuras predictivas de diferentes versiones de TCTP con las diferencias funcionales de estas se generó la hipótesis que en los organismos vegetales en donde hay más de un gen codificante para TCTP habría un reparto del trabajo, como en el caso de Arabidopsis (Toscano-Morales *et al.*, en revisión); mientras que en donde hay un solo gen para TCTP, como en el caso de calabaza este haría las funciones de las múltiples versiones de TCTP en otras plantas (Hinojosa-Moya *et al.*, 2013).

Se analizaron 59 secuencias de plantas cuyo genoma ha sido secuenciado (Figura 55), y se intentó hacer un análisis filogenético que eventualmente fallo en brindar información útil. Por lo tanto, se generaron estructuras predictivas 3D para cada una de las 59 secuencias mencionadas anteriormente, y se analizaron sus estructuras encontrándose sutiles diferencias en la región en forma de bolsillo relacionada con la probable interacción de TCTP con proteínas G, las cuales están relacionadas con la regulación de múltiples funciones dentro de las cuales destacan la proliferación y diferenciación celular.

Finalmente se propuso la clasificación de las diferentes TCTP en planta en dos grupos basándonos en estas diferencias estructurales predichas, dando como resultado el clado-AtTCTP1 y el clado-CmTCTP (Figura 57, Tabla 6). Aunado a esto se generaron secuencias consenso de las regiones promotoras de todos los genes de cada uno de los clados propuestos, y se analizaron estas secuencias en busca de motifs. Producto de este análisis *in silico* se encontraron dos motifs compartidos entre ambos grupos, y un motif bastante divergente entre ambos, que podría sugerir diferencias en cuanto a la regulación de la expresión de ambos grupos (Figura 56). Entonces, a partir de la información generada por este estudio teórico (Gutiérrez-Galeano *et al.*, 2014) se propone que se podría predecir hasta cierto punto, que versiones de TCTP podrían estar más relacionadas con la diferenciación, con la proliferación celular o ambas.

8.8 AtTCTP2 es capaz de transportarse a larga distancia en forma de proteína y ARNm a través de injertos de tabaco y está asociado a la formación de raíces aéreas.

Como hemos mencionado anteriormente, contábamos con evidencia clara de la expresión de AtTCTP2 en tejido vascular (Figuras 35 y 36), así como de la acumulación de la proteína de fusión AtTCTP2-GFP específicamente en floema (Figura 34 y 35). Además en otros trabajos se mostraba la presencia de TCTP en tejido vascular (Berkowitz *et al.*, 2008; Hinojosa-Moya *et al.*, 2006), sugiriéndose el probable transporte a larga distancia, asociada a alguna otra proteína, e incluso una posible función no autónoma celular (Aoki *et al.*, 2005). Sabiendo esto, y aprovechando la progenie de las plantas de tabaco que se tenían expresando a AtTCTP2-GFP se llevó a cabo un ensayo de injertos de tabaco silvestre sobre tabaco transgénico (Silv/ AtTCTP2) y visceversa (AtTCTP2/Silv), con su respectivo homoinjerto silvestre (Silv/Silv).

Los resultados muestran claramente que AtTCTP2 es capaz de movilizarse a larga distancia a través de los heteroinjertos en forma de ARNm con predilección de desplazarse del portainjerto hacia el injerto (Figura 49; Tabla 6). Cabe resaltar que en promedio parece estar moviéndose solo un 8-12% del transcrito *AtTCTP2*, mientras que en los injertos en

donde no se observó movimiento por RT-PCR el porcentaje de ARN móvil no superó el 2% (Figura 50).

El caso del movimiento a larga distancia de la proteína fue distinto, debido a que se detectó a la proteína en todos los injertos Silvestre/AtTCTP2, pero solo en 4 de 7 de injertos AtTCTP2 (Figura 51; Tabla 6). Mientras que la localización de la proteína AtTCTP2-GFP presentó el mismo patrón de acumulación en concordancia con lo anteriormente descrito para Arabidopsis y tabaco mismo (Figura 52).

Sin embargo, un aspecto importante que resultó estar asociado al movimiento de la proteína fue la aparición de raíces aéreas adyacentes a la región de contacto de los injertos (Figura 53). Es decir, en aquellos injertos en donde no se detectó el transporte de AtTCTP2 no se observó la presencia de estas raíces adventicias (Tabla 6). Adicionalmente, al analizar por microscopia confocal la localización de AtTCTP2-GFP en estas raíces aéreas se encontró el mismo patrón de acumulación que en las raíces primarias de las plantas transgénicas, caracterizado por la presencia en núcleo y en primordios de raíces laterales (Figura 54), coincidiendo con lo visto durante el análisis de los sitios de expresión de AtTCTP2 (Figura 36E).

