



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

## **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

### **Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**Interacción de Leafbladeless (LBL1) con complejos de unión a cap**

#### **T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**Maestro en Ciencias**

PRESENTA:

**LIBB. Carlos Eduardo Flores Tinoco**

TUTOR PRINCIPAL:

**Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova**

Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**Dr. Luis Padilla Noriega**

Facultad de Medicina, UNAM

**Dr. José Luis Reyes Taboada**

Instituto de Biotecnología, UNAM

**Ciudad Universitaria, México, D.F.**

**Abril 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Dedicatorias

A MIS PADRES, DORA TINOCO Y EDUARDO FLORES, Y MI TÍO ALFREDO TINOCO QUE SIN IMPORTAR COMO, CUANDO Y DONDE SIEMPRE ME HAN ESTADO APOYANDO Y PROCURANDO EN CADA ETAPA DE MI VIDA, PARA USTEDES TODO MI AMOR, RESPETO Y ADMIRACIÓN.

A MI ABUELO CRUZ Y MIS TÍAS ISA, ÁNGELA, ARTE, GOYA Y A TODA MI FAMILIA Y AMIGOS POR SIEMPRE ESTAR AL PENDIENTE DE MI Y SIEMPRE DARME ÁNIMOS.

A CARLA POR EL GUSTO DE ESTAR JUNTOS DURANTE ESTA TRAVESÍA Y LAS VENIDERAS, JUNTOS HEMOS CONVERTIDO LOS MOMENTOS DIFÍCILES EN FÁCILES Y LOS FÁCILES EN EXTRAORDINARIOS.

A FÁTIMA Y DIEGO, QUE A PESAR DE LA DISTANCIA Y QUE TIENE EL LEOPARDO UN ABRIGO EN EL MONTE SECO Y PARDO, YO TENGO MÁS QUE EL LEOPARDO PORQUE TENGO UN PAR DE BUENOS AMIGOS (*GUAJIRA GUANTANAMERA*).

A CESY POR DARME ESTA GRAN OPORTUNIDAD Y GUIARME DURANTE ESTOS AÑOS, HA SIDO UN GRAN APRENDIZAJE PERO UN MAYOR GUSTO.

A LOS INTEGRANTES DEL LABORATORIO 103: ERIKA, CHIAPAS, MARIELA, LUIS, KEVIN, FRIDA, ELOISA, NAHOLI, NORMA, DAVID, ABRAHAM, ANA LILIA, THAMARA, CARO Y TODOS AQUELLOS QUE SE HAN INTEGRADO POR SU AYUDA, CONSEJOS PERO SOBRETUDO MOMENTOS GRATOS QUE HEMOS PASADO.

A APOLONIO (QEPD), ERITREO (QEPD), ERIC (QEPD) Y GASPAR.

A LA UNAM: POR TANTOS AÑOS DE ENSEÑANZAS Y ALEGRÍAS, ENTRE ELLAS HABLAR POR MI RAZA.

A LOS CONTRIBUYENTES.

A MÉXICO.

## Agradecimientos

A la Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova que fungió como asesora principal de este proyecto y que gracias a su constante apoyo este trabajo se pudo concluir.

Al comité tutor por sus invaluable comentarios durante la realización de este trabajo, el comité estuvo conformado por:

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova	Facultad de Química, UNAM
Dr. Luis Padilla Noriega	Facultad de Medicina, UNAM
Dr. José Luis Reyes Taboada	Instituto de Biotecnología, UNAM

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante 2 años para la realización de los estudios de maestría.

Al Dr. José Luis Reyes Taboada por la donación del plásmido pDEST24.

Al Dr. Luis Padilla Noriega por la ayuda en el diseño de los vectores T7LBL1, T7kozacLBL1, T7GSTLBL1 y T7kozacGSTLBL1.

Al Dr. León Patricio Martínez Castilla por su ayuda en la refinación del motivo de unión a eIF4E.

Al Biol. Jorge Herrera Díaz por toda la ayuda técnica proporcionada a lo largo de este trabajo.

A la UNAM por proporcionar las instalaciones, facilidades y equipos, así como a los proyectos PAPPIT IN210912 e ICyTDF 10-55/2010 por el financiamiento durante la realización de este trabajo.

Al laboratorio L-103 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM donde se realizó este trabajo y a todos sus integrantes, en especial al Bach. Kevin Delgado, que con su ayuda facilitaron la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado que revisaron y enriquecieron con sus comentarios este trabajo y que estuvo conformado por:

Presidente	Dr. León Patricio Martínez Castilla	Facultad de Química, UNAM
Secretario	Dra. Blanca Haydé Ruiz Ordaz	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Vocal	Dra. Alicia Gamboa de Buen	Instituto de Ecología, UNAM
Vocal	Dr. Greco Hernández Ramírez	Instituto Nacional de Cancerología, México
Vocal	Dr. Luis Antonio Mendoza Sierra	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

***No tengo miedo del futuro, pues conozco el pasado y amo el presente.***

***William Allen White***

***You've yet to have your finest hour***

***Roger Taylor***

***Por mi raza hablará el espíritu***

***José Vasconcelos***

## Resumen

La germinación es el proceso donde las semillas pasan de un estado quiescente a uno activo para continuar con el ciclo de vida de la planta a través de una nueva generación. Durante el inicio de la germinación, el principal control de la expresión génica es la traducción selectiva de los mRNAs almacenados durante el desarrollo de la semilla.

En trabajos previos realizados en el laboratorio se encontró por espectrometría de masas que la proteína Leadbladeless (LBL1) se asocia a los complejos de unión a cap durante el inicio de la germinación del maíz. Además se determinó que LBL1 contiene un motivo de unión al factor de inicio de la traducción 4E (eIF4E), el cual es el responsable de unir directamente a los mRNAs a través de su estructura 5' cap.

LBL1 es una proteína involucrada en el procesamiento de RNAs interferentes (siRNAs), en particular de los de acción en *trans* (tasiRNAs), una clase específica de siRNAs en plantas. A la fecha no se ha determinado un vínculo entre LBL1 y los complejos que unen al cap de los mRNAs.

El presente trabajo buscó evaluar las condiciones en las que LBL1 era capaz de unir a los complejos de unión a cap y si esta unión era mediada por eIF4E. Encontramos que LBL1 sí es capaz de unir a eIF4E pero no de manera directa, lo cual fue inesperado debido al motivo de unión a eIF4E presente en LBL1, por lo que también tratamos de refinar el modelo del motivo, resultando en un nuevo motivo que es más robusto que el modelo consenso previo. El probar que, aunque sea indirectamente, LBL1 y eIF4E son capaces de interactuar es algo nuevo que abre nuevas líneas de investigación sobre la función de LBL1.

El papel de LBL1 y los tasiRNAs ha sido muy estudiado en hojas pero no en semilla, por lo que investigamos si LBL1 y los tasiRNAs estaban presentes durante la germinación del maíz. Encontramos que el mRNA de LBL1 está presente durante toda la germinación no así los tasiRNAs, sugiriendo la probable existencia de diferentes complejos funcionales donde LBL1 participa.

## Abstract

Germination is the process where seeds get away from their inactive state to continue on with a new generation of plants. At the beginning of germination, gene expression relies mainly on selective translation of mRNAs stored during the seed development.

Previous work done in the lab found by mass spectrometry that the protein Leafbladeless (LBL1) was part of the cap binding complexes at the start of maize germination. Also it was found that LBL1 contains a conserved binding motif to the eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E), which is responsible to directly bind the mRNAs at their 5' cap structure.

LBL1 is a protein involved in the processing of short interfering RNAs (siRNAs), specially tasiRNAs, a specific class of plant siRNAs. For the time being there hasn't been reported any link between LBL1 and the complexes that bind to the cap of mRNAs.

This work aimed to evaluate the conditions under which LBL1 was capable to bind to the cap binding complexes and if this interaction was mediated by eIF4E. We found that LBL1 was able to bind to eIF4E but not directly, which was unexpected due to the eIF4E binding motif present in LBL1, so we also tried to refine the binding motif model resulting in a new motif which is more robust than the previous one. Our findings that, although indirectly, LBL1 and eIF4E interact provide new insights over LBL1's function.

LBL1 and tasiRNAs have been mainly studied in leaves but not in seed, so we investigated if LBL1 and tasiRNAs are present during germination. We found that while LBL1's mRNA is indeed during the whole germination, tasiRNAs were not always detected, suggesting the possible existence of different functional complexes of LBL1.

## Abreviaturas

4EBP	Proteína de unión a eIF4E
AGO	Proteína Argonauta
dsRNA	RNA de doble cadena
eIF	Factor de inicio eucarionte
miRNAs	Micro RNAs
PTGS	Silenciamiento post-transcripcional
RDR	Polimerasa dependiente de RNA
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA
RRL	Lisado de reticulocito de conejo
siRNAs	RNAs interferentes
sRNAs	RNAs pequeños
tasiRNAs	RNAs interferentes de acción en <i>trans</i>
TGS	Silenciamiento transcripcional

## Unidades

aa	aminoácidos	min	minutos
Abs	absorbancia	n(U)	nano(unidad)
c.b.p	cuanto baste para	°C	grado centígrado
c(U)	centi(unidad)	p/p	Relación peso-peso
Ci	Curies	p/v	Relación peso-volumen
Da	Dalton	pH	potencial de hidrógeno
DO	densidad óptica	rpm	revoluciones por minuto
F	Faraday	s	segundos
h	horas	U	unidades
k(U)	kilo(unidad)	V	Volts
L	litro	v/v	Relación volumen-volumen
M	molar	$\times g$	Fuerza centrífuga
m	metro	$\mu(U)$	micro(unidad)
m(U)	mili(unidad)		

# Índice

1	Introducción.....	1
2	Antecedentes.....	2
2.1	Silenciamiento post-transcripcional (PTGS).....	2
2.1.1	RNA interferente de acción en trans (tasiRNAs).....	5
2.1.2	LBL1/SGS3.....	7
2.2	Regulación de la traducción.....	8
2.2.1	Complejos de unión a cap.....	9
2.2.2	Importancia de la traducción durante la germinación.....	9
2.3	LBL1 en complejos de unión a cap.....	10
3	Hipótesis.....	12
4	Objetivo General.....	12
5	Objetivos Particulares.....	12
6	Materiales y Métodos.....	13
6.1	Material Biológico.....	13
6.1.1	Bacterias.....	13
6.1.1.1	Especies y cepas utilizadas.....	13
6.1.1.2	Obtención de células Escherichia coli competentes para transformación por choque térmico..	13
6.1.1.3	Transformación de Escherichia coli competentes por choque térmico.....	13
6.1.1.4	Obtención de células Escherichia coli electrocompetentes.....	14
6.1.1.5	Transformación de Escherichia coli competentes por electroporación.....	14
6.1.2	Plantas.....	15
6.1.2.1	Material utilizado.....	15
6.1.2.2	Esterilización de semillas.....	15
6.1.2.3	Germinación de semillas de maíz.....	15
6.1.2.4	Siembra de semillas en tierra.....	15
6.2	Técnicas de Biología Molecular.....	16
6.2.1	Generación de plásmidos.....	16
6.2.1.1	Por ligación.....	16
6.2.1.2	Por recombinación.....	16
6.2.2	Extracción de DNA.....	17
6.2.2.1	Purificación de plásmido a partir de bacterias.....	17
6.2.3	Extracción de RNA.....	17
6.2.4	Amplificación de DNA.....	18
6.2.4.1	Transcripción Reversa.....	18
6.2.4.2	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	18
6.2.5	Inducción de proteínas recombinantes.....	18

6.2.6	Transcripción/traducción in vitro en lisado de reticulocito de conejo.....	19
6.2.7	Extracción de Proteínas de Bacteria.....	19
6.2.8	Proteólisis por trombina.....	19
6.2.9	Interacción proteína-proteína y proteína-ligando.....	20
6.2.9.1	Interacción con glutatión sefarosa 4B de GE Healthcare®.....	20
6.2.9.2	Interacción con 7mGTP sefarosa GE Healthcare®.....	21
6.2.9.3	Interacciones proteína-proteína.....	21
6.2.9.3.1	Coelución de proteínas unidas a glutatión sefarosa 4B.....	21
6.2.9.3.2	Coelución de proteínas unidas a 7mGTP sefarosa.....	21
6.2.10	Cuantificación de Proteínas.....	22
6.2.11	Inmunodetección.....	22
6.2.12	Autoradiografía (Detección de proteínas radiactivas).....	22
6.3	Metodología in silico.....	23
6.3.1	Obtención de secuencias homólogas a LBL1, eIF4G y LOX2.....	23
6.3.2	Predicción de regiones espaciales hidrofóbicas.....	23
6.3.3	Predicción de motivos de unión a eIF4E.....	23
6.3.4	Búsqueda de motivos de unión a eIF4E en diversas proteínas.....	24
6.3.4.1	Motivos consensos.....	24
6.3.4.2	Motivos provenientes de MEME.....	24
6.3.5	Obtención de la composición de LBL1 y LBL1-GST.....	24
6.3.6	Identificación de la identidad entre homólogos de LBL1.....	24
7	Resultados.....	25
7.1	Expresión de LBL1 durante la germinación del maíz.....	25
7.2	Generación de LBL1 recombinante.....	27
7.3	Interacción de LBL1 con complejos de unión a cap.....	32
7.4	Conservación del motivo de unión a eIF4E en LBL1.....	35
7.5	Refinación del motivo de unión a eIF4E.....	41
8	Discusión.....	47
9	Conclusiones.....	49
10	Perspectivas.....	50
11	Apéndices.....	52
11.1	Apéndice A: Soluciones usadas.....	52
11.1.1	Medios de cultivo y soluciones de transformación.....	52
11.1.2	Separación de ácidos nucleicos.....	52
11.1.3	Separación de proteínas e inmunodetección.....	52
11.1.4	Extracción de Proteínas.....	53
11.2	Apéndice B: Inducción de LBL1 recombinante en Escherichia coli.....	54
11.2.1	Apéndice B1: Cepas de Escherichia coli usadas.....	54

11.2.2 Apéndice B2: Vectores y fragmentos generados y usados en este trabajo.....	54
11.2.3 Apéndice B3: Condiciones usadas para la inducción de LBL1 recombinante en E. coli.....	55
11.3 Apéndice C: Amplificación de DNA por PCR.....	56
11.3.1 Apéndice C1: Oligonucleótidos usados.....	56
11.3.2 Apéndice C2: Condiciones de PCR.....	58
11.3.2.1 Transcripción Reversa.....	58
11.3.2.2 PCR.....	58
11.4 Apéndice D: LBL1.....	59
11.4.1 Apéndice D1: Composición fisicoquímica de LBL1 y LBL1-GST.....	59
11.4.1.1 LBL1.....	59
11.4.1.2 LBL1-GST.....	60
11.4.2 Apéndice D2: Sitios de proteólisis en LBL1 y LBL1-GST.....	61
11.4.2.1 LBL1.....	61
11.4.2.2 LBL1-GST.....	61
11.4.3 Apéndice D3: Estructura de LBL1.....	62
11.5 Apéndice E: Proteínas interactoras con eIF4E.....	63
11.5.1 Apéndice E1: Proteínas comprobadas que unen a eIF4E.....	63
11.5.2 Apéndice E2: Proteínas mutantes que pierden capacidad de unión a eIF4E.....	65
11.5.3 Apéndice E3: Condiciones usadas para la búsqueda de nuevos motivos de unión a eIF4E...	66
11.5.4 Apéndice E4: Nuevos motivos de unión a eIF4E encontrados.....	67
11.6 Apéndice F: Secuencias usadas en este trabajo.....	74
11.7 Apéndice G: Agrupamientos hidrofóbicos (HCAs) en el motivo de unión a eIF4E.....	75
12 Literatura citada.....	82

# 1 Introducción

Las plantas son organismos sésiles que están completamente expuestos al ambiente que los rodea, a pesar de eso logran sobrevivir y perpetuarse a través de las siguientes generaciones. Para tener éxito en su cometido de mantenerse con vida, es necesario que las plantas usen de manera adecuada la información pasada y actual para responder y desarrollarse correctamente en las situaciones que se lleguen a enfrentar.

Una manera en la que las plantas responden al medio ambiente y se desarrollan es a través de la regulación de la expresión de sus genes. Si los genes se expresan de manera inoportuna generan defectos en el desarrollo y la respuesta al medio ambiente de la planta, por lo que hay múltiples y diversos mecanismos que controlan cuando se expresa un gen. Los puntos de regulación descritos son tan vastos que van desde el control de la transcripción del gen, la exportación del mRNA del núcleo para ser traducido, su misma traducción o su activación y degradación una vez que ya está en su forma funcional.

La germinación ha mostrado ser una etapa donde se pueden apreciar distintos mecanismos de control de la expresión génica. La semilla quiescente contiene mRNAs y proteínas almacenadas para poderlos utilizar al momento que inicie la germinación. Durante el inicio de esta etapa solo hay regulación directa de los mRNAs y proteínas almacenados, particularmente el control traduccional en los primeros. Conforme avanza la germinación, comienza la transcripción de los genes y posteriormente se da lugar a la replicación celular con lo que eventualmente se completa la reactivación del metabolismo de la semilla (Bewley 1997; Walbot y Evans 2003).

Trabajos previos realizados en el laboratorio (Lázaro-Mixteco y Dinkova 2012) han buscado ahondar en la traducción selectiva de los mRNAs durante la germinación del maíz, para lograr este cometido se purificaron los complejos de proteínas que unen la estructura 5' cap de los mRNAs. Los complejos de unión a cap son únicos para cada mRNA, pero un elemento constante es el factor de inicio de la traducción 4E (eIF4E), el cual se une directamente a la estructura 5' cap de los mRNAs (Fischer 2009). Durante la germinación del maíz se encontró

de manera diferencial a la proteína LBL1 presente en los complejos de unión a cap (Lázaro-Mixteco y Dinkova 2012). Además, un análisis manual identificó en LBL1 un motivo consenso de unión a eIF4E, sugiriendo que LBL1 interacciona directamente con eIF4E en el mismo sitio que lo hace el factor eIF4G, siendo esencial para poder llevar a cabo la traducción de mRNAs (Besse y Ephrussi 2008), prediciendo a LBL1 como un potencial regulador de la traducción.

LBL1 (del inglés *Leafbladeless 1*) es una proteína fundamental en el desarrollo del maíz y otras plantas (Timmermans et al. 1998; Juarez, Twigg, et al. 2004; Nagasaki et al. 2007; Yan et al. 2010). Principalmente se ha caracterizado al ortólogo de LBL1 en *Arabidopsis thaliana*, SGS3, el cual se ha documentado que participa en la biogénesis de ciertos RNAs pequeños no codificantes denominados *trans-acting siRNAs* (tasiRNAs, Figura 1), los cuales al igual que otros RNAs no codificantes promueven la degradación de mRNAs específicos mediante eventos de complementareidad entre el RNA no codificante y el mRNA blanco (Vaucheret 2005; Allen y Howell 2010).

Hasta el momento se desconoce la relación que LBL1 guarda con los complejos de unión a cap por lo que el análisis de la posible interacción de LBL1 con complejos de unión a cap y en particular con algún miembro de la familia eIF4E permitiría profundizar en la intersección entre la regulación por RNAs pequeños y por proteínas involucradas en la traducción de mRNAs en plantas.

## **2 Antecedentes**

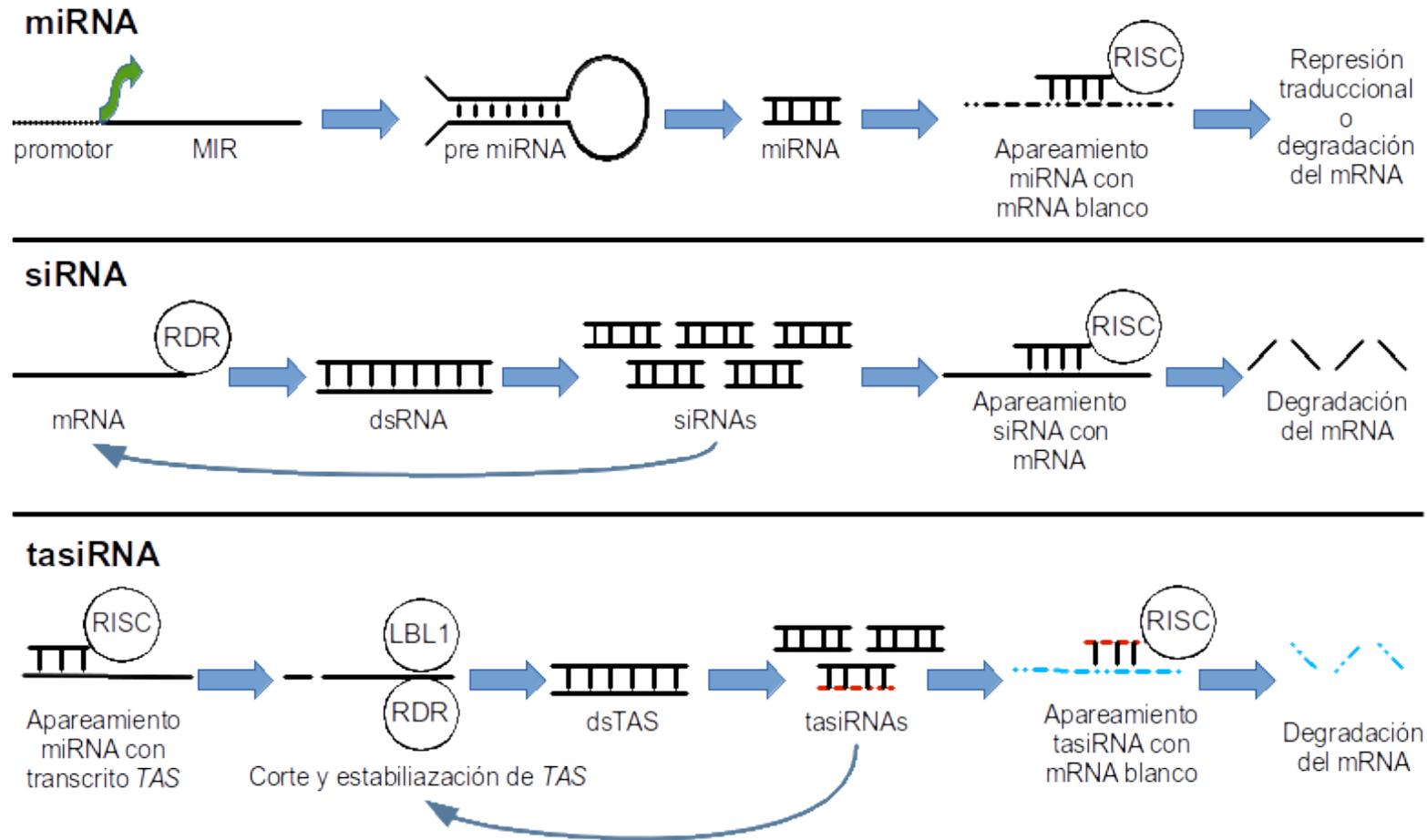
### **2.1 Silenciamiento post-transcripcional (PTGS)**

Uno de los mecanismos que en años recientes se han comprendido mejor es el silenciamiento post-transcripcional mediado por RNAs pequeños (sRNAs), el cual está conservado entre la gran mayoría de los eucariontes. Este tipo de regulación (Figura 1) implica la represión de un transcrito a través de un sRNA (no mayor a 24 nucleótidos) que es complementario al transcrito y promueve su represión traduccional o su corte endonucleolítico

para posteriormente ser degradado (Baulcombe 2004; Xie y Qi 2008; Schwab y Voinnet 2010; Kaikkonen et al. 2011; Chen 2012).

Hay muchas maneras de clasificar a los sRNAs, una de éstas es de acuerdo a su biogénesis como micro RNAs (miRNAs) y RNAs interferentes (siRNAs). Los miRNAs están codificados en el genoma por genes que son transcritos por la RNA Polimerasa II y su expresión está dirigida por un promotor como la mayoría de los genes. Una vez transcritos, los RNAs adoptan estructuras secundarias del tipo tallo-asa que posteriormente serán procesadas hasta generar un sRNA de doble cadena, una de esas cadenas es complementaria a algún transcrito celular. El miRNA se asocia a proteínas que forman parte de un complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), el cual promoverá el corte endonucleolítico o represión traduccional dependiendo de si el apareamiento entre el miRNA y el mRNA es completo o parcial, respectivamente (Vazquez et al. 2003; Baulcombe 2004; Xie y Qi 2008; Kaikkonen et al. 2011; Chen 2012).

A diferencia de los miRNAs, los siRNAs no están codificados en el genoma. El origen de los siRNAs radica en la síntesis de la cadena complementaria a un transcrito celular (sea endógeno o exógeno) por parte de una RNA polimerasa dependiente de RNA (RDR), resultando en un RNA largo de doble cadena. El RNA largo de doble cadena posteriormente será procesado en fragmentos de doble cadena de 21-24 nucleótidos(nt), estos siRNAs entonces actuarán del mismo modo que los miRNAs sobre los mRNAs de donde fueron derivados (Baulcombe 2004; Katiyar-Agarwal et al. 2006; Xie y Qi 2008; Schwab y Voinnet 2010; Kaikkonen et al. 2011; Chen 2012). En plantas existen otros tipos de siRNAs que actúan a nivel transcripcional (TGS) silenciando epigenéticamente con ayuda de las RNA Polimerasas IV y V (Ahmad et al. 2010; Chen et al. 2010). También en plantas se ha descrito que los siRNAs son capaces de ser producidos en una parte de la planta y transportarse a través de varios tejidos donde llevarán a cabo su función represiva (Chitwood y Timmermans 2010; Ex et al. 2011; Parent et al. 2012).



**Figura 1. Biogénesis y acción de RNAs pequeños. *MicroRNA (miRNA)*:** se encuentran codificados en el genoma y su expresión esta guiada por un promotor. Una vez transcritos adoptan estructuras secundarias tallo-asa para posteriormente ser procesados en pequeños RNAs de doble cadena. Una de las cadenas asociadas al complejo RISC guiará el corte endonucleolítico o represión traduccional de un mRNA al que es complementario (Baulcombe 2004; Kaikkonen et al. 2011). ***RNAs interferentes (siRNAs)*:** A partir de un transcrito ya existente, se sintetiza su cadena complementaria resultando en un RNA largo de doble cadena (dsRNA) que posteriormente es cortada en fragmentos de 21-24nt y que serán usados para promover la degradación de otras copias del transcrito original de un modo similar al que lo hacen los miRNAs, algunos siRNAs también son usados como cebadores para generar más siRNAs y amplificar la señal (Baulcombe 2004; Kaikkonen et al. 2011). ***siRNAs de acción en trans (tasiRNAs)*:** Un miRNA genera el corte del transcrito TAS pero en lugar de ser degradado, mediante LBL1 y RDR6 es estabilizado y su cadena complementaria es sintetizada para generar siRNAs, algunos de estos actúan sobre el transcrito TAS pero otros tienen como blanco otros mRNAs (Vaucheret 2005; Xie y Qi 2008; Allen y Howell 2010).

