

**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

“Análisis de la región reguladora del gen psif de *Arabidopsis thaliana*”

T E S I S

Que para obtener el Título de:

Maestro en Ciencias en Biología Experimental

Presenta:

Biol. Alfonso Méndez Bravo

Director de Tesis:

D.C. Marco A. Pardo Galván

Morelia Mich., Mayo de 2006

ÍNDICE TEMÁTICO

		Página
Capítulo I	Introducción	1
1.1	Regulación transcripcional	2
1.2	Auxina	4
1.3	Auxina y el ciclo celular	5
1.3.1	Primer punto de control, transición G1/S	7
1.3.2	Segundo punto de control, transición G2/M	8
1.3.3	Mitosis	8
Capítulo II	Antecedentes	11
Capítulo III	Hipótesis y objetivos	15
3.1	Hipótesis	15
3.2	Objetivo general	15
3.3	Objetivos específicos	15
Capítulo IV	Estrategia experimental general	16
Capítulo V	Material y métodos	17
5.1	Material	17
5.1.1	Cepas y plásmidos	17
5.1.2	Medios de cultivo	22
5.1.2.1	Medio de crecimiento para bacterias y antibióticos	22
5.1.2.2	Medios de crecimiento para células vegetales Nt-1	22
5.2	Métodos	23
5.2.1	Resiembra semanal del cultivo en suspensión Nt-1	23
5.2.2	Aislamiento de plásmidos por lisis alcalina	23
5.2.3	Electroforesis en gel de agarosa	24
5.2.4	Recuperación y lavado de DNA a partir de un gel de agarosa	24

5.2.5	Purificación de DNA a partir de solución	25
5.2.6	Reacciones de ligación	25
5.2.7	Preparación de células bacterianas electrocompetentes	26
5.2.8	Transformación de bacterias por electroporación	26
5.2.9	Digestiones enzimáticas	27
5.2.9.1	Digestión de plásmidos	27
5.2.9.2	Liberación de fragmentos para subclonar	27
5.2.9.3	Análisis de restricción	28
5.2.10	Aislamiento de DNA a partir de tejido vegetal	28
5.2.11	Transformación de células vegetales Nt-1 por el sistema binario de <i>Agrobacterium</i>	29
5.2.12	Sincronización de células Nt-1 por arresto con afidicolina	30
5.2.13	Determinación de índice mitótico	30
5.2.14	Aislamiento de RNA con Trizol	31
5.2.15	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	32
5.2.16	Ensayo citoquímico de actividad de GUS en células transgénicas Nt-1	33
5.2.17	Extracción de GUS a partir de células Nt-1 transgénicas	34
5.2.18	Ensayo de Bradford	34
5.2.19	Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (<i>SDS-PAGE</i>)	36
5.2.20	Tinción de gel de poliacrilamida-sds con azul de Coomassie	36
5.2.21	Ensayo fluorométrico de actividad de GUS	36
5.2.22	Ensayo de inducción por auxina de <i>RegAth</i> en células Nt-1	37
5.2.23	RT-PCR	38
Capítulo VI	Resultados y discusión	39
6.1	Clonación de <i>RegAth</i>	39
6.2	Fusión de <i>RegAth</i> a <i>gus</i>	42

6.3	Introducción de <i>RegAth</i> a un T-DNA	42
6.4	Obtención de una línea celular Nt-1 transgénica con el T-DNA de pRCE204	44
6.5	Funcionalidad de la fusión <i>RegAth-gus</i>	46
6.6	Caracterización de <i>RegAth</i> durante el ciclo celular	47
6.7	Inducción de <i>RegAth</i> por auxina	48
Capítulo VII	Conclusiones y perspectivas	53

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Regulación del ciclo celular de plantas por la auxina	10
Figura 2.1	Inducción de la inducción de <i>psif</i> de frijol por distintos factores de crecimiento de plantas	12
Figura 2.2	Expresión de <i>psif</i> dependiente de auxina	13
Figura 2.3	Expresión de <i>psif</i> en el ciclo celular	13
Figura 2.4	Búsqueda de <i>psif</i> en el genoma de <i>Arabidopsis thaliana</i>	14
Figura 5.1	Células Nt-1 transgénicas con la proteína verde fluorescente (GFP)	17
Figura 5.2	Mapa físico del plásmido pGEM-T	18
Figura 5.3	Mapa físico del vector de clonación pSK+	19
Figura 5.4	Mapa físico del vector pRITA I	20
Figura 5.5	Mapa físico del vector para el sistema binario de <i>Agrobacterium</i> pART27	21
Tabla 1	Oligonucleótidos utilizados	32
Figura 5.6	Esquema de localización de los oligonucleótidos en la secuencia de <i>RegAth</i>	33
Figura 5.7	Curva estándar de concentración de albúmina sérica de bovino (BSA)	35
Figura 6.1	Amplificación e introducción de <i>RegAth</i> en el vector pGEM-T	40
Figura 6.2	Estrategia de clonación de <i>RegAth</i>	41
Figura 6.3	Análisis de restricción de las subclonaciones de <i>RegAth</i>	43
Figura 6.4	Transformación de Nt-1 con <i>RegAth-gus-nos</i>	45
Figura 6.5	Actividad de GUS por inducción de <i>RegAth</i> en células Nt-1 transgénicas	46
Figura 6.6	Actividad de <i>RegAth</i> -GUS durante el ciclo celular de Nt-1	47
Figura 6.7	Ensayo citoquímico de GUS en Nt-1 transgénicas, inducidas por auxina	49
Figura 6.8	Actividad de GUS en Nt-1 transgénicas por inducción de auxina	50
Figura 6.9	RT-PCR semicuantitativo de <i>gus</i> inducido con ANA	52
Figura 6.10	Expresión de <i>gus</i> en Nt-1 transgénicas inducida por auxina	53

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

“...¿Podemos suponer que un mismo tipo de filamentos vivientes es y ha sido la causa de toda vida orgánica?” (Darwin E., 1794). La pregunta del médico y naturalista Erasmo Darwin sentaría bases sólidas en el quehacer científico de los años siguientes. Esta pregunta fue planteada sesenta y cinco años antes de “El Origen de las Especies” de su nieto Charles Darwin y setenta y un años antes de “*Experiments on Plant Hybrids*” de Gregor Mendel, trabajo con el cual se inicia la Genética y el cual explica que mediante un proceso que implica la transmisión de alguna clase de información de una generación a la siguiente, todas las formas de vida preceden de una muy similar y sólo serán biológicamente valiosas si éstas a su vez son capaces de perpetuarse mediante la transmisión de sus caracteres a una siguiente generación (herencia).

Una célula inicia su vida a partir de la división de otra célula madre. Resulta entonces pertinente preguntarse: ¿Cómo han preservado las células esta capacidad?, ¿Mediante qué mecanismos logran hacer copias fieles de sí mismas? (Asimov, 1982): en 1880 Walter Flemming estudió a fondo el proceso de la división celular y descubrió que el núcleo contiene un material al que llamó *cromatina* el cual durante la división celular se aglomera en pares de filamentos llamados *cromosomas*, estos filamentos (como los llamó Darwin) contienen el material hereditario, al cual en 1865 Mendel llamó “genes”.

El proceso de expresión génica es responsable de las características estructurales, funcionales y de comportamiento de cualquier célula. De manera general, consta de la transcripción de un segmento de DNA a RNA y su traducción posterior a proteína

El desarrollo de los organismos pluricelulares se basa en el uso de diferentes genes para producir los distintos fenotipos celulares de cada tejido. La variedad celular,

diferenciación y especialización celular en un mismo organismo están dadas por los mecanismos que regulan su expresión génica; solamente una fracción del genoma es expresada en cualquier tipo de células y en cierto momento del ciclo biológico.

La expresión genética es regulada en cuatro niveles fundamentales: 1) Transcripcional. Determina los genes del núcleo que son copiados a los RNAs y qué genes se mantienen en estado inactivo; 2) Postranscripcional. Regula los eventos entre la transcripción y la traducción del mRNA; 3) Traduccional. Regula la velocidad a la que los mRNAs son usados por los ribosomas en la síntesis de proteínas; y 4) Postraduccional. regula la actividad y vida media de proteína sintetizada (Lewin, 2000).

1.1 REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL

La transcripción es el primer punto del proceso de expresión génica que está sujeto a control y determina el nivel de regulación más importante en las células eucariontes (Latchman, 2001).

El paso inicial (y en algunos casos el único) en la regulación es la decisión de transcribir un gen o no. Existen elementos reguladores para la RNA polimerasa II de eucariontes dentro de la región denominada promotor situados en una región en dirección 5' y 3' (*upstream* y *downstream*) del sitio de inicio de la transcripción en una secuencia determinada (elementos *cis*). Cada promotor tiene una combinación particular de elementos en *cis* reguladores positivos o negativos ordenados en número, tipo y arreglo espacial único. Estos elementos son sitios de unión para factores de transcripción secuencia-específica que activan o reprimen la transcripción de un gen. Usualmente, los elementos *cis* están posicionados dentro de los primeros cientos de pares de bases *upstream* del punto de inicio transcripcional, pero algunos elementos pueden ejercer control desde distancias más grandes (1-30 kb). (Mitchel y Tjian, 1989)

La importancia de un elemento *cis* en particular varía en los diferentes tipos celulares en respuesta a señales fisiológicas. Esto se debe a que los factores transcripcionales o factores que reconocen al elemento varíen en abundancia y a la capacidad de respuesta bajo diferentes tipos celulares y bajo distintas condiciones fisiológicas. (Mitchel y Tjian, 1989).

Los promotores de genes eucariontes poseen una región *cis* denominada caja TATA, localizada generalmente a unos 30 bp *upstream* del punto de inicio de la transcripción que funciona como sitio de unión para la RNA polimerasa. Es un elemento que tiene una localización relativamente fija con respecto al punto de inicio. La secuencia consenso de esta caja consta de \approx 8 bp en su totalidad, de parejas AT, en dos posiciones de orientación es variable, y en algunos pocos casos existe un par GC (Latchman, 2001).

No todos los promotores contienen los dos elementos centrales de regulación de un promotor: caja TATA y el elemento iniciador. El elemento iniciador es una secuencia corta y poco conservada cercana al punto de inicio de la transcripción, es importante para dirigir la síntesis adecuada de los transcritos. Una variación en secuencia y espaciamiento entre estos dos elementos ocurre en casi todos los promotores de eucariontes superiores, y dada esta diversidad, ocurre también una variación en las interacciones del DNA con la maquinaria de transcripción. (Hampsey, 1998)

Así, existen otros elementos en *cis* situados en dirección 5' de la caja TATA y pueden estar presentes en cualquier orientación y a distintas distancias con respecto al punto de inicio, estos elementos son reconocidos por factores de transcripción que interactúan directamente con componentes de la maquinaria transcripcional. De estos factores *cis* podemos mencionar a las secuencias tipo *enhancers* (situadas a distancias grandes del punto de inicio) que ensamblan algún complejo proteico específico con las proteínas unidas al promotor, requiriendo que el DNA situado entre ellas sea desenrollado hacia fuera, formando lazos. Otros elementos reguladores comunes en los promotores de genes eucariontes son la caja GC y CAAT (Hampsey, 1998), y elementos menos comunes han sido implicados en tipos especializados de regulación transcripcional dependiente de alguna señal, tal como en respuesta a choque térmico, hormonas y factores de crecimiento (Mitchel y Tjian, 1989). La caja GC se localiza aproximadamente 90 bp en dirección 5' del punto de inicio de la traducción, su secuencia consenso es GGGCGG, y con frecuencia aparece en varias copias en el promotor, pudiendo encontrarse en cualquier orientación (Lewin, 2000).

1.2 AUXINA

Los organismos eucariontes producen mediante reacciones metabólicas de manera tejido-específica sustancias que pueden funcionar como controles transcripcionales activando o reprimiendo la unión de factores transcripcionales con elementos de respuesta en los promotores, y se les denomina hormonas (Biggs *et al.*, 2000).

Las hormonas son compuestos reguladores de actividades celulares generalmente mediante el control transcripcional de algunos genes específicos. En mamíferos y plantas las hormonas son transportadas a través de los tejidos vasculares y llevadas hasta células blanco, donde modulan diversas funciones genéticas y fisiológicas como producción de gametos, homeostasis, crecimiento y desarrollo, reacciones inmunológicas, etc. (Audesirk, 1997). En plantas se conocen seis clases principales de hormonas y de forma común se denominan fitoreguladores o reguladores de crecimiento en plantas (FCP). Son sintetizadas para controlar su crecimiento y desarrollo, y son: auxina, citocininas, giberelinas, etileno, ácido abscísico y brasinoesteroides (Haberer y Kieber, 2002).

Experimentos *in situ* con células vegetales han demostrado que las plantas adquieren su identidad y diferenciación conforme se establecen sus patrones controlados de división celular. Estos procesos requieren que se dé una comunicación compleja entre células, tejidos y órganos, y a su vez, esta comunicación es controlada por los FCP. En ocasiones los FCP se encuentran en bajas concentraciones y generalmente sus sitios de acción son distantes del sitio en que son sintetizados (Berger *et al.*, 2000). Un aspecto distintivo del FCP auxina es que su actividad está dada por su concentración relativa con otras hormonas y no por su concentración *per se*, esto implica su intervención reguladora en diversas rutas biosintéticas y de actividad del resto de FCP.

El ácido indol-acético (IAA) es la forma natural más abundante de auxina, se sintetiza a partir de triptofano, principalmente en las yemas apicales foliares de los brotes en crecimiento, desde donde es transportado hacia el resto de la planta. Es un factor determinante en diversos procesos fisiológicos, entre los cuales se incluyen: el desarrollo embrionario, la formación de raíces principales y secundarias, el desarrollo de los tejidos vasculares xilema y floema, el control de la dominancia apical (aumento de masa dirigido por las yemas o puntas de tallos y raíces), el envejecimiento de determinados tejidos y órganos, conocido como muerte celular programada (senescencia), y las respuestas trópicas a luz y gravedad (Davies, 1995).

A nivel intracelular, el IAA actúa como una señal para la división, la elongación y la diferenciación celular durante el transcurso del ciclo de vida de la planta (Abel y Theologis, 1996, Guilfoyle *et al.*, 1998, Eckardt, 2001). El crecimiento inducido por auxina tiene lugar en dos fases: primero ocurre un aumento relativamente rápido de la longitud del brote, seguido de cambios lentos con aumento de la biomasa y la activación de complejos proteicos reguladores del ciclo celular (Francis *et al.*, 1998).

1.3 AUXINA Y EL CICLO CELULAR

Como consecuencia del estilo de vida sesil de las plantas, éstas han tenido que responder a lo largo de su evolución a las condiciones ambientales cambiantes mediante modificaciones fisiológicas y moleculares finamente reguladas y mediante la capacidad de redireccionar su crecimiento. La auxina y la citocinina son los principales compuestos encargados de transmitir las señales ambientales al interior de las células y de dirigir el crecimiento y la muerte celular, es decir, el ciclo de vida o ciclo celular (Stals e Inzé, 2001).

Los procesos de crecimiento celular regulados por auxina requieren también la presencia y acción de citocinina. Los mecanismos de esta acción conjunta se definen de manera clásica como un equilibrio entre la concentración de una respecto a la otra; debido a que el sitio principal de síntesis de citocininas es la región de la punta de la raíz y el de la auxina es la parte apical aérea, se establece un gradiente de concentración de ambas hormonas en dirección contraria a lo largo de los tejidos vasculares (Haberer y Kieber, 2002). Además del equilibrio de concentración de dichos FCP, otro aspecto sobre esta relación fue reportado recientemente por Nordström *et al.* (2004), quienes demostraron que la auxina tiene un papel importante en la vía principal de síntesis de las citocininas: el exceso de la auxina provoca una fuerte disminución en los niveles de citocininas, no ocurriendo así a la inversa.

El ciclo celular es el mecanismo fundamental y universal que rige la creación de una nueva célula y comprende dos eventos generales: 1) la replicación del DNA (fase S) y 2) la división celular (fase M); en organismos eucariontes estos dos eventos están separados temporalmente por los intervalos G1 y G2. Una característica distintiva del ciclo celular de las plantas, es que algunos tejidos susceptibles de dividirse y diferenciarse presentan

ploidía nuclear aumentada (varias copias del material genético) como consecuencia de repeticiones del proceso de replicación, sin que entren necesariamente a la fase de división (Dewitte y Murray, 2003). Como se discutirá más adelante, la señal de entrada de las células al proceso de replicación (fase S) es dada por la presencia de la auxina y citocinina.

El ciclo celular se divide en cuatro fases consecutivas: la fase M corresponde a la división celular, y las fases G1, S y G2 constituyen el tiempo biosintéticamente activo de la interfase. Este arreglo de las etapas del ciclo de vida de las células permite que la entrada a los procesos críticos de replicación del DNA (fase S) y la mitosis (fase M) sean controlados de manera precisa en la transición G1/S y G2/M (Dewitte y Murray, 2003). Por ejemplo, en el ciclo celular de los hongos unicelulares levaduras existe un punto de la fase G1 (llamado *START point* y en mamíferos “punto de restricción”), en el que las células “deciden” si continúan su ciclo o lo detienen para entrar en procesos de diferenciación. Las células vegetales también poseen este punto de regulación, el cual es dirigido por auxina, modulando señales de paro o progresión a través del ciclo (Stals e Inzé, 2001) (figura 1).