Finalmente, considerando la información antes descrita podemos aseverar que AtTCTP2 es capaz de moverse a larga distancia a través de injertos de tabaco en forma de proteína y de ARNm. Y tal vez podríamos sugerir que AtTCP2 juega un rol importante en la formación de raíces, quizás induciendo la diferenciación y proliferación de este tejido.

9. CONCLUSIONES

- AtTCTP2 no es un pseudogen, sino más bien es un gen cuyo locus genómico correctamente procesado.
- AtTCTP2 es un gen esencial para el correcto desarrollo en Arabidopsis.
- La regulación de los productos de AtTCTP2 parece estar dando a nivel transcripcional y traduccional.
- AtTCTP2 es un gen funcional cuyos productos génicos están inclinados hacia la regulación de la diferenciación celular.
- La sobreexpresión de AtTCTP2 en *A. rhizogenes* induce la regeneración de plantas a partir de explantes de tabaco.
- Existen diferencias estructurales, de localización y funcionales entre ambos genes de TCTP en Arabidopsis, indicando un probable reparto del trabajo entre ambas versiones.
- AtTCTP2 es capaz de transportarse a larga distancia a través de injertos de tabaco en forma de ARN o Proteína.
- Existe una estrecha relación entre la estructura de la proteína, su localización y la función que terminan ejerciendo ambas versiones de TCTP de Arabidopsis.
- Es posible predecir la tendencia funcional de algunas versiones de TCTP vegetales basándonos en la estructura predictiva 3D de la proteína.
- AtTCTP2 tiene el potencial para generar una patente que permita la utilización de esta secuencia y sus productos para la elaboración de protocolos de regeneración de plantas recalcitrantes, pero de interés agrícola, farmacéutico y/o científico.

10. PERSPECTIVAS

Como se muestra en este trabajo, AtTCTP2 presentó características que hacen muy atractivo a nivel básico-científico y aplicado. Aún hace falta mucho por trabajar para conocer más a fondo los mecanismos por los cuales ejerce sus funciones. Sin embargo enlistaré a continuación los que creo que se podría enfocar el futuro de la investigación respecto a AtTCTP2 y en general TCTP en plantas:

- Realizar el ensayo de rescate de tricomas para evaluar la capacidad de movimiento de las versiones modificadas de ambos genes respecto a las versiones endógenas.
- Llevar a cabo ensayos de transformación de explantes de tabaco para evaluar la capacidad regenerativa de diferentes versiones de TCTP de planta para comprobar la hipótesis publicada.
- Realizar ensayos de interacción proteína-proteína utilizando extractos nucleares de raíz para encontrar probables proteínas asociadas a AtTCTP2.
- Ahondar en la interacción AtTCTP2-A. *rhizogenes* y los mecanismos de regeneración de plantas.

11. BIBLIOGRAFIA

Atta, R., Laurens, L., BouchereDubuisson, E., Guivarc'h, A., Carnero, E., Giraudat-Pautot, V., ... & Chriqui, D. (2009). Pluripotency of Arabidopsis xylem pericycle underlies shoot regeneration from root and hypocotyl explants grown in vitro. *The Plant Journal*, 57(4), 626-644.

Aoki, K., Kragler, F., Xoconostle-Cázares, B., & Lucas, W. J. (2002). A subclass of plant heat shock cognate 70 chaperones carries a motif that facilitates trafficking through plasmodesmata. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(25), 16342-16347.

Aoki, K., Suzui N., Fujimaki S., Dohmae, N., Yonekura-Sakakibara K., Fujiwara, T., Hayashi, H., Yamaya, T., Sakakibaraa H. (2005) Destination-Selective Long-Distance Movement of Phloem Proteins. *The Plant Cell* 17: 1801-1814.

Balachandran, S., Xiang, Y., Schobert, C., Thompson, G. A., & Lucas, W. J. (1997). Phloem sap proteins from *Cucurbita maxima* and *Ricinus communis* have the capacity to traffic cell to cell through plasmodesmata. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(25), 14150-14155.

Berkowitz O., Ricarda J., Pollmann S., Maslea J. (2008) Characterization of TCTP, the Translationally Controlled Tumor Protein, from *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*. 20: 3430–3447.