### 2.1.1 RNA interferente de acción en *trans* (tasiRNAs)

Recientemente se ha descrito en plantas una nueva clase de siRNAs denominados siRNAs de acción en *trans* (tasiRNAs) (Figura 1), en éstos se destacan dos particularidades sobre el resto de los siRNAs. La primera consiste en su acción represora sobre otros transcritos diferentes al que los derivó (en *trans*, de ahí su nombre) y la segunda es su origen, necesitan de la acción de un microRNA que eventualmente desencadenará la generación de siRNAs (Vazquez et al. 2004; Allen et al. 2005; Yoshikawa et al. 2005; Vaucheret 2005; Xie y Qi 2008; Allen y Howell 2010; Parent et al. 2012).

De manera más detallada, la biogénesis de los tasiRNAs es del siguiente modo (Figura 1): el transcrito precursor de tasiRNAs contiene un sitio de complementareidad para un miRNA, con lo cual será objeto del corte endonucleolítico asociado a los miRNAs pero no será degradado, en su lugar es estabilizado por la proteína LBL1/SGS3 y posteriormente la cadena complementaria al transcrito es sintetizada por la RNA polimerasa dependiente de RNA número 6 (RDR6) (Allen et al. 2005; Vaucheret 2005; Montgomery et al. 2008; Xie y Qi 2008; Allen y Howell 2010). El RNA largo de doble cadena es procesado en siRNAs de 21-22nt por la proteína tipo Dicer 4 (DCL4) (Allen et al. 2005; Vaucheret 2005; Yoshikawa et al. 2005), algunos de estos siRNAs actúan sobre el mismo precursor de tasiRNAs (Rajeswaran y Pooggin 2012; Rajeswaran et al. 2012) ayudando a delimitar la zona de donde se generarán los tasiRNAs y otros reprimen a otros mRNAs, a los que son complementarios, y que están involucrados en otras vías de señalización (Vazquez et al. 2004; Vaucheret 2005; Yoshikawa et al. 2005; Hunter et al. 2006; Nogueira et al. 2007; Xie y Qi 2008; Yan et al. 2010; Zhai et al. 2011; Xia et al. 2012).

El transcrito precursor de los tasiRNAs es el transcrito no codificante *TAS* del cual se han comprobado 4 familias conservadas en las plantas numeradas del 1 al 4 (Xie y Qi 2008). Cada una de las familias es blanco de un miRNA diferente y los tasiRNAs generados tienen como blanco diferentes mRNAs (Vazquez et al. 2004; Yoshikawa et al. 2005; Vaucheret 2005; Xie y Qi 2008; Xia et al. 2012) (Tabla 1). No obstante otras familias de transcritos *TAS* han sido predichos en uva (Zhang, Li, et al. 2012) y en leguminosas se han descrito a los

transcritos *PHAS* como generadores de tasiRNAs (Zhai et al. 2011) haciendo más diversa a esta vía de señalización.

**Tabla 1. La generación de tasiRNAs en cada transcrito *TAS* esta asociado a un miRNA distinto, además los tasiRNAs producidos tienen diferentes blancos (Vaucheret 2005; Xie y Qi 2008; Allen y Howell 2010).**

Transcrito <i>TAS</i>	miRNA que lo corta	Argonauta del complejo RISC asociada al miRNA	mRNAs blanco
<i>TAS1</i>	173	AGO1	<i>PPR</i>
<i>TAS2</i>	173	AGO1	<i>PPR</i>
<i>TAS3</i>	390	AGO7	<i>ARF3 y 4</i>
<i>TAS4</i>	898	AGO1	<i>MYB</i>

De todos los transcritos *TAS* el más conservado en las plantas es la familia número tres (Axtell et al. 2006; Shen et al. 2009; Yan et al. 2010; Xia et al. 2012), encontrándose desde musgos hasta monocotiledóneas y dicotiledóneas. El transcrito *TAS3* presenta características propias para la generación de tasiRNAs en la gran mayoría de las plantas. Este transcrito contiene dos sitios blanco para el miR390 (Axtell et al. 2006; Montgomery et al. 2008) pero solo el más próximo al extremo 3' del transcrito debe ser cortado. Además el miR390 debe estar asociado a la proteína Argonauta 7 (AGO7) en lugar de la proteína Argonauta 1 (AGO1) quien participa con las familias 1 y 2 de transcritos *TAS*, de lo contrario no se generan los tasiRNAs (Montgomery et al. 2008).

Los eventos fisiológicos donde se aprecia claramente la acción de los tasiRNAs son varios, y con los nuevos precursores que se han descrito seguramente aumentarán. Algunos de esos eventos son la inactivación de las defensas de la planta para promover la simbiosis entre bacterias y legumbres (Zhai et al. 2011), la emergencia de la raíz lateral (Marin et al. 2010), el inicio del desarrollo del meristemo (Nagasaki et al. 2007) y desarrollo de las flores (Timmermans et al. 1998; Peragine et al. 2004; Yan et al. 2010).

En hojas, la carencia de tasiRNAs provoca hojas en forma de agujas y pérdida de los planos corporales, principalmente el eje dorsoventral (abaxial-adaxial), dando como resultado hojas con simetría circular (Timmermans et al. 1998; Nogueira et al. 2007; Nogueira y Timmermans 2007; Nogueira et al. 2009; Yan et al. 2010; Yifhar et al. 2012). Otro efecto que tiene la falta

de tasiRNAs es una acelerada transición de juvenil a adulto (heteroblasticidad) de las hojas (Peragine et al. 2004; Adenot et al. 2006; Hunter et al. 2006; Xu et al. 2006; Usami et al. 2009; Mecchia et al. 2012; Yifhar et al. 2012).

En el desarrollo de las hojas se requiere al transcrito *TAS3* que generará tasiRNAs que tienen como blanco los factores de respuesta a auxinas 3 y 4 (ARF3 y ARF4) (Tabla 1) (Allen et al. 2005; Vaucheret 2005; Axtell et al. 2006; Shen et al. 2009; Allen y Howell 2010). Para promover la correcta dorsoventralidad de las hojas, es necesario que se forme un gradiente de tasiRNAs desde lado adaxial y otro con los ARF3 y 4 desde el lado abaxial (Figura 2); los ARF3 y 4 activan al miR166, el cual reprime a los factores adaxializantes HDZIP III conllevando a la polaridad de la hoja (Juarez, Kui, et al. 2004; Hunter et al. 2006; Nogueira y Timmermans 2007; Nogueira et al. 2007; Douglas et al. 2010).



**Figura 2. RNAs interferentes de acción en *trans* (tasiRNAs) y la dorsoventralidad de la hoja.** Modelo propuesto que define la polaridad de la hoja. Un gradiente de tasiRNAs que proveniente del lado adaxial reprime a los ARF3 y 4 que activan al miR166 y que a su vez reprime a los factores adaxializantes HDZIP III (Nogueira y Timmermans 2007).

### 2.1.2 LBL1/SGS3

LBL1 es la proteína encargada de estabilizar el transcrito *TAS* una vez que ha sido objeto del corte dirigido por el miRNA (Peragine et al. 2004; Vaucheret 2005; Elmayan et al. 2009; Elkashef y Ding 2009; Allen y Howell 2010) aunque el mecanismo bajo el que lo logra aún no es claro.

LBL1 es una proteína específica de plantas (Bateman 2002) que es capaz de unir RNA (Zhang y Trudeau 2008; Elkashef y Ding 2009). Estructuralmente tiene 3 dominios (Apéndice D3), un dedo de zinc que le permite unir RNA, el dominio XS de función desconocida y un dominio de hélice entrecruzada (Bateman 2002) que le permite dimerizarse para ejercer su

función (Elmayan et al. 2009). LBL1 colocaliza con RDR6 en gránulos específicos que difieren de los cuerpos P (Kumakura et al. 2009) y posiblemente funcionan como gránulos generadores de tasiRNAs (Jouannet et al. 2012).

La falta de LBL1 genera la ausencia de tasiRNAs con sus fenotipos asociados, de hecho su efecto en la pérdida de los planos polares de la hoja le dieron el nombre *Leafbladeless 1* (LBL1) (Timmermans et al. 1998). A pesar de que los efectos vistos por la falta de LBL1 o los tasiRNAs son en ciertas estructuras o momentos de la planta, el RNA de LBL1 se ha encontrado en la gran mayoría de tejidos estudiados (Schmid et al. 2005; Yan et al. 2010; Sekhon et al. 2011) sugiriendo la existencia de otros lugares y momentos de acción para LBL1.

Aparte de la generación de tasiRNAs, LBL1 se ha descrito en el procesamiento de siRNAs en general, ya sea endógenos (Borsani et al. 2005; Katiyar-Agarwal et al. 2006) o en defensa ante algún patógeno (Mourrain et al. 2000; Vazquez et al. 2003; Muangsan et al. 2004; Glick et al. 2008; Du et al. 2011). También se ha encontrado a LBL1 involucrada en la biosíntesis de cera cuticular, en este caso se encontró asociado a RDR1 y no a RDR6 (Lam et al. 2012) lo cual es sorprendente pues previamente no se había hallado a LBL1 con alguien diferente a RDR6. Otras proteínas de la familia de LBL1 se han documentado en eventos de silenciamiento epigenético, con respecto a esto se sabe que algunos tasiRNAs son dirigidos para metilar el DNA de los genes TAS (Xie, Ren, Costa-Nunes, et al. 2012; Xie, Ren, Zhang, et al. 2012), aunque se desconoce si esto solo es para antagonizar la señal de los tasiRNAs (Jauvion et al. 2012; Wu et al. 2012) o si estaría LBL1 involucrada.

## **2.2 Regulación de la traducción**

La traducción comprende a la serie de eventos que conllevan a la decodificación de un mRNA en una proteína. En eucariontes, este proceso consta de 3 fases: el inicio, que tiene como objetivo el ensamble del complejo ribosomal 80S en el codón de inicio; la elongación, en la cual los tRNAs correspondientes a cada codón del mRNA entran al ribosoma donde se decodifica el mRNA y se realizan los enlaces peptídicos a la vez que se va liberando la proteína naciente hasta llegar al codón de término o paro donde ocurre la última etapa, la

terminación, proceso que implica el disociamiento del complejo ribosomal del mRNA dejándolo listo para reciclarse en un nuevo ciclo traduccional (Gebauer y Hentze 2004; Sonenberg y Hinnebusch 2009; Jackson et al. 2010).

En eucariontes, los mRNAs tienen en su extremo 5' la estructura 7mGpppN (donde G indica una guanina y N puede ser cualquier nucleótido) denominada *cap* (Fischer 2009). Esta estructura es primordial para que se lleve a cabo la traducción pues es reconocida por el factor eucarionte de inicio de la traducción (eIF) 4E que junto con eIF4G y la proteína de unión a poliadeninas (PABP) (situada en el extremo 3' del mRNA) circularizan al mensajero protegiéndolo y dándole estabilidad ante nucleasas permitiendo su traducción (Sonenberg y Gingras 1998; Gebauer y Hentze 2004; Sonenberg y Hinnebusch 2009).

### **2.2.1 Complejos de unión a cap**

Los complejos de unión a cap son grupos de proteínas que unen a los mRNAs a través de la estructura cap presente en el extremo 5' de los mRNAs (Topisirovic et al. 2011). En el citoplasma, la principal proteína que directamente se une a la estructura cap es el factor eIF4E (Gebauer y Hentze 2004; Topisirovic et al. 2011), el cual a su vez une al factor eIF4G para que el mRNA unido se pueda traducir (Gebauer y Hentze 2004).

Como una manera de regular la traducción de mRNAs, se han descrito proteínas que compiten con eIF4G por la unión con eIF4E (Sonenberg y Gingras 1998; Gebauer y Hentze 2004; Richter y Sonenberg 2005; Besse y Ephrussi 2008; Rhoads 2009), a través del motivo común YxxxxLφ (donde x es cualquier aminoácido y φ uno hidrofóbico) encontrado en eIF4G y las proteínas de unión a eIF4E (4EBPs) permitiendo que solo uno de los dos se pueda unir en un momento dado a eIF4E (Mader et al. 1995; Sonenberg y Gingras 1998).

### **2.2.2 Importancia de la traducción durante la germinación**

La germinación es un proceso altamente complejo y regulado con el cual las semillas salen del estado quiescente en el que se encuentran para dar lugar a un nuevo ciclo de vida de la planta. Fisiológicamente, involucra varios eventos secuenciales (Figura 3), incluyendo la

expresión génica, que comienzan con la absorción de agua (imbibición) por parte de la semilla quiescente y termina con la emergencia de la radícula (Bewley 1997; Walbot y Evans 2003; Rajjou et al. 2012).

En el maíz, solo es necesaria la presencia de agua y una temperatura óptima de crecimiento para que comience la germinación. Una vez que la semilla empieza a hidratarse usando el agua que se encuentra presente en el medio se desencadenan varios procesos celulares como son la respiración, que le proveerá de energía la semilla, y la síntesis de proteínas; esta última en un inicio procede usando mRNAs que fueron almacenados durante la maduración de la semilla y posteriormente los mRNAs sintetizados *de novo* (Bewley 1997; Walbot y Evans 2003; Rajjou et al. 2012).

El hecho de que las primeras proteínas sintetizadas son a partir de mRNAs almacenados, convierte a los complejos de unión a cap en fundamentales para la fina regulación de su traducción y permitir el correcto desarrollo de la germinación. El poder comprender los mecanismos que regulan la traducción y el destino de los mRNAs permitirán el entendimiento de la misma germinación.

### **2.3 LBL1 en complejos de unión a cap**

Trabajos previos realizados en el laboratorio (Lázaro-Mixteco y Dinkova 2012) identificaron por espectrometría de masas a LBL1 de manera diferencial en los complejos de unión a cap durante la germinación del maíz. LBL1 fue detectado en la semilla quiescente (cero horas de imbibición) mas no a 24h de imbibición cuando la mitad de las semillas ya han germinado.

Hasta el momento, no se ha descrito un vínculo claro entre los complejos de unión a cap y la vía de los tasiRNAs, sin embargo existen dos reportes (Montgomery et al. 2008; Zhang, Ng, et al. 2012) que sugieren que sí existe una relación entre ambos.

Uno de estos reportes (Montgomery et al. 2008) describió que en el transcrito *TAS3* se tienen dos sitios de corte para el miR390, pero solo el más próximo al extremo 3' debe ser cortado mientras que el próximo al 5' cap debe mantenerse integro. De no ocurrir así no se generan

tasiRNAs, sugiriendo la posibilidad de que haya factores que cubran el sitio más próximo al cap.

En la búsqueda de generar tasiRNAs sintéticos, otro reporte (Zhang, Ng, et al. 2012) encontró que dependiendo de la ubicación del marco de lectura abierto (ORF) y principalmente el codón de paro se afectaba la producción de tasiRNAs, siendo el único reporte hasta la fecha que hace una relación clara entre la traducción y la generación de tasiRNAs.

Por otra parte, durante los trabajos previos realizados en el laboratorio (Lázaro-Mixteco y Dinkova 2012) se encontró que LBL1 cuenta con el posible motivo de unión a eIF4E YMDLELE, que a pesar de no contar un aminoácido hidrofóbico en la última posición, es similar a YRKEELE que fue reportado para la lipoxigenasa 2 (LOX2) de *Arabidopsis thaliana*, quien interacciona con eIF4E (Freire et al. 2000) sugiriendo un nuevo rol para LBL1 como 4EBP.

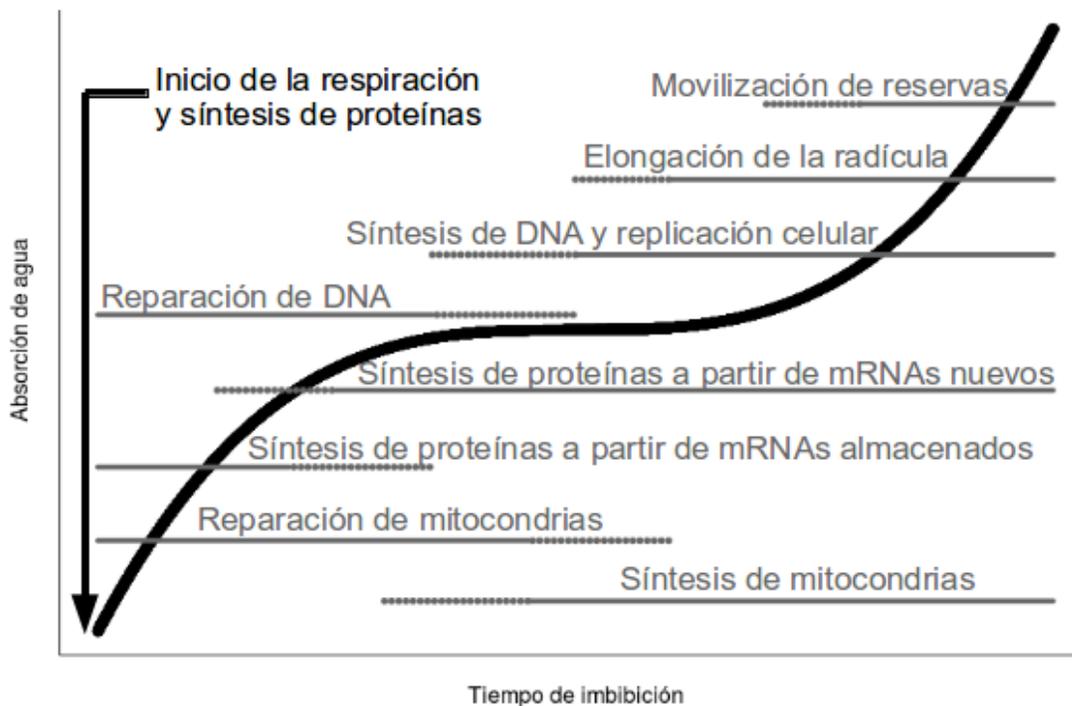


Figura 3. Principales eventos que ocurren durante la germinación. Adaptado de (Bewley 1997)

### **3 Hipótesis**

La interacción de LBL1 con los complejos de unión a cap está mediada por su capacidad de unir directamente a eIF4E. La presencia diferencial de LBL1 en los complejos de unión a cap durante la germinación no es debida a una falta de expresión de la misma LBL1, sugiriendo la existencia de distintos complejos funcionales de LBL1.

### **4 Objetivo General**

Determinar la interacción de LBL1 con proteínas de unión a cap.

### **5 Objetivos Particulares**

- Analizar los niveles de expresión de LBL1.
- Clonar LBL1 para poder producirla de manera recombinante.
- Analizar la interacción entre LBL1 y los complejos de unión a cap.
- Evaluar si LBL1 es capaz de interaccionar directamente con el factor de inicio de la traducción eIF4E.

## 6 Materiales y Métodos

Las soluciones usadas se describen con mayor detalle en el Apéndice A.

### 6.1 Material Biológico

#### 6.1.1 Bacterias

##### 6.1.1.1 Especies y cepas utilizadas

Para el presente trabajo se utilizaron las siguientes cepas de la bacteria *Escherichia coli* : DH5 $\alpha$ , TOP10, BL21 DE3, BL21 pLysS, BL21 XLGold, BL21 Rosetta y BL21 Codon Plus. Las características de estas cepas se encuentran en el Apéndice B1.

##### 6.1.1.2 Obtención de células *Escherichia coli* competentes para transformación por choque térmico

A partir de una colonia de *Escherichia coli* se realizó un precultivo de 10mL en medio LB líquido, el cual se mantuvo a 37°C toda la noche con agitación de 200-350rpm. Se usaron 4mL del precultivo en un volumen de 400mL de medio LB líquido que se incubó del mismo modo que el precultivo hasta que alcanzara una DO<sub>600nm</sub> de 0.4 (aproximadamente 3 a 5h de incubación), tras lo cual se dejó en hielo por 30min y se centrifugó a 1700 x g por 7min a 4°C desechando el sobrenadante. Posteriormente, el botón obtenido se resuspendió en 10mL de la solución de CaCl<sub>2</sub> y se centrifugó 5min a 1700 x g y 4°C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 2mL de la solución de CaCl<sub>2</sub> que se dividieron en fracciones de 250 $\mu$ L. Las células competentes se usaron en el momento o congelaron con nitrógeno líquido para almacenarlas a -70°C.

##### 6.1.1.3 Transformación de *Escherichia coli* competentes por choque térmico

A células competentes previamente descongeladas en hielo se agregaron 10ng de plásmido que se mezclaron cuidadosamente por inversión e incubaron en hielo por 30min para posteriormente aplicarles un choque térmico a 42°C durante 45s, tras lo cual fueron regresadas al hielo por mínimo 5min. Bajo condiciones de esterilidad, a las células se les agregó 250 $\mu$ L de medio LB y se incubaron durante 1h a 37°C en agitación a 200-350rpm,

pasado ese tiempo se centrifugaron a  $1700 \times g$  por 1min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 100 $\mu$ L de medio LB. Las células se estriaron en cajas con medio LB sólido con kanamicina (50mg/L) o ampicilina (100mg/L) y se incubaron a 37°C por 24h.

#### **6.1.1.4 Obtención de células *Escherichia coli* electrocompetentes**

A partir de una colonia de *Escherichia coli* se realizó un precultivo de 5mL en medio LB líquido, el cual se mantuvo a 37°C toda la noche con agitación de 200-350rpm. Se usaron 2.5mL del precultivo en un volumen de 500mL de medio LB líquido que se incubó del mismo modo que el precultivo hasta que alcanzara una  $DO_{600nm}$  de 0.5-0.6 (aproximadamente 4 a 6h de incubación); tras lo cual se dejó en hielo por 15min y se centrifugó a  $5000 \times g$  por 20min a 4°C desechando el sobrenadante. Posteriormente, el botón obtenido se resuspendió en 5mL de agua atemperada a <4°C. Se realizó un lavado añadiendo 500mL de agua atemperada a <4°C y centrifugando a  $5000 \times g$  por 20min a 4°C desechando el sobrenadante, este lavado se repitió una vez mas decantando inmediatamente el sobrenadante y resuspendiendo muy gentilmente con el agua remanente.

Si las células se usaron al momento para transformar, se centrifugaron a  $5000 \times g$  por 10min a 4°C desechando el sobrenadante. Se estimó el volumen del botón (~500 $\mu$ L/500mL de cultivo) y se resuspendió en un volumen de agua atemperada a <4°C para finalmente dividirse en fracciones de 50 $\mu$ L-300 $\mu$ L. Las células frescas funcionan mejor que las congeladas.

Si las células se congelaron para posteriormente usarse, se añadieron 40ml de glicerol 10% v/v atemperado a <4°C y se centrifugaron a  $5000 \times g$  por 10min a 4°C desechando el sobrenadante. Se estimó el volumen del botón (~500 $\mu$ L/500mL de cultivo) y se resuspendió en un volumen de glicerol 10% atemperado a <4°C para finalmente dividirse en fracciones de 50 $\mu$ L-300 $\mu$ L. Las células competentes se congelaron con nitrógeno líquido para almacenarlas a -70°C.

#### **6.1.1.5 Transformación de *Escherichia coli* competentes por electroporación**

A células electrocompetentes frescas o previamente descongeladas en hielo se agregaron 10ng de plásmido que se mezclaron cuidadosamente por inversión. Las células se traspasaron a una celda de electroporación atemperada a <4°C, para dar un pulso en el

electroporador con ajustado a 2.5kV, 25 $\mu$ F y 200-400ohms, inmediatamente después se agregó 1mL de medio SOC. Las células se traspasaron a un tubo estéril y se mantuvieron en incubación 1h a 37°C en agitación a 200-350rpm, pasado ese tiempo se centrifugaron a 1700 x g por 1min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 100 $\mu$ L de medio LB. Las células se estriaron en cajas con medio LB sólido con kanamicina (50mg/L) o ampicilina (100mg/L) y se incubaron a 37°C por 24h.

## **6.1.2 Plantas**

### **6.1.2.1 Material utilizado**

La planta utilizada para esta tesis fue *Zea mays* (maíz) variedad Chalqueño obtenida a partir de productores locales.

### **6.1.2.2 Esterilización de semillas**

Para evitar el posible crecimiento de patógenos durante la germinación del maíz, las semillas se trataron con NaClO comercial diluido al 10% v/v y se agitaron vigorosamente durante 5min, pasado el tiempo se hicieron 3 lavados con agua destilada de 5min cada uno con agitación vigorosa.

### **6.1.2.3 Germinación de semillas de maíz**

Las semillas esterilizadas de maíz se colocaron entre 2 capas de algodón plisado comercial empapado en agua potable y se mantuvieron en obscuridad a 28°C durante un máximo de 72h.

### **6.1.2.4 Siembra de semillas en tierra**

Se preparó una mezcla de sustratos con turba, agrolita y vermiculita (6:3:2 p/p/p) que equivale a Metromix 200®, se humedeció con agua potable o destilada y se colocó en macetas o charolas.

Las semillas germinadas se sembraron directamente en tierra a una profundidad de aproximadamente 4cm y se mantuvieron en un rango de 19 a 29°C con luz ambiental. Las plantas se regaron cada dos días o cuando fuera necesario con agua potable.

## **6.2 Técnicas de Biología Molecular**

### **6.2.1 Generación de plásmidos**

Los plásmidos generados durante este trabajo (Apéndice B2) incluyeron la secuencia codificante de la proteína de interés (inserto) dentro de un vector que contiene un promotor que dirige la expresión del inserto, así como genes de resistencia o reporteros que sirven como marcadores de selección y un origen de replicación autónomo.

El inserto se obtuvo a partir de un plásmido ya existente o de la amplificación por PCR de la secuencia de interés y se unió al vector mediante ligación con T4 ligasa o recombinación a través de topoisomerasas o recombinasas.