Las principales señales intracelulares que regulan y conducen el ciclo celular consisten en la activación secuencial de complejos heterodiméricos de proteínas cinasas conocidos como cinasas dependientes de ciclinas (CDKs). Estos complejos CDKs constan de una subunidad catalítica CDK, y una reguladora denominada ciclina. Las ciclinas reciben su nombre debido a su patrón de expresión transcripcional en forma periódica a lo largo del ciclo celular, a diferencia de las cinasas cuya expresión se mantiene constante a través del mismo. Las proteínas CDKs monoméricas fosforilan residuos de serina y treonina en proteínas *blanco* y tienen por sí mismas una actividad reducida de cinasa, por lo que su activación completa requiere de la unión con las ciclinas. Cada CDK puede asociarse con distintas ciclinas lo que determina qué proteína será fosforilada por el complejo a partir del cambio conformacional que produzca la interacción CDK/ciclina (Kitazono *et al.*, 2001). Estas reacciones de adición y remoción de grupos fosfato sirven como marcaje de activación o inactivación de interacciones proteicas que desencadenan cascadas de señalización que controlan la actividad celular (Dewitte y Murray, 2003). La ventaja de este método de control de la función de las proteínas es que la enzima puede cambiar de la inactividad total a un estado completamente activo simplemente alterando la fosforilación de la proteína (Lodish *et al.*, 2002).

Los niveles y temporalidad de las ciclinas están regulados por los cuatro niveles de control antes mencionados. La expresión de sus genes a nivel transcripcional involucra factores transcripcionales específicos del ciclo celular, así como la actividad *per se* de los complejos CDK/ciclina. Una vez expresadas las ciclinas, su actividad se regula a nivel traduccional y postraduccional mediante su fosforilación, hasta ser degradadas rápidamente por el proteosoma en fases específicas del ciclo celular. La localización celular es otra manera de regular la función de las ciclinas, ya que algunas requieren ser transportadas del citoplasma al núcleo para ser completamente activas (Takizawa y Morgan, 2000).

1.3.1 PRIMER PUNTO DE CONTROL DEL CICLO CELULAR

La auxina interviene prácticamente durante todas las fases de regulación del ciclo (Stals e Inzé, 2001): activa transcripcionalmente genes que codifican proteínas cinasas reguladoras del ciclo (Frank y Schmülling, 1999) que son requeridas para la progresión de la fase tardía de G1/S y para la transición de G2/M (Huntley y Murray, 1999); tal es el caso del gen de la CDK Cdc2. La proteína CDC2 fue identificada inicialmente en levadura como la cinasa maestra en la regulación del ciclo celular de dicho organismo; en *Arabidopsis thaliana* se han encontrado las cinasas homólogas a CDC2 CDKA y CDKB (Nasmyth, 1993) (figura 1). Además del IAA, el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y el ácido naftalenacético (NAA), que son formas sintéticas de la auxina, estimulan la acumulación de los transcritos de homólogos de CDC2 en varias especies de plantas (Menges *et al.*, 2002).

En *A. thaliana* se encontró que existe una correlación entre los niveles de expresión de CDKA y CDKB, y el estado proliferativo de diferentes órganos y tejidos. En general, la expresión de los homólogos de CDC2 en plantas es alta en tejidos mitóticamente activos, en los cuales se han encontrado concentraciones elevadas de auxina. Por otra parte, dicha actividad de CDC2 es nula en órganos maduros no proliferativos (Francis *et al.*, 1998).

Durante la transición G1/S, los FCP auxina y citocininas activan la transcripción de los genes de ciclinas tipo D, así como de su subunidad catalítica CDKA. Este complejo CDKA/CICLINA D es indispensable para la progresión hacia la fase S, ya que participa en

la hiperfosforilación de la proteína RB (retinoblastoma) y por tanto en la liberación del factor transcripcional E2F, el cual promueve la transcripción de genes esenciales para la replicación del DNA (Stals e Inzé, 2001) (figura 1).

1.3.2 SEGUNDO PUNTO DE CONTROL

Este evento crucial para la división corresponde a la transición G2/M, y nuevamente auxina y citocininas están implicadas en la regulación de la entrada en la fase M al controlar la activación transcripcional de las ciclinas A y ciclinas B. En particular, la regulación sobre la ciclina B es de vital importancia para asegurar que el DNA haya sido replicado de forma completa y correcta. Una vez activo, el complejo CDKA/CICLINA B, promueve el rompimiento de la envoltura nuclear, la condensación de los cromosomas y la maduración de los centriolos duplicados, entre otros eventos que se llevan a cabo durante la mitosis (Dewitte y Murray, 2003) (figura 1).

1.3.3 MITOSIS

Al terminar la interfase, tiene lugar la última fase del ciclo celular correspondiente a la división mitótica durante la cual los materiales duplicados se reparten en proporciones iguales entre las dos células hijas. Durante la mitosis, se observa una serie de eventos característicos que, a pesar de presentarse de manera continua, son convencionalmente divididos en cuatro etapas: profase, metafase, anafase y telofase. Durante la transición de la metafase a la anafase, se presenta el primer punto de control de la mitosis que verifica el adecuado ensamblaje del huso mitótico. Un segundo punto de control se da durante la telofase, cuyo objetivo es asegurar la posición correcta del huso central donde se posicionará el anillo contráctil durante la citocinesis. La citocinesis o separación de los dos territorios citoplasmáticos es en ocasiones tomada como una fase más del ciclo celular, pero de manera general se ubica como la culminación de la división celular (Farias, 2005).

Los procesos necesarios para la progresión y salida de mitosis son controlados por la síntesis y por la proteólisis dependiente de ubiquitina de ciclinas y otras proteínas reguladoras clave; la auxina tiene una fuerte incidencia en el inicio de estas cascadas de eventos. La supramolécula 20S, denominada ciclosoma o complejo promotor de la anafase (APC), es una enzima ligasa de ubiquitina (E3) de localización nuclear la cual es capaz de marcar por sí sola a las proteínas para su degradación (Golan *et al.*, 2002) (figura 1), y la auxina activa a E3 durante la transición metafase/anafase. E3 está constituida por 8-12 proteínas diferentes y una de sus subunidades es la CDC27, de la cual se ha encontrado un homólogo en *Arabidopsis thaliana* denominado HOBBIT. Mutaciones en *hobbit* afectan la división y la diferenciación celular. Además, la transcripción de *hobbit* es específica de la fase G2/M de las células meristemáticas. Interesantemente, la respuesta a auxina (medida por la actividad del reportero β -glucuronidasa fusionado al promotor sintético DR5 de genes de respuesta a auxina, DR5: GUS) es parcialmente inhibida en las mutantes *hobbit*. Este defecto es probablemente la consecuencia de la estabilización del factor de transcripción AXR3/IAA17, cuya disponibilidad está regulada por la degradación dependiente de ubiquitina a través de la ruta SCF^{TIR1} (complejo proteína ligasa a ubiquitina tipo SCF, conocido como E3) (Blilou *et al.*, 2002).

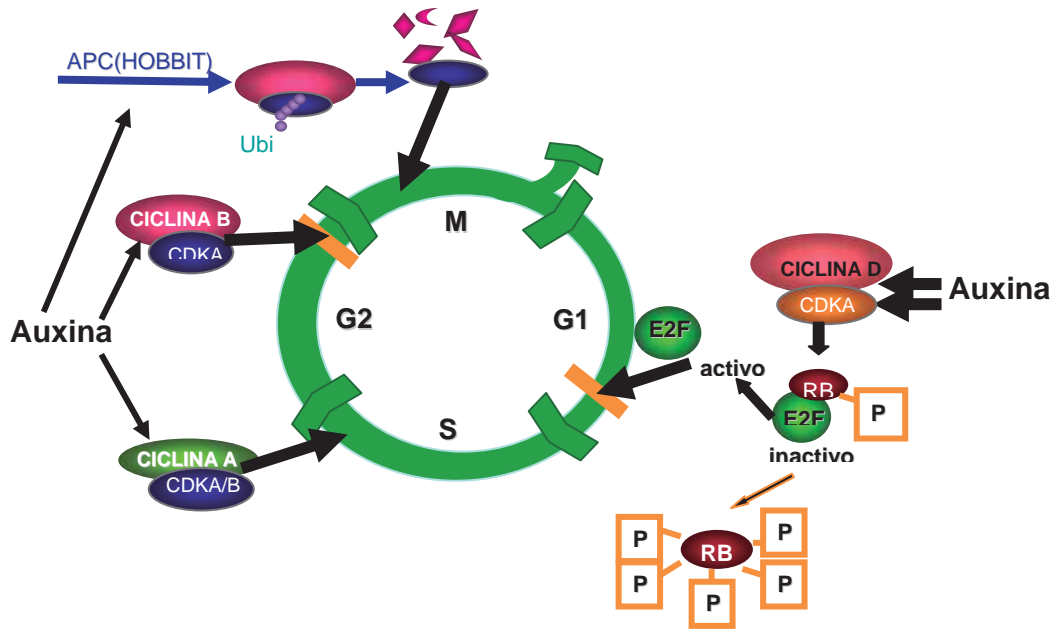


Figura 1. Regulación del ciclo celular de plantas por auxina. G1 corresponde a la primera fase de intervalo donde la célula crece en tamaño y sintetiza nuevas proteínas; S es la fase de síntesis de DNA; G2 corresponde a la segunda fase de intervalo y M es la fase de división celular mitótica o meiotica. La auxina activa transcripcionalmente a las ciclinas y cinasas reguladoras de los puntos de control (indicados en G1/S y G2/M con una línea transversal). Además promueve la degradación de complejos proteicos por el proteosoma a través de la vía de marcaje por ubiquitina (E2Fc, un inhibidor de E2F durante G1/S y de CDKA/Ciclina B durante la fase M en la transición metafase-anafase). (modificado de: Stals e Inzé, 2001).

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

Los FCP son considerados los reguladores endógenos de la división celular de plantas. Debido a sus múltiples efectos fisiológicos y de desarrollo, se desconoce de forma precisa su acción directa en el control del ciclo celular (del Pozo, 2005). En consecuencia, resultan necesarios modelos de estudio para tal fin que no alteren las condiciones morfofisiogenéticas de la planta.

Bajo este contexto, utilizando el modelo simbiótico de *Phaseolus vulgaris* y la bacteria *Rhizobium tropici* (Martínez *et al*, 1991) se realizó una expresión selectiva de genes de la planta en condiciones de inducción por auxina, citocinina y factores NOD con experimentos conocidos como “*differential display*” con el fin de identificar genes involucrados en la regulación de la división y diferenciación celular.

Es así como se aisló una secuencia génica del frijol denominada psif que cumplía con los objetivos planteados. Posteriormente se demostró por experimentos tipo “*Northern blot*” y bajo distintas condiciones de tratamientos en raíces de frijol con auxinas, citocininas, ácido absísico y otros FCP que su expresión está modulada por auxina (IAA), por citocininas y factores Nod, pero por ningún otro FCP, presentando un patrón de expresión dependiente de la concentración de auxina (figura 2.1 y 2.2).

Al realizar análisis comparativos de la secuencia de psif en las genotecas publicadas, se encontró que presenta homología con la subunidad eIF3f (factor de inicio de la traducción 3 de eucariontes) (Higareda, 2003); siendo psif un gen regulado transcripcionalmente por auxinas y citocininas, existía una gran posibilidad de que la proteína para la que codifica psif estuviera relacionada a la división celular.

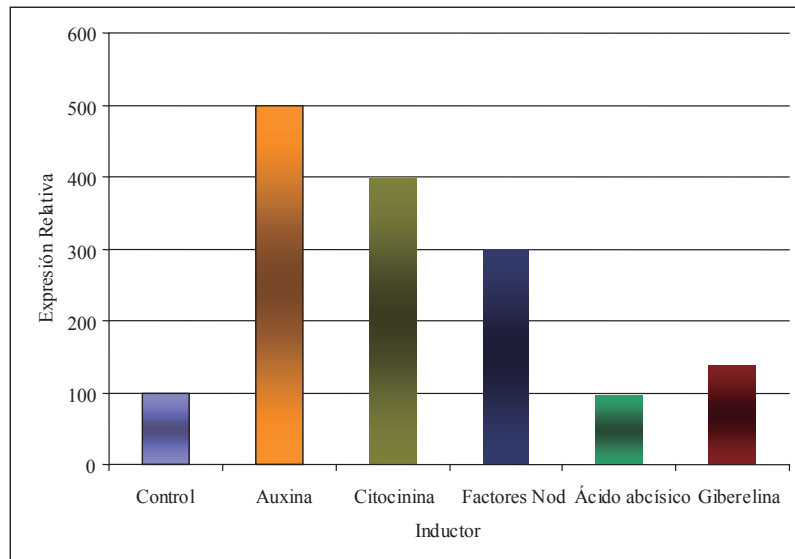


Figura 2.1 Ensayos de tipo *Northern blot* de inducción de la expresión de *psif* por distintos factores de crecimiento de plantas. Valores expresados en unidades arbitrarias de opacidad.

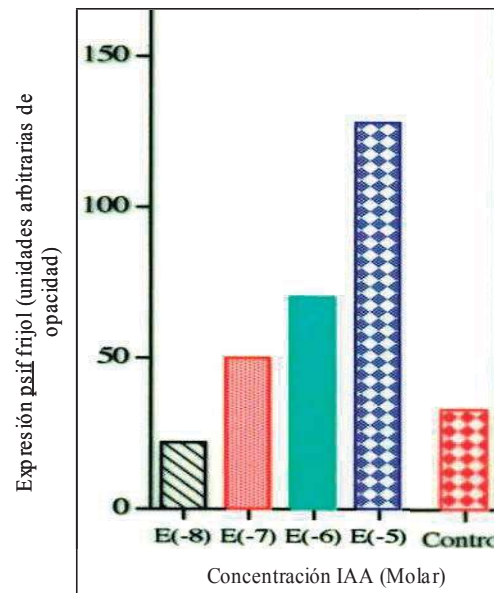


Figura 2.2 Expresión de *psif* dependiente de auxina. Análisis de opacidad de la película radiográfica velada por la señal quimioluminiscente de hibridación de *psif* de frijol con una sonda homóloga marcada con digoxigenina; valores expresados en unidades arbitrarias de opacidad.

Con el propósito de determinar una probable regulación de psif en el ciclo celular, se utilizó un sistema que permitiera la detección del mRNA de psif en una población celular con homogeneidad durante su ciclo: la línea celular perenne de crecimiento en suspensión de *Nicotiana tabacum* TBY-2 (Nagata, 1992). Por ensayos de tipo *Northern blot* se detectó un pico de expresión cíclico una hora antes del pico mitótico, con lo que se concluyó que la expresión de psif está circunscrita a la fase G2/M (Figura 2.3), que es el intervalo en el que se determina si la maquinaria celular está lista o no para dividirse.

Para adjudicar una posible función de psif en la división celular, se generaron células TBY-2 transgénicas con el gen clonado en *sentido* y *antisentido*. Los resultados obtenidos a partir de estos experimentos demostraron que la función de psif es indispensable para la progresión de la fase G2 a Mitosis, ya que al ser silenciado, las células eran incapaces de proseguir con su ciclo y se iniciaban programas de muerte celular, esto, evidenciado por el colapso de la membrana celular y la eventual ruptura nuclear (Higareda, 2003) (figura 2.3).

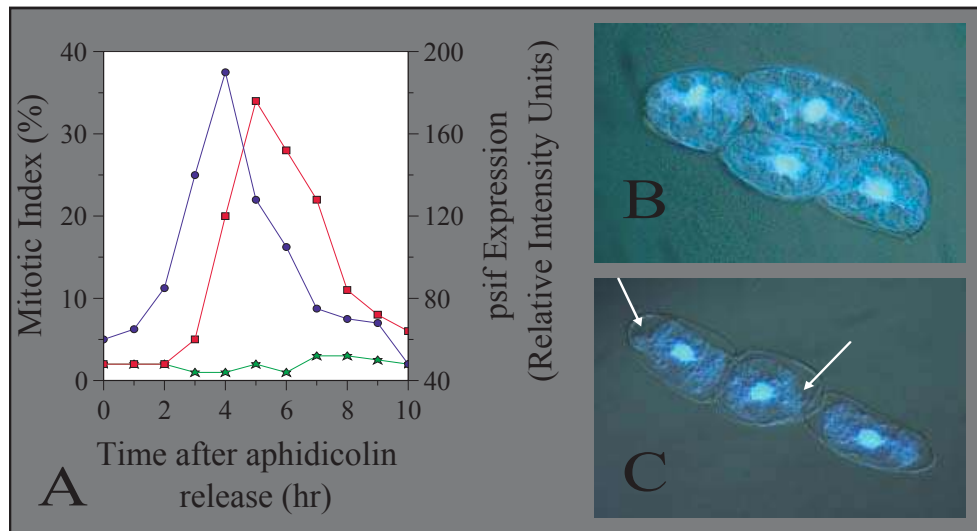


Figura 2.3 Expresión de psif en el ciclo celular. A) Patrón de expresión de psif de frijol (línea azul) en células sincronizadas TBY-2, índice mitótico (línea roja) y antisentido de psif (línea verde). B) Células TBY-2 control, y C) transgénicas (psif antisentido), las flechas indican el fenotipo apoptótico por el colapso de la membrana.

Así, estudiar a la región reguladora (el promotor) de psif, es un objetivo primario para la comprensión de su respuesta transcripcional a auxina y su regulación durante el ciclo celular.

El modelo biológico de *Arabidopsis thaliana* resulta de gran utilidad para la identificación y aislamiento de secuencias génicas debido a que la secuencia completa de su genoma se encuentra disponible (*Internacional Arabidopsis Genome Initiative*). Por ello se realizaron análisis bioinformáticos a fin de identificar el probable promotor de psif en dicha especie vegetal y de buscar posibles elementos de regulación que sugirieran su funcionalidad transcripcional (figura 2.4).