Bird, D. A., Franceschi, V. R., & Facchini, P. J. (2003). A tale of three cell types: alkaloid biosynthesis is localized to sieve elements in opium poppy. *The Plant Cell Online*, 15(11), 2626-2635.

Boguski, M.S., and McCormick, F. (1993). Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature*. 366: 643–654.

Bommer, U. A., & Thiele, B. J. (2004). The translationally controlled tumour protein (TCTP). *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(3), 379-385.

Bommer, U.A. (2012). Cellular function and regulation of the translationally controlled tumour protein TCTP . *The Open Allergy Journal*, 5 (1), 19-32.

Brioudes, F., Thierry, A. M., Chambrier, P., Mollereau, B., and Bendahmane, M. (2010). Translationally controlled tumor protein is a conserved mitotic growth integrator in animals and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 16384–16389.

Cabrera-Ponce, J. L., López, L., Assad-Garcia, N., Medina-Arevalo, C., Bailey, A. M., & Herrera-Estrella, L. (1997). An efficient particle bombardment system for the genetic transformation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Plant Cell Reports*, 16(5), 255-260.

Chen, S., Wu, P.-H., Chou, C.-H., Yan, Y.-T., Liu, H., Weng, S.-Y., and Yang-Yen, H.-F. (2007) A knockout mouse approach reveals that TCTP functions as an essential factor for cell proliferation and survival in a tissue- or cell type–specific manner. *Mol. Cell. Biol.* 18: 2525–2532.

Chitpatima S.T., Makrides S., Bandyopadhyay R. Brawerman G. (1988) Nucleotide sequence of a major messenger ARN for a 21 kilodalton polypeptide that is under translational control in mouse tumor cells. *Nucleic Acids Res.* 16 2350.

Clough S.J., Bent A.F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 16: 735–743.

Corbesier L, Prinsen E, Jacquard A, et al (2003) Cytokinin levels in leaves, leaf exudate and shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana* during floral transition. *Journal of Experimental Botany*. 54: 2511-2517.

De Smet, I., Tetsumura, T., De Rybel, B., dit Frey, N. F., Laplace, L., Casimiro, I., ... & Beeckman, T. (2007). Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of *Arabidopsis*. *Development*, 134(4), 681-690.

De Rybel, B., Vassileva, V., Parizot, B., Demeulenaere, M., Grunewald, W., Audenaert, D., ... & Beeckman, T. (2010). A novel aux/IAA28 signaling cascade activates GATA23-dependent specification of lateral root founder cell identity. *Current Biology*, 20(19), 1697-1706.

Doering-Saad, C., Newbury, H.J., Couldridge, C.E., Bale, J.S., and Pritchard, J. (2006). A phloem-enriched cDNA library from *Ricinus*: insights into phloem function. *J. Exp. Bot.* 57:3183-3193.

Ermolayev, V., Weschke, W., and Manteuffel, R. (2003) Comparison of Al-induced gene expression in sensitive and tolerant soybean cultivars. *J. Exp. Bot.* 54: 2745–2756.

Gachet, Y., Tournier, S., Lee, M., Lazaris-Karatzas, A., Poulton, T., and Bommer,

U.A. (1999) The growth-related, translationally controlled protein P23 has properties of a tubulin binding protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle. *J. Cell Sci.* 112: 1257–1271

Gautheret, R.J. (2003) Plant tissue culture: the history, In *Plant Tissue Culture: 100 Years since Gottlieb Haberlandt*, SpringerWien.

Gnanasekar, M., & Ramaswamy, K. (2007). Translationally controlled tumor protein of *Brugia malayi* functions as an antioxidant protein. *Parasitology research*, 101(6), 1533-1540.

Gross, B., Gaestel, M., Böhm, H. and Bielka, H. (1989) ADNc sequence coding for a translationally controlled human tumor protein. *Nucleic Acids Res.* 17:8367-8376.

Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., and Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59, 307–321.

Gutiérrez-Galeano, D. F., Toscano-Morales, R., Calderón-Pérez, B., Xoconostle-Cázares, B., & Ruiz-Medrano, R. (2014). Structural divergence of plant TCTPs. *Frontiers in plant science*, 5.

Haecker, A., Groß-Hardt, R., Geiges, B., Sarkar, A., Breuninger, H., Herrmann, M., & Laux, T. (2004). Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 131(3), 657-668.

Ham BK, Brandom JL, Xoconostle-Cazares B, Ringgold V, Lough TL, Lucas WJ (2009) A polypyrimidine tract binding protein, pumpkin RBP50, forms the basis of a phloem-mobile ribonucleoprotein complex. *Plant Cell* 21 197–215.