#### **6.2.1.1 Por ligación**

Para los plásmidos generados a través de ligación, primero tanto el vector como el inserto se purificaron para evitar que hubiera contaminantes que interfirieran con la unión de ambos. Primero se separaron a través de un gel de agarosa para obtener el fragmento correspondiente al tamaño deseado, dichos fragmentos se escindieron del gel y se purificaron con el ilustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit® de GE Healthcare®. Posteriormente la ligación se llevó a cabo usando el Rapid DNA Ligation Kit® de Roche®, usando una concentración 3:1 de inserto:vector y siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente se usó la décima parte de la reacción para transformar *Escherichia coli* por choque térmico.

#### **6.2.1.2 Por recombinación**

En los plásmidos generados mediante recombinación se utilizó la tecnología TOPO® y Gateway® de Invitrogen® de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La tecnología TOPO® permite la introducción de secuencias dentro de un vector donador que posteriormente se puede recombinar en vectores de uso final como pueden ser los de sobreexpresión usando la tecnología Gateway®, que usa las propiedades de la recombinación del bacteriófago  $\lambda$  para integrarse al genoma de *Escherichia coli*. De manera resumida, el vector pENTR/SD/D-TOPO® cuenta con un sitio que es reconocido por la

topoisomerasa I del virus *Vaccinia* que introducen direccionalmente el inserto. Para asegurar la direccionalidad del fragmento a introducir, éste debe llevar en su extremo 5' la secuencia CACC, en este caso el fragmento fue la secuencia codificante de LBL1 y la secuencia de direccionalidad fue incluida desde el momento que se amplificó, ya que el oligonucleótido sentido (Fw) fue sintetizado con la secuencia CACC en el extremo 5'. El vector obtenido (pSDTOPOLBL1) se utilizó para transformar células de *Escherichia coli* electrocompetentes pues al hacerlo por choque térmico solamente se obtuvieron plásmidos sin el inserto. Para generar el vector de expresión inducible, el vector pSDTOPOLBL1 se recombinó con el vector pDEST24 usando la tecnología Gateway®, con el vector resultante se transformaron células de *Escherichia coli* por choque térmico.

## **6.2.2 Extracción de DNA**

### **6.2.2.1 Purificación de plásmido a partir de bacterias**

A partir de una colonia bacteriana se inocularon 6mL de medio LB líquido con antibióticos incubándose con agitación 16h a 37°C. Y posteriormente se extrajo el plásmido con el GeneJET Plasmid Miniprep Kit® de Thermo Scientific® de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

### **6.2.3 Extracción de RNA**

Se utilizaron 50-100mg de tejido de planta o semilla fresco o congelado a -70°C, el cual se maceró siempre en congelación con pistilos de plástico limpios y estériles. Posteriormente se realizó la extracción de RNA usando el reactivo de TRIzol® de Invitrogen® siguiendo las indicaciones del fabricante. EL RNA obtenido se resuspendió en 20µL de agua tratada con DEPC, de los cuáles se tomaron 3µL para evaluar la calidad e integridad del RNA a través de un gel 1.5% Agarosa 1X MOPS 4% formaldehído teñido con bromuro de etidio. Previó a cargarse la muestra en el gel ésta se mezcló con amortiguador de carga para RNA y se calentó a 65°C durante 5min.

Una vez corroborada la integridad de la muestra, se procedió a cuantificarla usando 1µL de RNA diluido en 99µL de agua, a esta disolución se le midió la absorbancia (Abs) a 260nm y

280nm en un espectrofotómetro. Para calcular la concentración de RNA se aplicó a la siguiente fórmula:

$(Abs_{260nm})(40)(100)=mg/mL$  RNA, donde 40 representa el coeficiente de extinción molar a la longitud de onda señalada.

Una relación  $(Abs_{260nm}/Abs_{280nm}) > 1.6$  indica que la muestra no contiene contaminantes proteicos.

## **6.2.4 Amplificación de DNA**

### **6.2.4.1 Transcripción Reversa**

Todo RNA usado fue tratado previamente con DNAsa (RQ1 DNase de Promega® , acorde a las instrucciones del fabricante) para evitar cualquier posible contaminación por DNA.

A partir de 1µg de RNA total se sintetizó el cDNA complementario a los mRNAs usando el sistema ImProm-II™ Reverse Transcription de Promega® de acuerdo a las instrucciones del fabricante, y un oligonucleótido de polidesoxitimidinas (oligo dT) indicado en el Apéndice C1.

### **6.2.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

A partir 50-300ng de DNA o cDNA se realizaron las amplificaciones detalladas en la sección de resultados. Para clonar genes se usó la Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase de New England Biolabs®, para el resto se usó la Taq Polimerasa de Alta Enzymes®. Los oligonucleótidos así como las condiciones usadas en las reacciones se detallan en los apéndices C1 y C2 respectivamente.

## **6.2.5 Inducción de proteínas recombinantes**

Las condiciones particulares de cada inducción son diferentes, aquí se describen de manera general y de manera específica en el Apéndice B3. A partir de una colonia de *Escherichia coli* se realizó un precultivo de 5mL en medio LB líquido, el cual se mantuvo a 37°C toda la noche con agitación de 200-350rpm. Se usaron 2mL del precultivo en un volumen de 150mL de medio LB líquido que se incubó del mismo modo que el precultivo hasta que alcanzara una

DO<sub>600nm</sub> de 0.4-0.6 (aproximadamente 4 a 10h de incubación). Una vez alcanzada la DO<sub>600nm</sub> deseada, se agregó IPTG a una concentración final de 0.5mM y se incubó por 3h más en las mismas condiciones. Finalmente el cultivo se centrifugó a 1700 x g por 10min a 4°C desechando el sobrenadante y guardando el botón con las células para futuros procedimientos.

### **6.2.6 Transcripción/traducción *in vitro* en lisado de reticulocito de conejo**

Para este fin se usó el sistema acoplado de transcripción/traducción *in vitro* TNT® Coupled Reticulocyte Lysate Systems de Promega®. Como templado se usaron los vectores pDEST24LBL1, T7GSTLBL1 y T7LBL1 (Apéndice B2) en reacciones con el amortiguador IVT. La reacción se incubó durante 90min a 30°C. Para seguir a las proteínas sintetizadas se utilizó <sup>35</sup>S[Metionina] EASYTAG METHIONINE®, L-(35S)- >1000 Ci/mmol 10.2 mCi/ML. PACKAGED IN A STABILIZED AQUEOUS SOLUTION WITH BLUE DYE. 500 µCi/VIAL VIAL/500 µCi de PERKIN ELMER®.

### **6.2.7 Extracción de Proteínas de Bacteria**

Un botón de células de bacterias, proveniente de un cultivo celular de 150mL, se resuspendió en 12mL del amortiguador de Extracción de Proteínas de Bacteria 1X, adicionado al momento con 12mg de lisozima, 24µL de PMSF 100mM y 120µL de inhibidor de proteasas miniCOMPLETE de Roche® 7X y se incubó 1h a 4°C en rotación ligera. Posteriormente se agregó sarcosyl a una concentración final 0.7% v/v y se mezcló gentilmente por inversión, enseguida se agregó tritón X-100 y CHAPS a una concentración final de 3% v/v y 20mM, respectivamente. La mezcla se incubó 15min a 4°C en rotación ligera, pasado este tiempo se centrifugó 15min a 15000 x g a 4°C. Finalmente la fracción soluble o sobrenadante se separó y de ser necesario se filtró con gasa mientras que la fracción insoluble se desechó.

### **6.2.8 Proteólisis por trombina**

Las proteínas que fueran a ser sometidas a proteólisis con trombina debían ser libres de inhibidores de proteasas. Para el caso de proteínas unidas a resinas o sefarosas se realizaron 3 lavados con 10 volúmenes de amortiguador PBS 1X y se centrifugaron 5min a

500 x g a 4°C para remover los inhibidores de proteasas.

Las proteínas se incubaron con 6U trombina GE Healthcare® por lo menos 20h a temperatura ambiente con rotación ligera para poder observar proteólisis, a pesar de que a este tiempo no se aprecia proteólisis total, extender el tiempo de incubación no parece incrementar la eficiencia. Para inactivar la trombina, la reacción se incubó con 0.3mM de PMSF a 37°C durante 15min.

## **6.2.9 Interacción proteína-proteína y proteína-ligando**

### **6.2.9.1 Interacción con glutatión sefarosa 4B de GE Healthcare®**

Previo a la interacción de proteínas afines, se removió el conservador de la resina mediante un lavado con 10 volúmenes de amortiguador PBS 1X o el amortiguador que se use para la interacción seguido de una centrifugación 5min a 500 x g y desechando el sobrenadante. Posteriormente se equilibró la resina repitiendo el lavado anterior pero con tres volúmenes de amortiguador PBS 1X o el amortiguador de interacción. Finalmente se añadió un volumen de amortiguador PBS 1X o el amortiguador que se use para la interacción para que la resina quedará al 50% v/v.

Para llevar a cabo la interacción, se usaron 25µL de resina al 50% equilibrada por cada 70µg de GST (aproximadamente un cultivo inducido produce 2.5µg de GST/mL de cultivo) en el amortiguador de interacción (ya fuera PBS, Extracción de Proteínas de Bacteria 1X o TGEM). La mezcla se incubó a temperatura ambiente con rotación ligera durante 1h, transcurrido este tiempo se centrifugó 5min a 500 x g y se desechó el sobrenadante. Posteriormente se hizo un lavado con 10 volúmenes del amortiguador de interacción y tritón X-100 al 0.5% v/v seguido de una centrifugación 5min a 500 x g y desechando el sobrenadante; se repitió el lavado pero con 0.1% v/v de Tritón X-100. Si se requería eluir la proteína unida a la resina, se agregó 0.2 volúmenes de amortiguador de Elución de GST y se incubó durante 10min a temperatura ambiente con rotación ligera y posteriormente se centrifugó 5min a 500 x g y colectó el sobrenadante con la proteína eluida. La elución se repitió 2 veces más incubando 1h y 16h.

### **6.2.9.2 Interacción con 7mGTP sefarosa GE Healthcare®**

Para llevar a cabo la interacción, se usaron 25µL de resina por cada 70µg de proteína en el amortiguador de Unión a 7mGTP. La mezcla se incubó 2h a 4°C con rotación ligera; transcurrido este tiempo se centrifugó a 500 x g durante 5min a 4°C y se desechó la fracción no unida a la resina (FNU). Posteriormente se hicieron tres lavados con 10 volúmenes del amortiguador de Unión a 7mGTP cada uno seguido de una centrifugación 500 x g durante 5min a 4°C y desechando el sobrenadante. Finalmente se hizo un último lavado igual a los previos pero añadiendo GTP a una concentración final de 100µg/mL para remover aquellas uniones a GTP independientemente de si está metilado o no.

### **6.2.9.3 Interacciones proteína-proteína**

#### *6.2.9.3.1 Coelución de proteínas unidas a glutatión sefarosa 4B*

Estos experimentos se realizaron con una versión modificada a lo indicado en (Nguyen y Goodrich 2006). La resina se equilibró e interaccionó con GST usando el amortiguador TGEM. Las proteínas unidas (aproximadamente 300µg) a la glutatión sefarosa 4B se mezclaron con las proteínas de interés (una reacción de transcripción/traducción *in vitro*) 2h a 4°C con rotación ligera, transcurrido este tiempo se centrifugó 500 x g durante 5min a 4°C y desechó la fracción no unida a la resina (FNU). Posteriormente se hicieron cuatro lavados con 10 volúmenes del amortiguador TGEM cada uno seguido de una centrifugación 500 x g durante 5min a 4°C y desechando el sobrenadante.

#### *6.2.9.3.2 Coelución de proteínas unidas a 7mGTP sefarosa*

Para llevar a cabo la interacción, se mezclaron las proteínas de interés (una reacción de transcripción/traducción *in vitro*) con las proteínas ya unidas (aproximadamente 300µg) a la resina y se agregaron 10 volúmenes del amortiguador de Unión a 7mGTP. La mezcla se incubó 2h a 4°C con rotación ligera; transcurrido este tiempo se centrifugó 500 x g durante 5min a 4°C y se desechó la fracción no unida a la resina (FNU). Posteriormente se hicieron tres lavados con 10 volúmenes del amortiguador de Unión a 7mGTP cada uno seguido de una centrifugación 500 x g durante 5min a 4°C y desechando el sobrenadante. Finalmente se hizo un último lavado igual a los previos pero añadiendo GTP a una concentración final de

100µg/mL para remover aquellas uniones a GTP independientemente de si esta metilado o no.

### **6.2.10 Cuantificación de Proteínas**

Se realizó mediante el método colorimétrico de Bradford utilizando el reactivo de BioRAD®. A 800µL del Reactivo de Bradford a temperatura ambiente, se agregaron 199µL de agua desionizada y 1µL de proteína y se midió en un espectrofotómetro a DO<sub>595nm</sub>. La reacción se llevo a cabo por triplicado y el valor promedio se comparó con una curva de calibración de albumina. La curva de calibración se realizó (por triplicado) del mismo modo agregando concentraciones conocidas de albúmina (0,1,2,4,5,8,10,15 y 20µg).

### **6.2.11 Inmunodetección**

Las proteínas (20µg adicionadas con amortiguador de carga de proteínas y calentadas a 95°C durante 5min) se separaron mediante electroforesis en geles de acrilamida al 10-15% a 100V durante 2h en amortiguador de Corrida de Proteínas 1X. Tras esto las proteínas fueron transferidas del gel a una membrana de PVDF (previamente activada en metanol absoluto) en amortiguador de Transferencia de Proteínas a 100V 1h. La membrana fue bloqueada con leche en polvo baja en grasa al 5% (p/v) en PBS 1X durante 1h con agitación. Tras esto se incubó con agitación 1h con los anticuerpos primarios mouse anti-GST (1:3000). Se lavó la membrana con amortiguador PBS 1X 3 veces durante 10min y se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a HRP goat-antimouse (1:5000) y se reveló usando el substrato quimioluminiscente HRP de Millipore®, y exponiendo la membrana en una placa radiográfica por 5min o detector de quimioluminiscencia por 1min. Para remover los anticuerpos pegados y realizar nuevas detecciones en la misma membrana ésta se incubó 1h con la Solución de Desnudado de Membranas y se lavó 3 veces con amortiguador PBS 1X por 10min.

### **6.2.12 Autoradiografía (Detección de proteínas radiactivas)**

Las proteínas marcadas radiactivamente en las reacciones de transcripcion/traducción *in vitro* fueron adicionadas con amortiguador de carga de proteínas y calentadas a 95°C durante 5min). Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles de acrilamida al

10-15% a 100V durante 2h en amortiguador de Corrida de Proteínas 1X. Posteriormente los geles se mantuvieron en agitación ligera 30min a temperatura ambiente con agua destilada, transcurrido este tiempo se tiñeron con la solución de azul de Coomasie durante 16h. Posteriormente los geles teñidos se lavaron 30min con agua destilada y 30min con Solución de Desteñidora de Commasie para remover el exceso de azul de Coomasie y que las proteínas fueran visibles. Finalmente se dejó mas de 1h en agua destilada para hidratar el gel y poderlo secar. Para secar el gel se utilizó el secador de geles Hoefer GD2000 Vacuum Gel-Drying System® durante 1h 15min a 72°C con vacío. El gel seco se puso a exponer durante al menos 96h en total oscuridad dentro de un cartucho de exposición sobre una pantalla Kodak® Phosphor Screen para finalmente ser leído en el documentador Typhoon 9410® (longitud de onda 633nm y 100µm de resolución).

### **6.3 Metodología *in silico***

#### **6.3.1 Obtención de secuencias homólogas a LBL1, eIF4G y LOX2**

A partir de las secuencias de LBL1 en maíz, eIF4G y LOX2 ambas en *Arabidopsis thaliana* se realizó una búsqueda de homólogos usando BLAST en la base de datos UNIPROT con los parámetros por defecto. Aquellas proteínas con mayor identidad en cada especie fueron tomadas para análisis posteriores. Los datos de las secuencias analizadas se encuentran en el Apéndice F.

#### **6.3.2 Predicción de regiones espaciales hidrofóbicas**

La predicción de las zonas hidrofóbicas se realizó mediante el programa MeDOR (Metaserver of Disorder) v1.4 (Lieutaud et al. 2008). La comparación de zonas entre proteínas se hizo de manera manual.

#### **6.3.3 Predicción de motivos de unión a eIF4E**

Las secuencias de las proteína que unen a eIF4E fueron sometidas al servidor MEME v4.9.1 (<http://meme.sdsc.edu/meme/cgi-bin/meme.cgi>) (Bailey et al. 2009). Los parámetros usados durante la predicción se encuentran en el Apéndice E3.

## **6.3.4 Búsqueda de motivos de unión a eIF4E en diversas proteínas**

### **6.3.4.1 Motivos consensos**

Los motivos consenso YxxxxLφ, YxxxxLζ, y YxxxxLx al tener demasiadas posiciones ambiguas imposibilita su uso en el algoritmo de MAST (Bailey et al. 2009) que hacen uso de matrices, por lo que la búsqueda de estas expresiones regulares se hizo de manera manual sobre las proteínas de interés.

### **6.3.4.2 Motivos provenientes de MEME**

Los motivos provenientes de MEME (descrito en la sección de metodología 6.3.3) y el motivo [HRKQ]xxYx[RH]x[FAVLIM]L[MLWFY] (Gosselin et al. 2013) se sometieron al servidor MAST (Bailey et al. 2009) (<http://meme.nbcr.net/meme/cgi-bin/mast.cgi>) bajo las condiciones indicadas en el Apéndice E3 sobre las proteínas de interés.

## **6.3.5 Obtención de la composición de LBL1 y LBL1-GST**

La secuencia de LBL1 se sometió al servidor ProtParam (Gasteiger et al. 2005) (<http://web.expasy.org/protparam/>) para obtener la información de su composición fisicoquímica (Apéndice D1) y al servidor PeptideCutter (Gasteiger et al. 2005) ([http://web.expasy.org/peptide\\_cutter/](http://web.expasy.org/peptide_cutter/)) para verificar que LBL1 no fuera objeto de corte por trombina y esto pudiera interferir con su eventual purificación (Apéndice D2).

## **6.3.6 Identificación de la identidad entre homólogos de LBL1**

Las secuencias de los homólogos de LBL1 (ya fuera completa o solo el dominio de hélice entrecruzada) fueron sometidas al servidor Supermatcher (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/supermatcher>) del conjunto de herramientas EMBOSS (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/>) usando los parámetros por defecto.

## 7 Resultados

### 7.1 Expresión de LBL1 durante la germinación del maíz

Una posible razón por la cual LBL1 no se encuentre en los complejos de unión a cap a 24h de imbibición es debido a que tal vez no se esté expresando en ese momento de la germinación. Se analizó la expresión de LBL1 en un periodo de tiempo de 0h a 72h de imbibición, el cual abarca tanto eventos germinativos como postgerminativos. Debido a que no se cuenta con un anticuerpo capaz de reconocer a LBL1 nos limitamos a ver su expresión a nivel de RNA (Figura 4).

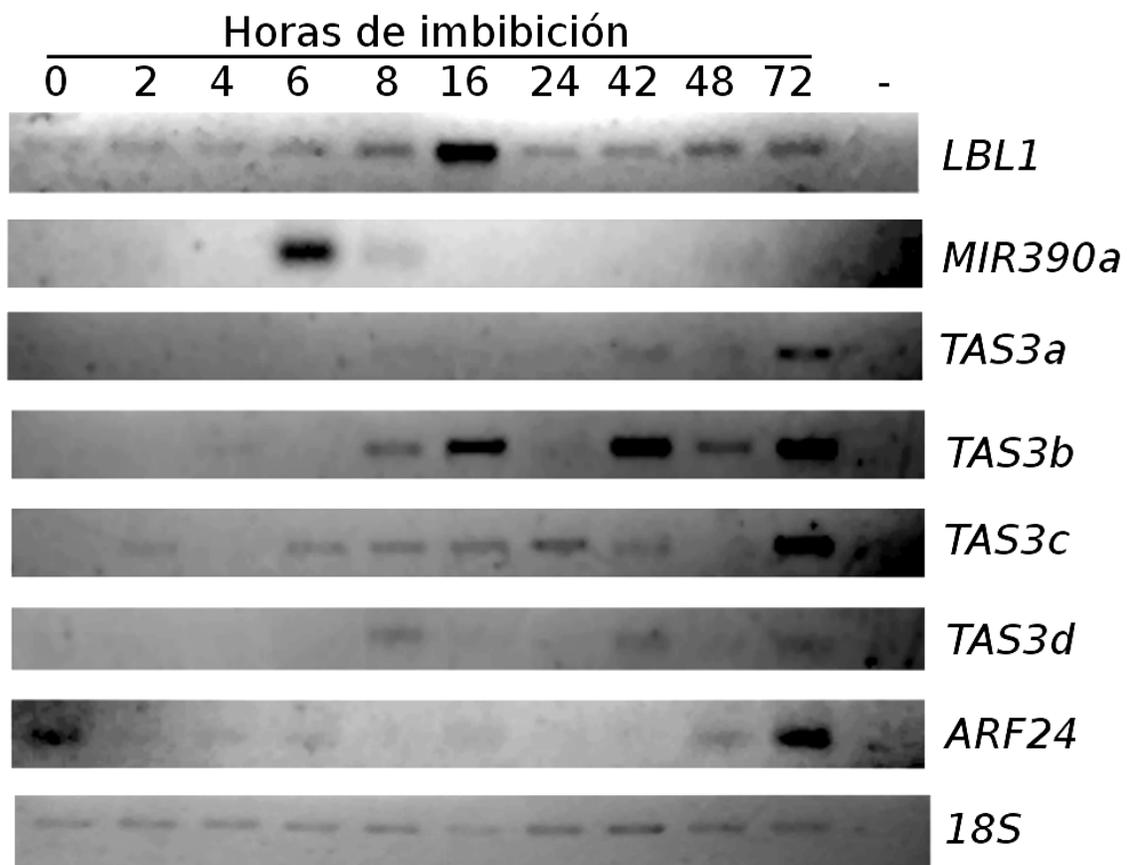


Figura 4. La expresión del RNA de LBL1 no sobrelapa con la expresión de elementos de la vía de los tasiRNAs durante la germinación del maíz. RT-PCR de LBL1, el precursor del miR390 (MIR390a), los precursores de tasiRNAs (TAS3a-d), ARF24 (el homólogo a ARF3 de *Arabidopsis thaliana* (Xing et al. 2011)) y como control de carga el RNA ribosomal 18S.

Los tiempos de análisis se eligieron acorde a los eventos fisiológicos que ocurren en la

semilla (Figura 3): 0h a 4h el control de la expresión génica es a través de los mRNAs almacenados en la semilla, 4h a 8h se comienza la transcripción *de novo*, 16h ya hay división celular, 24h a 48h se pueden observar desde 50-100% de semillas germinadas y 72h donde la parte aérea ha emergido (Bewley 1997; Rajjou et al. 2012).

Se pudo apreciar que LBL1 está presente en todos los tiempos de imbibición ensayados (Figura 4). Si bien los patrones de expresión a nivel de RNA no siempre corresponden con la expresión a nivel de proteína (Baerenfaller et al. 2012), los niveles constantes de LBL1 nos hacen sugerir que su proteína probablemente está presente durante la germinación y su ausencia en los complejos de unión a cap a las 24h de imbibición (Lázaro-Mixteco y Dinkova 2012) se deba a que esté desempeñando funciones diferentes.

Además de la expresión de LBL1 se analizó la expresión de algunos componentes de la vía que establece la dorsoventralidad de las hojas a través de tasiRNAs (Figura 2). De manera interesante se pudo observar que no hay una relación entre la constante expresión de LBL1 y la del resto de componentes de la vía (Figura 4), quienes también presentaron patrones diferenciales.

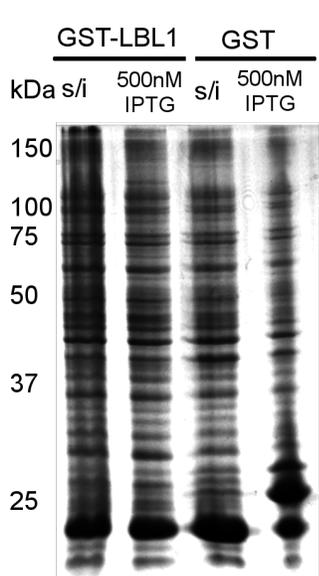
La expresión diferencial de los genes TAS es consistente con lo ya reportado en hoja (Nogueira et al. 2009). Reportes previos indican que el miR390 no está expresado en semillas sin germinar y tras 24h de imbibición (Li et al. 2013), lo cual concuerda con los resultados obtenidos para el precursor MIR390a, pero resulta interesante haber encontrado el precursor expresado en etapas intermedias sugiriendo un papel para este miRNA en estas etapas (Figura 4). El factor ARF24 (el homólogo a ARF3 de *Arabidopsis thaliana* (Xing et al. 2011)), se encontró expresado al inicio de la germinación y posteriormente hasta etapas postgerminativas (Figura 4) quedando por determinar si su ausencia es debida a los tasiRNAs.

Previamente se ha demostrado mediante hibridaciones *in situ* que la expresión de los elementos de la vía de los tasiRNAs es muy específica dentro de los tejidos (Nogueira et al. 2007; Nogueira et al. 2009), por lo que no se descarta que la vía si pudiera estar expresada

pero el buscarlos dentro de todo el eje embrionario pudo haberlos enmascarado, además existe un segundo precursor del miRNA 390 (el MIR390b (Nogueira et al. 2009)) que no fue analizado.

## 7.2 Generación de LBL1 recombinante

Para analizar la capacidad de LBL1 de interaccionar con los complejos de unión a cap se procedió a obtener a la proteína de manera recombinante fusionada a etiquetas como la glutatión-S-transferasa (GST) o un tracto de seis histidinas (Apéndice B2). En principio se intentó inducir su expresión en *Escherichia coli*, pero desafortunadamente a pesar de todas las condiciones intentadas (Apéndice B3) solo se logró la inducción de una proteína de mayor tamaño molecular (Figura 5), la cual no era posible recuperar mediante cromatografía de afinidad para la etiqueta de GST. La proteína observada no era producto de una inducción específica del plásmido que codifica solo a GST (Figura 5 ;últimos 2 carriles).