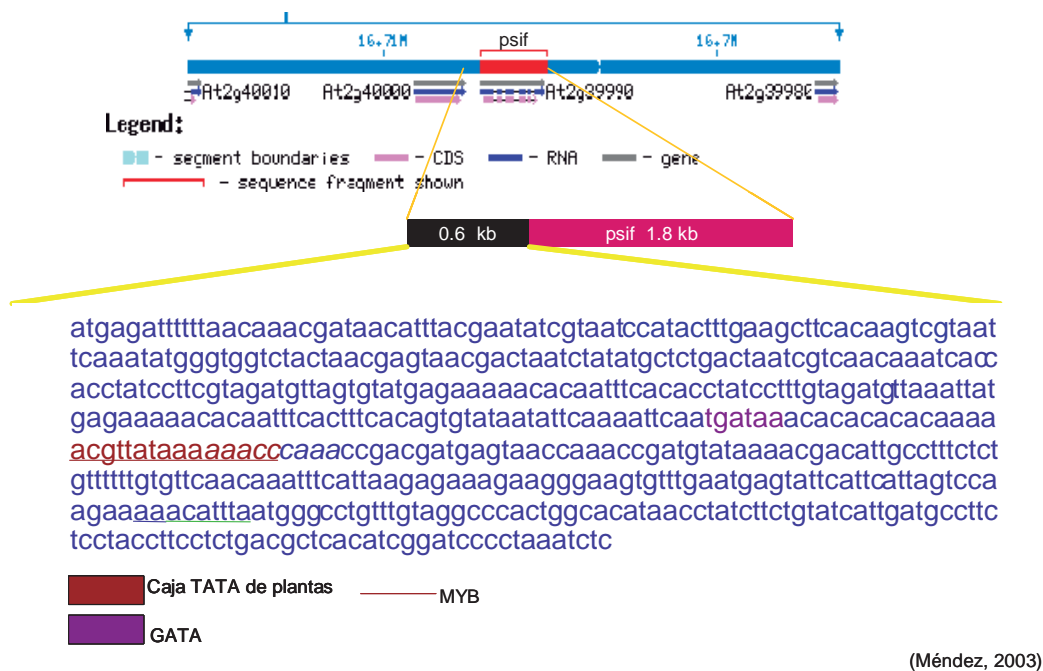


Figura 2.4 Secuencia nucleotídica de psif de *Arabidopsis thaliana*. Se muestra la secuencia situada en la región posterior al término del gen situado en el locus anterior a psif (At2g 40000) y previa al sitio de inicio de la transcripción de psif (At2g39990).

De la búsqueda de la secuencia correspondiente a homólogos de p47 o subunidad eIF3f que corresponde a psif se encontró como secuencia unigénica localizada en el cromosoma II con el locus At2g 39990. La región intergénica previa al inicio del mensajero

de psif se denominó *RegAth*, en ella se identificaron probables elementos correspondientes a un típico promotor vegetal, tales como la caja TATA, el elemento GATA y un sitio unión a factores transcripcionales reguladores de la división celular en plantas adscritos al ciclo celular de la familia MYB (Ito, *et al.*, 1998).

Con base en los antecedentes mencionados nos planteamos la pregunta: ¿corresponde la secuencia de *RegAth* al promotor funcional de psif, y será esta región capaz de responder a estímulos específicos del ciclo celular y a la presencia de auxina?

CAPÍTULO III

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

La región identificada como *RegAth* corresponde al promotor funcional de psif de *Arabidopsis thaliana*, se activa específicamente durante la transición G2/M del ciclo celular y es regulado por auxina.

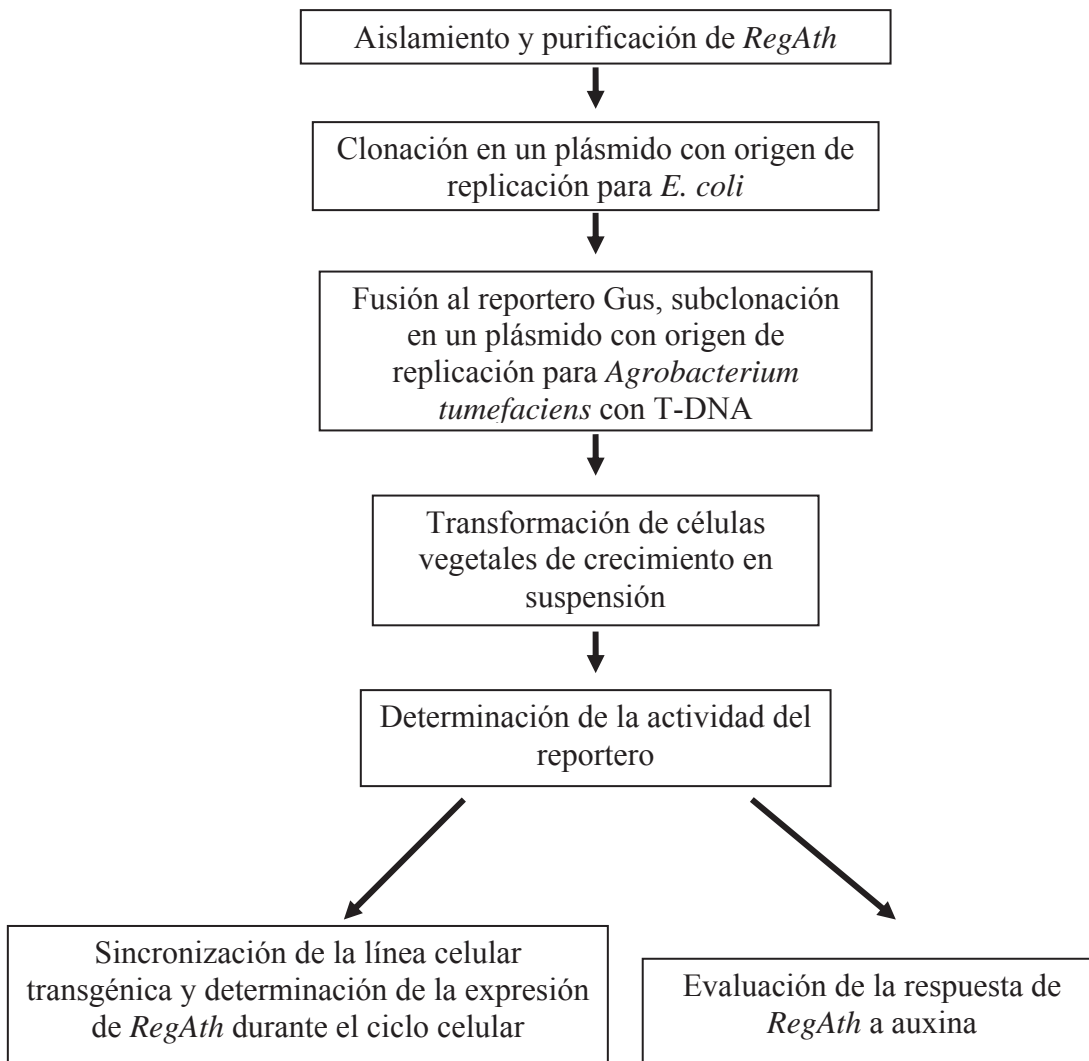
3.2 OBJETIVO GENERAL

Determinar la funcionalidad de *RegAth*, su patrón de activación dependiente del ciclo celular y su respuesta a auxina.

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislar y clonar a *RegAth*.
2. Realizar una fusión transcripcional de *RegAth* al gen reportero β -glucoronidasa (*gus*).
3. Obtener transformantes vegetales que contengan la fusión *RegAth-gus* y comprobar su activación transcripcional.
4. Caracterizar la inducción de *RegAth* durante el ciclo celular en cultivos de crecimiento en suspensión de tabaco.
5. Evaluar la respuesta de *RegAth* a la auxina.

CAPÍTULO 1V
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL



CAPITULO V

MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 CEPAS Y PLÁSMIDOS

Como células receptoras bacterianas se utilizaron las cepas de *Escherichia coli*, XLblue y DH5 α , y la cepa LBA 4404 de *Agrobacterium tumefaciens*.

La línea celular de tabaco *Nicotiana tabacum* de crecimiento en suspensión empleada como modelo de estudio fue la Nt-1 (Gynheung, 1985).

Para la clonación de *RegAth* se utilizó el plásmido comercial pGEM -T (Promega), diseñado para la inserción de productos amplificados por PCR (figura 5.2).

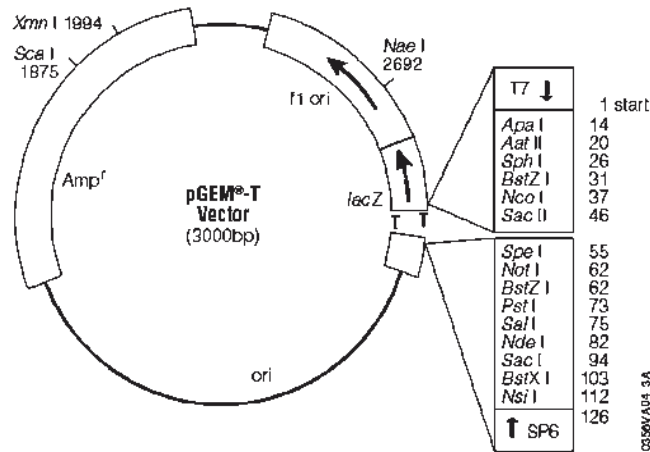


Figura 5.1 Mapa del plásmido pGEM-T. El producto amplificado se inserta en dos extremos de Timina (T) en un sitio múltiple de clonación (MCS) ubicado dentro del gen *LacZ*, con un origen de replicación para *E. coli* (ori), y un gen de resistencia a ampicilina como marcador de selección (Amp^r) (Promega, TM042).

Una vez clonado el inserto *RegAth* en el vector pGEM-T, este se subclonó en el plásmido pBluescript SK+ (pSK) (figura 5.2).

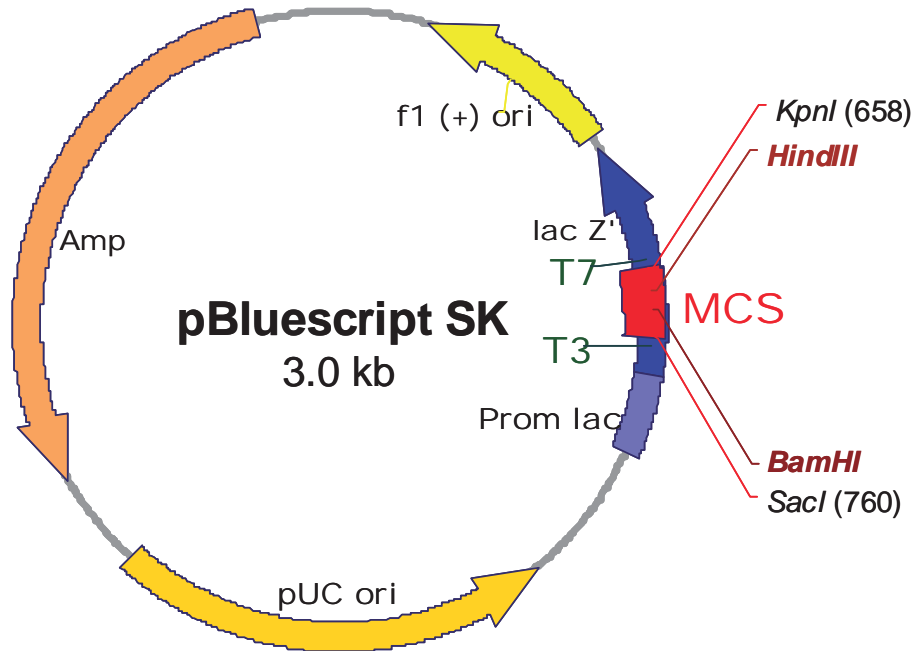


Figura 5.2 Mapa físico del vector de clonación pSK+. Contiene: un origen de replicación de alto número de copias para *E. coli*, (pUC ori), un sitio múltiple de clonación (MCS) con un gran número de sitios de restricción únicos situado en el gen *LacZ* (*lac Z'*), y el gen de resistencia a ampicilina β -*lactamasa* (ampicilin resistance). Se indican a la derecha los sitios de restricción relevantes para dirigir la inserción de *RegAth* (*HindIII*, *BamHI*) y los que flanquean el MCS (*SacI*, *KpnI*).

La fusión transcripcional de *RegAth* a la región codificante del gen reportero β -glucoronidasa uidA (*gus*) (Novel y Novel, 1973) se realizó en el plásmido pRITA I (figura 5.3).

El cassette *RegAth-gus-nos* fue liberado del pRITA y subclonado en el plásmido para el sistema binario de transformación por *Agrobacterium* pART 27 (Gleave, 1992) (figura 5.4).

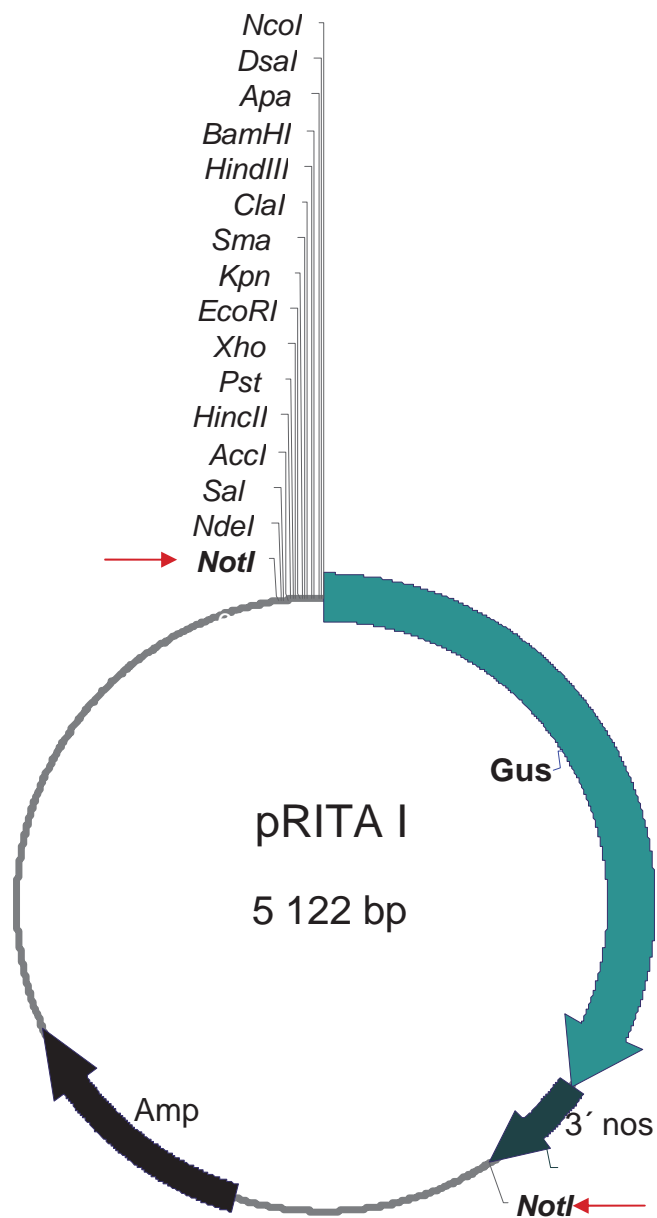


Figura 5.3 Mapa del vector pRITA I. Contiene: un gen de resistencia a ampicilina (Amp), un MCS -sin ningún codón AUG- ubicado en el fragmento α del operón lacZ en dirección 5' de la región codificante del reportero gus, el terminador del gen de la nopalina sintasa (3' nos) en dirección 3' de gus y dos sitios octaméricos únicos de restricción para la endonucleasa *NotI* (indicados con una flecha roja) que permiten la escisión del cartucho completo que incluye MCS-gus-nos.

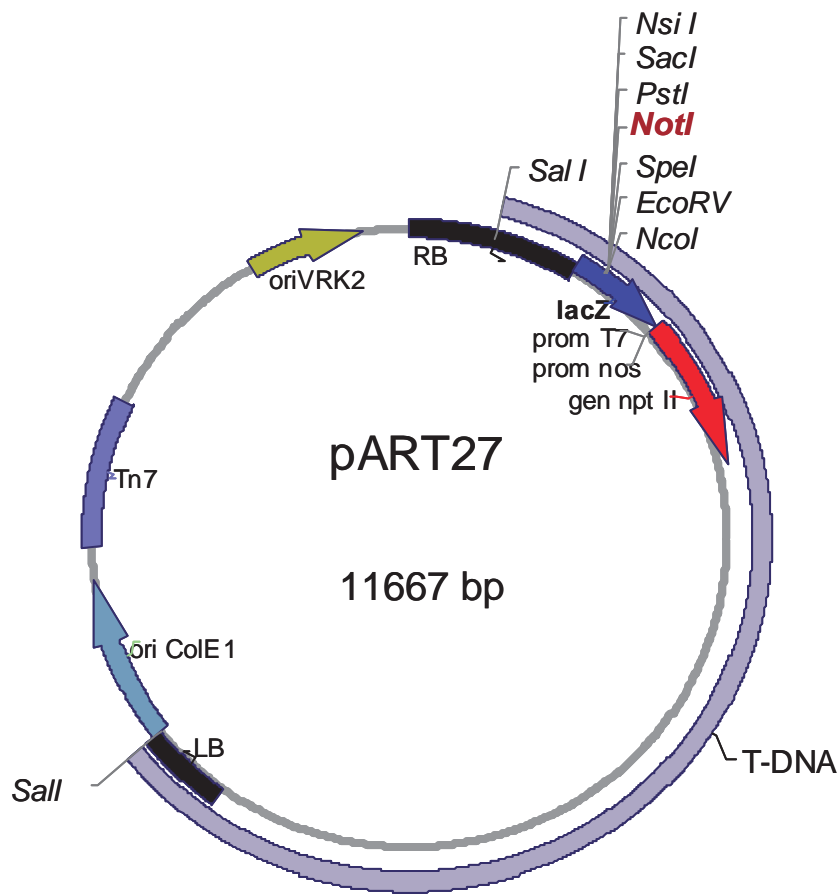


Figura 5.4 Mapa del vector para el sistema binario de *A. tumefaciens* pART 27. Contiene: un origen de replicación de alto número de copias para *E. coli* (oriColE1) y uno de bajo número de copias para *Agrobacterium* (oriVRK2), un T-DNA (región gris) flanqueado por los extremos izquierdo y derecho (LB y RB, respectivamente) que posee un MCS de pocos sitios de restricción (se resalta *NotI*), en el gen de *lac Z* y el gen de resistencia vegetal a kanamicina (*nptII*).