Heinlein, M., & Epel, B. L. (2004). Macromolecular transport and signaling through plasmodesmata. *International review of cytology*, 235, 93-164.

Helariutta, Y., Fukaki, H., Wysocka-Diller, J., Nakajima, K., Jung, J., Sena, G. & Benfey, P. N. (2000). The SHORT-ROOT Gene Controls Radial Patterning of the Arabidopsis Root through Radial Signaling. *Cell*, 101(5), 555-567.

Herron, Jon C.; Freeman, Scott (2007). *Evolutionary analysis* (4th ed.). Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall. ISBN 0-13-227584-8.

Himanen, K., Boucheron, E., Vanneste, S., de Almeida Engler, J., Inzé, D., & Beeckman, T. (2002). Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *The Plant Cell Online*, 14(10), 2339-2351.

Himanen, K., Vuylsteke, M., Vanneste, S., Vercruyse, S., Boucheron, E., Alard, P., ... & Beeckman, T. (2004). Transcript profiling of early lateral root initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(14), 5146-5151.

Hinojosa-Moya JJ, Xoconostle-Cázares B, Lucas WJ, Ruiz-Medrano R (2006) Differential accumulation of a translationally controlled tumor protein mRNA from *Cucurbita maxima* in response to CMV infection. In: F Sanchez C Quinto IM Lopez-Lara O Geiger (eds) *Biology of plant microbe interactions*, vol 5. International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions, St Paul, MN, 242–246.

Hinojosa-Moya JJ, Xoconostle-Cázares B., Piedra-Ibarra E., Mendez-Tenorio A., Lucas WJ, Ruiz-Medrano R. (2008) Phylogenetic and Structural Analysis of

Translationally Controlled Tumor Proteins. *J Mol Evol.* 66:472–483.

Hinojosa-Moya, J. J., Xoconostle-Cázares, B., Toscano-Morales, R., Ramirez-Ortega, F. A., Cabrera-Ponce, J. L., & Ruiz-Medrano, R. (2013). Characterization of the pumpkin Translationally-Controlled Tumor Protein CmTCTP. *Plant signaling & behavior*, 8(12), e26477.

Hirotsune S., Yoshida N., Chen A., Garrett L., Sugiyama F., Takahashi S., Yagami K., Wynshaw-Boris A., Yoshiki A. (2003) An expressed pseudogene regulates the messenger-ARN stability of its homologous coding gene. *Nature.* 423: 91-6.

Hsu, Y.C., Chern, J.J., Cai, Y., Liu, M., and Choi, K.W. (2007) *Drosophila* TCTP is essential for growth and proliferation through regulation of dRheb GTPase. *Nature.* 445: 785–788.

Ikeuchi, M., Sugimoto, K., and Iwase, A. (2013). Plant callus: mechanisms of induction and repression. *Plant Cell* 25, 3159–3173.

Imlau, A., Truernit, E., & Sauer, N. (1999). Cell-to-cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues. *The Plant Cell Online*, 11(3), 309-322.

Itzen, A., Pylypenko, O., Goody, R.S., Alexandrov, K., and Rak, A. (2006) Nucleotide exchange via local protein unfolding—structure of Rab8 in complex with MSS4. *EMBO J.* 25: 1445–1455.

Jackson, D., Veit, B., & Hake, S. (1994). Expression of maize KNOTTED1 related

homeobox genes in the shoot apical meristem predicts patterns of morphogenesis in the vegetative shoot. *Development*, 120(2), 405-413.

Jacqumard A, Detry N, Dewitte W, et al (2002) In situ localisation of cytokinins in the shoot apical meristem of *Sinapis alba* at floral transition. *Planta*. 214:970-973.

Perianez-Rodriguez, J., Manzano, C., & Moreno-Risueno, M. A. (2014). Post-embryonic organogenesis and plant regeneration from tissues: two sides of the same coin?. *Frontiers in plant science*, 5.

Kim, G., LeBlanc, M. L., Wafula, E. K., & Westwood, J. H. (2014). Genomic-scale exchange of mRNA between a parasitic plant and its hosts. *Science*, 345(6198), 808-811.

Kim, M., Jung, Y., Lee, K., and Kim, C. (2000). Identification of the calcium binding sites in translationally controlled tumor protein. *Arch. Pharm. Res.* 23 633–636.

Kim, M., Canio, W., Kessler, S., & Sinha, N. (2001). Developmental changes due to long-distance movement of a homeobox fusion transcript in tomato. *Science*, 293(5528), 287-289.