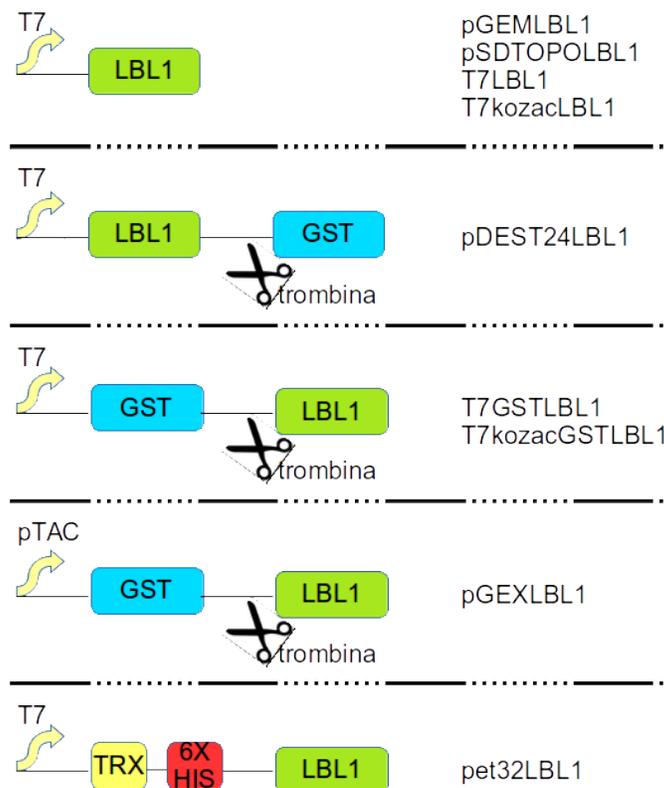


**Figura 5. La inducción de GST-LBL1 produce una proteína de mayor tamaño al esperado.** Inducción de GST-LBL1 con 500nM de IPTG resultando en una proteína de mayor tamaño (◄) al esperado (◄◄). La inducción de dicha proteína no es propia del vector pues la inducción de GST sola no la produce y si es capaz de inducir a GST (◄).

Otra manera de obtener la proteína recombinante es de manera *in vitro*, para este fin se usó el sistema heterólogo de transcripción/traducción *in vitro* de lisado de reticulocito de conejo (RRL) y marcaje radiactivo con  $^{35}\text{S}[\text{Met}]$  para identificar las proteínas traducidas. Se usaron diversos vectores (Figura 6, Apéndice B2) que codificaban a LBL1 ya fuera solo (pGEMLBL1, pSDTOPOLBL1, T7LBL1 y T7kozacLBL1) o con etiquetas fusionadas como tioredoxina y un tracto de 6 histidinas (pet32LBL1) o GST (pDEST24LBL1, T7GSTLBL1,

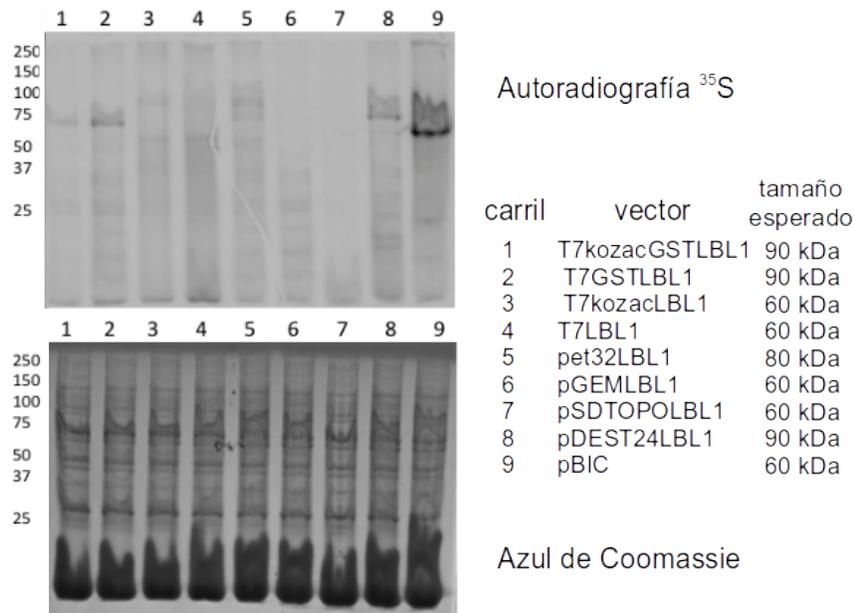
T7kozacGSTLBL1 y pGEXLBL1). Los vectores con la etiqueta GST la tenían ya fuera en el extremo amino (pGEXLBL1, T7GSTLBL1 y T7kozacGSTLBL1) o carboxilo (pDEST24LBL1) terminal de LBL1, además en todos ellos es posible separar a LBL1 de GST mediante un sitio de corte a trombina entre ambas proteínas.

Debido a que el sistema de transcripción/traducción *in vitro* en RRL induce la transcripción de genes mediante la T7 Polimerasa, el plásmido pGEXLBL1 no es útil para este ensayo pues induce a la proteína recombinante bajo el promotor pTAC. Para poder tener vectores que codificaran a LBL1 con GST fusionada en el amino terminal se generaron amplicones con oligonucleótidos que contenían el promotor T7 seguido de dicha construcción (T7GSTLBL1 y T7kozacGSTLBL1) a partir del plásmido pGEXLBL1 y que posteriormente pudieran ser usados para la transcripción/traducción *in vitro* de acuerdo a lo ya reportado con anterioridad (Mackow et al. 1990; Padilla-Noriega et al. 1995). Usando el mismo enfoque se generaron amplicones que codificaban a LBL1 sin ninguna etiqueta ( T7LBL1 y T7kozacLBL1), además en los amplicones T7kozacLBL1 y T7kozacGSTLBL1 entre el promotor T7 y la secuencia de la proteína de fusión se agregó el sitio de entrada para el ribosoma eucarionte.



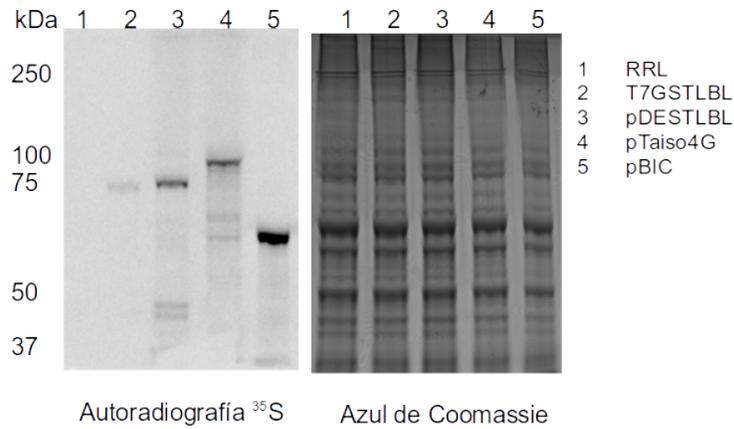
**Figura 6. Vectores para generar LBL1 recombinante.** Diversos plásmidos o productos de PCR fueron usados para producir a LBL1, los cuales eran inducibles por el promotor pTAC o T7, el último sirve para poder traducir *in vitro*. Los vectores que empiezan con “p” son plásmidos y los que empiezan con “T7” son productos de PCR útiles para hacer traducciones *in vitro* (Mackow et al. 1990; Padilla-Noriega et al. 1995). Los fragmentos de PCR T7kozacLBL1 y T7kozacGSTLBL1 se les añadió el sitio de entrada al ribosoma eucarionte.

Se probaron todas las construcciones capaces de ser usadas en el ensayo de transcripción/traducción *in vitro* y se observó que solo el plásmido pDEST24LBL1 y los amplicones T7LBL1, T7kozacLBL1, T7GSTLBL1, T7kozacGSTLBL1 fueron capaces de traducir proteínas del tamaño esperado (Figura 7, Apéndice D1). Por su parte los plásmidos pet32LBL1, pSDTOPOLBL1 y pGEMLBL1 no fueron útiles pues no traducían proteínas del tamaño esperado (Figura 7, Apéndice D1). Como control de la reacción de transcripción/traducción *in vitro* se usó el plásmido pBic (Martínez-Salas et al. 1993) el cual codifica a las proteínas luciferasa (60kDa) y cloranfenicol acetil transferasa (25kDa) ambas bajo el promotor de la T7 Polimerasa (Figura 7 y 8); también se usó como control de la reacción el plásmido pTaiso4G (Mayberry et al. 2007) que bajo el promotor T7 induce la transcripción del mRNA del factor elFiso4G de trigo sin ningún tipo de etiqueta (Figura 8).



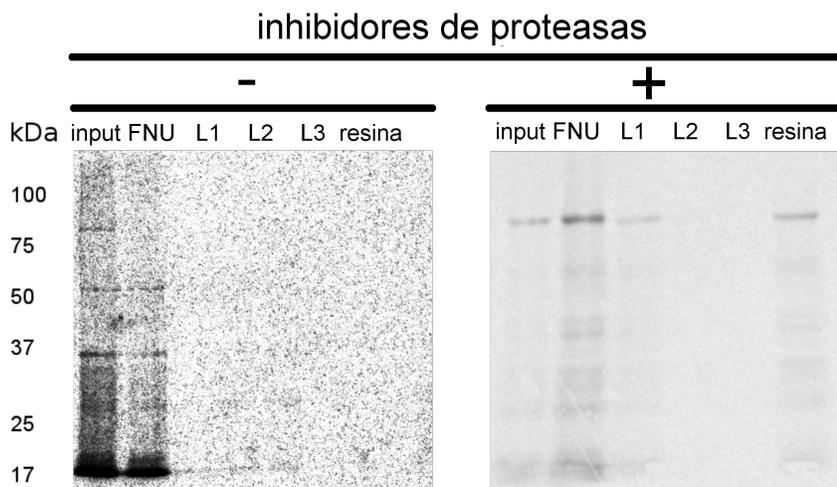
**Figura 7. Traducción *in vitro* de LBL1.** Traducción *in vitro* en lisado de reticulocito de conejo de los vectores mostrados en la Figura 6 junto con el vector pBIC que traduce a la luciferasa. Arriba se muestra la autorradiografía donde se ve la proteína traducida y abajo la tinción con azul de Coomassie como control de carga.

Las proteínas traducidas fueron específicas y no un falso positivo de algún DNA ya presente en el reticulocito de conejo (Figura 8). Para los posteriores experimentos se usaron las construcciones T7LBL1, que nos ofreció a LBL1 sin ninguna etiqueta, y pDEST24LBL1 que tiene fusionada a GST en el carboxilo terminal de LBL1 (Figura 6, Apéndice B2), así que los productos purificados por afinidad a glutatión sefarosa deberían tener a LBL1 completamente traducida.



**Figura 8. El lisado de reticulocito de conejo por si solo no traduce ninguna proteína.** Solo el uso de vectores para traducir genera proteínas, por si solo el lisado reticulocito de conejo (RRL) no traduce nada (autoradiografía carril 1).

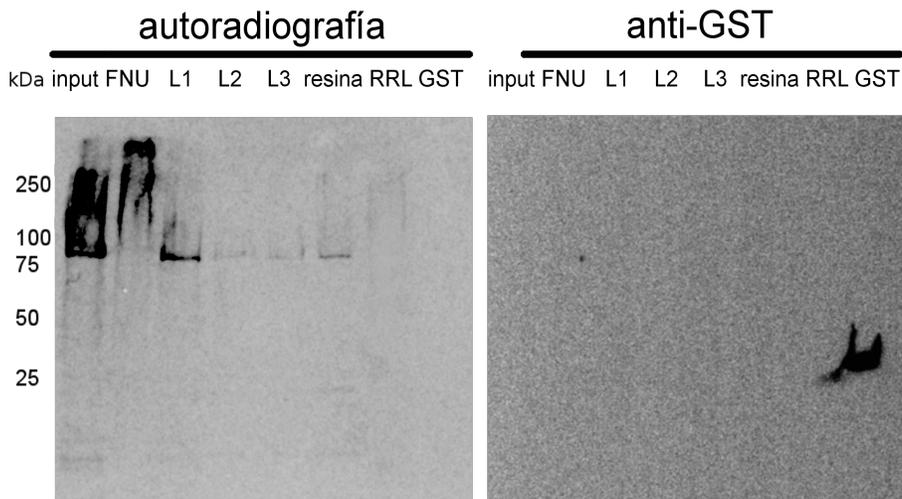
Debido a la fusión de GST en el carboxilo terminal de LBL1 codificada en el plásmido pDEST24LBL1, la proteína traducida *in vitro* se purificó a través de una cromatografía de afinidad con glutatión sefarosa 4B (Figura 9), durante la purificación se observó que la proteína era muy sensible a degradación por las proteasas presentes en el reticulocito de conejo y solo se podía purificar agregando inhibidores de proteasas tanto en la traducción como en la purificación.



**Figura 9. LBL1-GST es sensible a las proteasas presentes en el reticulocito de conejo.** Durante la purificación de LBL1-GST se observó que esta proteína es sensible degradación por las proteasas endógenas del RRL y solo se podía purificar mediante cromatografía de afinidad usando inhibidores de proteasas. *Input*: traducción *in vitro*; *FNU*: fracción no unida a la resina; *L1-3*: lavados; *resina*: fracción unida a la resina.

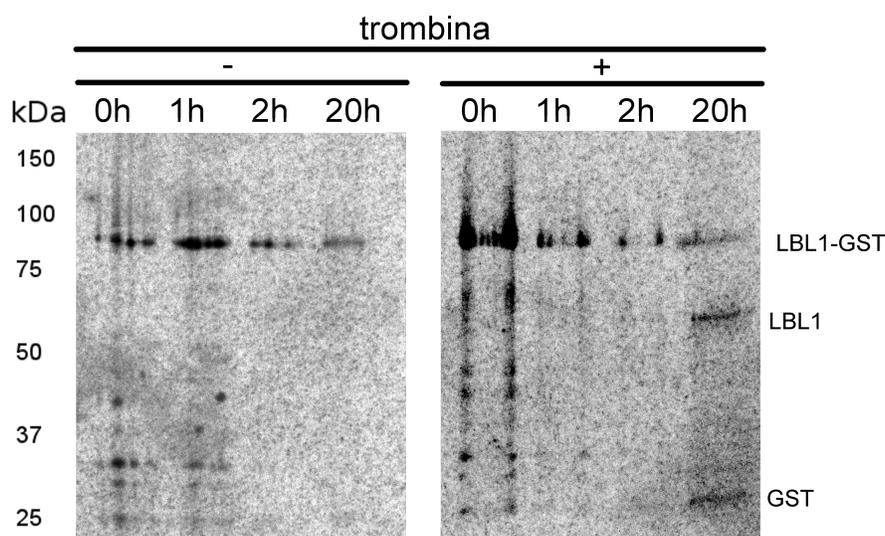
Por otra parte, tratando de aprovechar la etiqueta de GST, se intentó detectar a la proteína de fusión LBL1-GST mediante inmunodetección contra GST. Sin embargo, no se obtuvo señal para esta proteína mientras que los anticuerpos fueron capaces de reconocer a GST sola (Figura 10). Este resultado pudo deberse a la poca cantidad de proteína traducida o tal vez el

anticuerpo comercial no reconoce epítopes en la proteína de fusión.



**Figura 10. LBL1-GST no es detectada mediante inmunodetección dirigida contra GST.** La traducción in vitro de LBL1-GST no fue posible detectarla usando anticuerpos contra GST, pudiendo ser muy poca proteína para ser detectada o algún defecto del anticuerpo para reconocer a la proteína de fusión. *Input*: traducción in vitro; *FNU*: fracción no unida a la resina; *L1-3*: lavados; *resina*: fracción unida a la resina; *RRL*: lisado de reticulocito de conejo sin traducir; *GST*: proteína GST.

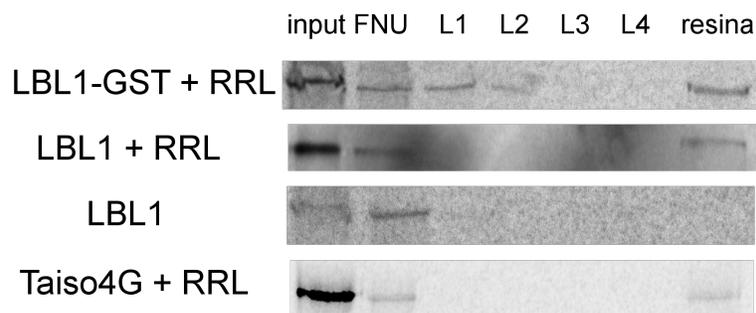
Por último, la proteína de fusión LBL1-GST está separada por un sitio de corte a trombina y dado que ninguna de las 2 proteínas es susceptible a dicha proteasa (Apéndice D2), usamos este sitio separar a LBL1 de GST en la proteína de fusión purificada (Figura 11) permitiéndonos tener a LBL1 libre de otras proteínas y componentes del RRL. Para poder visualizar a LBL1 y GST separadas se requirió de un mínimo de 20h de incubación con trombina, aunque aun a este tiempo de incubación permanecía un fragmento de proteína de fusión intacto (Figura 11).



**Figura 11. Separación de LBL1 y GST mediante trombina.** La proteína de fusión LBL1-GST purificada y tras 20h de incubación con trombina resultó en ambas proteínas separadas, aunque sigue existiendo una porción de proteína de fusión intacta.

### 7.3 Interacción de LBL1 con complejos de unión a cap

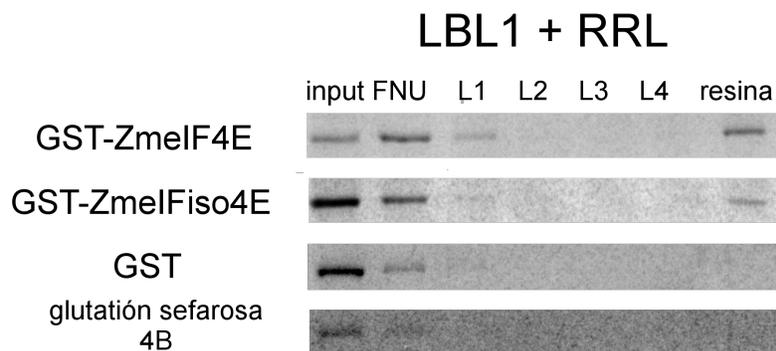
Analizamos la capacidad de LBL1 recombinante de interaccionar con los complejos de unión a cap. De manera inicial y aprovechando que en el reticulocito de conejo hay componentes de unión a cap, analizamos si LBL1 era capaz de ser retenido en la columna de afinidad 7mGTP (análogo del cap) sefarosa (Figura 12). Observamos que LBL1 ya sea con o sin la fusión a GST, en presencia del reticulocito de conejo fue capaz de retenerse en la columna (Figura 12), esto dejaba la posibilidad de que LBL1 pudiera unir directamente el 7mGTP o lo hiciera a través de algún otro componente. Para conocer si LBL1 pudiera unir por su cuenta el cap, purificamos de la traducción *in vitro* a LBL1-GST y lo separamos de GST como se describió en la sección anterior. El producto de la digestión con trombina se puso a interaccionar con el 7mGTP y como resultado se obtuvo que LBL1 en ausencia del RRL no fue capaz de ser retenido en la cromatografía de afinidad (Figura 12). Se usó a elFiso4G de trigo (Taiso4G), codificada en el plásmido pTaiso4G, como un control positivo de una proteína que sea capaz de ser retenida en la resina 7mGTP (Figura 12).



**Figura 12. LBL1 requiere de factores adicionales para interaccionar con la estructura cap.** Cromatografía de afinidad de LBL1 y LBL1-GST en presencia o no del lisado de reticulocito de conejo (RRL) a un análogo de la estructura cap (7mGTP). Como un control positivo de unión se usó al factor elFiso4g de trigo (Taiso4G). *Input*: traducción *in vitro*; *FNU*: fracción no unida a la resina; *L1-4*: lavados; *resina*: fracción unida a la resina.

Debido a un putativo motivo de unión a eIF4E descubierto en LBL1 (Lázaro-Mixteco y Dinkova 2012) que es similar a otro identificado en la proteína LOX2 de plantas (Freire et al. 2000) y que eIF4E pertenece a una familia de proteínas altamente conservadas en los eucariontes (Joshi et al. 2005), es posible que la interacción de LBL1 con los complejos de unión a cap vista en los experimentos de traducción *in vitro* sea debida a su interacción con el eIF4E presente en el RRL.

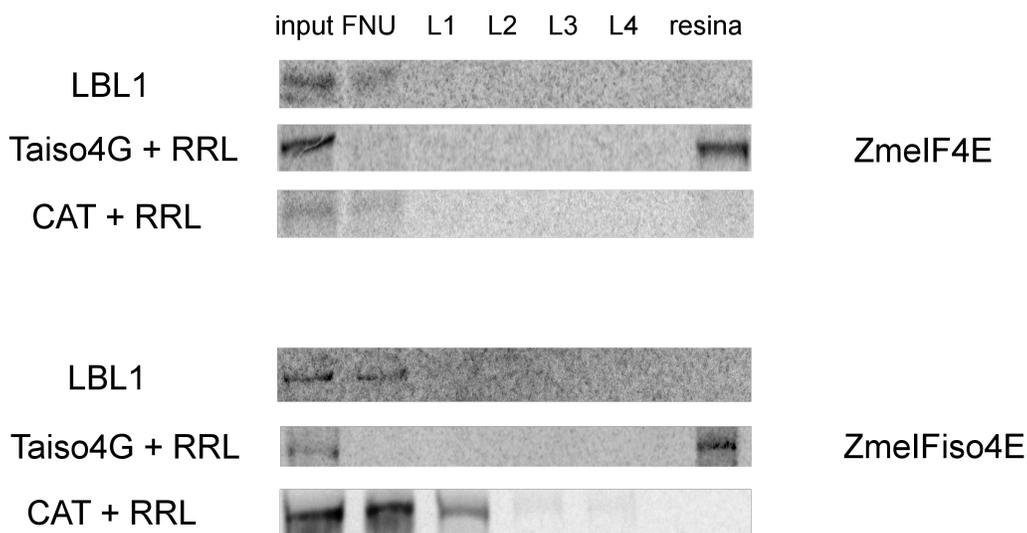
Para probar dicha idea pusimos a interactuar a LBL1 con los factores eIF4E y eIFiso4E de maíz. Primero se usaron a eIF4E y eIFiso4E fusionados a GST (Apéndice B2) en su extremo amino terminal y fijados en la resina de glutatión sefarosa para ponerlos a interactuar con la traducción *in vitro* del amplicón T7LBL1 el cual codifica a LBL1 sin ninguna etiqueta y contiene a todos los elementos del RRL. En este ensayo pudimos observar que LBL1 en presencia del RRL era capaz de ser retenido en la columna de glutatión sefarosa, además la interacción es específica pues no es capaz de unirse a GST sola ni a la resina de glutatión sefarosa (Figura 13).



**Figura 13. LBL1 en presencia del RRL es capaz de interactuar con eIF4E.** Cromatografía de afinidad de LBL1 en presencia del RRL a los factores eIF4E de maíz (ZmeIF4E y ZmeIFiso4E) fusionados a GST y unidos a la resina de glutatión sefarosa 4B. *Input*: traducción *in vitro*; *FNU*: fracción no unida a la resina; *L1-4*: lavados; *resina*: fracción unida a la resina.

Posteriormente decidimos analizar si LBL1 era capaz de interactuar directamente con los factores eIF4E de maíz. Para esto se purificó a LBL1-GST del RRL y posteriormente se digirió con trombina para poder separarlo de GST y del mismo modo se separó GST de los factores eIF4E y eIFiso4E; los factores eIF4E ya libres de GST fueron fijados a la resina 7mGTP para ponerlos a interactuar con LBL1. Sorprendentemente, cuando pusimos a interactuar a LBL1 purificado del reticulocito de conejo y separado de GST a interactuar con los factores eIF4E (Figura 14), no fue capaz de retenerse. Como control negativo de este experimento se usó la cloranfenicol acetil transferasa (CAT) codificada en el vector pBic (Apéndice B2) y como control positivo el factor eIFiso4G de trigo (Taiso4G) codificada en el vector pTaiso4G (Apéndice B2) que se retuvo mejor con los factores eIF4E de maíz que con los de conejo (comparar Figura 12 y 14) ya fuera por mejor afinidad y cantidad de los factores de maíz o por la posible presencia de 4EBPs en el reticulocito de conejo que compiten con

eIF4G por la unión a eIF4E (Gebauer y Hentze 2004).



**Figura 14. LBL1 por si solo no es capaz de unirse a eIF4E.** Cromatografía de afinidad de LBL1 a los factores eIF4E de maíz (ZmEIF4E y ZmEIFiso4E) unidos a la resina de 7mGTP (análogo de cap) *Input*: traducción in vitro; *FNU*: fracción no unida a la resina; *L1-4*: lavados; *resina*: fracción unida a la resina.