5.2 MEDIOS DE CULTIVO

5.2.1 MEDIO DE CRECIMIENTO PARA BACTERIAS Y ANTIBIÓTICOS

El medio de cultivo LB (Luria Bertani) fue utilizado para crecer las cepas de *E. coli* (Sambrook *et al.*, 1989). Para su preparación se disolvieron 10 g de peptona de caseína, 5 g de extracto de levadura y 10 g de cloruro de sodio para 1 l volumen final. Se esterilizó por

calor a presión constante. Para la preparación de medio sólido se adicionaron 15 g/l de agar bacteriológico.

Como antibiótico de selección de las cepas transformantes de *E. coli* se empleó ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml para el medio sólido y de 50 µg/ml para el medio líquido. La espectinomicina se utilizó a una concentración final de 300 µg/ml.

Como marcador de selección para la cepa madre de *A. tumefaciens* el antibiótico usado fue rifampicina disuelta en metanol a una concentración final de 30 µg/ml. Y para las células transformantes, se empleó espectinomicina a 100 µg/ml final.

5.2.2 MEDIOS DE CRECIMIENTO PARA CÉLULAS VEGETALES Nt-1

Las células perennes de crecimiento en suspensión Nt-1 son cultivadas en 100 ml de medio con sacarosa (30 g/L) como fuente de carbono, mezcla de sales para plantas de macronutrientes MS (Murashige y Skoog, 1962) (4.3 g/L) y KH₂PO₄ (0.2 g/L), la auxina sintética 2,4-D (1 µM), vitamina (tiamina:mioinositol, 0.5:50 g/L) a pH 5.8 ajustado con KOH; denominado LS (modificado de Linsmaier y Skoog, 1964).

Una vez transfectadas las células Nt 1 por *A. tumefaciens* (ver 5.13), la bacteria fue eliminada con cefatoxima a 25 µg/ml. Para la selección de callos transformantes de Nt-1 se utilizó kanamicina a una concentración final de 50 µg/ml en medio LS sólido y de 30 µg/ml en el medio líquido.

5.3 RESIEMBRA SEMANAL DEL CULTIVO EN SUSPENSIÓN Nt-1

Cada 100 ml de medio LS son inoculados con 6 ml de células de 7 días de crecimiento. En condiciones aeróbicas, estériles, en oscuridad y agitación orbital constante de 120-130 rpm se incuban a 26° C durante 7 días.

5.4 AISLAMIENTO DE PLÁSMIDOS POR LISIS ALCALINA (MINI-prep)
(modificado de Sambrook *et al.*, 1989)

Esta técnica se utilizó para el aislamiento y purificación de plásmidos bacterianos, a partir de 5 ml de cultivo líquido, crecido hasta fase exponencial. En tubos *ependorf* de 1.5 ml se centrifugó en cultivo durante 1 min a 3 600 rpm. El agregado celular se resuspendió en 1 ml de STE frío, se agitó en vórtex hasta homogeneizar y se centrifugó 5 min a 3600 rpm. El precipitado fue resuspendido en 300 μ l de solución de resuspensión (5 mM de glucosa, 10 mM de EDTA, 25 mM de Tris-HCl pH 8, RNasa 40 μ g/ml) a 4°C. Se adicionaron y homogeneizó por inversión con 300 μ l de una solución fresca de lisis (0.2 N de NaOH y 1% de SDS), dejando reposar 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 300 μ l de solución neutralizante (60 ml de una solución de acetato de potasio 5 M, 11.5 ml de ácido acético glacial y 28.5 ml de agua desionizada) y se incubó en hielo durante 10 min. Posteriormente se centrifugó 15 min/14 000 rpm/4° C. El ácido nucleico fue precipitado con 0.7 vol de isopropanol frío por centrifugación durante 30 min/14 000 rpm/4° C. Se lavó el sobrenadante con 1 ml de etanol frío al 70 % centrifugando 5 min/14 000 rpm. La pastilla se secó al vacío a 30°C y fue resuspendida en 50 μ l de agua desionizada estéril. Las extracciones fueron analizadas por electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

5.5 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Las distintas muestras de DNA aislado en este trabajo fueron analizadas mediante separación molecular por electroforesis en gel de agarosa al 1%, la agarosa fue disuelta por calor en amortiguador TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM, pH 6.8). A las muestras a analizar se les agregaron en una proporción 1:5 colorante de carga (1.5 g de ficoll, 0.25 g de azul de bromofenol y 0.25 g de xilencianol por cada 10 ml). El corrimiento se realizó aplicando 90 voltios y el DNA fue detectado por fluorescencia en transiluminador de luz UV agregando al gel 5 μ l de bromuro de etidio (0.05 μ g/ml).

Para las muestras de DNA que posteriormente serían purificadas del gel para insertarlas en algún vector de clonación se realizó un gel de agarosa al 0.8% y se utilizó una corriente de 70 voltios.

5.6 RECUPERACIÓN Y LAVADO DE DNA A PARTIR DE UN GEL DE AGAROSA

Para la purificación específica y clonación subsiguiente de cada fragmento de DNA, ya sea amplificado por PCR o liberado de algún plásmido por digestiones enzimáticas, se realizó una electroforesis en agarosa para cortar del gel cada banda de interés y ser purificado con el kit de Promega “Wizard sv Gel and PCR Clean up System” (A9280) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La concentración final de DNA se determinó electroforéticamente corriendo 2 μ l del total en un gel de agarosa.

5.7 PURIFICACIÓN DE DNA A PARTIR DE SOLUCIÓN (EXTRACCIÓN FENÓLICA) (modificado de Sambrook *et al.*, 1989)

Se llevaron todas las muestras a un volumen mínimo de 200 μ l, y se les agregó 1 volumen de solución de Fenol:Cloroformo:Isoamílico 25:24:1. Se agitó en vórtex y se centrifugó durante 3.5 min/13,200 rpm.

Al sobrenadante se homogeneizó en un volumen de Solución Cloroformo: Isoamílico 24:1 y se centrifugó por 3 min/13,200 rpm.

Del sobrenadante obtenido se precipitó el ácido nucleico con 2.5 volúmenes de etanol absoluto y 0.3 volúmenes de Acetato de Amonio 7.5 M agitando por inversión, incubando a -20° C un tiempo mínimo de 2 hr y centrifugando durante 9 min/13 200 rpm/ 4° C. La pastilla fue lavada con 1 ml de etanol frío al 80% centrifugando 3 min/13 200 rpm, y finalmente se secó por vacío a 10 min/ 30° C para resuspender en agua desionizada estéril. Cada solución de DNA se almacenó a -20° C.

5.8 REACCIONES DE LIGACIÓN

La ligación de cualquiera de los insertos de DNA a los vectores para las distintas construcciones genéticas realizadas se logró manteniendo una proporción equimolar de extremos 2:1 (inserto:vehículo 200 ng) estas construcciones fueron denominadas pRCE 202-204. Mientras que la ligación del amplificado de *RegAth* por PCR a partir de DNA de *A. thaliana* al vector pGEM-T se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante y la

construcción obtenida se denominó pRCE 201. Las reacciones se incubaron a 21°C durante 12 h utilizando ligasa T4 (Promega, M1801).

5.9 PREPARACIÓN DE CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES DE *E. coli* Y *A. tumefaciens* (modificado de Sambrook *et al.*, 1989)

Las células electrocompetentes de *E. coli* y *A. tumefaciens* que fueron transformadas por electroporación se obtuvieron mediante el siguiente protocolo:

Se partió de cultivos en líquido de 5 ml en fase estacionaria. De estos cultivos se reinocularon 250 µl en 250 ml de medio LB líquido y se incubaron hasta alcanzar la fase exponencial. Estos cultivos se vaciaron en 1 l de medio y se incubaron hasta obtener una absorbancia de 0.2 a 600 nm. Se centrifugaron en botellas de 250 ml durante 15 min/4 000 rpm /4° C. El agregado celular se resuspendió en agua desionizada estéril y fría. Se centrifugó nuevamente 15 min/4 000 rpm /4° C y el agregado se resuspendió nuevamente con agua desionizada estéril y fría. Se repitió el ciclo de centrifugación y la pastilla obtenida se resuspendió en 3 ml de glicerol al 10%. De la mezcla se tomaron alícuotas de 100 µl en tubos eppendorf y se almacenaron a -80° C.

Todo el experimento se realizó bajo condiciones estériles y manteniendo las células a 4°C.

5.10 TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS POR ELECTROPORACIÓN

Para las transformaciones realizadas a bacterias con los distintos plásmidos se empleó el siguiente protocolo: se adicionaron 2 µl de la ligación/plásmido a 80 µl de células electrocompetentes y se incubó 2 min en hielo en una celda para electroporación; posteriormente, se aplicó el choque eléctrico de 2 500 voltios e inmediatamente se adicionó 1 ml de LB; las muestras fueron incubadas durante 1 h a 37°C en agitación suave; de este cultivo se tomaron alícuotas de 25 µl, 50 µl y 150 µl que se sembraron en cajas petri con medio selectivo y se incubaron a 37°C por 14 h.

5.11 DIGESTIONES ENZIMÁTICAS

5.11.1 DIGESTIÓN DE PLÁSMIDOS

Para digirir el plásmido pSK se realizó la siguiente reacción: agua desionizada estéril a un volumen final de 30 µl, 3 µl de buffer 10X, 2 µg de DNA, 2 µl de enzima *HindIII* incubando por 12 h a 37° C. Se lavó la reacción por extracción fenólica y se realizó una siguiente digestión con la enzima *BamHI* en las mismas condiciones y de igual manera se purificó el DNA digerido.

La doble digestión de pRITA con *KpnI-BamHI* se obtuvo de la siguiente reacción: agua desionizada estéril a un volumen final de 30 µl, 3 µl de buffer multicore (Promega) 10X, 1.5 µg de DNA, 2 µl de cada enzima. La reacción se incubó durante 12 h a 37° C.

La digestión del plásmido pART27 con la enzima *NotI* mediante la siguiente reacción: agua desionizada estéril a un volumen final de 50 µl, 5 µl de buffer 10X, 1.5 µg de DNA, 4 µl de enzima. La reacción se dejó incubar 18 h a 37 °C.

Todas las digestiones se analizaron electroforéticamente corriendo 1 µl/muestra en un gel de agarosa al 1%.

5.11.2 LIBERACIÓN DE FRAGMENTOS PARA SUBCLONAR

La región *RegAth* fue liberada del vector pRCE201 utilizando los dos sitios de restricción insertados en los oligos diseñados para su amplificación mediante las siguientes reacciones de digestión : agua desionizada estéril a un volumen final de 30 µl, 3 µl de buffer 10X, 1 µg de DNA, 2 µl de enzima *HindIII*, se incubó 12 hrs a 37 °C. Se lavó la reacción por extracción fenólica y se realizó una siguiente digestión con la enzima *BamHI* en las mismas condiciones y de igual manera se purificó el DNA digerido.

La liberación de *RegAth* del plásmido pRCE202, se obtuvo mediante dos digestiones por separado. En la primera digestión, la muestra fue sometida a la acción de la enzima *KpnI* para lo cual se realizó la siguiente mezcla: agua desionizada estéril a un volumen final de 30 µl, 3 µl de buffer 10X, 1 µg de DNA, 2 µl de enzima, durante 6 h a 37 °C. Posterior al lavado por extracción fenólica, el DNA se digirió con la enzima *BamHI*. Para esta reacción se realizó la siguiente mezcla: agua desionizada estéril a un volumen final de 30

μl, 3 μl de buffer 10X, 0.5 μg de DNA, 1 μl de enzima. Se incubó la reacción a 37° C durante 12 h y se detuvo la reacción incubando 15 min a 65° C, y posteriormente se lavó el DNA por una extracción fenólica.

Para escindir la fusión *RegAth-gus-nos3'* del plásmido pRCE203 se digirió con la enzima *NotI* mediante la siguiente reacción: agua desionizada estéril a un volumen final de 50 μl, 5 μl de buffer 10X, 1.5 μg de DNA, 4 μl de enzima. La reacción se dejó incubar 18 h a 37 °C, y finalmente se purificó el DNA por extracción fenólica.

Cada digestión fue corroborada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, comparándola con el plásmido sin digerir y/o linearizado.

5.11.3 ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN

Las digestiones enzimáticas para los análisis de restricción en todos los casos se realizaron mezclando: agua desionizada estéril a un volumen final de 20 μl, 2 μl de buffer 10X, 1 μg de DNA, 1 μl de enzima (la endonucleasa correspondiente para liberar cada inserto).

5.12 AISLAMIENTO DE DNA A PARTIR DE TEJIDO VEGETAL

Se extrajo DNA total a partir de tejido aéreo de *A. thaliana* para la posterior amplificación de *RegAth* y a partir de células Nt-1 siguiendo el siguiente protocolo:

Se trituró el tejido o agregado celular en mortero con pistilo a T° de N2 líquido. El molido se pasó a un tubo cónico de 50 ml con 1 ml/g de tejido de buffer de extracción (1 % Sarcosil, 0.8 M NaCl, 0.022 M EDTA pH 8.00, 0.22 M Tris – HCl pH 7.8, 0.8 % CTAB, 0.14 M manitol, 1 mM β-mercapto etanol). Se agregaron 20 ml de cloroformo:alcohol isoamílico, agitando por inversión y se incubó a 65° C con agitación ocasional y destapando el tubo periódicamente. Las muestras se centrifugaron durante 10 min/10 000 rpm. Del sobrenadante obtenido se precipitó el DNA con 1 volumen de isopropanol centrifugando 10 min/10 000 rpm. La pastilla se lavó con 1 ml de et-OH al 70 % centrifugando por 4 min/10 000 rpm; la pastilla finalmente se secó por vacío a 10 min/30° C para resuspender en 500 μl agua desionizada estéril y se digirió con RNAasa 10 μg/ml a

37° C durante 15 min. Posteriormente se purificó el DNA por extracción fenólica, se resuspendió en H₂O y cuantificó en espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm.

Se determinó la integridad y la pureza del DNA extraído por electroforesis en gel de agarosa al 0.7%.

5.13 TRANSFORMACIÓN DE Nt-1 POR EL SISTEMA BINARIO DE *Agrobacterium tumefaciens* (modificado de Van Der Zaal *et al.*, 1991)

Este método se realizó para obtener cultivos transgénicos con la construcción *RegAth-gus*. El procedimiento efectuado fue el siguiente:

Una colonia aislada de células de *A. tumefaciens* transformadas con la construcción pRCE204 se creció durante ~20 h en 5 ml de medio LB líquido con espectinomicina 100 µg/ml. Se concentró el agregado celular del cultivo centrifugando durante 5 min/5 000 rpm y el precipitado se resuspendió en 10 ml de LB. Se centrifugó nuevamente durante 5 min/5 000 rpm, y una vez más el agregado celular se resuspendió en 4.5 ml de LB. Se agregaron 50 µl de esta suspensión bacteriana a 4 ml de un cultivo de Nt-1 de 3-4 días de crecimiento, en caja petri chica de 5 cm de diámetro mezclando cuidadosamente. Las cajas selladas se incubaron en oscuridad total a 28° C durante 48 h.

La mezcla celular se mezcló por pipeteo y se centrifugaron 10 ml en tubos cónicos de 50 ml durante 5 min/1 200 rpm. El agregado se resuspendió en 40 ml de medio LS agitando suavemente y se centrifugó por 5 min/1 200 rpm; se repitió el paso anterior pero agregando al medio cefatoxima para eliminar las bacterias. El sedimento se resuspendió en 5 ml de este medio selectivo. Empleando un pipeteo suave se mezclaron 2 ml de las células en medio selectivo, en un tubo nuevo e inmerso en baño maría a 37° C, con 2 ml de LS + agarosa de bajo punto de fusión y antibiótico bacteriano + el antibiótico de selección vegetal a una concentración 2X. La mezcla se vació inmediatamente a caja petri chica y se dejó polimerizar la agarosa durante ~20 min a T° ambiente. Las cajas fueron incubadas durante 12 días a 28° C en oscuridad total, hasta que los callos resultantes alcanzaron un diámetro aproximado de 2-3 mm. Estos callos se disgregaron en 100 ml de LS en condiciones normales de crecimiento, manteniendo el antibiótico de selección vegetal durante el primer ciclo de resiembra.

5.14 SINCRONIZACIÓN DE CÉLULAS Nt-1 POR ARRESTO CON AFIDICOLINA (modificado de Nagata y Kumagai, 1999)

Estos experimentos se realizaron para mantener con un fenotipo homogéneo de constante división y en la misma fase del ciclo celular los cultivos transgénicos. Se llevaron a cabo de la siguiente manera:

De un cultivo de 7-8 días de crecimiento se sembraron 13 ml de células en 100 ml de LS + afidicolina 5 mg/l y se incubaron durante 24 h en condiciones normales de crecimiento. Se lavó la afidicolina del cultivo filtrando en malla de tela con 600 ml de LS y se reinocularon las células colectadas en 100 ml de LS. Se tomaron muestras de 1 ml por triplicado durante cada hora, durante 13 h para determinar Índice Mitótico (I.M.), extraer RNA total y proteína total respectivamente.

5.15 DETERMINACIÓN DEL I.M. DE CÉLULAS Nt-1

Este parámetro se determinó como una medida indirecta de cuantificación de sincronización y actividad mitótica de los cultivos arrestados por afidicolina.

Las células colectadas se dejaron sedimentar en hielo durante 10 min, y se resuspendieron en 1 volumen de solución fijadora (), se almacenaron 12 h a 4° C.

Se lavaron las células con buffer salino de fosfatos (PBS) centrifugando 1 min/1 200 rpm. Se les agregó 200 µl de PBS y 0.2 µl de DAPI (10 mg/ml) incubando mínimo 6 h a 4° C. Se contaron por triplicado células en mitosis observando los cromosomas teñidos en campos completos de 20 µl de células en microscopio epifluorescente.