Kim, J. Y., Yuan, Z., Cilia, M., Khalfan-Jagani, Z., & Jackson, D. (2002). Intercellular trafficking of a KNOTTED1 green fluorescent protein fusion in the leaf and shoot meristem of *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(6), 4103-4108.

Kim, J. Y., Rim, Y., Wang, J., & Jackson, D. (2005). A novel cell-to-cell trafficking assay indicates that the KNOX homeodomain is necessary and sufficient for

intercellular protein and mRNA trafficking. *Genes & development*, 19(7), 788-793.

Kim, Y. M., Han, Y. J., Hwang, O. J., Lee, S. S., Shin, A. Y., Kim, S. Y., *et al.* (2012). Overexpression of Arabidopsis translationally controlled tumor protein gene AtTCTP enhances drought tolerance with rapid ABA-induced stomatal closure. *Mol. Cells* 33, 617–626.

Kragler, F., Monzer, J., Shash, K., Xoconostle-Cázares, B., & Lucas, W. J. (1998). Cell-to-cell transport of proteins: requirement for unfolding and characterization of binding to a putative plasmodesmal receptor. *The Plant Journal*, 15(3), 367-381.

Kuchler, K., Thorner, J. (1992) Secretion of peptides and proteins lacking hydrophobic signal sequences: the role of adenosine triphosphate-driven membrane translocators. *Endocr Rev* 13: 499–514.

Kühn C, Franceschi VR, Schulz A, *et al.* (1997). Macromolecular trafficking indicated by localization and turnover of sucrose transporters in enucleate sieve elements. *Science*. 275:1298-1300.

Lee, J.Y., and Lee, D.H. (2003) Use of serial analysis of gene expression technology to reveal changes in gene expression in Arabidopsis pollen undergoing cold stress. *Plant Physiol*. 132: 517–529.

Li, F., Zhang, D., and Fujise, K. (2001) Characterization of fortilin, a novel antiapoptotic protein. *J. Biol. Chem*. 276: 47542–47549.

Li, G., Lu, X. Y., Li, X. P., & Wang, Z. Y. (2010). Cloning of a TCTP gene in wheat and its expression induced by *Erysiphe graminis*. *Bulletin of Botanical Research*, 30(4), 441-447.

Li, H. L., Guo, D., Tian, W. M., & Peng, S. Q. (2013). Cloning and molecular characterization of a cDNA encoding a small GTPase from *Hevea brasiliensis*. *Genetics and molecular research: GMR*, 12(3), 3305.

Lin, M.K., Lee, Y.J., Lough, T.J., Phinney, B.S., and Lucas, W.J. (2009). Analysis of the pumpkin phloem proteome provides insights into angiosperm sieve tube function. *Mol. Cell Proteomics* 8, 343–356. doi: 10.1074/mcp.M800420-MCP200.

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *methods*, 25(4), 402-408.

Lucas, W. J., Bouché-Pillon, S., Jackson, D. P., Nguyen, L., Baker, L., Ding, B., & Hake, S. (1995). Selective trafficking of KNOTTED1 homeodomain protein and its mRNA through plasmodesmata. *Science*, 270(5244), 1980-1983.

Lucas, W. J., Yoo, B. C., & Kragler, F. (2001). RNA as a long-distance information macromolecule in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(11), 849-857.

MacDonald, S. M., Bhisutthibhan, J., Shapiro, T. A., Rogerson, S. J., Taylor, T. E., Tembo, M., *et al.* (2001). Immune mimicry in malaria: *plasmodium falciparum* secretes a functional histamine-releasing factor homologin vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 10829–10832

Mahfouz, M.M., Kim, S., Delauney, A.J., and Verma, D.P. (2006) *Arabidopsis*

TARGET OF RAPAMYCIN interacts with RAPTOR, which regulates the activity of S6 kinase in response to osmotic stress signals. *Plant Cell*. 18: 477–490.

Mazaika, E., & Homsy, J. (2014). Digital Droplet PCR: CNV Analysis and Other Applications. *Current Protocols in Human Genetics*, 7-24.

Meyvis, Y., Houthoofd, W., Visser, A., Borgonie, G., Gevaert, K., Vercruyse, J., ... & Geldhof, P. (2009). Analysis of the translationally controlled tumour protein in the nematodes *Ostertagia ostertagi* and *Caenorhabditis elegans* suggests a pivotal role in egg production. *International journal for parasitology*, 39(11), 1205-1213.