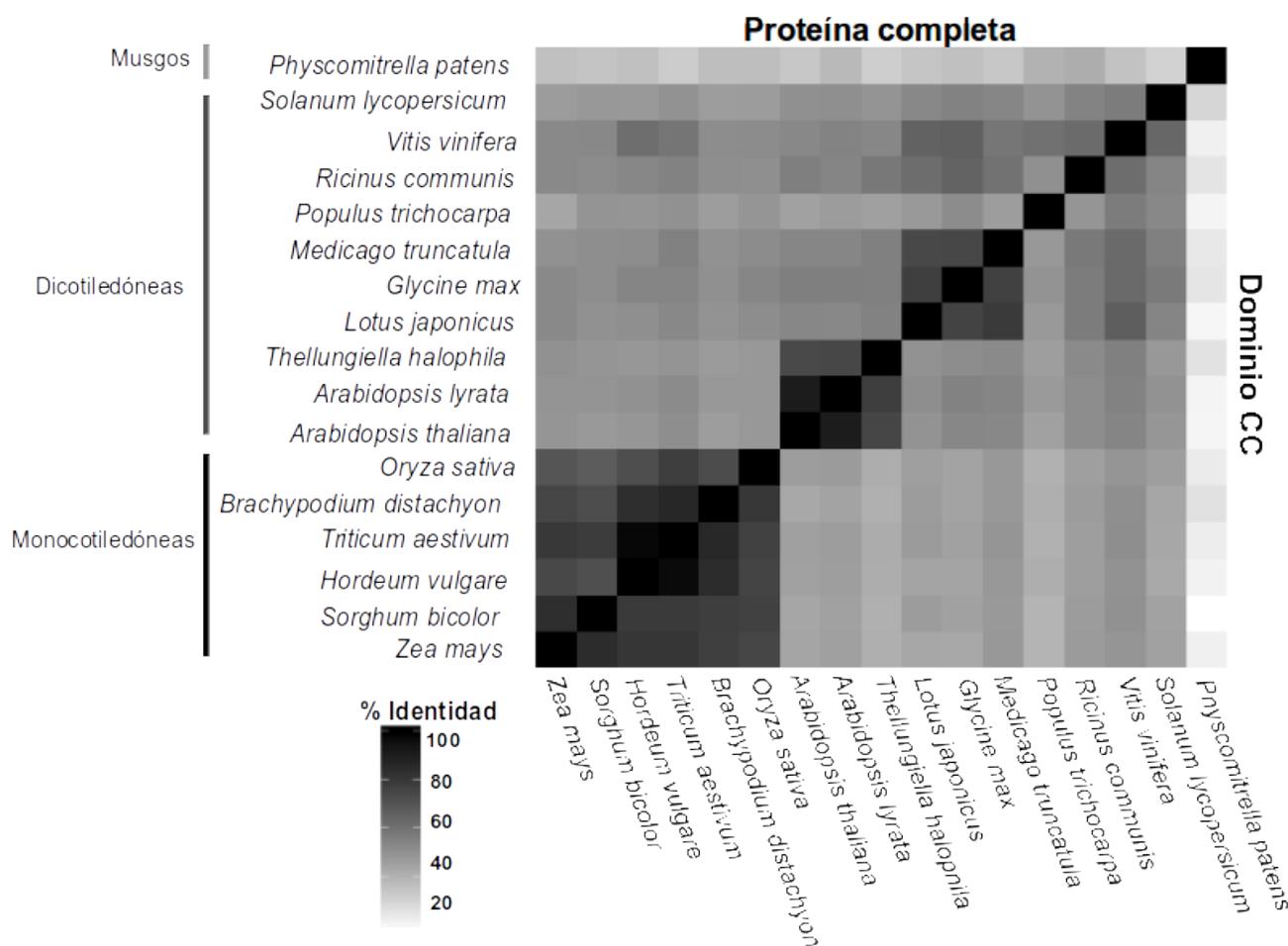
Hay que considerar que la carencia de un control positivo de unión de LBL1 no nos permite asegurar que la purificación y posterior proteólisis con trombina no altere a LBL1 ya sea removiendo modificaciones postraduccionales o inclusive afectando la zona donde se encuentre el supuesto motivo de unión a eIF4E que se encuentra próximo al sitio de corte por trombina (Apéndice D3). Por consiguiente pudiera ser el procesamiento al que sometimos a LBL1 un artefacto que no nos dejó ver su unión a los factores eIF4E.

Existen otras dos razones por las cuales LBL1 solo se pudiera unir a los complejos de unión a cap cuando esta con el RRL, la primera es la capacidad de unir RNA por parte de LBL1 (Bateman 2002; Zhang y Trudeau 2008; Elkashef y Ding 2009), pues si bien el reticulocito no contiene ningún RNA más que el que se va a traducir, este último está presente en grandes proporciones; además se han documentado proteínas que dependen (Niessing et al. 2002) o aumentan (Napoli et al. 2008) su capacidad de unión a eIF4E cuando a la vez están unidas a RNA. La segunda razón es que exista algún un cambio conformacional de eIF4E que no le permita ser reconocido por LBL1 cuando está unido a la estructura cap. Si LBL1 uniera a eIF4E a través del motivo predicho y por consiguiente en la misma zona que lo hace eIF4G y las 4EBPs, resulta poco probable la segunda opción ya que muchas de las proteínas que

unen a eIF4E no se ven afectadas por la unión de este último al cap (Marcotrigiano et al. 1999; Cohen et al. 2001; Topisirovic et al. 2003; Nakamura et al. 2004; Kinkelin et al. 2012).

## 7.4 Conservación del motivo de unión a eIF4E en LBL1

Debido a que LBL1 no fue capaz de interactuar directamente con eIF4E bajo las condiciones experimentales de este estudio, nos interesó saber si ese motivo de unión está conservado en sus ortólogos en otras especies de plantas. Empezamos por analizar la conservación de LBL1 y su dominio de hélice entre cruzada (*coiled coil*) (Figura 15) que es donde se encuentra el motivo de unión a eIF4E (Apéndice D3) y se pudo observar que el grado de conservación entre los ortólogos es bastante alto y como es de esperarse dentro de grupos filogenéticos mas cercanos la conservación es mayor.



**Figura 15. Conservación de LBL1 dentro de las plantas.** Gradiente para la proteína completa (parte diagonal superior) o el dominio de hélice entrecruzada (CC) (parte diagonal inferior) que muestra la identidad entre cada par de homólogos de LBL1.

Posteriormente vimos que tan conservado se encontraba el motivo de unión a eIF4E en los ortólogos a LBL1 y como punto de referencia usamos a eIF4G y la lipoxigenasa 2 (LOX2) (Tabla 2). De eIF4G se sabe que es fundamental su unión a eIF4E para que la traducción (Gebauer y Hentze 2004) se lleve a cabo y LOX2 tiene un motivo similar al de LBL1 (Freire et al. 2000) para unir a eIF4E. Si bien LBL1 está conservado en las plantas, pudimos observar que el motivo propuesto de unión a eIF4E no lo está, a diferencia de lo hallado para eIF4G (Tabla 2). Notoriamente en LOX2 tampoco se encuentra conservado el motivo (Tabla 2). A pesar de que en LBL1 y LOX2 no se encuentra estrictamente conservado el motivo de unión a eIF4E si hay varias sustituciones como la valina en lugar de la leucina en LBL1 que resultarían en un motivo con características fisicoquímicas similares aunque al ser más laxos en las posiciones críticas del motivo aumentamos la probabilidad de encontrar dicho motivo en cualquier lugar por azar.

**Tabla 2. El motivo de unión a eIF4E no está conservado en LBL1 ni en LOX2 pero sí en eIF4G de plantas. Las diagonales indican que esa proteína no fue encontrada en la base de datos UNIPROT. <sup>1</sup> indica que el motivo estaba en otra región distinta al resto de los homólogos.**

Consenso <b>YxxxxLφ</b>	LBL1	eIF4G	LOX2
<i>Zea_mays</i>	<b>YMDLELE</b>	<b>YSRDFLL</b>	<b>LRKKDLQ</b>
<i>Sorghum_bicolor</i>	<b>YMEKELE</b>	<b>YSRDFLL</b>	<b>YRNKDLE</b>
<i>Hordeum_vulgare</i>	<b>YMTKEVE</b>	<b>YSRDFLL</b>	<b>LRKKELE</b>
<i>Triticum_aestivum</i>	<b>YMAKEVE</b>	<b>YSRDFLL</b>	////////
<i>Brachypodium_distachyon</i>	<b>YMAKELE</b>	<b>YSRDFLL</b>	<b>LRRKELE</b>
<i>Oryza_sativa</i>	<b>YLAKEFE</b>	<b>YSRDFLL</b>	<b>LRKKELE</b>
<i>Arabidopsis_thaliana</i>	<b>HHEEIFD</b>	<b>YSRDFLL</b>	<b>YRKEELE</b>
<i>Arabidopsis_lyrata</i>	<b>HYEEILD</b>	<b>YSRDFLL</b>	<b>YRKEELE</b>
<i>Thellungiella_halophila</i>	<b>HYEEMLD</b>	<b>YSRDFLL</b>	////////
<i>Lotus_japonicus</i>	<b>HWEEVE</b>	////////	////////
<i>Glycine_max</i>	<b>HWEEEVQ</b>	<b>YSRDFLL</b>	<b>LREEELE</b>
<i>Medicago_truncatula</i>	<b>HWEEVE</b>	<b>YSRDFLL</b>	<b>LRKEELM</b>
<i>Populus_trichocarpa</i>	<b>YWEELLV</b>	<b>YSRDFLL</b>	<b>LREEELV</b>
<i>Ricinus_communis</i>	<b>HWEEFE</b>	<b>YSRDFLL</b>	<b>LREAELE</b>
<i>Vitis_vinifera</i>	<b>HWEEEVG</b>	<b>YSRDFLL</b>	<b>LREMELE</b>
<i>Solanum_lycopersicum</i>	<b>YWEVE</b>	<b>YSRDFLL</b>	<b>LREEELV</b>
<i>Physcomitrella_patens</i> <sup>1</sup>	<b>QHEAALT</b>	<b>YKKSGLV</b>	<b>LREQELK</b>

Dentro de la búsqueda de la conservación del motivo de unión a eIF4E en eIF4G de plantas (Tabla 2), encontramos que en el caso del musgo *Physcomitrella patens* estaba ubicado en otra zona de la proteína por lo que decidimos ver si encontraríamos este motivo más de una vez dentro de las proteínas analizadas anteriormente (Tabla 3-5). De manera interesante encontramos que tanto en eIF4G (Tabla 3), LOX2 (Tabla 4) y LBL1 (Tabla 5) se encontraba el motivo de unión en otras posiciones y en muchas de ellas se encontraba repetido más de una vez, independientemente de si tenía un aminoácido hidrofóbico ( $\phi$ ), hidrofílico ( $\zeta$ ) o cualquier sustituyente (x) en la posición final del motivo. En el caso particular de eIF4G (Tabla 3) nos llamó la atención este hecho pues estudios en animales indican que solo existe un sitio de unión a eIF4E (Lampheart et al. 1995) lo que nos hizo cuestionar que tan buen predictor es el modelo del motivo de unión a eIF4E.

**Tabla 3. Número de motivos de unión a eIF4E dentro de cada proteína homóloga a eIF4G.**

Tipo de Motivo	Consenso			(Gosselin et al. 2013)	Motivo 1	Motivo 2	Motivo 3	Motivo 4
	YxxxxL $\phi$	YxxxxL $\zeta$	YxxxxLx	[HRKQ]xx Yx[RH]x[F AVLIM]L[ MLWIFY]	Y[DGI] [RE]x[FY] L	[KR]I[IK] [FYN]DR KFL[LW] [DQ]	[KC][YF] [DT][RI] [ED]FLL	[RK] [YF]K[RIK] ]E[FT]L[L Y]
Especie								
<i>Physcomitrella patens</i>	1	2	3	0	0	0	0	0
<i>Arabidopsis lyrata</i>	1	1	2	1	1	1	1	1
<i>Thellungiella halophila</i>	1	1	2	1	1	1	1	1
<i>Ricinus communis</i>	3	2	5	1	1	0	1	1
<i>Glycine max</i>	2	4	6	1	2	0	1	2
<i>Arabidopsis thaliana</i>	1	1	2	1	1	1	1	1
<i>Vitis vinifera</i>	2	3	5	1	1	1	1	1
<i>Medicago truncatula</i>	1	5	6	1	1	2	1	1
<i>Solanum lycopersicum</i>	3	2	5	1	1	1	1	2
<i>Populus trichocarpa</i>	1	3	4	1	1	0	2	1
<i>Oryza sativa</i>	2	3	5	1	1	1	1	1
<i>Brachypodium distachyon</i>	2	2	4	1	1	1	1	1
<i>Triticum aestivum</i>	2	2	4	1	1	2	1	1
<i>Hordeum vulgare</i>	2	2	4	1	1	2	1	1

<i>Sorghum bicolor</i>	3	2	5	1	1	1	1	1
<i>Zea mays</i>	1	5	6	1	1	1	1	1
promedio	1.75	2.5	4.25	0.9375	1	0.9375	1	1.0625

Mediante ensayos cristalográficos se determinó que DmCup (Kinkelin et al. 2012), HseIF4G y Hs4EBP1 (Marcotrigiano et al. 1999) unen a eIF4E a través del motivo consenso propuesto pero la zona de contacto va más allá de los aminoácidos que el motivo predice. Tomando la tirosina como el primer aminoácido del motivo se observó que el contacto puede iniciar 3 aminoácidos antes y seguir haciendo contacto 3 aminoácidos después del aminoácido hidrofóbico, además algunos aminoácidos variables dentro del motivo también hacen contacto con eIF4E (Marcotrigiano et al. 1999; Kinkelin et al. 2012).

**Tabla 4. Número de motivos de unión a eIF4E dentro de cada proteína homologa a LOX2.**

Tipo de Motivo	Consenso			(Gosselin et al. 2013)	Motivo 1	Motivo 2	Motivo 3	Motivo 4
	YxxxxLφ	YxxxxLζ	YxxxxLx	[HRKQ]xx Yx[RH]x[F AVLIM]L[ MLWIFY]	Y[DGI] [RE]x[FY] L	[KR]I[IK] [FYN]DR KFL[LW] [DQ]	[KC][YF] [DT][RI] [ED]FLL	[RK] [YF]K[RIK] ]E[FT]L[L Y]
Especie								
<i>Arabidopsis thaliana</i>	2	3	5	0	0	0	1	1
<i>Arabidopsis lyrata</i>	2	2	4	0	0	0	1	1
<i>Vitis vinifera</i>	2	2	4	0	0	0	0	0
<i>Ricinus communis</i>	1	1	2	0	0	0	0	0
<i>Glycine max</i>	2	1	3	0	0	0	0	0
<i>Solanum lycopersicum</i>	1	2	3	0	0	0	0	0
<i>Populus trichocarpa</i>	1	1	2	0	0	0	1	0
<i>Oryza sativa</i>	1	1	2	0	0	0	0	0
<i>Zea mays</i>	1	2	3	0	0	0	0	0
<i>Brachypodium distachyon</i>	1	1	2	0	0	0	0	0
<i>Medicago truncatula</i>	1	0	1	0	0	0	0	0
<i>Hordeum vulgare</i>	1	2	3	0	0	0	0	0
<i>Physcomitrella patens</i>	1	0	1	1	0	0	0	0
<i>Sorghum bicolor</i>	0	2	2	0	0	0	0	0
promedio	1.214	1.428	2.642	0.071	0	0	0.214	0.142

Ahondando más en el motivo de unión a eIF4E buscamos proteínas que ya estuvieran comprobadas como interactoras directas de eIF4E (Tabla 6, Apéndice E1). Observamos que para muchas proteínas el motivo de unión consenso no satisfacía la zona demostrada o predicha de unión con eIF4E (Tabla 6) y en varios casos hasta se contradecían, por ejemplo una sustitución del aminoácido hidrofóbico en DmBicoid por arginina resulta en una pérdida total de la unión con eIF4E (Niessing et al. 2002; Cho et al. 2005) mientras que en HsDDX3 la arginina está presente en esa posición del motivo de unión a eIF4E (Shih et al. 2008). Inclusive observamos (Tabla 7) que el motivo consenso (YxxxxLφ), la variante con un aminoácido hidrofílico en el último residuo (YxxxxLζ) o cualquier aminoácido en la última posición (YxxxxLx) no eran capaces de reconocer a la gran mayoría de las proteínas reportadas como interactoras directas de eIF4E (Tabla 6, Apéndice E1) o las versiones mutantes de estas proteínas que son capaces de mantener la unión con eIF4E (Apéndice E2).

**Tabla 5. Número de motivos de unión a eIF4E dentro de cada proteína homologa a LBL1.**

Tipo de Motivo	Consenso			(Gosselin et al. 2013)	Motivo 1	Motivo 2	Motivo 3	Motivo 4
	YxxxxLφ	YxxxxLζ	YxxxxLx	[HRKQ]xx Yx[RH]x[F AVLIM]L[ MLWFY]	Y[DGI] [RE]x[FY ]L	[KR]I[IK] [FYN]DRK FL[LW] [DQ]	[KC][YF] [DT][RI] [ED]FLL	[RK] [YF]K[RIK] E[FT]L[LY]
Especie								
<i>Zea mays</i>	0	1	1	0	0	0	0	0
<i>Sorghum bicolor</i>	0	1	1	0	0	0	0	0
<i>Hordeum vulgare</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Triticum aestivum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Brachypodium distachyon</i>	0	1	1	0	0	0	0	0
<i>Oryza sativa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Arabidopsis thaliana</i>	1	1	2	0	0	0	1	0
<i>Arabidopsis lyrata</i>	1	1	2	0	0	0	1	0
<i>Thellungiella halophila</i>	1	0	1	0	0	1	0	0
<i>Lotus japonicus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Glycine max</i>	0	0	0	0	0	0	0	0

<i>Medicago truncatula</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Populus trichocarpa</i>	1	1	2	0	0	0	0	0
<i>Ricinus communis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Vitis vinifera</i>	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Solanum lycopersicum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Physcomitrella patens</i>	0	1	1	0	0	0	0	0
promedio	0.235	0.411	0.647	0	0	0.117	0.117	0

Con toda esta información concluimos que el motivo consenso YxxxxL $\phi$  (donde x es cualquier aminoácido y  $\phi$  uno hidrofóbico) no es un buen predictor para identificar proteínas de unión a eIF4E.

**Tabla 6. El motivo de unión a eIF4E consenso no satisface a todas las proteínas que ya se han demostrado que unen a dicho factor.**

Proteína	Motivo	Condición del motivo	¿Satisfecho por el motivo consenso?
AtBTF3	STLKRIG	predicho	No
HsDDX3	YIPPHLR	comprobado	No
Hs4EBP1	YDRKFLM	comprobado	Sí
Hs4EBP2	YDRKFLM	comprobado	Sí
Hs4EBP3	YDRKFLM	comprobado	Sí
DmBicoid	YIRPYLP	comprobado	No
Hs4E-T	YTKEELL	comprobado	Sí
PVAHcPro	YINIFLA	comprobado	Sí
TEVHcPro	YMNIFFA	predicho	Sí
PVYHcPro	YINIFLA	predicho	Sí
Prep1/Pnox1	YRHPLFPLL	comprobado	No
ScelF4G	YGPTFLL	comprobado	Sí
HselF4G	YDREFLL	comprobado	Sí
LmlF4G-3	YPGFSLD	comprobado	No
HsGemin5	YEAVELL	comprobado	Sí
DmCup	YTRSRLM	comprobado	Sí
MmEmx2	YSNPDLV	predicho	Sí

XIMaskin	TEADFLL	comprobado	No
OcelF4G	YDREFLL	predicho	Sí
Scp20	YTIDELF	predicho	Sí
4EGI péptido sint	YTYDELF	comprobado	Sí
AtLOX2	YRKEELE	predicho	No
MmNgd	YSTEKGL	predicho	No
HsAngel1	YGRDFLL	comprobado	Sí
HsPML	nd	predicho	No
AtelFiso4G1	YTREQLL	predicho	Sí
AtelFiso4G2	FSREEIL	predicho	No
HsPRH	YAPTPLL	comprobado	Sí
CePGL1	YQLFFLI	predicho	Sí
MmCYFIP1	LDKRLRSECK	comprobado	No

## 7.5 Refinación del motivo de unión a eIF4E

Debido a los defectos que vimos en el motivo de unión a eIF4E consenso como predictor decidimos tratar de refinar dicho modelo para hacerlo más útil. El primer enfoque que tomamos fue analizar si en las secuencias de la Tabla 6 el motivo de unión a eIF4E forma grupos espaciales hidrofóbicos (HCA) (Apéndice G).

Observamos que no existía un patrón común hidrofóbico entre la zona de unión de las diferentes proteínas que unen a eIF4E (Apéndice G), también buscamos si las mutantes en las que se reporta algún tipo de pérdida de unión con respecto a su versión silvestre (Apéndice E2) incurrieran en algún patrón específico, pero tampoco logramos identificar alguno (Apéndice G), por lo que concluimos que el enfoque de HCAs no nos permite apreciar las similitudes que este motivo pueda tener entre proteínas.

Lo siguiente que intentamos identificar es si existe algún tipo de similitud a nivel de secuencia entre las proteínas que unen a eIF4E lo que resultó en 4 nuevos motivos (Apéndice E4) similares entre ellos y con el motivo consenso. Al probar los 4 nuevos motivos (Motivos 1 a 4) encontramos que mostraban claras mejorías con respecto al reconocimiento de las proteínas de unión a eIF4E ya reportadas (Tabla 7) e inclusive resultaron mucho mejores que la matriz

propuesta por (Gosselin et al. 2013) definida como [HRKQ]xxYx[RH]x[FAVLIM]L[MLWFY] (Tabla 7).

La capacidad de los motivos que encontramos y del propuesto por (Gosselin et al. 2013) para predecir motivos de unión en eIF4G de plantas fue más cercana a un motivo por proteína que la observada para los motivos consenso (Tabla 3) y que corresponde mejor con lo reportado previamente (Lampheart et al. 1995). Con respecto a LOX2 (Tabla 4) nuestros motivos indican que en general no es una proteína de unión a eIF4E contrario a lo que los motivos consensos indicaban, aunque los motivos 3 y 4 predijeron que en *Arabidopsis* sí une a eIF4E lo cual concuerda con lo publicado con anterioridad (Freire et al. 2000). Ninguno de los nuevos motivos propuso a LBL1 como un potencial interactor directo de eIF4E (Tabla 5) particularmente en maíz, lo cual concuerda con nuestros propios resultados.

**Tabla 7. Número de motivos de unión a eIF4E dentro de cada proteína cuya interacción ha sido demostrada con eIF4E.**

Tipo de Motivo		Consenso			(Gosselin et al. 2013)	Motivo 1	Motivo 2	Motivo 3	Motivo 4
		YxxxxLφ	YxxxxLζ	YxxxxLx	[HRKQ]xx Yx[RH]x[F AVLIM]L[ MLWFY]	Y[DGI] [RE]x[FY] L	[KR]I[K] [FYN]DR KFL[LW] [DQ]	[KC][YF] [DT][RI] [ED]FLL	[RK] [YF]K[RIK] ]E[FT]L[L Y]
Secuencia	Tipo de unión								
HsDDX3	normal	0	1	1	0	0	1	1	1
Hs4EBP1	normal	1	0	1	1	1	1	1	1
Hs4EBP2	normal	1	0	1	1	1	1	1	1
Hs4EBP3	normal	1	0	1	1	1	1	1	1
DmBicoid	normal	0	2	2	0	1	1	1	0
Hs4ET	normal	1	0	1	0	0	2	1	1
PVAHcPro	normal	1	0	1	0	1	1	1	1
MmPrep1	normal	0	0	0	0	1	1	0	1
ScelF4G	normal	1	1	2	1	1	1	1	1
HselF4G	normal	3	0	3	1	2	1	1	1
LmeIF4G3	normal	0	3	3	0	1	1	1	1
HsGemin5	normal	1	0	1	0	1	1	0	1

DmCup	normal	1	0	1	0	1	1	1	1
XIMaskin	normal	0	0	0	0	1	1	0	1
péptido sintético	normal	1	0	1	0	0	0	1	0
HsAngel1	normal	2	2	4	1	1	2	1	1
HsPRH	normal	1	2	3	0	1	1	0	1
MmCYFP1	normal	2	2	4	0	1	1	1	1
HsDDX3Y38A	baja	0	0	0	0	0	1	1	1
HsDDX3L43A	muy baja	0	0	0	0	0	1	1	1
PVAHcProY34 5AL350A	baja	0	0	0	0	1	1	0	1
MmPrep1 Y59A	baja	0	0	0	0	1	1	0	1
MmPrep1 Y59AL66A	baja	0	0	0	0	1	1	0	1
MmPrep1 Y59AL66AL67 A	muy baja	0	0	0	0	1	1	0	1
ScelF4G Y452F	baja	0	1	1	0	0	1	1	1
HselF4GY612 F	baja	2	0	2	1	2	1	1	1
LmeIF4G- 3Y20F	baja	0	2	2	0	1	1	1	1
LmeIF4G- 3P21A	baja	0	3	3	0	1	1	1	1
LmeIF4G- 3G22A	muy baja	0	3	3	0	1	1	1	1
LmeIF4G- 3E27A	muy baja	0	3	3	0	1	1	1	1
HsGemin5Y99 2A	muy baja	0	0	0	0	1	1	1	1
HsGemin5L99 7AL998A	baja	0	0	0	0	1	1	1	1
HsGemin5L26 5A	baja	1	0	1	0	1	1	1	1
HsGemin5L27	baja	1	0	1	0	1	1	1	1

0AK271A									
DmCupY327A	muy baja	0	0	0	0	0	1	0	1
DmCupL332A M333A	baja	0	0	0	0	0	1	0	1
DmCupY327A L332AM333A	muy baja	0	0	0	0	0	1	0	1
DmCupL364A L368A	baja	1	0	1	0	1	1	1	1
HsPRHL23AL 24A	muy baja	0	2	2	0	1	1	1	1
MmCYFIP1D7 24AR726A	baja	2	2	4	0	1	1	1	1
MmCYFIP1D7 24KK725ER72 6EE730K	muy baja	2	2	4	0	1	1	1	1
MmCYFIP1K7 25E	muy baja	2	2	4	0	1	1	1	1
promedio		0.667	0.785	1.452	0.166	0.833	1.023	0.738	0.952

De los 4 motivos obtenidos el motivo 4 pareciera ser el más efectivo, pues es el que mayor número de proteínas reconoce y en todas las que reconoce lo hace solo una vez, reduciendo el número de falsos positivos que podríamos obtener con el motivo consenso (Tabla 7 y 9).

Para continuar verificando la utilidad de los nuevos motivos, retomamos a todos los motivos disponibles contra versiones mutantes de las proteínas de unión a eIF4E que no son capaces de mantener esta unión (Apéndice E2) y con una versión de eIF4G que naturalmente no une a eIF4E (p97) (Imataka et al. 1997) (Tabla 8). El motivo que tuvo el mejor desempeño en las pruebas contra las proteínas de nula unión a 4E fue [HRKQ]xxYx[RH]x[FAVLIM]L[MLWY] (Gosselin et al. 2013) pero hay que considerar que el número de proteínas de unión que reconoce es muy baja (Tabla 7 y 9). Sorpresivamente el motivo de unión consenso YxxxxLφ fue realmente bueno en esta prueba convirtiéndolo en el segundo mejor, por parte de los motivos nuevos que encontramos el motivo 4 [RK][YF]K[RIK]E[FT]L[LY] fue el mejor (Tabla 8), consistente con su resultado en la Tabla 7, el resto de los motivos no tuvo un buen desempeño en esta prueba (Tabla 8).