5.16 AISLAMIENTO DE RNA CON TRIZOL

Se extrajo RNA total de las transgénicas Nt-1 triturando en mortero a T° de N2 líquido las células y siguiendo este protocolo:

El molido fino fue almacenado a -80° C. Se descongeló mezclando con 500 µl de Trizol (Gibco/BRL) y fue incubado 5 min a T° ambiente. Se agregaron 200 µl de

coloformo, se agitó, y se incubó 3 min a T° ambiente. Las muestras se centrifugaron durante 15 min/14 000 rpm/4° C. La fase acuosa se mezcló suavemente con 500 µl de isopropanol incubando 10 min a T° ambiente. Nuevamente centrifugó por 10 min/14 000 rpm/4° C y se lavó la pastilla obtenida con 1 ml de EtOH 75% centrifugando durante 6 min/14 000 rpm/4° C y se secó parcialmente la pastilla en campana de flujo laminar. Finalmente, se resuspendió en 40 µl de agua libre de RNasas, se incubó durante 10 min/65° C/10 min y se agregaron 0.5 µl de inhibidor de RNasas (40U/µl). Las muestras de RNA se almacenaron a -20° C. Para determinar la integridad del producto de extracción se realizó un corrimiento electroforético para cada muestra en gel de agarosa al 1.2 %. La concentración se midió por absorbancia en espectrofotómetro a 260 nm.

5.17 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Para la amplificación de *RegAth* se diseñaron los oligos REGARAHIII 5' y REGARABI 3' en los cuales se sustituyeron 6 bases respecto a la secuencia obtenida del genoma de *A. thaliana* para insertarles los sitios de restricción *HindIII* y *BamHI* respectivamente (tabla 1), los cuales se localizan 45 bases posteriores al término de la región 3' no traducida del gen del locus anterior a *psif* (At2g40000) el primero, y 10 bases después del sitio de inicio de la transcripción de *psif* el segundo (figura 5.6). La reacción de amplificación se realizó en un volumen 50 µl mezclando los siguientes componentes: 5 µl de buffer de reacción (10X), 1.5 µl dNTP's (10 mM), 1.5 µl de MgCl₂ (50 mM), 2 µl oligos (20 pmol de cada uno), 1 µl de DNA (5ng/µl), 2 µl de Taq polimerasa, en un volumen final de 50 µl. La mezcla anterior se sometió a un proceso de amplificación de 35 ciclos a una temperatura de desnaturalización de 94° C/30 seg, de alineamiento a 55° C/45 seg, y de polimerización a 72° C/1 min, con un ciclo previo de 94° C/5 min y uno posterior de 72° C/5 min; para comprobar la amplificación del fragmento de interés se realizó un corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1 %.

La comprobación de la presencia del plásmido pRCE204 en *A. tumefaciens* y de la inserción de la construcción *RegAth-gus* en las células Nt-1 se realizó amplificando un fragmento de *gus* con los oligos *gus 36* y *gus 37* (cuadro 1) con las mismas condiciones de amplificación del párrafo anterior.

Cuadro 1. Oligonucleótidos utilizados

OLIGONUCLEOTIDOS	SECUENCIA (5'-3')	TAMAÑO (bp)
REGARAHIII 5'	catactttgAAGCTTcacaagtcgtaattcaaata	35
REGARABI 3'	gagatttagGGATCCgatgtgagcgtcag	29
gus 36	tcagcgttggtgggaaagcg	20
gus 37	gcgttgcttccgccagtgg	19

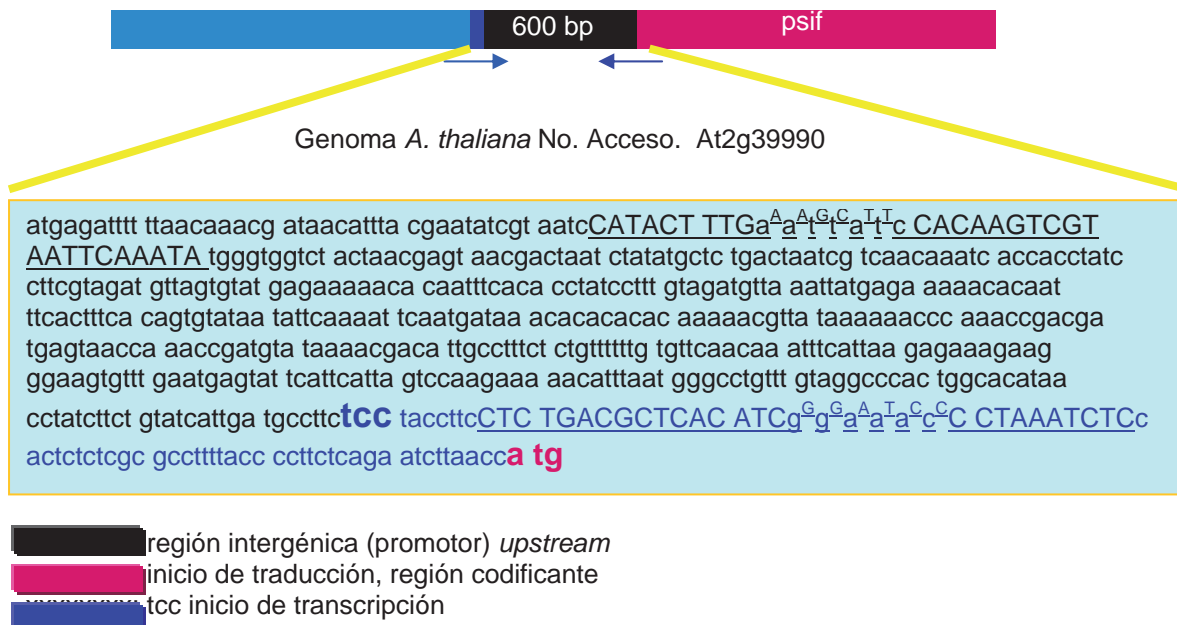


Figura 5.5 Esquema de localización de los oligonucleótidos en la secuencia de *RegAth* (5'-3'). Se indica subrayada la secuencia de los oligonucleótidos y en superíndice las sustituciones hexaméricas para insertar los sitios de restricción.

5.18 ENSAYO CITOQUÍMICO DE ACTIVIDAD DE GUS EN CÉLULAS Nt-1
(modificado de Jefferson, 1987)

Este ensayo cualitativo se basa en la capacidad enzimática de GUS de hidrolizar glucorónidos (ajenos a las plantas). El sustrato utilizado fue el 5-bromo-4-cloro-3-indolyl β -D-glucorónido (X-Gluc). El procedimiento seguido se describe a continuación:

De un cultivo de Nt-1 transgénicas de 7 días de crecimiento, se tomaron alícuotas de crecientes de células 0.5-2 ml, dejando sedimentar las células en hielo y agregando 500 μ l de solución de reacción (1 mM X-gluc, 100 mM buffer fosfatos de Sodio pH 7.0, 0.5 mM ferricianuro pH 7.0, 0.5 mM ferrocianuro pH 7.0). Se incubaron en oscuridad y con los tubos bien cerrados a 37° C durante 12 h. La formación de un precipitado azul insoluble por la oxidación del ácido glucorónico indica la actividad de GUS.

5.19 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL A PARTIR DE Nt-1 (modificado de Gallagher, 1992)

Para lisar las células Nt-1, estas fueron trituradas en mortero a T° de N2 líquido y el polvo obtenido se descongeló en 100 μ l de *Gus extraction buffer* (Na₂HPO₄ pH 7.0 50 mM, dithiothreitol 10 mM, EDTA 10 mM, lauril sarcosin Na 0.1%, tritón X-100 0.1%) (Jefferson, 1987) y se mantuvo en agitación durante ~15 min. Posteriormente, se centrifugó por 10 min/12 000 rpm/4° C. El sobrenadante se pasó a un tubo nuevo y se le adicionó inhibidor de proteasas PMSF 25 μ g/ml. Las muestras fueron almacenadas durante algunos días a 4° C o a -80° C durante períodos largos. La integridad de los extractos de proteínas se corroboró mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE) y la concentración se determinó por el ensayo colorimétrico de Bradford.

5.20 ENSAYO DE BRADFORD

Para determinar la concentración de proteína se realizó una curva estándar de albúmina sérica de bovino (BSA) disuelta en *Gus extraction buffer* (5.19) desde 2 μ g/ μ l hasta 10 μ g/ μ l. A estas muestras se les agregó NaCl 0.15 M y 900 μ l de solución de colorante Bradford (5 ml Etanol, 10 mg azul de Coomassie G-250, 10 ml H₃PO₄ 85% /100 ml). Se incubaron a temperatura ambiente por 2 min y se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro (figura 5.7).

La concentración proteica de los extractos celulares se determinó de la misma manera con 1 µl de cada muestra y sustituyendo los valores de densidad óptica en la ecuación de la recta de la curva estándar para expresar los valores en µg de proteína/µl del extracto.

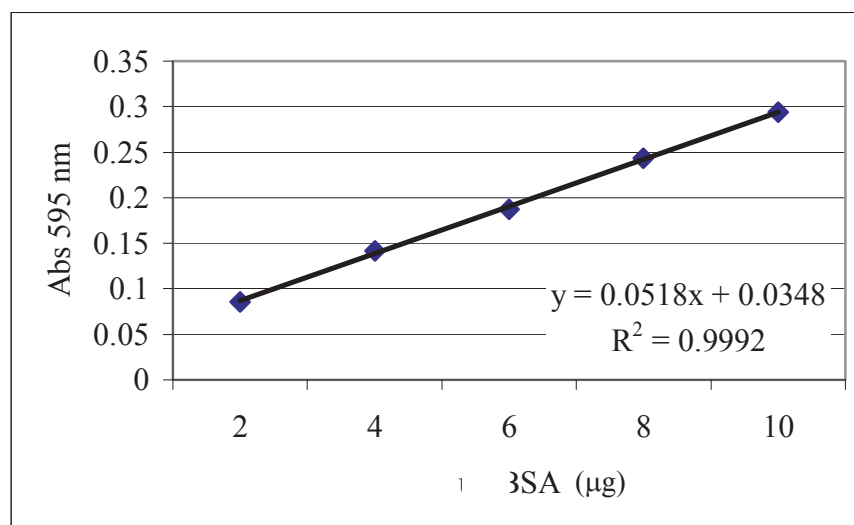


Figura 5.6 Curva estándar de concentración de albúmina sérica de bovino. Las graficas muestran la absorbancia obtenida para 2, 4, 6, 8, y 10 µg de BSA siguiendo el método de Bradford descrito en el texto.

5.21 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DESNATURALIZANTE (*SDS-PAGE*) (Sambrook, *et al.*, 1989)

El corrimiento electroforético de proteínas en condiciones desnaturalizantes se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 10 o 12%. Para el gel de resolución se mezclaron los siguientes componentes en un volumen final de 5 ml: 1.9 ml de agua desionizada estéril, 1.7 ml de acrilamida-bis 30% (Bio-Rad 161-0154), 1.3 ml de Tris 1.5 M pH 8, 0.05 ml de SDS 10%, 0.05 ml de persulfato de amonio 10% y 0.002 ml de TEMED; el gel concentrador al 5% se preparó realizando la siguiente mezcla: 0.68 ml de agua desionizada estéril, 0.17 ml de archilamida-bis 30% (Bio-Rad 161-0154), 0.13 ml de Tris 1 M pH 6.8, 0.01 ml de SDS 10%, 0.01 ml de persulfato de amonio y 0.0044 ml de TEMED.

Las muestras a analizar se prepararon adicionándoles 10 µl de buffer de carga 1X SDS (Tris-Cl pH 8.0 50 mM, dithiothreitol 100 mM, SDS 2%, azul de bromofenol 0.1%, glicerol 10%) y desnaturalizando a 100° C por 3 min. El corrimiento electroforético se realizó a 80 V para el gel concentrador y 100 V en el gel de separación, utilizando como amortiguador Tris-glicina 1X (stock 5X: 15.1 g, Tris-base, 94 g glicina en 900 ml de agua desionizada estéril, y 50 ml de SDS 10%).

5.21.1 TINCIÓN DE GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS CON AZUL DE COOMASSIE

Para teñir el gel de poliacrilamida-SDS se disolvieron 0.25 g de azul de Coomassie R-250 en 90 ml de agua:metanol: ácido acético glacial (45:45:10). Se sumergió el gel en esta solución y se mantuvo en agitación recíproca por 2 h como mínimo. Se desechó la solución y se agregó una solución agua:metanol:ácido acético 45:45:10 para desteñir el gel, misma que se cambió 3 o 4 veces en un periodo de 2 a 4 h en agitación constante.

5.22 ENSAYO FLUOROMÉTRICO DE ACTIVIDAD DE GUS (modificado de Jefferson, 1987)

El sustrato fluorogénico para GUS que se utilizó fue el 4-metil umbeliferil glucoronido (MUG. Sigma, 9130). Éste se preparó a una concentración de 2 mM disolviéndolo en *Gus extraction buffer*; el ensayo se efectuó como se describe a continuación:

El volumen necesario para tener 5 µg de los extractos de proteína de GUS se llevó a 250 µl con *Gus extraction buffer*. A esta solución se le agregó 1 volumen de MUG 2 mM, para quedar a una concentración 1 mM en 500 µl de reacción. Ésta fue incubada a 37° C y se colectaron 50 µl de muestra a los 15, 30, 60 y 120 min. Siempre se incluyeron las reacciones control: blanco (500 µl *Gus extraction buffer*) e hidrólisis espontánea (500 µl MUG 1 mM).

La reacción por cada muestra se detuvo agregando 1 950 µl de Na₂CO₃ 0.2 M para determinar las unidades de fluorescencia (rfu) en un fluorómetro (BioRad, 170-2402), y

calibrándolo a 1 000 rfu con 1 μ M del producto hidrolizado metilumbeliferona (MU. Sigma, 1508).

5.23 ENSAYO DE INDUCCIÓN POR AUXINA DE *RegAth* EN CÉLULAS Nt-1 (modificado de Boot *et al.*, 1996)

Los cultivos a inducir se sensibilizaron a bajas concentraciones de 2,4-D manteniéndolos durante dos ciclos de resiembra con 0.75X de la concentración normal (ver 5.2.2). La inducción se realizó de la siguiente forma:

De un cultivo de 8 días de crecimiento se lavaron 13 ml de células en malla de tela con 600 ml de medio LS sin auxina y éstas se sembraron en 100 ml de LS sin auxina. Se incubaron durante 48 h en condiciones normales de crecimiento.

De este cultivo privado de auxina se inocularon 20 ml en 50 ml de LS que contenían concentraciones de 0, 0.1, 1, 10 y 100 μ M de la auxina sintética ácido naftalen-acético (ANA) disuelta en etanol. Se incubaron en condiciones normales de crecimiento durante 6 h y se colectó el contenido total de cada tratamiento dejando sedimentar las células, para someter posteriormente a diferentes procedimientos de análisis: ensayo citoquímico de GUS, extracción de proteína total y extracción de RNA.

5.24 TRANSCRIPCIÓN REVERSA DE *gus* (*RT-PCR*)

El cDNA de *gus* se obtuvo mediante una reacción semicuantitativa de transcripción reversa, a partir del RNA obtenido de células Nt-1 transgénicas inducidas con ANA, así como cultivos sincronizados por arresto con afidicolina. El sistema utilizado fue el *iScript cDNA Síntesis Kit* (BioRad, 170-8891) siguiendo las instrucciones del fabricante, agregando 500 ng de RNA por reacción.

Para la amplificación del cDNA obtenido se emplearon los oligonucleótidos: *gus* 36 y 37 (ver cuadro 1), la reacción se llevó a cabo en 50 μ l utilizando la décima parte del cDNA total mezclando los siguientes componentes: 5 μ l de buffer de reacción (10X), 1.5 μ l dNTP's (10 mM), 1.5 μ l MgCl₂ (50mM), 2 μ l oligonucleótidos (20 pmol de cada uno), 2 μ l Taq polimerasa. La mezcla anterior se sometió a un proceso de amplificación de 15, 20 y

30 ciclos a una temperatura de desnaturalización de 94° C/45 seg, de alineamiento a 56° C/45 seg y de polimerización a 72° C/1 min, con un ciclo previo de 94° C/5 min y uno final de 72° C/1 min. Para comprobar la amplificación de la muestra y su cuantificación, se realizó un corrimiento electroforético con 10 µl de cada muestra en gel de agarosa al 1% y posteriormente, la fotografía de este gel se sometió a un análisis de opacidad con el sistema EDAS.

CAPÍTULO VI

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 CLONACIÓN DE *RegAth*

Para cumplir con el primer objetivo planteado (ver 3.3), era necesario contar con un par de oligonucleótidos específicos para amplificar la región identificada como *RegAth* por PCR a partir de DNA genómico de tejido aéreo de *A. thaliana*. Considerando cubrir la mayor parte de la región intergénica situada en dirección 5' a psif y procurando tener un balance del ~50 % de C-G s, se diseñaron y mandaron sintetizar los oligonucleótidos REGARAHIII 5' y REGARABI 3' (ver tabla 1 y figura 5.6).

Una vez concluida la reacción de PCR (realizada con 5 ng de DNA), y corroborada la presencia del fragmento específico esperado de ~600 bp (figura 6.1a), se purificó a partir de un gel de agarosa el DNA del total de la reacción para insertarlo en un vehículo de clonación para productos de PCR pGEM-T (figura 6.1b y 5.2).

Después de la ligación con el vector, el plásmido fue introducido por electroporación en la cepa de *E. coli*, DH5 α y de las colonias obtenidas en selección por ampicilina, se les realizó una extracción plasmídica para verificar el tamaño molecular esperado (3 600 bp) y someterlas a un análisis de restricción que liberara el inserto (con las enzimas *HindIII* y *BamHI*, figura 6.1c). Esta construcción genética se denominó pRCE201.

A continuación era necesario diseñar una estrategia de clonación que permitiera la fusión transcripcional de *RegAth* a *Gus* (*RegAth-gus*) y la posterior inserción en un vector con T-DNA para el sistema binario de *A. tumefaciens* (figura 6.2).