Mezitt, L. A., & Lucas, W. J. (1996). Plasmodesmal cell-to-cell transport of proteins and nucleic acids. In *Post-Transcriptional Control of Gene Expression in Plants* (pp. 251-273). Springer Netherlands.

Muesch A, Hartmann E, Rohde K, Rubartelli A, Sitia R, Rapoport T (1990) A novel pathway for secretory proteins? *Trends Biochem Sci* 15: 86–88.

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.

Nickel W (2005) Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells. *Traffic* 6: 607–614.

Okada, T. S. (1991). *Transdifferentiation: flexibility in cell differentiation*. Oxford University Press, USA.

Palauqui, J. C., Elmayan, T., Pollien, J. M., & Vaucheret, H. (1997). Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to silenced scions. *The EMBO Journal*, 16(15), 4738-4745.

Poliseno L (2010). A coding-independent function of gene and pseudogene

mRNAs regulates tumour biology. *Nature* 465: 1033–1038.
doi:10.1038/nature09144. PMC 3206313. PMID 20577206.

Rehmann, H., Brüning, M., Berghaus, C., Schwarten, M., Köhler, K., Stocker, H., ... & Wittinghofer, A. (2008). Biochemical characterisation of TCTP questions its function as a guanine nucleotide exchange factor for Rheb. *FEBS letters*, 582(20), 3005-3010.

Rodríguez-Medina, C., Atkins, C. A., Mann, A. J., Jordan, M. E., and Smith, P. M. C. (2011). Macromolecular composition of phloem exudate from white lupin (*Lupinus albus* L.). *BMC Plant Biology* 11:36. doi: 10.1186/1471-2229-11-36

Ruiz-Medrano R, Xoconostle-Cazares B, Lucas WJ. 1999. Phloem long-distance transport of CmNACP mRNA: implications for supracellular regulation in plants. *Development*. 126: 4405-4419.

Sage-Ono, K., Ono, M., Harada, H., and Kamada, H. (1998) Dark-induced accumulation of mRNA for a homolog of translationally controlled tumor protein (TCTP) in *Pharbitis*. *Plant Cell Physiol*. 39: 357-369.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sasaki T, Chino M, Hayashi H, *et al.* 1998. Detection of several mRNA species in rice phloem sap. *Plant and Cell Physiology*, vol 39:895-897–360.

Sena, G., Wang, X., Liu, H. Y., Hofhuis, H., & Birnbaum, K. D. (2009). Organ regeneration does not require a functional stem cell niche in plants. *Nature*,

457(7233), 1150-1153.

Sessions, A., Yanofsky, M. F., & Weigel, D. (2000). Cell-cell signaling and movement by the floral transcription factors LEAFY and APETALA1. *Science*, 289(5480), 779-781.

Sharp, W. R., Sondahl, M. R., Caldas, L. S., and Maraffa, S. B. 1980. The physiology of in vitro asexual embryogenesis. *Horticul. Rev.*2: 268–310.

Street, H.E. (ed.) (1977) *Plant Tissue and Cell Culture*, Blackwell Scientific Publications

Su, Y. H., and Zhang, X. S. (2014). The hormonal control of regeneration in plants. *Curr. Top. Dev. Biol.*108, 35–69. doi: 10.1016/B978-0-12-391498-9.00010-3

Sugimoto, K., Gordon, S. P., & Meyerowitz, E. M. (2011). Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation?. *Trends in cell biology*, 21(4), 212-218.

Sugimoto, K., Jiao, Y., & Meyerowitz, E. M. (2010). *Arabidopsis* Regeneration from Multiple Tissues Occurs via a Root Development Pathway. *Developmental cell*, 18(3), 463-471.

Tamura, K., Nei, M., and Kumar, S. (2014). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*101, 11030–11035.

Thaw P, Baxter NJ, Hounslow AM, Price C, Waltho JP, Craven CJ (2001) Structure of TCTP reveals unexpected relationship with guanine nucleotide-free

chaperones. *Nat Struct Biol* 8:701–704

Thiele, H., Berger, M., Skalweit, A., & Thiele, B. J. (2000) Expression of the gene and processed pseudogenes encoding the human and rabbit translationally controlled tumour protein (TCTP). *European Journal of Biochemistry*. 267: 5473

Thomas, G. (1986) Translational control of mRNA expression during the early mitogenic response in Swiss mouse 3T3 cells: identification of specific proteins. *J. Cell Biol.* 103, 2137-2144.