**Tabla 8. Número de motivos de unión a eIF4E dentro de cada proteína demostrada que no es capaz de unir a eIF4E.**

Tipo de Motivo	Consenso			(Gosselin et al. 2013)	Motivo 1	Motivo 2	Motivo 3	Motivo 4
	YxxxxLφ	YxxxxLζ	YxxxxLx	[HRKQ]xx Yx[RH]x[F AVLIM]L[M LWFY]	Y[DGI] [RE]x[FY] L	[KR]I[IK] [FYN]DRK FL[LW] [DQ]	[KC][YF] [DT][RI] [ED]FLL	[RK] [YF]K[RI] K]E[FT]L[ LY]
Secuencia								
Hsp97	0	1	1	0	0	0	0	0
DmBicoidY68AL73R	0	1	1	0	0	0	0	0
Hs4E-TY30A	0	1	1	0	0	2	1	0
ScelF4GY452A	2	0	2	0	0	1	0	0
ScelF4GL457AL458A	2	0	2	0	0	0	0	0
HselF4GY612A	0	0	0	1	1	1	1	1
HselF4GL617AL618A	0	0	0	0	1	1	1	0
Hs4EBP1L59AM60A	0	2	2	0	1	1	1	0
Hs4EBP2L59AL60A	0	3	3	0	1	1	1	0
LmIF4G-3Y20A	0	2	2	0	0	1	1	1
LmIF4G-3F23A	0	2	2	0	1	1	1	1
LmIF4G-3L25A	0	1	1	0	1	1	1	1
DmBicoidY66A	0	0	0	0	1	1	1	0
DmBicoidL73R	0	0	0	0	1	1	0	0
XIMaskinT577AF581AL582AL583A	1	2	3	0	1	1	0	1
DmCupY327AL364AL368A	0	2	2	0	0	1	0	1
HsAngel1 Y507A	0	2	2	0	0	2	1	1
HsPRHY18AL23AL24A	0	0	0	0	1	1	1	1
HsPRH Y18A	0	1	1	0	1	1	1	1
promedio	0.263	1.052	1.315	0.052	0.578	0.947	0.631	0.473

Nuestros resultados sugieren que el motivo 4 hace un buen trabajo prediciendo interactores de eIF4E (Tablas 7-9). A pesar de que en la prueba contra secuencias de nula unión tuvo la mitad de la efectividad que el motivo consenso (Tabla 8), el número de proteínas interactoras que sí determinó fue alrededor del doble que el motivo YxxxxLφ (Tabla 7).

Finalmente, para confirmar cual era el mejor motivo se calculó la especificidad y la sensibilidad de cada motivo (Tabla 9), para esto se tomaron en cuenta las proteínas que correctamente fueron identificadas como interactoras de eIF4E (verdaderos positivos), aquellas que se sabe no unen a eIF4E y los motivos no las mostraron como interactoras (verdaderos negativos), así como los errores que produjeron en dichos rubros (falsos negativos y positivos) (Tabla 9). La sensibilidad se calculó como el cociente de verdaderos positivos dividido entre la adición de los verdaderos positivos con los falsos negativos. La especificidad se calculó como el cociente de verdaderos negativos dividido entre la adición de los verdaderos negativos con los falsos positivos.

El cálculo de la especificidad y sensibilidad confirmó al Motivo 4 como un mejor modelo que el consenso pues tiene una mayor sensibilidad que los motivos consenso y el propuesto por (Gosselin et al. 2013) además de una especificidad similar a la observada para el motivo consenso YxxxxLφ, sugiriendo que este motivo es más robusto y puede permitir la identificación de potenciales interactores que el motivo consenso no podría hacerlo.

**Tabla 9. Especificidad y sensibilidad de los motivos de unión a eIF4E.**

Tipo de Motivo	Consenso			(Gosselin et al. 2013)	Motivo 1	Motivo 2	Motivo 3	Motivo 4
	YxxxxLφ	YxxxxLζ	YxxxxLx	[HRKQ]xx Yx[RH]x[F AVLIM]L[M LWFY]	Y[DG]I [RE]x[FY] L	[KR]I[IK] [FYN]DRK FL[LW] [DQ]	[KC][YF] [DT][RI] [ED]FLL	[RK] [YF]K[RI] K]E[FT]L[ LY]
Análisis								
Verdaderos positivos (VP)	20	16	29	7	33	41	31	40
Falsos positivos (FP)	13	37	58	1	13	19	12	9
Verdaderos negativos (VN)	16	7	5	18	8	3	7	10
Falsos negativos (FN)	22	26	13	35	9	1	11	2
Sensibilidad (VP/(VP+FN))	0.4761	0.3809	0.6904	0.1666	0.7857	0.9761	0.7380	0.9523
Especificidad (VN/(VN+FP))	0.5517	0.1590	0.0793	0.9473	0.3809	0.1363	0.3684	0.5263

## 8 Discusión

El presente trabajo ha aportado nueva información sobre la manera de actuar de LBL1, principalmente nuestros resultados sugieren que LBL1 participa en distintos complejos funcionales.

Los primeros indicios sobre los distintos complejos funcionales en los que participa LBL1 radican en su expresión, LBL1 se expresa durante toda la germinación a diferencia de la vía de los tasiRNAs que solo la encontramos expresada a partir de etapas posteriores. Si bien hacen falta más experimentos para poder afirmar completamente la expresión diferencial de LBL1 y la vía de los tasiRNAs, nuestros datos nos llevan a pensar que LBL1 está realizando alguna función con los complejos de unión a cap y eventualmente sea secuestrado de estos complejos para participar en otros, pudiendo ser para formar parte de la vía de los tasiRNAs, cuya expresión se da en etapas posteriores de la germinación.

Aun cuando en este trabajo no se demostró la funcionalidad de LBL1 en distintos complejos de unión a cap, su capacidad de interactuar con eIF4E resulta novedosa pues este es el primer trabajo que claramente vincula directamente a LBL1 con la maquinaria traduccional, una idea previamente sugerida en otros trabajos (Axtell et al. 2006; Montgomery et al. 2008; Zhang, Ng, et al. 2012). Este vínculo no solo podría impactar en nuestro conocimiento sobre los tasiRNAs y su biogénesis sino en general sobre los siRNAs.

La presencia de LBL1 en los complejos de unión a cap y el motivo consenso de unión a eIF4E que tiene presente (Lázaro-Mixteco y Dinkova 2012), sugería a eIF4E como un potencial interactor directo de LBL1. Nuestros hallazgos, con las salvedades ya mencionadas en la sección de Resultados, hallaron que en efecto LBL1 y eIF4E son capaces de interactuar, pero no directamente, lo que se contrapone con el modelo de un motivo de unión a eIF4E funcional que propiciaría una interacción directa. Encontrar al intermediario entre LBL1 y eIF4E resulta en un gran interés pues se encontró que la interacción persiste usando un sistema animal, cuando LBL1 es una proteína única de plantas (Bateman 2002). Aunque falta por descartar que pudiera ser el RNA el que promoviera la interacción entre

LBL1 y eIF4E, nuestros datos apoyan un factor o dominio conservado entre los eucariontes que media su interacción. Así mismo sería interesante conocer si la interacción vista en los complejos de unión a cap de reticulocito de conejo es capaz de mantenerse en plantas y si lo hace a través de los mismos factores.

Nuestro trabajo también dió pie al refinamiento del motivo de unión a eIF4E, el cual resultaba ineficiente como modelo predictor aun en proteínas ya reportadas como de unión a eIF4E (Tabla 6 y 7), resultando en un nuevo motivo de unión que a pesar de no eliminar totalmente los falsos positivos, nos provee de un mejor modelo que el previamente establecido (Tabla 9). Futuros trabajos continuarán refinando este modelo, posiblemente tomando en cuenta la estructura secundaria que adopta el motivo o su estructura espacial cuando está en contacto con eIF4E.

La dificultad para expresar a LBL1 a través de tecnologías recombinantes en bacterias supuso un obstáculo para poder realizar ensayos de interacción con esta proteína. Desconocemos si no se pudo lograr este objetivo en bacterias debido a una posible toxicidad por parte de LBL1 a la célula o si es susceptible a degradación por proteasas endógenas como lo fue en el caso del lisado de reticulocito de conejo, aun cuando las cepas BL21 de *Escherichia coli* son deficientes en ciertas proteasas. No obstante existen otros sistemas de sobreexpresión como *Pichia pastoris* o en cultivos libres de células a partir de embriones de trigo (Madin et al. 2000) que pueden ser usados, la ventaja del primero es la posibilidad de secretar la proteína fuera de la célula esperando que con esto se reduzca su posible toxicidad o inestabilidad; por su parte el segundo sistema tiene la ventaja de ser propiamente un sistema de plantas lo que en principio supondría una mayor facilidad para poder sintetizar una proteína propia de plantas. Finalmente se podrían sintetizar inclusive en bacteria fragmentos de LBL1 que sirvan para poder sintetizar anticuerpos contra LBL1.

## 9 Conclusiones

La expresión de componentes de la vía de los tasiRNAs descrita para el establecimiento de la dorsoventralidad de las hojas en maíz no sobrelapa con el patrón de expresión del RNA de LBL1, el cual se expresa durante todos los puntos evaluados durante la germinación.

LBL1 es una proteína inestable susceptible a degradación por las proteasas endógenas del lisado de reticulocito de conejo. Además en el sistema de sobreexpresión por inducción de *Escherichia coli* no fue posible obtener a LBL1.

Bajo nuestro sistema experimental heterólogo, LBL1 requiere de otros factores para poder interactuar con un análogo de la estructura 5' cap de los mRNAs y con eIF4E.

El motivo de unión a eIF4E canónico resulta insuficiente para predicciones de potenciales interactores de eIF4E e inclusive para algunos ya demostrados. El motivo de unión [RK][YF]K[RIK]E[FT]L[LY] encontrado durante este proyecto supone mejoras en dicha capacidad predictiva.

## 10 Perspectivas

La posibilidad de detectar a LBL1 a nivel de proteína es fundamental para poder detallar su función. Se propone la generación de anticuerpos ya sea expresando a LBL1 en otros sistemas de sobreexpresión o mediante la sobreexpresión de péptidos que permitan levantar anticuerpos contra dicha proteína.

Cabe mencionar que el hallazgo previo de donde se encontró que LBL1 se encuentra de manera diferencial en los complejos de unión a cap durante la germinación del maíz (Lázaro-Mixteco y Dinkova 2012) pudiera deberse a un artefacto debido a la sensibilidad misma de la espectrometría de masas, por lo que es necesario realizar inmunodetecciones de LBL1 en complejos de unión a cap obtenidos a lo largo de la germinación para confirmar que LBL1 no se encuentra de manera constante en dichos complejos.

Para poder asegurar que LBL1 y la vía de los tasiRNAs no tienen un completo empalme es necesario evaluar la presencia de tasiRNAs durante la germinación así como algunos otros componentes como RDR6 y DCL4 para descartar otros posibles precursores de estos RNAs, pues en uva se han predicho nuevas familias de genes TAS (Zhang, Li, et al. 2012) así como otros precursores de tasiRNAs en leguminosas (Zhai et al. 2011). Por otra parte es necesario determinar la expresión de LBL1 a nivel de proteína para confirmar que hay una correspondencia entre la expresión del RNA y proteína de LBL1, pues en otros genes se ha llegado a ver lo contrario (Baerenfaller et al. 2012).

Para complementar este trabajo es necesario identificar que factor es el que promueve la unión entre LBL1 y la estructura 5' cap así como LBL1 y eIF4E y determinar si este factor también explicaría la presencia de LBL1 en los complejos de unión a cap encontrados en la germinación de maíz. Un primer factor a buscar sería el RNA, el sistema de reticulocito de conejo contiene un exceso de RNA de LBL1 pudiendo ser este el mediador entre LBL1 y eIF4E ya que ambos unen RNA, en caso de que este fuera el factor será importante conocer si es a través de mRNAs específicos o si de manera global se da esta interacción. En caso de que la unión al RNA no fuera la que estuviera mediando la interacción de LBL1 con los

complejos de unión a cap, resultará interesante conocer a esos factores y qué tan conservados están en plantas, así como saber si también están mediando esta interacción en la germinación del maíz.

Por último el motivo de unión a eIF4E que hemos propuesto resultó en un gran avance para la predicción de interactores de eIF4E, pero aún se puede refinar, posiblemente tomando en cuenta la estructura secundaria del motivo o su posibilidad de quedar expuesto en la superficie de la proteína así como determinar la posibilidad de dicha estructura de interactuar con la región de contacto de eIF4E.

# 11 Apéndices

## 11.1 Apéndice A: Soluciones usadas

### 11.1.1 Medios de cultivo y soluciones de transformación

#### LB pH = 7.0

- 1% p/v Peptona de Caseína
- 0.5% p/v Extracto de Levadura
- 0.5% p/v Cloruro de Sodio
- 1.5% Agar bacteriológico (si es sólido)

#### SOC

- 0.5 % p/v extracto de levadura
- 2.0 % p/v bactotripton
- 10 mM NaCl
- 2.5 mM KCl
- 10 mM MgCl<sub>2</sub>
- 10 mM MgSO<sub>4</sub>
- 20 mM Glucosa

#### Solución de CaCl<sub>2</sub> pH=7.0

- 60mM CaCl<sub>2</sub>
- 15% v/v Glicerol
- 10mM PIPES

### 11.1.2 Separación de ácidos nucleicos

#### Gel de Agarosa

##### -Para DNA

- 0.8-1.5% p/v Agarosa
- 1X TBE

##### -Para RNA

- 2% p/v Agarosa
- 1X MOPS
- 4% v/v Formaldehído 37%

##### -Agua DEPC

- 0.1% v/v DEPC

*Esterilizar antes de usar*

##### -TBE 5X

450mM Tris Hcl pH=8

450mM Ácido Bórico

10mM EDTA

-MOPS 20X

4M MOPS

20mM EDTA

100mM NaAC

#### Amortiguador de carga de DNA 6X

50% v/v Glicerol

1mM EDTA

0.25% p/v Azul de Bromofenol/Xilencianol

#### Amortiguador de carga de RNA 2X

0.25% Azul de Bromofenol/Xilencianol

1.5X MOPS

9% v/v Formaldehído 37%

60% v/v Formamida desionizada

*La separación se realiza a 60-80V en el TBE 1X o MOPS 1X, a las muestras a separar se les agregó amortiguador de carga 1X.*

### 11.1.3 Separación de proteínas e inmunodetección

#### Gel de Acrilamida

##### -Solución I (100mL)

30g Acrilamida

0.8g Bis acrilamida

##### -Solución II pH 8.8 (100mL)

9.075g Tris HCl

0.2g SDS

##### -Solución III pH 6.8 (100mL)

3.03g Tris HCl

0.2g SDS

##### -Gel Separador 15%

1:1 Solución I: Solución II

50µL APS 10%/10mL de gel  
10µL TEMED/10mL de gel  
-Gel Concentrador (2.5mL)

415µL Solución I  
1.25mL Solución III

807µL Agua  
25µL APS 10%  
3µL TEMED

#### **Amortiguador de Corrida 10X (1L)**

30g Tris HCl  
144g Glicina  
10g SDS

#### **Solución de Azul de Coomassie**

02% p/v Azul de coomassie coloidal (CBB) G-250  
5% p/v Sulfato de aluminio (14-18) hidratado  
10% v/v Etanol 96% v/v  
2% v/v Ácido ortofosfórico

Preparar y usar como está indicado en (Dyballa y Metzger 2009)

#### **Amortiguador de transferencia (1L)**

800mL amortiguador de corrida 1X  
200mL Metanol

#### **Solución de Desnudado de Membranas (100mL)**

1.5g Glicina  
1mL Tween 20  
0.1g SDS  
pH 2.2 ajustado con HCl

#### **Amortiguador de carga de proteínas 5X (20mL)**

0.6g Tris HCl pH=6.8  
0.4g SDS  
8mL Glicerol  
80mg Azul de bromofenol  
20µL β-mercaptoetanol/ 100µL de amortiguador  
(agregar al momento)

### **11.1.4 Extracción de Proteínas**

#### **Amortiguador de extracción de proteínas de bacteria**

##### **5X**

120mM Tris-HCl pH=8.1

400mM NaCl

5mM EDTA

1mM DTT (agregar al momento de usarse)

#### **Amortiguador de unión a 7mGTP pH=7.6**

100mM KCl

20mM HEPES

0.2mM EDTA

10% v/v Glicerol

0.5mM PMSF (agregar al momento de usarse)

0.5mM DTT (agregar al momento de usarse)

1X Complete (agregar al momento de usarse)

Almacenar a 4°C

#### **Amortiguador IVT(preparar al momento)**

12µL TNT® RRL

y 1µL TNT® Reaction Buffer

0.5µL TNT® T7 RNA Polimerasa

0.5µL Mezcla de aminoácidos sin metionina 1mM

0.5µL [<sup>35</sup>S] Metionina (10mCi/mL)

0.5µL Rnasin® (40U/µL)

200-500ng DNA

c.b.p 25µl PBS 1X miniCOMPLETE 7X PMSF 50mM

##### **TGEM**

20mM Tris HCl pH=7.9

20% Glicerol

1mM EDTA

5mM MgCl<sub>2</sub>

0.1% Nonidet (NP)-40

1M NaCl

1mM DTT (agregar al momento de usarse)

1X 0.2mM PMSF (agregar al momento de usarse)

#### **PBS 10X pH = 7.2 (1 L)**

80g NaCl

2g KCl

2.4g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

14.4g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

## 11.2 Apéndice B: Inducción de LBL1 recombinante en *Escherichia coli*

### 11.2.1 Apéndice B1: Cepas de *Escherichia coli* usadas

Cepa	Características
DH5α	Alta eficiencia de transformación
TOP10	Alta eficiencia de transformación
BL21 DE3	Expresa a la T7 polimerasa tras el estímulo con IPTG. Deficiente en las proteasas <i>lon</i> y <i>omp-t</i> haciéndola útil para la expresión de genes no tóxicos.
BL21 pLysS	BL21 DE3 que contiene el plásmido pLysS que codifica a la lisozima T7 reduciendo a nivel basal la expresión del gen de interés. Esta cepa puede reducir la toxicidad de los genes sobreexpresados.
BL21 XLGold	Alta eficiencia de transformación
BL21 Rosetta	BL21 que contiene un plásmido que otorga resistencia a cloranfenicol y que codifica para aminoácidos raramente usados en <i>E. coli</i> pero comunes en eucariontes.
BL21 Codon Plus-RIL	BL21 que contiene copias extras de los genes de los tRNAs argU, ileY, and leuW.

### 11.2.2 Apéndice B2: Vectores y fragmentos generados y usados en este trabajo

Nombre	Vector original	Características
pGEXLBL1	pGEX4T2®	Secuencia codificante de LBL1 clonada en los sitios <i>BamHI</i> y <i>SmaI</i> . Como resultado se tiene a GST seguido de LBL1 separadas por un sitio de corte a trombina. El gen es inducible bajo el promotor pTAC.
pGEMLBL1	pGEM-T-Easy®	Secuencia codificante de LBL1 clonada en los extremos colgantes del vector. Como resultado se tiene al gen de LBL1 rodeado de distintos sitios de corte para poder subclonarlo posteriormente. El gen es inducible bajo el promotor T7.
pSDTOPOLBL1	pENTR-SD-TOPO®	Secuencia codificante de LBL1 insertada por recombinación acorde al fabricante. Como resultado se tiene al gen de LBL1 rodeado de sitios para poder subclonarlo mediante recombinación. El gen es inducible bajo el promotor T7.
pDEST24LBL1	pDEST24®	Secuencia codificante de LBL1 proveniente del pSDTOPOLBL1 insertada por recombinación acorde al fabricante. Como resultado se tiene al gen de LBL1 seguido de GST separadas por un sitio de corte a trombina introducido en el oligonucleótido con el que se clonó a LBL1. El gen es inducible bajo el promotor T7.
T7LBL1	pGEXLBL1	Producto de PCR con el promotor T7 seguido de la secuencia codificante de LBL1.
T7kozacLBL1	pGEXLBL1	Producto de PCR con el promotor T7 seguido del sitio de entrada al ribosoma eucarionte y la secuencia codificante de LBL1.
T7GSTLBL1	pGEXLBL1	Producto de PCR con el promotor T7 seguido de la secuencia

		codificante de GST-LBL1.
T7kozacGSTLBL1	pGEXLBL1	Producto de PCR con el promotor T7 seguido del sitio de entrada al ribosoma eucarionte y la secuencia codificante de GST-LBL1.
pet32LBL1	pet32a®, pGEXLBL1	Secuencia codificante de LBL1 clonada en los sitios <i>BamHI</i> y <i>NotI</i> . Como resultado se tiene a TRX y 6XHIS seguido de LBL1 separadas por un sitio de corte a trombina. El gen es inducible bajo el promotor T7.
pBic	(Martínez-Salas et al. 1993)	Plásmido bicistrónico que codifica para la luciferasa y la cloranfenicol acetil transferasa (CAT) ambas se inducen bajo el promotor T7. La luciferasa contiene IRES que modula su traducción (Martínez-Salas et al. 1993).
pTaiso4G	pet3D®	Plásmido que codifica para el factor eIFiso4G de trigo sin ninguna etiqueta, clonado en los sitios <i>NcoI/BamHI</i> . El gen se induce bajo el promotor T7 (Mayberry et al. 2007)
pGEXZmeIF4E	pGEX4T2®	Plásmido que contiene la secuencia codificante de eIF4E de maíz en el extremo carboxilo terminal de GST, ambas proteínas están separadas por un sitio de corte a trombina.
pGEXZmeIFiso4E	pGEX4T2®	Plásmido que contiene la secuencia codificante de eIFiso4E de maíz en el extremo carboxilo terminal de GST, ambas proteínas están separadas por un sitio de corte a trombina.

### 11.2.3 Apéndice B3: Condiciones usadas para la inducción de LBL1 recombinante en *E. coli*

Parámetro	Condición usada
DO <sub>600nm</sub> al momento de la inducción	0.3,0.4,0.6,0.8,1.1
Temperatura de inducción	4°C,22°C,28°C,37°C
Tiempo de inducción	30min,1.5h,3h,18h
Concentración final de IPTG para inducir	100nm, 300nm, 500nm, 1mM
Cepas de <i>E. coli</i> usadas	BL21 DE3, BL21 pLysS, BL21 XLGold, BL21 Rosetta, BL21 Codon Plus-RIL

Se hicieron todas las combinaciones de condiciones con los plásmidos pGEXLBL1, pDEST24LBL1 y pet32LBL1. En todos los casos se logró lo mostrado en la Figura 5 o no se obtuvo inducción alguna.

## 11.3 Apéndice C: Amplificación de DNA por PCR

### 11.3.1 Apéndice C1: Oligonucleótidos usados

Oligonucleótido	Fw	Rv	Referencias	Características
LBL1 CDS	GGAGCGCGGGATCCATGT CGGGCTCCGGCGATCGT	TTACGAGCTGGAGGCCT CGAAGGTATCTGGCTTA	este trabajo	Amplificación de la secuencia codificante de LBL1 con sitios BamHI en el extremo 5' Fw y NotI en el extremo 3' Rv
pDEST24LBL1	CACCATGTCGGGCTCCGG CGATCGTCCG	GGATCCACGCGGAACCA GCGAGCTGGAGGCCTCG AAGGTATCTGGC	este trabajo	Amplificación de la secuencia codificante sin codón de paro de LBL1 con CACC en el extremo 5' Fw (para poder recombinar con el vector pENTR-SD-TOPO® y pDEST24®) y la secuencia del sitio de corte a trombina en el extremo 3' Rv
LBL1 mRNA	CCCATAGTGGCTGGGAAA CC	ACCATTTGCCAGAGGTG GAG	este trabajo	Amplificación del cDNA de LBL1
MIR390a	GCGAGGAGAAAGAAAGAG CCA	GATAGACAGAACCACGC CTCC	este trabajo	Amplificación del precursor A del miR390
TAS3a	GTAAGGCCTCTTCTTGAC CTTGTA	CACAGGGTGAAAACATT AACTGAAC	(Nogueira et al. 2009)	Amplificación del transcrito TAS3a
TAS3b	CTTGACCTTGTAAGACCC AACTCTA	TGTTTGTCTCATGCCTC ACTCTAT	(Nogueira et al. 2009)	Amplificación del transcrito TAS3b
TAS3c	GGTTCACGTGGTTCATGT CTAGTAT	AAACATATAGTTGAACC CACAGCTC	(Nogueira et al. 2009)	Amplificación del transcrito TAS3c
TAS3d	GGTTTCTCGTGCCAGAAT TAAC	AATAATTTCAACGCCAC CAAAC	(Nogueira et al. 2009)	Amplificación del transcrito TAS3d
ARF24	AGCAGGAATTGGTGATGC TGAC	ACATCGTCATCCCATCG AACCATC	este trabajo	Amplificación del cDNA de ARF24
18S	GGAAACTTACCAGGTCCA GACATAG	GTGGCCTAAACGGCCAT AGTCCCTC	este trabajo	Amplificación del 18S rRNA
t7gstl1	GAATAATACGACTCACTA TAGGGATGTCCCCTATAC TAGG	TCACGATGCGGCCGCTC GAGTCGACCC	este trabajo	Amplificación del fragmento GST-LBL1 separadas por un sitio de corte a trombina proveniente del pGEXLBL1. En el extremo 5' Fw contiene el promotor para la T7 polimerasa

t7kozacgstl1	GAAGAATAATACGACTCA CTATAGGGATCGCCACCA TGTCCCTATACTAGG	TCACGATGCGGCCGCTC GAGTCGACCC	este trabajo	Amplificación del fragmento GST-LBL1 separadas por un sitio de corte a trombina proveniente del pGEXLBL1. En el extremo 5' Fw contiene el promotor para la T7 polimerasa y el sitio de entrada al ribosoma
t7l1	GAATAATACGACTCACTA TAGGGATGTCGGGCTCCG GC	TCACGATGCGGCCGCTC GAGTCGACCC	este trabajo	Amplificación del fragmento LBL1 proveniente del pGEXLBL1. En el extremo 5' Fw contiene el promotor para la T7 polimerasa
t7kozac1	GAAGAATAATACGACTCA CTATAGGGATTTCCACCA TGTTCGGGCTCCGGC	TCACGATGCGGCCGCTC GAGTCGACCC	este trabajo	Amplificación del fragmento LBL1 proveniente del pGEXLBL1. En el extremo 5' Fw contiene el promotor para la T7 polimerasa y el sitio de entrada al ribosoma
oligodT		TTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTVN	este trabajo	Reverso transcripción de mRNAs a través de las poliadeninas en su extremo 3'

## 11.3.2 Apéndice C2: Condiciones de PCR

### 11.3.2.1 Transcripción Reversa

Temperatura	Tiempo(min)	Reacción
70°C	5	Desnaturalización (Oligo dT + RNA)
4°C	5	Desnaturalización (Oligo dT + RNA)
25°C	5	Alineamiento (Reacción RT)
42°C	60	Extensión (Reacción RT)
70°C	15	Inactivación RT (Reacción RT)

### 11.3.2.2 PCR

Paso	Temperatura	Tiempo
1	94°C	2min
2	94°C	15s
3	60°C	1min
4	72°C	1min
5	Repetir pasos 2 a 4 N* veces	
6	70°C	10min

cDNA a amplificar	Oligonucleótido	Número de Ciclos (N*)	Tamaño aproximado del fragmento amplificado
LBL1	LBL1 mRNA	32	250pb
18S	18S	22	250pb
MIR390A	MIR390a	35	90pb
TAS3a	TAS3a	35	250pb
TAS3b	TAS3b	35	250pb
TAS3c	TAS3c	35	250pb
TAS3d	TAS3d	35	250pb
ARF24	ARF24	35	80pb
LBL1	LBL1 CDS	35	1800pb
LBL1	pDEST24LBL1	35	1800pb
T7gstlbl1	t7gstlbl1	35	2500pb
T7kozacgstlbl1	t7kozacgstlbl1	35	2500pb
T7lbl	t7lbl	35	1800pb
T7kozacubl	t7kozacubl	35	1800pb

## 11.4 Apéndice D: LBL1

### 11.4.1 Apéndice D1: Composición fisicoquímica de LBL1 y LBL1-GST

#### 11.4.1.1 LBL1

Número de aminoácidos: 594

Tamaño molecular: 67752.5

pl teórico: 5.87

#### Composición de aminoácidos:

Ala (A)	33	5.6%
Arg (R)	35	5.9%
Asn (N)	22	3.7%
Asp (D)	41	6.9%
Cys (C)	4	0.7%
Gln (Q)	27	4.5%
Glu (E)	62	10.4%
Gly (G)	45	7.6%
His (H)	18	3.0%
Ile (I)	14	2.4%
Leu (L)	40	6.7%
Lys (K)	55	9.3%
Met (M)	18	3.0%
Phe (F)	20	3.4%
Pro (P)	28	4.7%
Ser (S)	49	8.2%
Thr (T)	25	4.2%
Trp (W)	14	2.4%
Tyr (Y)	13	2.2%
Val (V)	31	5.2%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%
(B)	0	0.0%
(Z)	0	0.0%
(X)	0	0.0%

Total de residuos cargados negativamente (Asp + Glu): 103

Total de residuos cargados positivamente (Arg + Lys): 90

#### Composición atómica:

Carbono C 2953

Hidrógeno	H	4603
Nitrógeno	N	853
Oxígeno	O	937
Azufre	S	22

Fórmula:  $C_{2953}H_{4603}N_{853}O_{937}S_{22}$

Número total de átomos: 9368

#### Coeficientes de extinción:

Los coeficientes de extinción están en las unidades  $M^{-1} cm^{-1}$ , a 280 nm medido en agua.