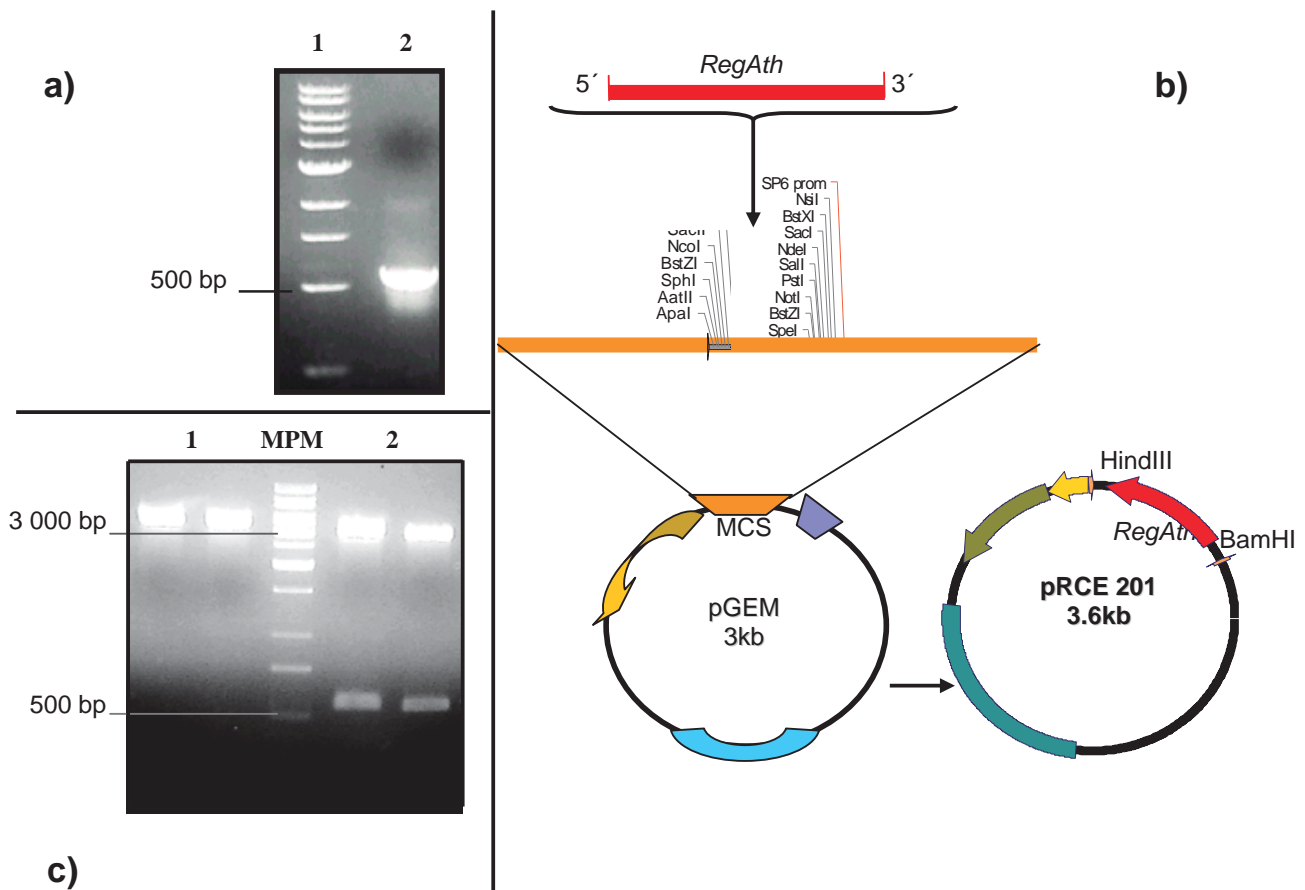


Figura 6.1 Amplificación e introducción de *RegAth* en el vector pGEM-T; **a)** Fotografía de la electroforesis en gel de agarosa de la PCR de *RegAth*. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular (MPM) de 250-10 000 bp; **b)** Diagrama de la inserción de *RegAth* en el MCS del vector de clonación. El plásmido obtenido se denominó pRCE201, se indican en el mapa los sitios de restricción que se usaron posteriormente para escindir el inserto; **c)** Fotografía de la electroforesis de pRCE201 linearizado por digestión con *HindIII* (carriles 1), vector e inserto liberados por doble digestión *HindIII.BamHI* (carriles 2). MPM de 500-10 000 bp.

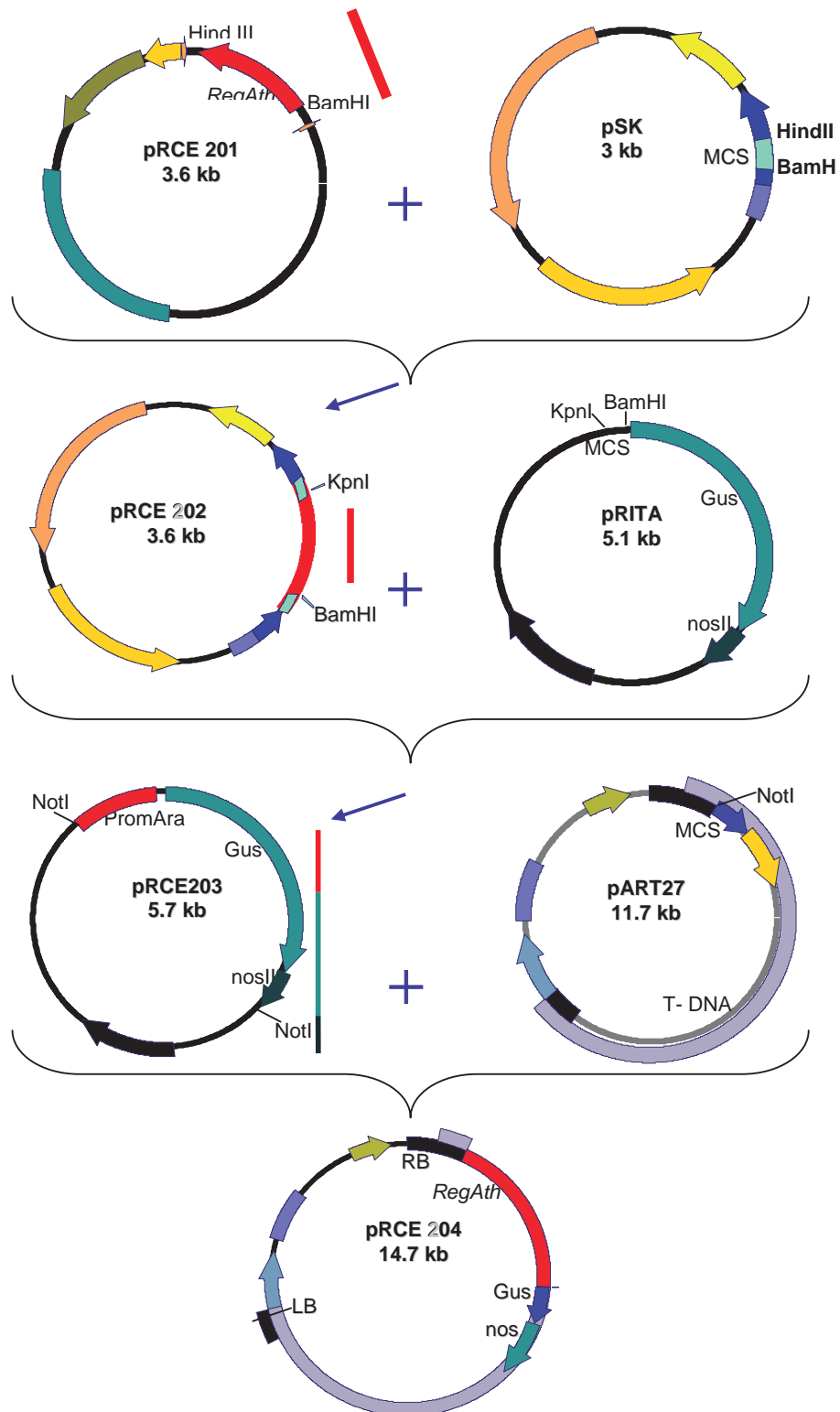


Figura 6.2 Estrategia de clonación de *RegAth*. Se realizó una subclonación previa a la fusión en el vector pSK en los sitios *HindIII*-*BamHI*, a partir de pRCE201, resultando en el plásmido pRCE202; la fusión se construyó en el vector pRITA, que posee una fusión del reportero *Gus* al terminador *nos* y permite la inserción de

promotores en un MCS –que no posee ningún ATG en su secuencia nucleotídica- en dirección 5´ a esta fusión para la posterior escisión del *casete* completo, la construcción obtenida se llamó pRCE203; la fusión *RegAth-gus-nos* fue liberada e insertada al vector “binario” pART27 en el sitio *NotI*, para obtener la construcción pRCE204, con la cual fue posible obtener transformantes de *A. tumefaciens*.

De la escisión de *RegAth* se purificó de gel de agarosa el fragmento y se ligó en el vector pSK digerido también con *HindIII-BamHI*. Con el producto de reacción se transformó la cepa de *E. coli* DH5 α , y de las colonias obtenidas se extrajo el DNA plasmídico (pDNA) para analizarse por restricción (figura 6.3a), obteniendo así, la construcción pRCE202. De esta manera quedaba cubierto el primer objetivo.

6.2 FUSIÓN DE *RegAth* A *Gus*

La fusión transcripcional *RegAth-gus* se realizó liberando *RegAth* del pRCE202 por digestión *KpnI-BamHI* (figura 6.3) y ligándolo de forma dirigida, en los mismos sitios del vector pRITA –sitios ubicados en el MCS, en dirección 5´ de *gus-* (figura 5.4), resultando en el plásmido pRCE203 (figura 6.2).

La fusión *RegAth-gus-nos* posee un tamaño de 2 800 bp, y se separó del resto del vehículo de 3 000 bp digiriendo en los sitios para la endonucleasa *NotI* (figura 6.3). De esta forma se verificó la presencia de la secuencia introducida al vector.

6.3 INTRODUCCIÓN DE *RegAth* A UN T-DNA

Una vez clonada la fusión de *RegAth* al gen reportero y a su terminador, se procedió a introducir el *casete* de expresión en el sitio único *NotI* del vector para *E. coli* y *A. tumefaciens* pART27 (figura 5.5). La separación en el gel de agarosa de los productos de digestión *NotI* de pRCE203 se dificultó considerablemente, debido a que la diferencia de tamaño entre los dos fragmentos es de poco menos de 200 bp y fue necesario prolongar la distancia de corrimiento en el gel y utilizar al 1.2 % la agarosa. A partir de este gel se purificó el fragmento de 2 800 bp.

Utilizando aproximadamente 10 ng del DNA empleado en la reacción de ligación *RegAt gus nos-ART27* se electroporaron las cepas XL1-Blue de *E. coli* y LBA

4404 de *A. tumefaciens*. Una vez realizada la purificación del pDNA, se corroboró la presencia de la construcción pRCE204 digiriendo nuevamente con *NotI* (figura 6.3c).

De esta manera concluimos nuestros objetivos iniciales para posteriormente integrar en el genoma de las células NT-1 a *RegAth-gus-nos*.

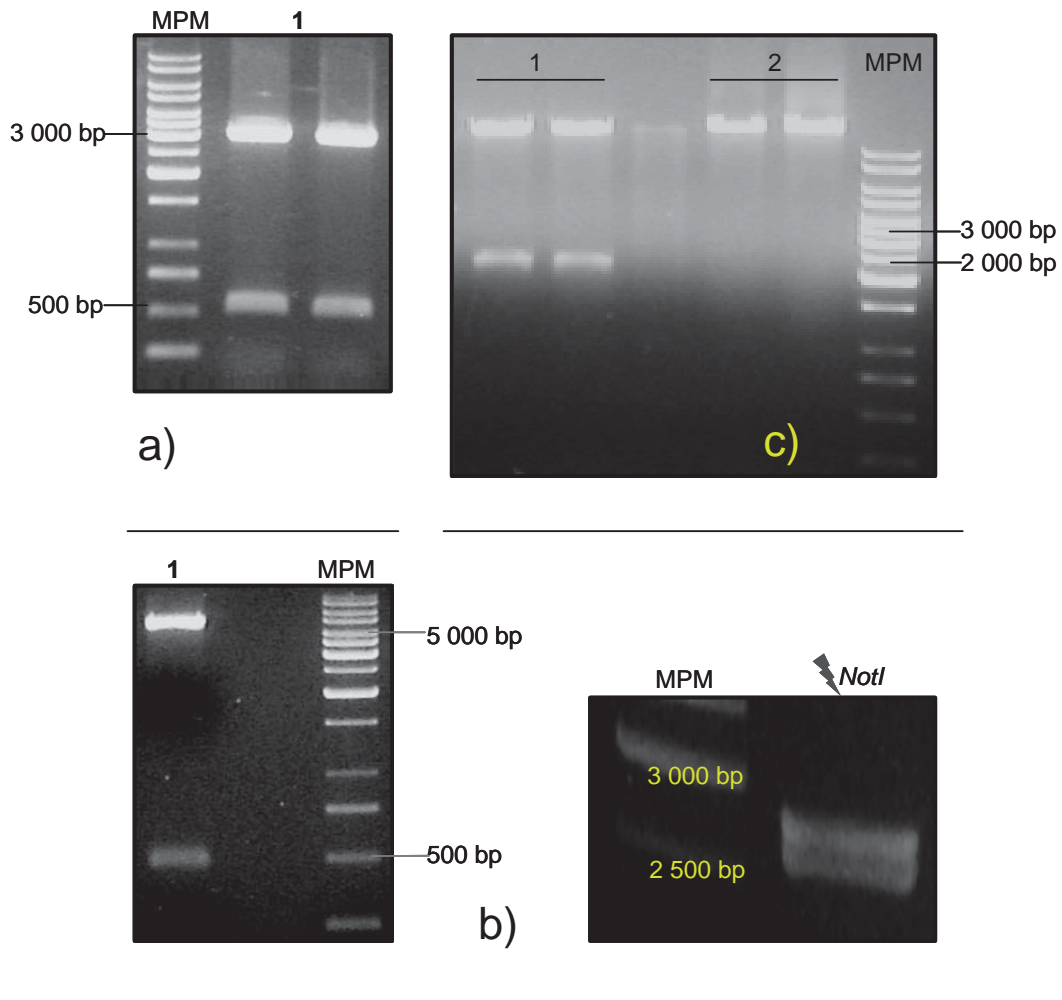


Figura 6.3 Análisis de restricción de las subclonaciones de *RegAth*. Fotografías del corrimiento electroforético de pDNAs extraídos a partir de cada construcción genética. Marcador de peso molecular 250- 10 000 bp (MPM); **a)** pRCE202 digerido en los sitios *HindIII-BamHI* (carril 1): se aprecian los dos fragmentos esperados, de 3 kb correspondiente al vector y de 600 bp que corresponde al inserto *RegAth* liberado; **b)** pRCE 203 digerido con *KpnI-BamHI* (gel lado izquierdo, carril 1): las bandas corresponden al vehículo RITA y al inserto fusionado a *gus*. La misma construcción,

pero liberando el *casete RegAth-gus-nos* por digestión *NotI* (gel lado derecho, carril *NotI*); c) pRCE204 extraído de 2 transformantes de *A. tumefaciens*, corte con *NotI* (carriles 1) y linearizado por corte con *EcoRV* (carriles 2).

6.4 OBTENCIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR Nt-1 TRANSGÉNICA CON EL T-DNA DE pRCE204

Una vez corroborada la presencia y el tamaño del *casete* introducido a la cepa LBA 4404, se creció durante 20 h en medio selectivo líquido para transfectar células de tabaco Nt-1 que son el modelo elegido para determinar la funcionalidad de *RegAth* y caracterizarlo transcripcionalmente mediante la expresión de *Gus*; concluido el tiempo de crecimiento bacteriano, se concentró (5.2.11) para realizar la transfección.

Se utilizó un cultivo estable en fase exponencial temprana (3 días de crecimiento) de Nt-1 para someterlo a la presencia de la cepa de *A.tumefaciens*. Se incubaron los volúmenes adecuados, tanto del cultivo vegetal como del bacteriano (5.2.11) durante 48 h y, se apreció al término de este tiempo, una capa blanquizca en la superficie del contenido celular. Se incluyó un control negativo de selección realizando una transfección con la cepa LBA 4404 transformada con el vector pART27 que no contenía el *casete* con nuestra construcción, y por lo tanto, carecía de la resistencia a Km como marcador de selección vegetal.

Después de eliminar y lavar las bacterias de la mezcla de transfección se siguió el procedimiento de selección de callos vegetales (5.2.11) y a los 12 días de incubación se apreció la presencia de abundantes callos con un diámetro de ~1.5 mm en las cajas que contenían la transformación con el T-DNA del pRCE204, caso contrario a las cajas control (figura 6.4), no hubo –como se esperaba- ningún callo. Con esto se validó el sistema de selección.

Se reinocularon en el medio de crecimiento vegetal + Km todos los callos de la caja en la que hubo mayor número para restablecer su fenotipo de crecimiento en suspensión. Además, para comprobar la inserción del transgén en el genoma de Nt-1, se trituraron en N2 líquido 3 callos por separado para amplificar en PCR por separado, a *RegAth* y *gus* (figura 6.4).

Las 3 extracciones dieron amplificación positiva específica, con lo que se comprobó la transgénesis esperada de las células vegetales.

Lo siguiente era esperar los días necesarios del restablecimiento del crecimiento en suspensión de la población celular.