Toscano-Morales, R., Xoconostle-Cázares, B., Martínez-Navarro, A. C., & Ruiz-Medrano, R. (2014). Long distance movement of an Arabidopsis Translationally Controlled Tumor Protein (AtTCTP2) mRNA and protein in tobacco. *Frontiers in plant science*, 5.

Toscano-Morales, R., Xoconostle-Cázares, B., Cabrera-Ponce, J.L., Galván-Gordillo, S.V., Ruiz-Salas, J.L., Hinojosa-Moya, J.J., Guevara-González, R.J., Ruiz-Medrano, R. AtTCTP2 is a novel functional Translationally Controlled Tumor Protein from Arabidopsis thaliana that induces whole plant regeneration. *Frontiers in Plant Science* (2015, segunda revisión).

van den Berg, C., Willemsen, V., Hage, W., Weisbeek, P., and Scheres, B. (1995). Vanin EF (1985). "Processed pseudogenes: characteristics and evolution". *Annu. Rev. Genet.* 19: 253–72. doi:10.1146/annurev.ge.19.120185.001345. PMID 3909943.

Vernoud, V., Horton, A.C., Yang, Z., and Nielsen, E. (2003) Analysis of the small GTPase gene superfamily of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 131: 1191–1208.

Vincent, D., *et al.* (2007) Proteomic analysis reveals differences between *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay and cv. Cabernet Sauvignon and their responses to water deficit and salinity. *J. Exp. Bot.* 58: 1873– 1892.

Voinnet, O., Vain, P., Angell, S., & Baulcombe, D. C. (1998). Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell*, 95(2), 177-187.

Wang, F., Shang, Y., Yang, L., and Zhu, C. (2012). Comparative proteomic study and functional analysis of translationally controlled tumor protein in rice roots under Hg²⁺ stress. *J. Environ. Sci.* 24, 2149–2158. doi: 10.1016/S1001-0742(11)61062-0

Wang, X., Fonseca, B. D., Tang, H., Liu, R., Elia, A., Clemens, M. J., *et al.* (2008). Re-evaluating the roles of proposed modulators of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling. *J. Biol. Chem.* 283, 30482–30492.

Wolf, S., Lucas, W. J., Deom, C. M., & Beachy, R. N. (1989). Movement protein of tobacco mosaic virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit. *Science*, 246(4928), 377-379.

Xoconostle-Cázares, B., Xiang, Y., Ruiz-Medrano, R., Wang, H.L., Monzer, J., Yoo, B.C., McFarland, K.C., Franceschi, V.R., and Lucas, W.J. (1999). Plant paralog to viral movement protein that potentiates transport of mRNA into the phloem. *Science* 283, 94–98

Xoconostle-Cázares, B., Ruiz-Medrano, R., and Lucas, W.J. (2000). Proteolytic processing of CmPP36, a protein from the cytochrome b(5) reductase family, is

required for entry into the phloem translocation pathway. *Plant J.* 24, 735–747.

Xoconostle, B., & Ruiz-Medrano, R. (2005). Transporte de señales a través del floema en plantas. *BioJournal*, 3.

Xu, L., & Huang, H. (2013). Genetic and epigenetic controls of plant regeneration. *Current topics in developmental biology*, 108, 1-33.

Yang, X y Zhang, X. (2010). Regulation of Somatic Embryogenesis in Higher Plants, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 29:1, 36-57.

Yarm, F.R. (2002) Plk phosphorylation regulates the microtubule stabilizing protein TCTP. *Mol. Cell. Biol.* 22: 6209–6221.

Yenofsky, R., Bergmann, I. y Brawerman, G. (1982) Messenger ARN species partially in a repressed state in mouse sarcoma ascites cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 5876-5880

Yoo BC., Kragler F., Varkonyi-Gasic E., (2004) A Systemic Small ARN Signaling System in Plants. *The Plant Cell.* 16: 1979-2000.