Coef. ext 96620

Abs 0.1% (=1 g/l) 1.426, asumiendo que todos los pares de residuos Cys forman cistinas

Coef. ext 96370

Abs 0.1% (=1 g/l) 1.422, asumiendo que todos los pares de residuos Cys están reducidos

#### Vida media estimada:

El N-terminal de la secuencia es considerado M (Met).

Vida media estimada: 30h (reticulocitos de mamífero, *in vitro*).

>20h (levadura, *in vivo*).

>10h (*Escherichia coli*, *in vivo*).

#### Índice de inestabilidad:

El índice de inestabilidad (II) es 48.77

Lo que la clasifica como inestable.

Índice alifático: 56.14

Gran promedio de hidropatía (GRAVY): -1.020

### 11.4.1.2 LBL1-GST

Número de aminoácidos: 845

Tamaño molecular: 96714.2

pl teórico: 6.07

#### Composición de aminoácidos:

Ala (A)	45	5.3%
Arg (R)	47	5.6%
Asn (N)	26	3.1%
Asp (D)	60	7.1%
Cys (C)	9	1.1%
Gln (Q)	32	3.8%
Glu (E)	78	9.2%
Gly (G)	64	7.6%
His (H)	24	2.8%
Ile (I)	28	3.3%
Leu (L)	70	8.3%
Lys (K)	78	9.2%
Met (M)	27	3.2%
Phe (F)	30	3.6%
Pro (P)	45	5.3%
Ser (S)	60	7.1%
Thr (T)	31	3.7%
Trp (W)	19	2.2%
Tyr (Y)	28	3.3%
Val (V)	44	5.2%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%
(B)	0	0.0%
(Z)	0	0.0%
(X)	0	0.0%

Total de residuos cargados negativamente (Asp + Glu): 138

Total de residuos cargados positivamente (Arg + Lys): 125

#### Composición atómica:

Carbono	C	4281
Hidrógeno	H	6651
Nitrógeno	N	1189

Oxígeno	O	1299
Azufre	S	36

Fórmula:  $C_{4281}H_{6651}N_{1189}O_{1299}S_{36}$

Número total de átomos: 13456

#### Coeficientes de extinción:

Los coeficientes de extinción están en las unidades  $M^{-1} cm^{-1}$ , a 280 nm medido en agua.

Coef. ext 146720

Abs 0.1% (=1 g/l) 1.517, asumiendo que todos los pares de residuos Cys forman cistinas

Coef. ext 146220

Abs 0.1% (=1 g/l) 1.512, asumiendo que todos los pares de residuos Cys están reducidos

#### Vida media estimada:

El N-terminal de la secuencia es considerado M (Met).

Vida media estimada: 30h (reticulocitos de mamífero, *in vitro*).

>20h (levadura, *in vivo*).

>10h (*Escherichia coli*, *in vivo*).

#### Índice de inestabilidad:

El índice de inestabilidad (II) es 44.50

Lo que la clasifica como inestable.

Índice alifático: 65.66

Gran promedio de hidropatía (GRAVY): -0.809

## 11.4.2 Apéndice D2: Sitios de proteólisis en LBL1 y LBL1-GST

### 11.4.2.1 LBL1

Enzima	No. de cortes
Arg-C proteinasa	35
Asp-N endopeptidasa	41
Asp-N endopeptidasa + N-terminal Glu	103
BNPS-Skatole	14
CNBr	18
Quimiotripsina-de alta especificidad (C-term a [FYW], sin P antes)	46
Quimotripsina-de baja especificidad (C-term a [FYW], sin P antes)	119
Clostripain	35
Enterocinasa	1
Ácido Fórmico	41
Glutamil endopeptidasa	62
Hydroxilamina	2
Ácido Iodosobenzoico	14
LysC	55
LysN	55
NTCB (2-nitro-5-ácido tiocianobenzoico)	4
Pepsina (pH1.3)	123
Pepsina (pH>2)	87
Prolina-endopeptidasa[*]	7
Proteinasa K	252
Peptidasa <u>I</u> de Staphylococcus	54
Termolisina	117
Tripsina	83

Las siguientes enzimas no tienen sitio de corte:

Caspasa1  
 Caspasa10  
 Caspasa2  
 Caspasa3  
 Caspasa4  
 Caspasa5  
 Caspasa6  
 Caspasa7  
 Caspasa8  
 Caspasa9  
 Factor Xa  
 GranzimaB  
 Trombina  
 Proteasa de TEV

### 11.4.2.2 LBL1-GST

Enzima	No. de cortes
Arg-C proteinasa	46
Asp-N endopeptidasa	60
Asp-N endopeptidasa + N-terminal Glu	138
BNPS-Skatole	18
CNBr	27
Quimiotripsina-de alta especificidad (C-term a [FYW], sin P antes)	72
Quimotripsina-de baja especificidad (C-term a [FYW], sin P antes)	186
Clostripain	46
Enterocinasa	1
Ácido Fórmico	60
Glutamil endopeptidasa	78
Hydroxilamina	3
Ácido Iodosobenzoico	18
LysC	78
LysN	78
NTCB (2-nitro-5-ácido tiocianobenzoico)	8
Pepsina (pH1.3)	208
Pepsina (pH>2)	143
Prolina-endopeptidasa[*]	8
Proteinasa K	371
Peptidasa <u>I</u> de Staphylococcus	68
Termolisina	185
Trombina	1
Tripsina	117

Las siguientes enzimas no tienen sitio de corte:

Caspasa1  
 Caspasa10  
 Caspasa2  
 Caspasa3  
 Caspasa4  
 Caspasa5  
 Caspasa6  
 Caspasa7  
 Caspasa8  
 Caspasa9  
 Factor Xa  
 GranzimaB  
 Proteasa de TEV

### 11.4.3 Apéndice D3: Estructura de LBL1

Dominio	Ubicación en ZmLBL1	Ubicación en AtSGS3
Dedo de zinc	196-231aa	221-265aa
XS	269-379aa	297-416aa
Hélice entrecruzada (CC)	387-594aa	420-625aa
Motivo de unión a eIF4E consenso YxxxxLφ	no aplica	241-247aa
Motivo de unión a eIF4E consenso YxxxxLζ	562-568aa	450-456aa

## 11.5 Apéndice E: Proteínas interactoras con eIF4E

### 11.5.1 Apéndice E1: Proteínas comprobadas que unen a eIF4E

Proteína	ID	E*	Motivo canónico	Une sin M1*	Motivo adicional	Une sin M2*	Une sin ambos	Motivo adicional	Une sin M1-3	PM1	PM2	PM3	Referencias
AtBTF3	AJ242970.1	4	STLKRIG	nd	nd	na	na	nd	na	41	na	na	(Freire 2005)
HsDDX3	AAC34298.1	2	YIPPLR	disminuye	nd	na	na	nd	na	38	na	na	(Shih et al. 2008)
Hs4EBP1	Q13541.3	1	YDRKFLM	no	PGVTS	disminuye	nd	nd	na	60	79	na	(Mader et al. 1995; Marcotrigiano et al. 1999; Paku et al. 2012)
Hs4EBP2	NP_004087.1	2	YDRKFLM	no	PGVTS	nd	nd	nd	na	54	79	na	(Mader et al. 1995; Paku et al. 2012)
Hs4EBP3	NP_003723.1	2	YDRKFLM	no	PGVTT	nd	nd	nd	na	40	65	na	(Paku et al. 2012)
DmBicoid	AAF54085.2	2	YIRPYLP	no	YNYIRPYLP	no	nd	nd	na	68	66	na	(Niessing et al. 2002; Cho et al. 2005)
Hs4E-T	Q9NRA8.2	2	YTKEELL	no	nd	na	na	nd	na	30	na	na	(Dostie et al. 2000)
PVAHcPro	Q9DIC2	2	YINIFLA	disminuye	nd	na	na	nd	na	345	na	na	(Ala-Poikela et al. 2011)
TEVHcPro	CCA30563.1	4	YMNIFFA	nd	YLLSILY	nd	nd	nd	na	339	384	na	(Ala-Poikela et al. 2011)
PVYHcPro	ABJ16044.1	4	YINIFLA	nd	nd	na	na	nd	na	343	na	na	(Ala-Poikela et al. 2011)
Prep1/Pnox1	NP_057879.2	2	nd	na	YRHPLFPLL	disminuye	na	nd	na	na	59	na	(Villaescusa et al. 2009)
ScelF4G	P39935.2	2	YGPTFLL	disminuye	nd	na	na	nd	na	452	na	na	(Mader et al. 1995; Altmann et al. 1997)
HselF4G	Q04637.4	1	YDREFLL	no	SDVVL	disminuye	no	nd	na	612	637	na	(Mader et al. 1995; Marcotrigiano et al. 1999; Umenaga et al. 2011)
LmIF4G-3	XP_001682243.1	2	YPGFSLD	no	nd	na	na	nd	na	20	na	na	(Yoffe et al. 2009)
HsGemin5	NP_056280.2	2	YEAVELL	no	LKLPFLK	disminuye	nd	nd	na	992	265	na	(Fierro-Monti et al. 2006)
DmCup	Q9VMA3.3	1	YTRSRLM	disminuye	LEGRLRRMNIWR	disminuye	no	nd	na	327	364	na	(Nakamura et al. 2004; Nelson et al. 2004; Kinkelin et al. 2012)
MmEmx2	Q04744.3	4	YSNPDLV	nd	nd	na	na	nd	na	65	na	na	(Nédélec et al. 2004)
XIMaskin	Q9PTG8.2	2	TEADFLM	no	nd	na	na	nd	na	577	na	na	(Stebbins-Boaz et al. 1999)

OceIF4G	P41110.1	3	YDREFLL	no	nd	na	na	nd	na	417	na	na	(Lampheart et al. 1995)
Scp20	P12962.2	3	YTIDELF	no	nd	na	na	nd	na	6	na	na	(Altmann et al. 1997)
4EGI péptido sintético	na	1	TYDELF	nd	nd	na	na	nd	na	2	na	na	(Moerke et al. 2007)
AtLOX2	P38418.1	3	YRKEELE	no	nd	na	na	nd	na	215	na	na	(Freire et al. 2000)
MmNgd	Q9DB96.1	3	YSTEKGL	nd	YQIDKLV	disminuye	disminuye	YVPPRLV	1,2,3	44	108	171	(Jung et al. 2006)
HsAngel1	Q9UNK9.1	2	YGRDFLL	no	nd	na	na	nd	na	507	na	na	(Gosselin et al. 2013)
HsPML	P29590.3	4	nd	nd	nd	na	na	nd	na	na	na	na	(Cohen et al. 2001)
AtIFiso4G1	Q93ZT6.1	4	YTREQLL	nd	nd	na	na	nd	na	72	na	na	(Lellis et al. 2010)
AtIFiso4G2	O82233.1	4	FSREEIL	nd	nd	na	na	nd	na	59	na	na	(Lellis et al. 2010)
HsPRH	Q03014.1	2	YAPTPLL	no	nd	na	na	nd	na	17	na	na	(Topisirovic et al. 2003)
CePGL1	Q9TZQ3.1	4	YQLFFLI	nd	nd	na	na	nd	na	266	na	na	(Amiri et al. 2001)
MmCYFIP1	Q7TMB8.1	2	LDKRLRSECK	disminuye	nd	na	na	nd	na	723	na	na	(Napoli et al. 2008)

ID de la base de datos NCBI

E: nivel de evidencia experimental del motivo.

1 cristalografía

2 mutación puntual

3 deleción de zonas en la proteína

4 predicción

\*: solo el nivel máximo se muestra

M1, M2, M3: motivos 1, 2 y 3 respectivamente.

PM1, PM2, PM3: número de aminoácido donde inicia el motivo 1, 2 y 3 respectivamente

na: no aplica

nd: no determinado

## 11.5.2 Apéndice E2: Proteínas mutantes que pierden capacidad de unión a eIF4E

Proteína	Capacidad de unión a eIF4E	Causa de la incapacidad de unión	Motivo afectado	Naturaleza de la proteína	Referencias
Hsp97	nula	falta del dominio que une a eIF4E	canónico	homólogo a eIF4G	(Imataka et al. 1997)
HsDDX3Y38A	baja	mutación del motivo	canónico	mutación	(Shih et al. 2008)
HsDDX3L43A	muy baja	mutación del motivo	canónico	mutación	(Shih et al. 2008)
DmBicoidY68AL73R	nula	mutación del motivo	canónico	mutación	(Niessing et al. 2002)
Hs4E-TY30A	nula	mutación del motivo	canónico	mutación	(Dostie et al. 2000)
PVAHcProY345AL350A	baja	mutación del motivo	canónico	mutación	(Ala-Poikela et al. 2011)
Prep1Y59A	baja	mutación del motivo	adicional	mutación	(Villaescusa et al. 2009)
Prep1Y59AL66A	baja	mutación del motivo	adicional	mutación	(Villaescusa et al. 2009)
Prep1Y59AL66AL67A	muy baja	mutación del motivo	adicional	mutación	(Villaescusa et al. 2009)
ScelF4GY452A	nula	mutación del motivo	canónico	mutación	(Mader et al. 1995)
ScelF4GY452F	baja	mutación del motivo	canónico	mutación	(Mader et al. 1995)
ScelF4GL457AL458A	nula	mutación del motivo	canónico	mutación	(Mader et al. 1995)
HselF4GY612A	nula	mutación del motivo	canónico	mutación	(Mader et al. 1995)
HselF4GY612F	baja	mutación del motivo	canónico	mutación	(Mader et al. 1995)
HselF4GL617AL618A	nula	mutación del motivo	canónico	mutación	(Mader et al. 1995)
Hs4EBP1L59AM60A	nula	mutación del motivo	canónico	mutación	(Mader et al. 1995)
Hs4EBP2L59AL60A	nula	mutación del motivo	canónico	mutación	(Mader et al. 1995)
LmIF4G-3Y20A	nula	mutación del motivo	canónico	mutación	(Yoffe et al. 2009)
LmIF4G-3Y20F	baja	mutación del motivo	canónico	mutación	(Yoffe et al. 2009)
LmIF4G-3P21A	baja	mutación del motivo	canónico	mutación	(Yoffe et al. 2009)
LmIF4G-3G22A	muy baja	mutación del motivo	canónico	mutación	(Yoffe et al. 2009)
LmIF4G-3F23A	nula	mutación del motivo	canónico	mutación	(Yoffe et al. 2009)
LmIF4G-3L25A	nula	mutación del motivo	canónico	mutación	(Yoffe et al. 2009)
LmIF4G-3E27A	muy baja	mutación del motivo	canónico	mutación	(Yoffe et al. 2009)
HsGemin5Y992A	muy baja	mutación del motivo	canónico	mutación	(Fierro-Monti et al. 2006)
HsGemin5L997AL998A	baja	mutación del motivo	canónico	mutación	(Fierro-Monti et al. 2006)
HsGemin5L265A	baja	mutación del motivo	adicional	mutación	(Fierro-Monti et al. 2006)
HsGemin5L270AK271A	baja	mutación del motivo	adicional	mutación	(Fierro-Monti et al. 2006)
DmBicoidY66A	nula	mutación del motivo	adicional	mutación	(Cho et al. 2005)
DmBicoidL73R	nula	mutación del motivo	adicional	mutación	(Cho et al. 2005)
DmCupY327A	muy baja	mutación del motivo	canónico	mutación	(Nakamura et al. 2004)
DmCupL332AM333A	baja	mutación del motivo	canónico	mutación	(Nakamura et al. 2004)

DmCupY327AL332AM33 3A	muy baja	mutación del motivo	canónico	mutación	(Nakamura et al. 2004)
XIMaskinT577AF581AL58 2AL583A	nula	mutación del motivo	canónico	mutación	(Stebbins-Boaz et al. 1999)
DmCupL364AL368A	baja	mutación del motivo	adicional	mutación	(Nelson et al. 2004)
DmCupY327AL364AL368A	nula	mutación del motivo	ambos	mutación	(Nelson et al. 2004)
HsAngel1 Y507A	nula	mutación del motivo	canónico	mutación	(Gosselin et al. 2013)
HsPRHY18AL23AL24A	nula	mutación del motivo	canónico	mutación	(Topisirovic et al. 2003)
HsPRH Y18A	nula	mutación del motivo	canónico	mutación	(Topisirovic et al. 2003)
HsPRH L23AL24A	muy baja	mutación del motivo	canónico	mutación	(Topisirovic et al. 2003)
MmCYFIP1D724AR726A	baja	mutación del motivo	canónico	mutación	(Napoli et al. 2008)
MmCYFIP1D724KK725ER7 26EE730K	muy baja	mutación del motivo	canónico	mutación	(Napoli et al. 2008)
MmCYFIP1 K725E	muy baja	mutación del motivo	canónico	mutación	(Napoli et al. 2008)

La capacidad de unión a eIF4E de las mutantes es con respecto a su versión silvestre.

### 11.5.3 Apéndice E3: Condiciones usadas para la búsqueda de nuevos motivos de unión a eIF4E

Parámetro	Motivo 1	Motivo 2	Motivo 3	Motivo 4	Motivo propuesto por (Gosselin et al. 2013)
Predicción del motivo usando MEME					
Secuencias usadas	Secuencias Apéndice E1 solo evidencia 1 y 2	Secuencias Apéndice E1 solo evidencia 1 y 2 y Apéndice E2 solo unión baja y muy baja	Secuencias Apéndice E1	Secuencias Tabla 7 y Apéndice E2 solo unión baja y muy baja	no aplica
Conjunto negativo	Secuencias Tabla 8	Secuencias Tabla 8	Secuencias Tabla 8	Secuencias Tabla 8	no aplica
Repeticiones del motivo en la secuencia	1	1	1	1	no aplica
Longitud máxima del motivo	20	20	20	20	no aplica
Longitud mínima del motivo	6	6	6	6	no aplica
Número de motivos a encontrar	1	1	1	1	no aplica
Búsqueda del motivo en proteínas usando MAST					
Motivo	Y[DG]I [RE]x[FY]L	[KR]I[I]K [FYN]DRKFL[LW] ][DQ]	[KC][YF][DT][RI] [ED]FLL	[RK] [YF]K[RIK]E[FT] L[LY]	[HRKQ]xxYx[RH] x[FAVLIM]L[MLW FY]
Secuencias donde buscar el motivo	Secuencias	Secuencias	Secuencias	Secuencias	Secuencias

	Apéndice E1 solo evidencia 1 y 2 y Apéndice E2 solo unión baja y muy baja	Apéndice E1 solo evidencia 1 y 2 y Apéndice E2 solo unión baja y muy baja	Apéndice E1 solo evidencia 1 y 2 y Apéndice E2 solo unión baja y muy baja	Apéndice E1 solo evidencia 1 y 2 y Apéndice E2 solo unión baja y muy baja	Apéndice E1 solo evidencia 1 y 2 y Apéndice E2 solo unión baja y muy baja
Mostrar secuencias con valor E menor a:	10	10	10	10	10
Ignorar motivos si el valor E es mayor a:	Usar todos los motivos				
Usar la composición individual de la secuencias en el cálculo del valor E y p	Si	Si	Si	Si	Si
Escalar el umbral del motivo mostrado por la longitud de la secuencia	No	No	No	No	No

## 11.5.4 Apéndice E4: Nuevos motivos de unión a eIF4E encontrados

\*\*\*\*\*

### MOTIVO 1: Y[DGI][RE]\*[FY]L

MEME - Motif discovery tool

\*\*\*\*\*

MEME version 4.9.1 (Release date: Fri Aug 23 16:49:42 2013 +1000)

Letter frequencies in dataset:

A 0.070 C 0.016 D 0.052 E 0.079 F 0.034 G 0.060 H 0.025 I 0.041 K 0.059  
L 0.092 M 0.023 N 0.043 P 0.070 Q 0.057 R 0.054 S 0.086 T 0.055 V 0.050  
W 0.009 Y 0.025

Background letter frequencies (from dataset with add-one prior applied):

A 0.070 C 0.016 D 0.052 E 0.079 F 0.034 G 0.060 H 0.025 I 0.041 K 0.059  
L 0.091 M 0.023 N 0.043 P 0.070 Q 0.057 R 0.054 S 0.086 T 0.055 V 0.050  
W 0.010 Y 0.025

\*\*\*\*\*

MOTIF 1 width = 6 sites = 18 llr = 189 E-value = 3.8e+001

\*\*\*\*\*

#### Motif 1 Description

```
-----
Simplified      A  :::::      K  ::12::
pos.-specific  C  1::::      L  :1:2:9
probability     D  :3:2::      M  :::::
matrix          E  ::2111      N  ::1::
                F  :::4:      P  ::11::
                G  :3::::      Q  :::::1
                H  :::::1      R  ::6:1:
                I  12:21:      S  :::1::
```

```

T :1:11: 2.0 *** **
V 11::: 1.3 *****
W ::::: 0.7 *****
Y 8:::2: 0.0 -----

```

```

bits 6.7 Multilevel YDRxFL
6.0 consensus GE Y
5.4 sequence I
4.7 *
Relative 4.0 *
Entropy 3.4 *
(15.1 bits) 2.7 * **

```

-----  
Motif 1 position-specific probability matrix  
-----

letter-probability matrix: alength= 20 w= 6 nsites= 18 E= 3.8e+001

```

0.000000 0.055556 0.000000 0.000000 0.000000 0.000000 0.000000 0.055556 0.000000
0.000000 0.000000 0.000000 0.000000 0.000000 0.000000 0.000000 0.000000 0.055556
0.000000 0.833333
0.000000 0.000000 0.277778 0.000000 0.000000 0.277778 0.000000 0.222222 0.000000
0.055556 0.000000 0.000000 0.000000 0.000000 0.000000 0.000000 0.111111 0.055556
0.000000 0.000000
0.000000 0.000000 0.000000 0.222222 0.000000 0.000000 0.000000 0.000000 0.055556
0.000000 0.000000 0.055556 0.111111 0.000000 0.555556 0.000000 0.000000 0.000000
0.000000 0.000000
0.000000 0.000000 0.166667 0.111111 0.000000 0.000000 0.000000 0.166667 0.166667
0.166667 0.000000 0.000000 0.111111 0.000000 0.000000 0.055556 0.055556 0.000000
0.000000 0.000000
0.000000 0.000000 0.000000 0.055556 0.444444 0.000000 0.111111 0.055556 0.000000
0.000000 0.000000 0.000000 0.000000 0.000000 0.055556 0.000000 0.055556 0.000000
0.000000 0.222222
0.000000 0.000000 0.000000 0.055556 0.000000 0.000000 0.000000 0.000000 0.000000
0.888889 0.000000 0.000000 0.000000 0.055556 0.000000 0.000000 0.000000 0.000000
0.000000 0.000000

```

-----  
\*\*\*\*\*

**MOTIVO 2: [KR]I[IK][FYN]DRKFL[LW][DQ]**

MEME - Motif discovery tool

\*\*\*\*\*

MEME version 4.9.1 (Release date: Fri Aug 23 16:49:42 2013 +1000)

Letter frequencies in dataset:

```

A 0.071 C 0.017 D 0.050 E 0.077 F 0.034 G 0.058 H 0.027 I 0.042 K 0.060
L 0.093 M 0.024 N 0.045 P 0.062 Q 0.059 R 0.054 S 0.084 T 0.055 V 0.052