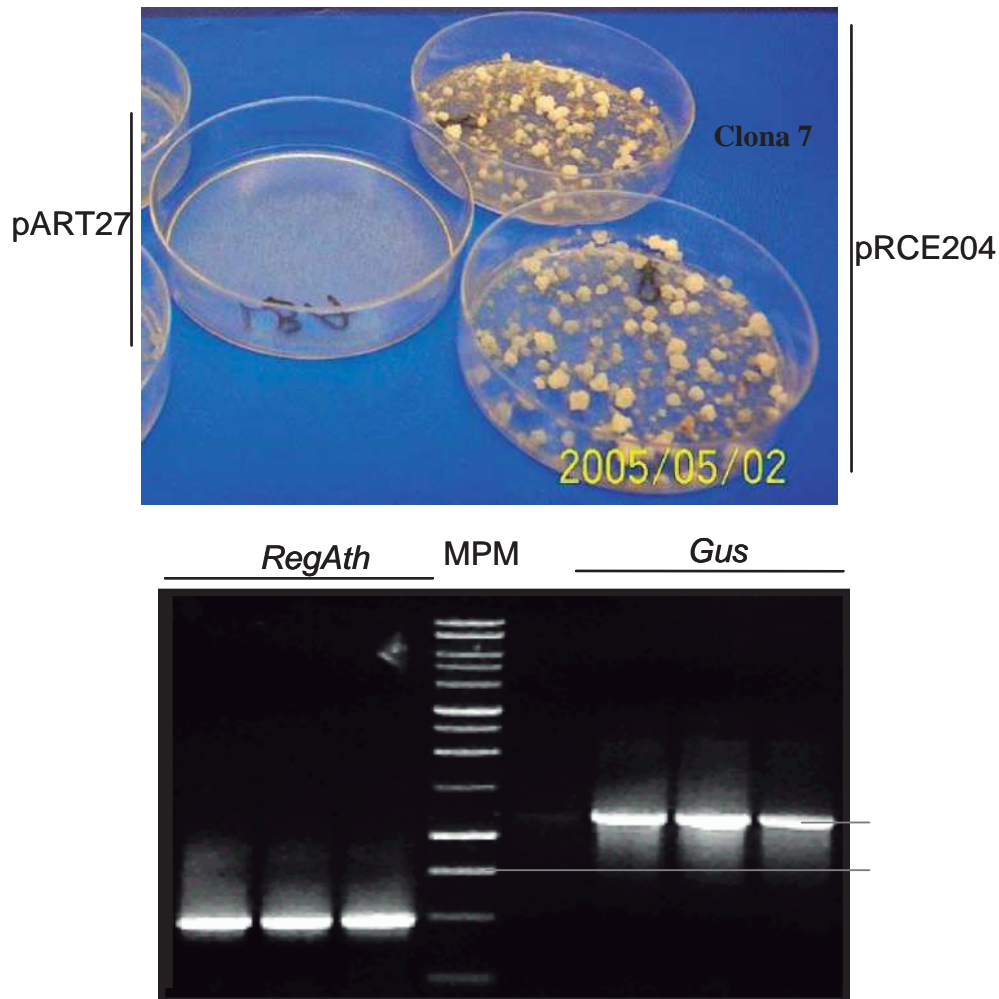


Figura 6,4 Transformación de Nt-1 con *RegAth-gus-nos*. **Foto superior:** Callos de 12 días de desarrollo en medio selectivo después de la transfección con *Agrobacterium*. Del lado izquierdo se presenta la transfección control (pART27), y del derecho la transfección con el T-DNA de pRCE204 por duplicado; **foto inferior:** electroforesis en gel de agarosa de los PCRs de *RegAth* y *gus*, a partir de DNA genómico de 3 callos de Nt-1 transfectadas por *Agrobacterium*. En ambos casos el producto específico fue el esperado (600 bp y 1.1 kb, respectivamente). MPM de 250-10 000 bp. se indican con la raya gris las bandas de 750 y 1 000 bp.

6.5 FUNCIONALIDAD DE LA FUSIÓN *RegAth-gus*

A los 8 días *post*incubación, los callos estaban completamente disgregados, se resembraron para mantener la línea celular y se tomaron muestras para ser sometidas a un ensayo citoquímico de actividad hidrolítica de *GUS*, que nos permitiría dilucidar si *RegAth* corresponde efectivamente a un promotor funcional.

El ensayo consistió en coleccionar del matraz con el cultivo transgénico (clona 7), al igual que del cultivo Nt-1 silvestre (que carece de la construcción *RegAth-gus*), muestras celulares de distinto volumen, dejar sedimentar en hielo, tirar el sobrenadante y agregarles la misma cantidad (1 volumen del agregado celular mayor) de solución de reacción con el sustrato cromogénico para *GUS* X-gluc (ver 5.2.15). Después de 12 h de incubar la reacción se esperaba apreciar una intensidad diferencial de tono azul, correspondiente al volumen celular utilizado.

No se observó tinción alguna en la reacción control, correspondiente a la línea silvestre. Caso contrario a la clona 7, la cual produce una intensidad del tono azulado dependiente del volumen de células utilizadas (figura 6.5).

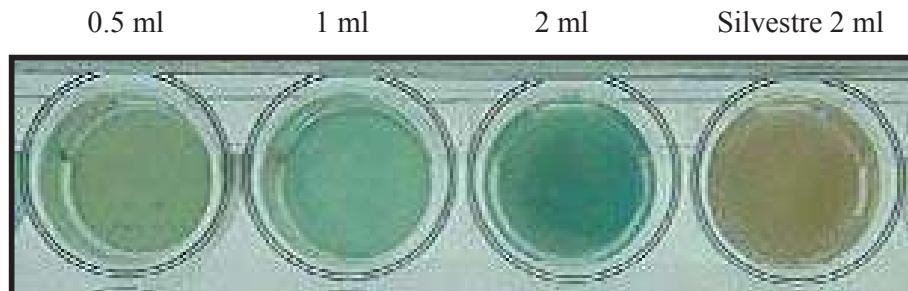


Figura 6.5 Actividad de β -glucoronidasa por inducción de *RegAth* en células Nt-1. La fotografía corresponde al ensayo citoquímico de *GUS*, la tinción azul es ocasionada por hidrólisis del X-gluc; el volumen celular utilizado en el ensayo y el cultivo control se indican en la parte superior de la fotografía.

Con el resultado obtenido se concluye que *RegAth* es un promotor transcripcionalmente activo, y validamos el uso de un sistema vegetal heterólogo para el estudio de la regulación transcripcional de *psif* en plantas.

Así, quedaba cubierto el tercer objetivo del trabajo.

6.6 CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *RegAth* DURANTE EL CICLO CELULAR

Con el fin de cumplir con el objetivo 5 del trabajo, el cultivo transgénico de Nt-1 clona 7 se sincronizó arrojando en fase S de ciclo celular adicionando afidicolina, y liberando del arresto por lavado 24 h después. Se colectó muestra durante cada hora para extraer proteína total por triturado en Nitrógeno líquido con buffer de extracción de GUS.

Se determinó la integridad y la homogeneidad de concentración de proteína mediante corrimiento electroforético en gel desnaturizante SDS-PAGE, cargando 10 μg de cada muestra (resultados no mostrados); con 5 μg de proteína se realizaron ensayos cuantitativos de actividad de GUS con el sustrato fluorogénico MUG (figura 6.6).

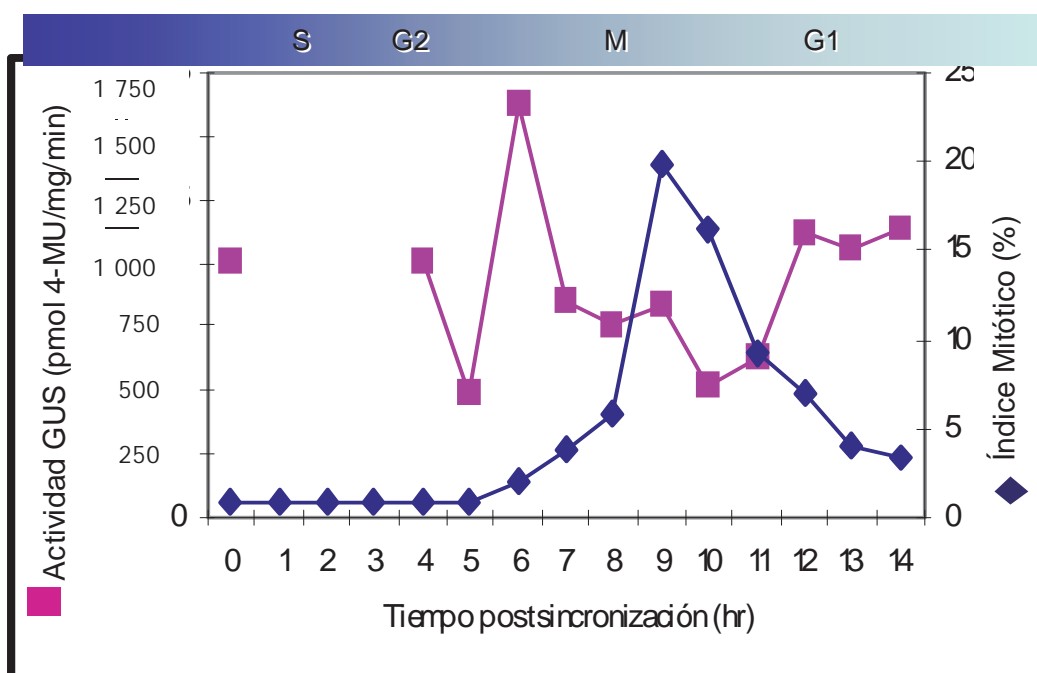


Figura 6.6 Actividad de *RegAth*-GUS durante el ciclo celular. Se muestra en la línea azul el índice mitótico determinado por conteo con microscopía epifluorescente del número de células en mitosis teñidas con DAPI, en la línea rosa los niveles de actividad enzimática de GUS representados en cantidad neta de MU/ mg de proteína/ unidad de tiempo, calculada a partir de la conversión de 1000 rfu/1 μM de MU.

El resultado obtenido sugiere la dependencia de expresión de *RegAth-gus* de la transición premitótica del cultivo. Se observa un pico de actividad 6 h después de la liberación de afidicolina, correspondiente a la transición G2/M del ciclo celular. Sin embargo, estos datos no son concluyentes debido a la variación de los niveles de actividad en diferentes repeticiones del ensayo, ocasionado quizás por una acumulación de la proteína de GUS durante el ciclo, siendo necesario corroborar en posteriores trabajos estos resultados midiendo la acumulación de mensajero de gus por experimentos de hibridación de tipo *Northern blot*.

6.7 INDUCCIÓN DE *RegAth* POR AUXINA

Como se mencionó en los antecedentes de este trabajo, el gen *psif* del frijol *P. vulgaris* posee un patrón de respuesta a diferentes auxinas de manera concentración-dependiente. Sin embargo, no se conoce tal característica en el gen de *A. thaliana* y, en consecuencia, era necesario determinar si esta respuesta era directamente inducida por su promotor.

El experimento realizado consistió en una primera fase de adaptación y sensibilización del cultivo transgénico clona 7 a bajas concentraciones de auxina. La auxina utilizada para el mantenimiento de esta línea celular es el 2,4 D, una auxina sintética que provoca fenotipos de respuesta a nivel molecular y fisiológico exagerados, por lo que, cuando se trabaja con un cultivo de este tipo, se recomienda disminuir a la mitad la concentración del compuesto, a fin de obtener resultados más confiables de respuesta.

En la segunda fase del ensayo, se lavó y privó de 2,4 D al cultivo de respuesta atenuada durante 48 h, para posteriormente, agregar una auxina en concentraciones crecientes (0, 1, 10 y 100 μM) y evaluar la respuesta de *RegAth* 6 h después de su aplicación. La auxina utilizada fue ANA, debido a que, a pesar de ser un compuesto sintético, provoca respuestas muy similares a las del ácido indol-acético (IAA), que es la auxina natural de los vegetales, pero su uso en este tipo de modelos biológicos se dificulta debido a que posee un coeficiente de extinción muy alto, en comparación al ANA.

Transcurridas las 6 h de inducción hormonal, se colectaron las muestras de los distintos tratamientos, una parte del cultivo se utilizó para realizar un ensayo

citoquímico con X-Gluc, y con el resto del cultivo se les extrajo proteína total y RNA para evaluar la actividad de *Gus* y su expresión a nivel de mRNA.

Con el ensayo citoquímico se esperaba obtener una tinción diferencial de las células de los tratamientos para validar el sistema de inducción auxínica; el resultado fue positivo, la intensidad de azul variaba respecto a las distintas concentraciones de ANA (figura 6.7).

La coloración por actividad de *GUS* en cada tratamiento con ANA de 3 ensayos independientes variaba, ésto debido a que el ensayo con X-Gluc no es cuantitativo (Jefferson, 1987), es decir, la intensidad de azul no necesariamente refleja la cantidad de enzima presente en la reacción.



Figura 6.7 Ensayo citoquímico de β -glucoronidasa en Nt-1 clona 7 inducidas por auxina. Fotografía de dos ensayos independientes, se indica la concentración utilizada de ANA.

Por ello, con 5 μ g de proteína total extraída en cada tratamiento, se realizó el ensayo cuantitativo de mayor precisión para la actividad de *GUS* reportado (Jefferson, 1987), con el sustrato fluorogénico MUG (ver 5.2.20).

Después de 2 h de incubada la reacción, esta se detuvo agregando Na_2CO_3 y se midió la cantidad de fluorescencia producida por la hidrólisis del sustrato, las unidades relativas de fluorescencia se convirtieron a pmol de producto fluorescente de la hidrólisis del sustrato (4-MU)/ mg de proteína total/tiempo (min) (figura 6.8).

Los resultados obtenidos reflejan una actividad enzimática de *GUS* dependiente de la inducción por auxina, sin embargo, los niveles de actividad basales (sin auxina) son duplicados con la inducción más alta (100 μM ANA), y una típica dependencia transcripcional de auxina es reflejado en inducciones que superan los niveles basales por al menos dos veces; para descartar un efecto acumulativo de *GUS*, se decidió evaluar esta respuesta de *RegAth* a través de la acumulación de mensajero de *gus* con un sistema de síntesis de cDNA semicuantitativo.

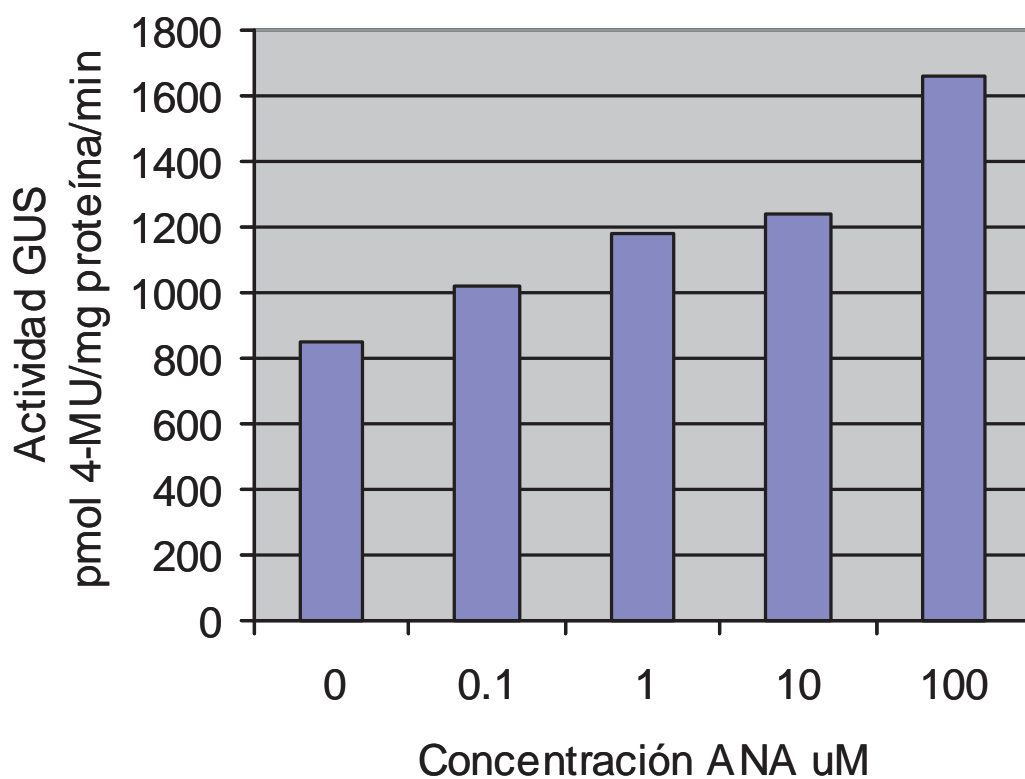


Figura 6.8 Actividad de *GUS* en Nt-1 clona 7 por inducción de auxina. El ensayo fluorométrico se realizó adicionando 1 mM de MUG a 5 μg de proteína en *Gus extraction buffer* extraída 6 h después de la adición de ANA. Cada lectura fluorométrica expresada en rfu se transformó a las unidades mencionadas calibrando el fluorómetro a 1 rfu/ nM de 4-MU.

Para este ensayo, se repitió la privación e inducción por ANA, y una vez transcurridas las 6 h de incubación con la auxina se extrajo RNA total de cada tratamiento, el cual fue cuantificado por espectrofotometría a 260 nm y su integridad fue verificada por separación electroforética en gel de agarosa con buffer TAE (figura 6.9).

Posteriormente, 500 ng de RNA de cada tratamiento se sometió a una reacción de RT-PCR, utilizando un oligo poli dT, suministrado con el *kit*, para enseguida someter a reacción de PCR utilizando los oligos 36 y 37 para *gus* durante episodios de 15, 20 (resultados no mostrados) y 25 ciclos (Richard *et al.*, 2002).

El producto de estas reacciones se analizó por electroforesis (figura 6.9) y, al igual que con los ensayos de actividad enzimática, se encontró una intensidad de producto creciente respecto a la concentración de ANA suministrada, pero apreciando un fuerte incremento de la inducción mayor, comparado con los niveles de expresión basales.

La intensidad obtenida de la fotografía del gel se cuantificó utilizando el programa EDAS DC120 (Kodak, IB5430150) mediante un análisis de opacidad, comparando la misma área de banda para cada muestra y los datos obtenidos se graficaron (figura 6.10). Como puede apreciarse en la gráfica, el nivel expresión con 100 μM de ANA es un 200 % mayor que con el tratamiento de 0 μM . Esto es interesante, porque el rango de concentración fisiológica de auxina en células de esta tipo es de 1- 10 μM , y concentraciones tan altas como 100 μM son consideradas tóxicas y, por lo tanto, represoras de la maquinaria transcripcional. Así, se demuestra con mayor contundencia la dependencia transcripcional de *psif* por la hormona auxina.