12. ANEXO

Tabla S1. Oligonucleótidos usados en el trabajo

Oligonucleótido	Gen	Secuencia	Experimento/Ensayo
AtTCTP2 F	AtTCTP2	ATGTTGGTCTACCAGGATATTCTTACA	Clonación
AtTCTP2-non-stop R	AtTCTP2	GCACTTGATCTCTTTCAAGCCGTAGGC	Clonación
AtTCTP2-stop R	AtTCTP2	TCAGCACTTGATCTCTTTCAAGCCGTA	Clonación
AtTCTP2-utr5' R	AtTCTP2	CTGTAGCTTTGAAGTATTCAAGCACTTGATCTC	Clonación
AtTCTP1 F	AtTCTP1	ATGTTGGTGTACCAAGATCTTCTCACC	Clonación
AtTCTP1-non-stop R	AtTCTP1	GCACTTGACCTCCTTCAAACCATGAGC	Clonación
AtTCTP2 MUT STOP	AtTCTP2	TAGATGTTGGTCTACCAGGATATTCTT	Clonación
P-AtTCTP2 F	AtTCTP2	AAACCATCACCTTCGTCGCCATCGGCA	Región Promotora
P-AtTCTP2 R	AtTCTP2	GTTTGAAGAGAGTAAAAGAGACTTTT	Región Promotora
AtTCTP2-q F	AtTCTP2	CTTTTCTACTTGGCCTACGGCTTGAA	qRT-PCR
AtTCTP2-q R	AtTCTP2	AGGAAATTGCATAAAAGTTAACTTCACT	qRT-PCR
AtTCTP1-q F	AtTCTP1	CATTTTTGACTTCGCTCATGGTTTGAA	qRT-PCR
AtTCTP1-q R	AtTCTP1	CGACGAAACACAGGACAATATAAAGAAACATA	qRT-PCR
18 S-q F	18S	GCCCCGGTAATCTTTGAAATTTTCAT	qRT-PCR
18 S-q R	18S	GTGTGTACAAAGGCAGGGACGTA	qRT-PCR
Actin-q F	Actin 8	CCATGACGGGATCACATTTTC	qRT-PCR
Actin-q R	Actin 8	CAAACGCTGTAACCGGAAAG	qRT-PCR
GFP F	GFP	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG	Deteccion transgén

GFP R	GFP	CCTGTACAGCTCGTCCATGC	Detección de transgen
35S F	35S	GACTAGAGCCAAGCTGATCTCCTTTGCC	Detección de transgen
35S R	35S	TCGACTAGAATAGTAAATTGTAATGTTG	Detección de transgen

12.2 Artículos publicados

Toscano-Morales, R., Xoconostle-Cázares, B., Cabrera-Ponce, J.L., Hinojosa-Moya, J.J., Galván-Gordillo, S.V., Ruiz-Salas, J.L., Guevara-González, R.J., Ruiz-Medrano, R. AtTCTP2 is a novel functional Translationally Controlled Tumor Protein from Arabidopsis thaliana that induces whole plant regeneration (submitted).

Ramírez-Ortega, F.A., Xoconostle-Cázares, B., **Toscano-Morales, R.**, Ruíz-Medrano, R. (2014) A simple method for pumpkin transformation. *Plant Omics Journal* 8(1):37-46 (2015).

Toscano-Morales, R., Xoconostle-Cázares, B., Martínez-Navarro, A. C., & Ruiz-Medrano, R. (2014). Long distance movement of an Arabidopsis Translationally Controlled Tumor Protein (AtTCTP2) mRNA and protein in tobacco. *Frontiers in Plant Science*, 5:705. doi: 10.3389/fpls.2014.00705.

Gutiérrez-Galeano, D. F.*, **Toscano-Morales, R.***, Calderón-Pérez, B., Xoconostle-Cázares, B., & Ruiz-Medrano, R. (2014). Structural divergence of plant TCTPs. *Frontiers in Plant Science* 5:361. doi: 10.3389/fpls.2014.00361. [*joint first authors].

Ramírez-Ortega, F. A., Herrera-Pola, P. S., **Toscano-Morales, R.**, Xoconostle-Cázares, B., & Ruiz-Medrano, R. (2014). Overexpression of the pumpkin (*Cucurbita maxima*) 16 kDa Phloem Protein CmPP16 increases tolerance to water deficit. *Plant Signaling & Behavior* 9:11. 9:11, e973823, doi: 10.4161/15592324.2014.973823.

Herrera-Martínez, A., Roberto Ruiz-Medrano, R., Galván-Gordillo, S.V., **Roberto Toscano Morales, R.**, Lidia Gómez-Silva, María Valdés, Jesús Hinojosa-Moya, Beatriz Xoconostle-Cázares (2014). A 2-component system is involved in the early stages of the *Pisolithus tinctorius*-*Pinus greggii* symbiosis. *Plant Signaling & Behavior*, 9(3):e28604.

Hinojosa-Moya, J. J., Xoconostle-Cázares, B., **Toscano-Morales, R.**, Ramirez-Ortega, F. A., Cabrera-Ponce, J. L., & Ruiz-Medrano, R. (2013). Characterization of the pumpkin Translationally Controlled Tumor Protein CmTCTP. *Plant Signaling & Behavior*, 8(12);e26477.