

DISEÑO DE NUEVOS VECTORES PARA EL ESTUDIOS DE DIFERENCIACIÓN Y PROLIFERACIÓN EN LOS NICHOS DE CÉLULAS TRONCALES DE *A. thaliana*.

José Irepan Reyes Olalde¹, Yessica Jazmín Gómez Pereda¹, Elena R. Álvarez-Buylla¹.

¹ Laboratorio de Genética Molecular, Epigenética, Desarrollo y Evolución de Plantas, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Av. Universidad 3000, Coyoacán, México D.F. 04510, México.

Palabras clave: células madre, vectores, ciclo celular

Introducción. El Ciclo Celular (CC) es un proceso esencial en el crecimiento y desarrollo de todos los organismos vivos. La monitorización del CC ha sido un tema de gran interés desde la invención de los primeros microscopios, inicialmente en preparaciones celulares fijadas y teñidas y posteriormente *in vivo*. La imagen *in vivo* es una herramienta esencial para visualizar células vivas. Esta tecnología exige una variedad de líneas indicadoras de plantas, cada una de las cuales expresa de forma única una proteína fluorescente. Sin embargo el estudio y análisis *in vivo* del CC de líneas celulares específicas es complejo ya que al ser el CC un proceso general no permite el seguimiento adecuado de un único grupo celular. Aquí desarrollaremos un conjunto de vectores versátiles que se pueden usar para monitorear el ciclo celular *in vivo* en células o tejidos específicos, sin fijación. Nuestro sistema HALO permite a los usuarios ensamblar construcciones de una manera simple y económica para el estudio de tejido o células específicas en un tiempo espacio determinado *in vivo*.

Metodología. Para la construcción de los vectores estos se basan en el sistema en la tecnología de clonación de recombinación específica del sitio Gateway (Hartley et al., 2000) y el sistema de plantas MoClo basado en la clonación Golden Gate (Weber et al., 2011).

Resultados. Primero diseñamos los vectores HALO1 y HALO2, en ambos sistemas los clones de entrada contienen un casete Gateway. El casete Gateway contiene un gen de resistencia al CmR y el gen *ccdB* tóxico que confiere letalidad a las cepas estándar de *E. coli*, flanqueado por sitios *attL* y *attR*. Para el vector HALO, la proteína X se fusiona con un dominio de unión al ligando de estrógeno mutante (ERT2) que requiere la presencia de tamoxifeno para su actividad. Para una expresión citosólica estable de X-ERT2 usamos la subunidad pequeña 5'UTR RbcS2B y la señal/terminador de poliadenilación 3'UTR Nos, que están en el sistema MoClo. El gen X-ERT2 y el casete Gateway contienen varios sitios de tipo IIS. Por lo tanto, eliminamos los sitios de restricción internos para las

enzimas utilizadas en MoClo (BsaI, BbsI y Esp3I) y agregamos los salientes flanqueantes de 4 nt apropiados. Para eliminar los sitios de restricción, usamos mutagénesis por PCR seguida de cortes para las enzimas tipo IIS. Una vez eliminados los sitios de restricción internos del gen X-ERT2 y el casete Gateway, los fragmentos se clonaron según el protocolo MoClo. Para el vector HALO2, las secuencias Y se clonaron en los vectores MoClo. El casete Gateway se clona en MoClo. La señal/terminador de poliadenilación (NOST) y el RFP, se ensamblaron de acuerdo con el protocolo MoClo. El gen Y se combina con un vector que tiene GFP. Finalmente, todos los plásmidos se ensamblarán en un vector aceptor de Nivel 2 de acuerdo con el protocolo MoClo.

Plantas de *Arabidopsis* ecotipos Col-0 fueron transformadas con HALO2 y se probaron con fluorescencia la presencia de RFP y la ausencia de GFP

Conclusiones. Con este sistema es posible analizar *in vivo* el ciclo celular en células tejido específico.

Agradecimiento. Estamos muy agradecidos a la Dra. Diana Belen Sánchez-Rodríguez por el soporte técnico. Agradecemos a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) por una beca posdoctoral a JIRO. Este trabajo en el laboratorio Álvarez-Buylla fue financiado por el PAPIIT UNAM IN203220, IN206220, IN200920, IN211721 y CONACYT 102959 y 102987.

Bibliografía.

Hartley, J.L., Temple, G.F., and Brasch, M.A. (2000). DNA cloning using *in vitro* site-specific recombination. *Genome Res* 10.

Weber, E., Engler, C., Gruetzner, R., Werner, S., and Marillonnet, S. (2011). A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. *PLoS One* 6