La respuesta de *RegAth-gus* detectada a nivel de mensajero por el sistema de RT-PCR reafirma la tendencia creciente de actividad obtenida mediante los ensayos fluorométricos de actividad de GUS, pero con niveles incrementados hasta 3 veces respecto al nivel basal. Un incremento de este tipo es incluso superior al característico de genes de *A. thaliana* adscritos al ciclo celular regulados por auxina (Richard *et al.*, 2002).

De esta manera quedaban cubiertos el total de los objetivos planteados y se respondía de manera afirmativa nuestra hipótesis.

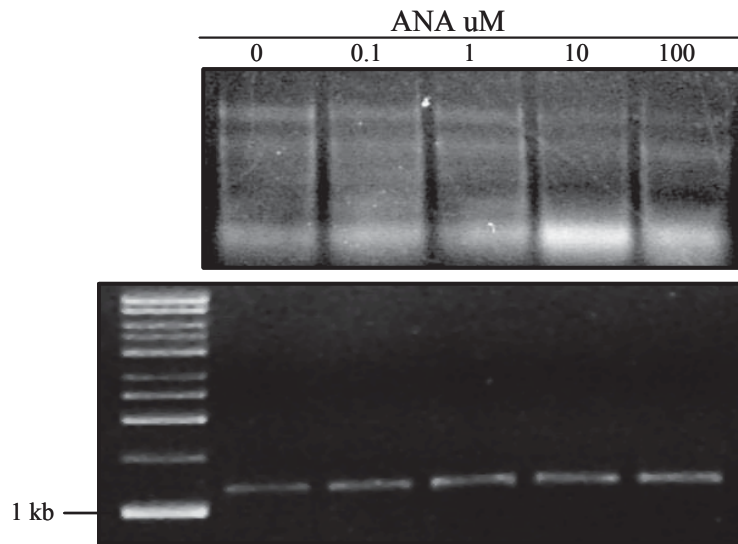


Figura 6.9 RT-PCR semicuantitativo de *gus* inducido con ANA. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2 %; La fotografía de arriba corresponde a 500 ng de RNA extraído de las Nt-1 clona 7; la fotografía de abajo al amplificado por RT-PCR durante 25 ciclos de *gus*, en el carril izquierdo: MPM 1- 10 kb, y en la parte superior se indica la concentración del inductor para cada carril.

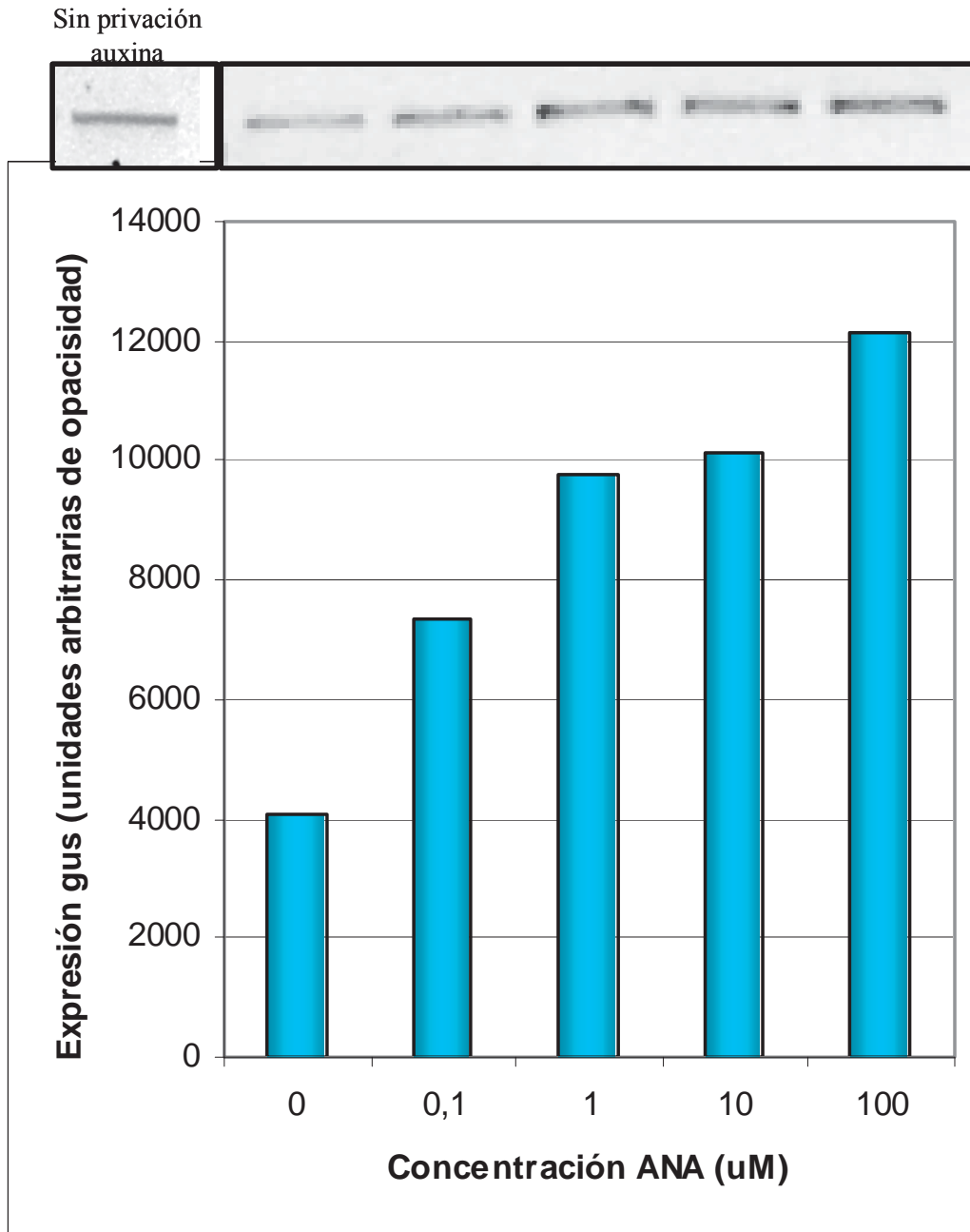


Figura 6.10 Expresión de *Gus* en Nt-1 clona 7 inducido por ANA. En la parte superior: fotografía invertida de fig. 6.9 a partir de la cuál se determinó el área por carril a medir por opacidad con el sistema EDAS (gráfica de la figura). Se indica además la cantidad de amplificado con RNA antes de privar las células de auxina (nivel basal de expresión, como reportan Richard *et al.*, 2002).

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

7.1 CONCLUSIONES

1. La región identificada como promotor de *psif* de *A. thaliana* es transcripcionalmente activa.
2. *Psif* de plantas es regulado transcripcionalmente por auxina.

7.2 PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

1. Determinación de la acumulación del mRNA de *gus* durante el ciclo celular por ensayos tipo *Northern blot*.
2. Deleciones unidireccionales de *RegAth* para determinar la región mínima de promoción e identificación de elementos reguladores.

BIBLIOGRAFÍA

- Abel, S., y A. Theologis. 1996. Early genes and auxin action. *Plant Physiol.* 111: 9-17.
- Asimov, I. 1982. El código genético. Plaza & Janes S.A. Barcelona
- Biggs, A., Kapicka, C., Lundgren, L. 2000. *Biología. La dinámica de la vida.* McGraw-Hill. México.
- Berger, D., Mussig, C., Altmann, T. 2001. Plant growth factors and receptors. *Nature Encyclopedia of Life Sciences.* London. [http:// www.els.net](http://www.els.net).
- Blilou, I., F. Frugier, S. Folmer, O. Serralos, V. Willemsen, H. Wolkenfelt, N. B. Eloy, P. C. G. Ferreira, P. Weisbeek y B. Scheres. 2002. The *Arabidopsis* HOBBIT gene encodes a CDC27 homolog that links the plant cell cycle to progression of cell differentiation. *Genes Dev.* 16: 2566-2575.
- Boot, C. J. M., van Duijn, B., Mennes, A. M., Libbenga, K. R. 1996. Regulation of a class of auxin-induced genes in cell-suspension cultures from *Nicotiana tabacum*. *Plant Hormone Signal Perception and Transduction.* 41-48.
- Chen, J. G., H. Ullah, J. C. Young, M. R. Sussman y A. M. Jones. 2001. ABP1 is required for organized cell elongation and division in *Arabidopsis* embryogenesis. *Genes Dev.* 15: 902-911. Chen en el genes pp648

- Crowell, N.D., Kadlecsek, T.A., John, C.M., Amasino, M.R. 1990. Cytokinin-induced mRNAs in cultured soybean cells. *Botany*. Nov 87
- Darwin, E. 1794. *Zoonomía: or the laws of organic life* vol.II, 3a.ed., (1801), Londres, J. Johnson.
- Davies P. J. 1995. The plant hormones: their nature, occurrence and function. In: *Plant Hormones Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. P. J. Davies. ed. (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers). Pp 1-12.
- DeLong A., Mockaitis K., Christensen S.,(2002), Protein phosphorylation in the delivery of and response to auxin signals; *Plant Molecular Biology*. 49: 285-303.
- del Pozo, J., Lopez-Matas, M., Ramirez-Parra, E., Gutierrez, C. 2005. Hormonal control of the plant cell cycle. *Physiologia Plantarum*. 123: 173-183.
- Dewitte, W. y Murray, J. 2003. The plant cell cycle. *Annual Rev. Plant Biol.* 54: 235-264.
- Dharmasiri, N., S. Dharmasiri, A. M. Jones y M. Estelle. 2003. Auxin action in a cell-free system. *Current Biol.* 13: 1418-1422.
- Eckardt, N.A. 2001. Auxin and the power of the proteasome in plants. *The Plant Cell*. 13: 2161-2163.
- Ecker J.R. 1995. The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science*. 5: 268(5211).
- Farias, E.A. 2005. Estudios sobre la regulación por fosforilación de la proteína *PSIF* de humano. Tesis de Maestría en Ciencias. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. UMSNH.

- Francis, D., D. Dudits y D. Inzé. 1998. Plant Cell Division. Portland Press Ltd., London. Pp. 347.
- Frank, M. y T. Schmülling. 1999. Cytokinin cycles cell. Science 4: 243- 244.
- Gallagher, S. R. 1992. GUS protocols: Using the GUS gene as a reporter of gene expression. Academic Press, Inc.USA.
- Gleave, A. 1992. A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. Plant Molecular Biology. 20: 1203-1207.
- Golan, A., Yudkovsky, Y., Hershko, A. 2002. The cyclin-ubiquitin ligase activity of cyclosome/APC is jointly activated by protein kinases Cdk1-cyclin B and Plk. J. Biol. Chem. 277 (18): 15552- 15557.
- Guilfoyle, T., Hagen, G., Ulmasov, T., Murfett, J. 1998. How does Auxin turn on genes?. Plant Physiology. 118: 341-347.
- Gutierrez, C. 2005. Coupling cell proliferation and development in plants. Nature Cell Biology. 2. 6: 535-541.
- Gynheung, A. 1985. High efficiency transformation of cultured tobacco cells. Plant Physiology. 79: 586-570.
- Haberer, G. y Kieber, J. J. 2002. Cytokinins. New insights into a classic phytohormone. Plant Physiol. 128: 354-362.
- Hagen, G. y Guilfoyle, T., 2002. Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. Plant Molecular Biology. 49: 373-385.

- Hampsey, M. 1998. Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62: 465-503.
- Higareda, A. E., Farias, A., Llanderal, J., Méndez, A., Pardo, M. A. 2003. A cell cycle and protein synthesis-related factor required for G2/M transition. *Miami Nature Biotechnology Short Reports*. 14: 111.
- Huntley, R. y J. Murray. 1999. The plant cell cycle. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 440-446.
- Ito, M., Iwase, M., Kodama, H., Lavisse, P., Komamine, A., Nishihama, R., Machida, Y., Watanabe, A. 1998. A novel *cis*-acting element in promoters of plant B-type cyclin genes activates M phase-specific transcription. *The Plant Cell*. 10: 331-341.
- Jefferson, R. A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter*. 5 (4): 387-405.
- Kepinski, S. y Leyser, O. 2002. Ubiquitination and auxin signaling: A degrading story. *Plant Cell* S81-S95.
- Kitazono, A.A., Fitz, G. N.J. y Kron, J.S. 2001. *Encyclopedia of Life Sciences: Cell cycle: regulation by cyclins*. Macmillan Publishers Ltd. Nature Publishing Group. ([www/els.net](http://www.els.net)). 1-8.
- Latchman, S. D. 2001. Transcriptional gene regulation in eukaryotes. *Nature Encyclopedia of Life Sciences*. London. [http:// www.els.net](http://www.els.net).
- Lewin, B. 1990. Driving the cell cycle: M phase kinase, its partners, and substrates. *Cell*. Jun 1;61(5).

- Lewin Benjamin. 2000. Genes VII. Oxford University Press. UEA.
- Leyser, O. 2002. Molecular genetics of auxin signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 377-398.
- Leyser, O. 1997. Auxin: lessons from a mutant weed. *Physiol. Plant.* 100: 407-414.
- Li, Y., Wu, Y.H., Hagen, G., Guilfoyle, T. 1999. Expression of the Auxin-Inducible GH3 Promoter/GUS Fusion Gene as a Useful Molecular Marker for Auxin Physiology. *Plant Cell Physiology.* 40 (7): 675-682.
- Lodish, H., A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore y J. Darnell. 2002. *Biología Celular y Molecular*. Editorial Panamericana. 4ª Edición. Pp1084.
- Lucas, P. y D. Granner. 1992. Hormone response domains in gene transcription. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 1131-1173.
- Martínez, R. E., Segovia, L., Mercante, F.M., Franco, A.A., Graham, P., Pardo, M.A. 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L; beans and *Leucaena* sp. *Trees. Int. Journal Syst. Bacteriol.* 41: 417-426.
- McKinney, D.J. y Heintz. 1991. Transcriptional regulation in the eukariotic cell cycle. *TIBS.* Nov Vol.16.
- Méndez, B. A. 2003. Estudios hacia la obtención de la región reguladora del gen psif de *Nicotiana tabacum*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. UMSNH.
- Menges, M., L. Hennings, W. Gruissem y J. A. H. Murray. 2002. Cell cycle-regulated gene expression in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 277: 41987-42002.
- Millner, P.A. 1995. The auxin signal. *Current Opinion Cell Biology.* Apr 7(2).
- Mitchel, P.J. y Tjian, R. 1989. Transcriptional Regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science.* 245: 371-378.

- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Nagata, T. y Kumagai, F. 1999. Plant cell biology through the window of the highly synchronized tobacco BY-2 cell line. *Methods in Cell Science.* 21: 123-127.
- Nagata, T., Nemoto, Y., Hasegawa, S. 1992, Tobacco BY-2 cell line as the HeLa cell in the cell biology of higher plants. *Internal. Rev. Cytol.* 132: 1-30.
- Nasmyth, K. 1993. Control of the yeast cell cycle by Cdc25 protein kinase. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5: 166-179.
- Nordström, A., P. Tarkowski , D. Tarkowska, R. Norbaek, C. Astot, K. Dolezal y G. Sandberg. 2004. Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: A factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 8039-8044.
- Novel, G. y Novel, M. 1973. *Mol. Gen. Genet.* 120: 319-335.
- Richard, C., Lescot, M., Inzé, D., De Veylder, L. 2002. Effect of auxin, cytokinin, and sucrose on cell cycle gene expression in *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 69: 167-176.
- Rogers, J. y Rogers, S. 1992. Definition and functional implications of gibberellin and abscisic acid *cis*-acting hormone response complexes. *Plant Cell.* 4: 1443-1451.
- Sabatini, S, D. Beis, H. Wolkenfelt, J. Murfett, T. Guilfoyle, J. Malamy, P. Benfey, O. Leyser, W. Bechtold, P. Weisbeer y B. Scheres. 1999. An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* 99: 463-472.
- Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual.* Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Shaul, O., Mironov, V., Burssens, S., Van Montagu, M., Inzé, D. 1996. Two *Arabidopsis* cyclin promoters mediate distinctive transcriptional oscillation in synchronized tobacco BY-2 cells. *Cell Biology*. May 93.
- Sitbon, F. y C. Perrot-Rechenman. 1997. Expression of auxin-regulated genes. *Physiol. Plant*. 100: 443-455.
- Stals, H. y D. Inzé. 2001. When plant cells decide to divide. *Trends Plant Sci*. 6: 359-364.
- Takizawa, G.C. y Morgan, D.O. 2000. Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin B1-Cdk1 and Cdc25. *Curr. Opin. Cell Biol*. 12: 658-665.
- Theologis, A. 1996. Rapid gene regulation by Auxin. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 37: 407-438.
- Tiwari, S. B., G. Hagen y T. Guilfoyle. 2003. The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *Plant Cell* 15: 533-543.
- Tiwari, S. B., X. J. Wang, G. Hagen y T. Guilfoyle. 2001. Aux/IAA proteins are active repressors, and their stability and activity are modulated by auxin. *Plant Cell*. 13: 2809-2823.
- Ulmasov, T., Z-B. Liu, G. Hagen y T. Guilfoyle. 1995. Composite structure of auxin response elements. *Plant Cell*. 7: 1611-1623.
- Ulmasov, T., J. Murfett, G. Hagen y T. Guilfoyle. 1997. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell*. 9: 1963-1971.

- Van Der Zaal, E. J., Droog, F. N. J., Boot, C. J. M., Hensgens, L. A. M., Hoge, J. H. C., Schilperoort, R. A., Libbenga, K. R. 1991. Promoters of auxin-induced genes from tobacco can lead to auxin-inducible and root tip-specific expression. *Plant Molecular Biology*. 16: 983-998.
- Walker, L. y M. Estelle. 1998. Molecular mechanisms of auxin action. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 434-439.
- Werner, T., Motyka, V., Strnad, M., Schmülling, T. 2001. Regulation of plant growth by cytokinin. *PNAS*. 98: 10487-10492.