```

W 0.011 Y 0.025

Background letter frequencies (from dataset with add-one prior applied):

A 0.071 C 0.017 D 0.050 E 0.077 F 0.034 G 0.058 H 0.027 I 0.042 K 0.060

L 0.093 M 0.024 N 0.045 P 0.062 Q 0.059 R 0.054 S 0.084 T 0.055 V 0.052

W 0.011 Y 0.025

\*\*\*\*\*

MOTIF 1 width = 11 sites = 42 llr = 643 E-value = 1.4e-059

\*\*\*\*\*

Motif 1 Description

```

-----
Simplified      A  :::1:::
pos.-specific   C  :::::
probability     D  :::5::2::4
matrix          E  :::::1:1:1
                F  :1:3:::41::
                G  :::1:::
                H  :::::1:::
                I  :23:11::1::
                K  4:3:114:1::
                L  1:::55:
                M  :::1::1:::
                N  :2121::1::1
                P  :::::
                Q  :1:::1:::3
                R  412::311::
                S  :::::
                T  :11::12:::1
                V  :::::1:::
                W  1:::2:
                Y  :1:3:::1:1
-----

```

			bits	6.5			
				5.8			
				5.2			
				4.5			
			Relative	3.9			
			Entropy	3.2	*		
			(22.1 bits)	2.6	*	*	*
				1.9	*****	****	
				1.3	*****		
				0.6	*****		
				0.0	-----		
			Multilevel			KIIFDRKFLLD	
			consensus			R KY	WQ
			sequence			N	

Motif 1 position-specific probability matrix

letter-probability matrix: alength= 20 w= 11 nsites= 42 E= 1.4e-059

```

-----
0.000000 0.000000 0.000000 0.000000 0.000000 0.000000 0.000000 0.000000 0.357143
0.095238 0.000000 0.023810 0.000000 0.000000 0.357143 0.023810 0.000000 0.000000
0.142857 0.000000
0.000000 0.000000 0.000000 0.000000 0.142857 0.000000 0.000000 0.214286 0.047619
0.000000 0.000000 0.190476 0.000000 0.119048 0.071429 0.000000 0.095238 0.000000
0.000000 0.119048
0.000000 0.000000 0.000000 0.000000 0.000000 0.047619 0.000000 0.261905 0.261905
0.000000 0.000000 0.142857 0.000000 0.000000 0.166667 0.047619 0.071429 0.000000
-----

```

0.000000	0.000000							
0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.333333	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
0.000000	0.119048	0.214286	0.000000	0.000000	0.000000	0.023810	0.000000	0.000000
0.000000	0.309524							
0.119048	0.000000	0.452381	0.000000	0.000000	0.071429	0.000000	0.095238	0.119048
0.000000	0.000000	0.142857	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
0.000000	0.000000							
0.000000	0.000000	0.000000	0.023810	0.000000	0.000000	0.119048	0.119048	0.095238
0.000000	0.000000	0.000000	0.047619	0.047619	0.333333	0.000000	0.071429	0.119048
0.023810	0.000000							
0.000000	0.000000	0.023810	0.071429	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.380952
0.023810	0.119048	0.000000	0.023810	0.095238	0.095238	0.000000	0.166667	0.000000
0.000000	0.000000							
0.000000	0.000000	0.190476	0.000000	0.380952	0.000000	0.000000	0.047619	0.023810
0.000000	0.000000	0.119048	0.000000	0.000000	0.095238	0.000000	0.000000	0.000000
0.000000	0.142857							
0.000000	0.000000	0.000000	0.071429	0.142857	0.000000	0.000000	0.095238	0.119048
0.547619	0.000000	0.000000	0.000000	0.023810	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
0.000000	0.000000							
0.000000	0.000000	0.023810	0.047619	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.023810
0.523810	0.023810	0.000000	0.023810	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
0.238095	0.095238							
0.000000	0.000000	0.357143	0.095238	0.000000	0.047619	0.000000	0.000000	0.023810
0.000000	0.000000	0.071429	0.000000	0.261905	0.023810	0.000000	0.119048	0.000000
0.000000	0.000000							

-----

\*\*\*\*\*

**MOTIVO 3: [KC] [YF] [DT] [RI] [ED] FLL**

MEME - Motif discovery tool

\*\*\*\*\*

MEME version 4.9.1 (Release date: Fri Aug 23 16:49:42 2013 +1000)

Letter frequencies in dataset:

A 0.073 C 0.015 D 0.052 E 0.081 F 0.034 G 0.063 H 0.023 I 0.042 K 0.061  
L 0.094 M 0.021 N 0.041 P 0.068 Q 0.053 R 0.057 S 0.084 T 0.052 V 0.053  
W 0.010 Y 0.023

Background letter frequencies (from dataset with add-one prior applied):

A 0.073 C 0.015 D 0.052 E 0.081 F 0.034 G 0.063 H 0.023 I 0.042 K 0.061  
L 0.094 M 0.021 N 0.041 P 0.068 Q 0.053 R 0.057 S 0.084 T 0.052 V 0.053  
W 0.010 Y 0.023

\*\*\*\*\*

MOTIF 1 width = 8 sites = 30 llr = 323 E-value = 2.7e+003

\*\*\*\*\*

Motif 1 Description

-----

Simplified A 1:::1 pos.-specific C 2::1:::



0.000000 0.033333

\*\*\*\*\*

**MOTIVO 4: [RK][YF]K[RIK]E[FT]L[LY]**

MEME - Motif discovery tool

\*\*\*\*\*

MEME version 4.9.1 (Release date: Fri Aug 23 16:49:42 2013 +1000)

Letter frequencies in dataset:

A 0.072 C 0.016 D 0.051 E 0.078 F 0.034 G 0.059 H 0.026 I 0.042 K 0.061  
L 0.094 M 0.023 N 0.044 P 0.062 Q 0.057 R 0.055 S 0.083 T 0.053 V 0.053  
W 0.011 Y 0.024

Background letter frequencies (from dataset with add-one prior applied):

A 0.072 C 0.016 D 0.051 E 0.078 F 0.034 G 0.059 H 0.026 I 0.042 K 0.061  
L 0.094 M 0.023 N 0.044 P 0.062 Q 0.057 R 0.055 S 0.083 T 0.053 V 0.053  
W 0.011 Y 0.024

\*\*\*\*\*

MOTIF 1 width = 8 sites = 54 llr = 582 E-value = 2.6e-023

\*\*\*\*\*

Motif 1 Description

Simplified	A ::::::	W ::::::
pos.-specific	C :1:::::	Y :4::::12
probability	D ::1:11::	
matrix	E ::1:21:1	bits 6.5
	F :4:::3::	5.9
	G ::1:::::	5.2
	H ::1:::::	4.6
	I 1:121:::	Relative 3.9
	K 3:3211::	Entropy 3.3 *
	L :::::75	(15.6 bits) 2.6 * *
	M :1::1:::	2.0 ** ***
	N ::2::1::	1.3 *****
	P ::::::	0.7 *****
	Q ::::1:1:	0.0 -----
	R 4::31:::	
	S :::1::::	Multilevel RYKREFLL
	T 1:1:12::	consensus KF I T Y
	V :::::11	sequence K

-----  
Motif 1 position-specific probability matrix  
-----

letter-probability matrix: alength= 20 w= 8 nsites= 54 E= 2.6e-023

0.000000	0.037037	0.000000	0.000000	0.000000	0.037037	0.000000	0.074074	0.333333
0.000000	0.000000	0.018519	0.000000	0.000000	0.351852	0.000000	0.148148	0.000000
0.000000	0.000000							
0.000000	0.092593	0.000000	0.000000	0.370370	0.000000	0.018519	0.000000	0.000000
0.000000	0.074074	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.018519	0.018519	0.000000
0.000000	0.407407							
0.000000	0.000000	0.111111	0.055556	0.000000	0.129630	0.092593	0.055556	0.259259
0.000000	0.000000	0.185185	0.000000	0.018519	0.000000	0.018519	0.074074	0.000000
0.000000	0.000000							
0.000000	0.018519	0.018519	0.000000	0.000000	0.018519	0.018519	0.240741	0.203704
0.000000	0.000000	0.018519	0.037037	0.000000	0.296296	0.074074	0.037037	0.000000
0.000000	0.018519							
0.000000	0.000000	0.111111	0.240741	0.000000	0.000000	0.000000	0.111111	0.148148
0.000000	0.092593	0.000000	0.000000	0.148148	0.055556	0.000000	0.092593	0.000000
0.000000	0.000000							
0.000000	0.000000	0.092593	0.074074	0.314815	0.000000	0.000000	0.000000	0.148148
0.000000	0.000000	0.092593	0.000000	0.037037	0.000000	0.000000	0.203704	0.037037
0.000000	0.000000							
0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.037037	0.000000
0.740741	0.000000	0.000000	0.000000	0.055556	0.000000	0.000000	0.000000	0.111111
0.000000	0.055556							
0.018519	0.000000	0.000000	0.055556	0.037037	0.000000	0.000000	0.018519	0.000000
0.537037	0.018519	0.000000	0.000000	0.018519	0.000000	0.000000	0.000000	0.055556
0.000000	0.240741							

-----

## 11.6 Apéndice F: Secuencias usadas en este trabajo

Las secuencias de las proteínas que están demostradas que unen a eIF4E se encuentran en el Apéndice E1 y E2.

Secuencia	ID	Base de Datos
eIF4G_Physcomitrella patens	A9SMY7	UNIPROT
eIF4G_Arabidopsis lyrata	D7LRN0	UNIPROT
eIF4G_Thellungiella halophila	E4MYC8	UNIPROT
eIF4G_Ricinus communis	B9SKF9	UNIPROT
eIF4G_Glycine max	K7KEA2	UNIPROT
eIF4G_Arabidopsis thaliana	Q76E23	UNIPROT
eIF4G_Vitis vinifera	F6GVD5	UNIPROT
eIF4G_Medicago truncatula	G7LCH5	UNIPROT
eIF4G_Solanum lycopersicum	K4AYR0	UNIPROT
eIF4G_Populus trichocarpa	B9MV40	UNIPROT
eIF4G_Oryza sativa	B9FXV5	UNIPROT
eIF4G_Brachypodium distachyon	I1GTK0	UNIPROT
eIF4G_Triticum aestivum	G5CEW6	UNIPROT
eIF4G_Hordeum vulgare	M0X781	UNIPROT
eIF4G_Sorghum bicolor	C5XBH3	UNIPROT
eIF4G_Zea mays	K7TVC7	UNIPROT
LOX2_Arabidopsis thaliana	P38418	UNIPROT
LOX2_Arabidopsis lyrata	D7LNL7	UNIPROT
LOX2_Vitis vinifera	F6HB91	UNIPROT
LOX2_Ricinus communis	B9RI74	UNIPROT
LOX2_Glycine max	K7LPI4	UNIPROT
LOX2_Solanum lycopersicum	K4ASM0	UNIPROT
LOX2_Populus trichocarpa	B9GMA4	UNIPROT
LOX2_Oryza sativa	Q6H7Q6	UNIPROT
LOX2_Zea mays	Q06XS3	UNIPROT
LOX2_Brachypodium distachyon	I1HYA9	UNIPROT

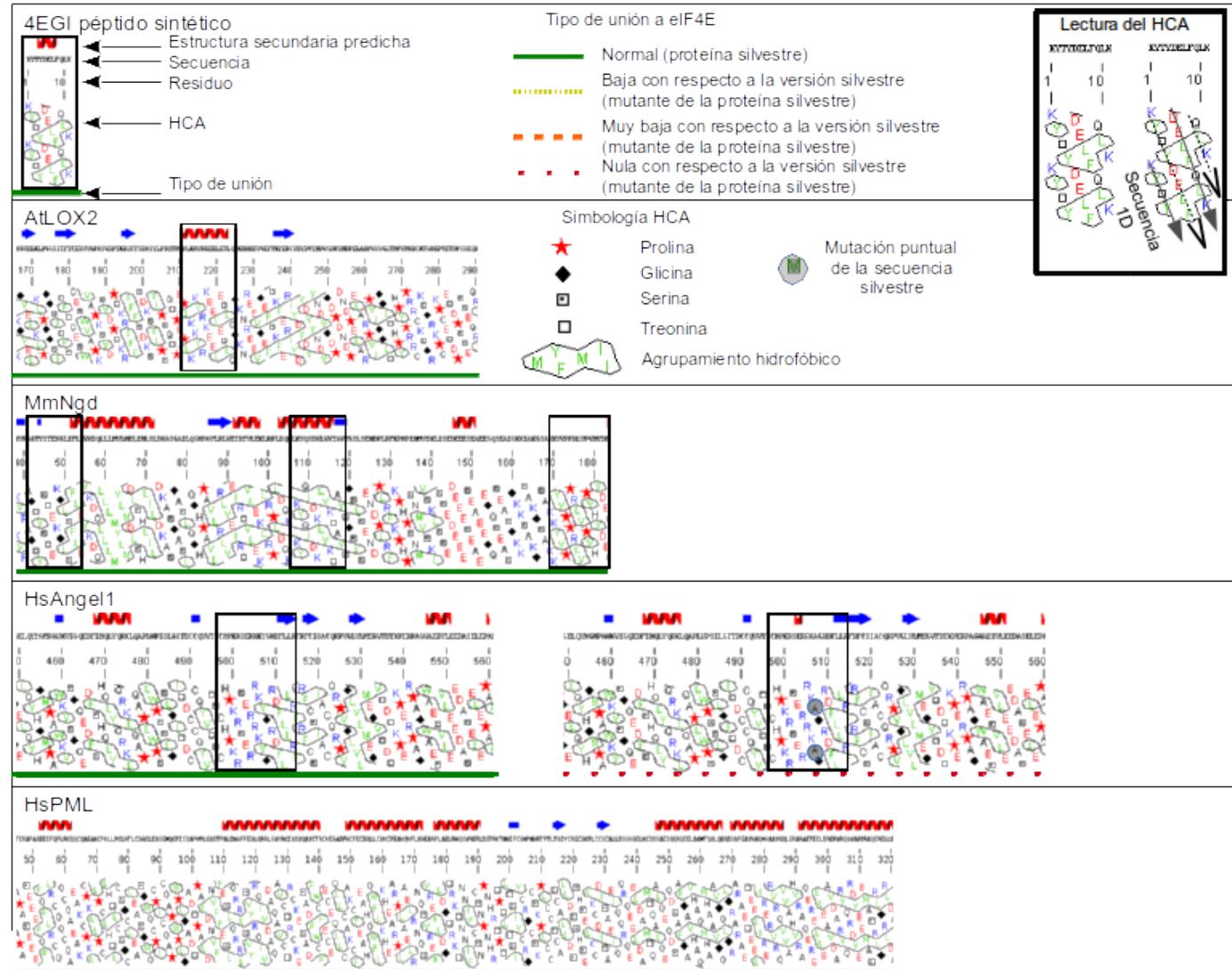
LOX2_Medicago truncatula	G7J629	UNIPROT
LOX2_Hordeum vulgare	F2E3N1	UNIPROT
LOX2_Physcomitrella patens	A9SEG6	UNIPROT
LOX2_Sorghum bicolor	C5YIS2	UNIPROT
LBL1_Zea mays	NP_001105989.1	NCBI
LBL1_Sorghum bicolor	XP_002443002.1	NCBI
LBL1_Hordeum vulgare	AK248770.1	NCBI
LBL1_Triticum aestivum	AAP80862.1	NCBI
LBL1_Brachypodium distachyon	XP_003578798.1	NCBI
LBL1_Oryza sativa	A2ZIW7.1	NCBI
LBL1_Arabidopsis thaliana	NP_197747.1	NCBI
LBL1_Arabidopsis lyrata	XP_002872063.1	NCBI
LBL1_Thellungiella halophila	BAJ34214.1	NCBI
LBL1_Lotus japonicus	ACN79519.1	NCBI
LBL1_Glycine max	XP_003523187.1	NCBI
LBL1_Medicago truncatula	XP_003602715.1	NCBI
LBL1_Populus trichocarpa	XP_002303167.1	NCBI
LBL1_Ricinus communis	XP_002518012.1	NCBI
LBL1_Vitis vinifera	XP_002267929.1	NCBI
LBL1_Solanum lycopersicum	NP_001234711.1	NCBI
LBL1_Physcomitrella patens	XP_001773905.1	NCBI
ARF24_Zea mays	HM004539.1	NCBI
MIR390a	MI0013209	miRBase

## 11.7 Apéndice G: Agrupamientos hidrofóbicos (HCAs) en el motivo de unión a eIF4E

Para la representación de los grupos espaciales hidrofóbicos (HCA), la secuencia de interés se muestra en diagonales descendentes pero de manera duplicada (la secuencia inicia a la mitad de la primer columna y continua desde la parte alta en la tercer columna; mientras que en la segunda columna inicia desde la parte alta y continua en la cuarta columna y así sucesivamente) (Gaboriaud et al. 1987; Woodcock et al. 1992; Mornon et al. 2002; Lieutaud et al. 2008). Dicha visualización permite que se puedan apreciar aminoácidos hidrofóbicos que estén separados uno de otro por cuatro aminoácidos pero que espacialmente puedan estar agrupados lo cual corresponde con las caras internas de estructuras secundarias regulares ( $\alpha$ -hélices y  $\beta$ -plegadas) (Gaboriaud et al. 1987; Woodcock et al. 1992).

Se buscaron los HCAs en la secuencia completa de las proteínas de unión a eIF4E y se comparó el patrón que se formaba en la zona reportada que es la responsable de unir a eIF4E (Figura 16 enmarcada con un cuadro negro), además se comparó si había algún patrón conforme se perdía la capacidad de unión de las proteínas con respecto a su versión silvestre. En ambos casos no fuimos capaces de observar patrón alguno.

**Figura 16. El motivo de unión a eIF4E no tiene un agrupamiento espacial hidrofóbico común.** HCAs del motivo (enmarcado en un recuadro negro) y sus zonas adyacentes de las proteínas que se ha comprobado su interacción directa con eIF4E (Tabla 6). La manera de representar los HCAs es a través de ubicar la secuencia de la proteína empezando por la mitad de la primer columna de manera descendente y continuando en la parte alta de las columnas impares (3,5,7,etc.); desde la parte alta de la segunda columna se anota la secuencia desde el primer aminoácido en forma descendente y se continúa anotando en las columnas pares (2,4,6,etc.). Esta manera de representarlo permite visualizar aminoácidos que no estén secuencialmente juntos pero si espacialmente. Los agrupamientos hidrofóbicos que se forman están contorneados. Aparte de comparar entre las diversas proteínas que unen a eIF4E (Tabla 6) observamos que no se ganaba ni perdía algún patrón común en las mutantes de esas proteínas de acuerdo al tipo de unión que mantenían con eIF4E con respecto a su versión silvestre (indicado debajo de cada HCA).



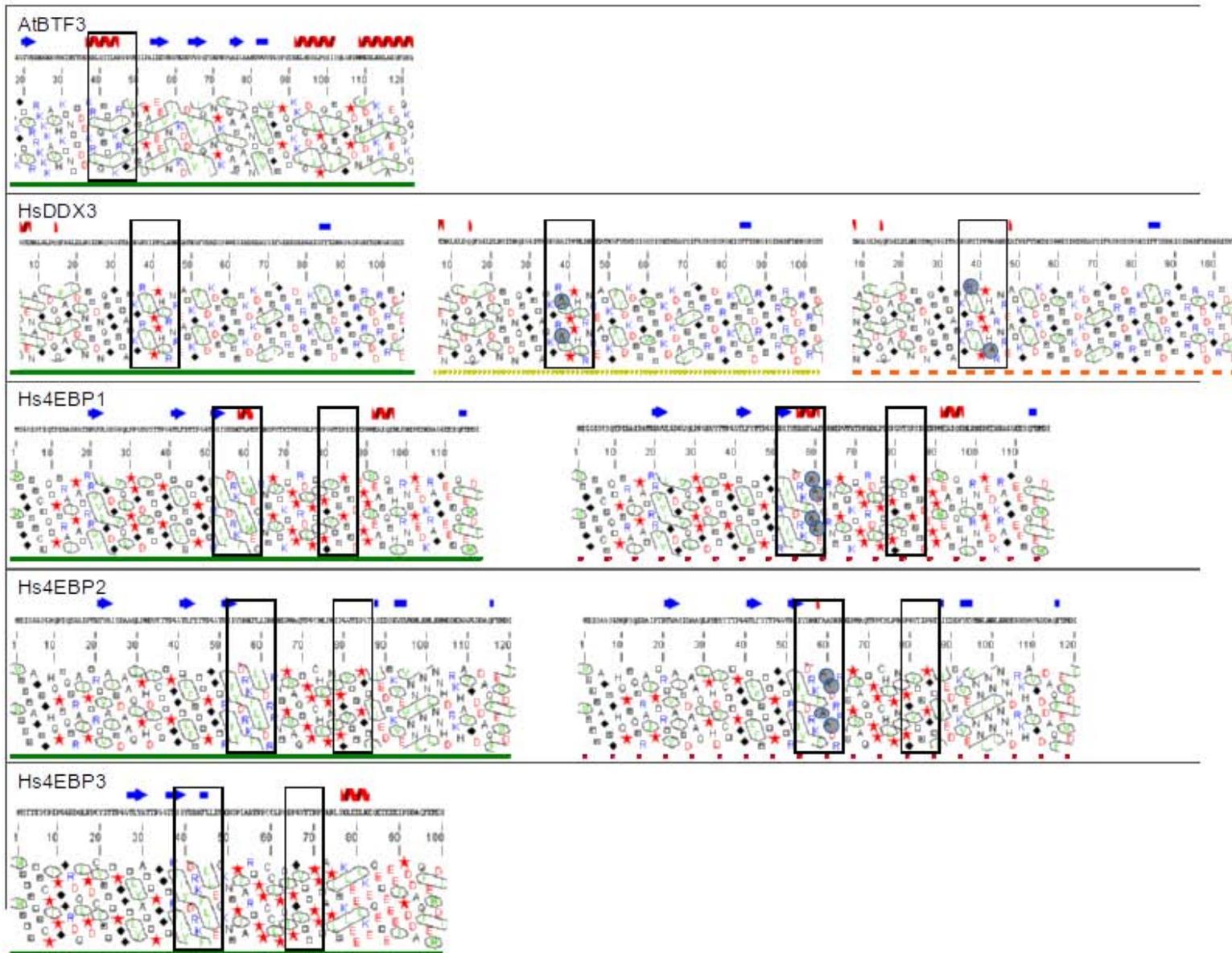


Figura 16. El motivo de unión a eIF4E no tiene un agrupamiento espacial hidrofóbico común (continuación).

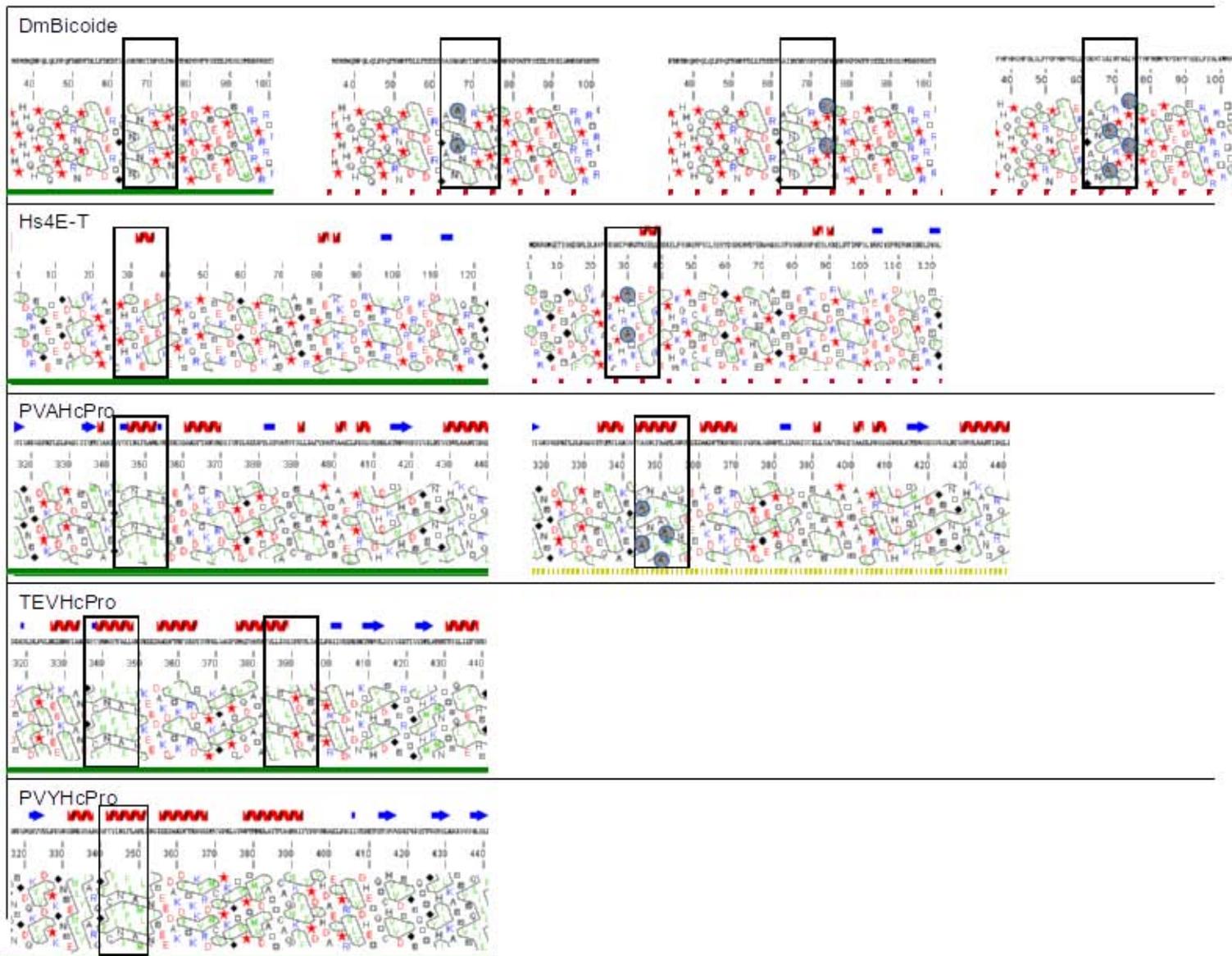


Figura 16. El motivo de unión a eIF4E no tiene un agrupamiento espacial hidrofóbico común (continuación).



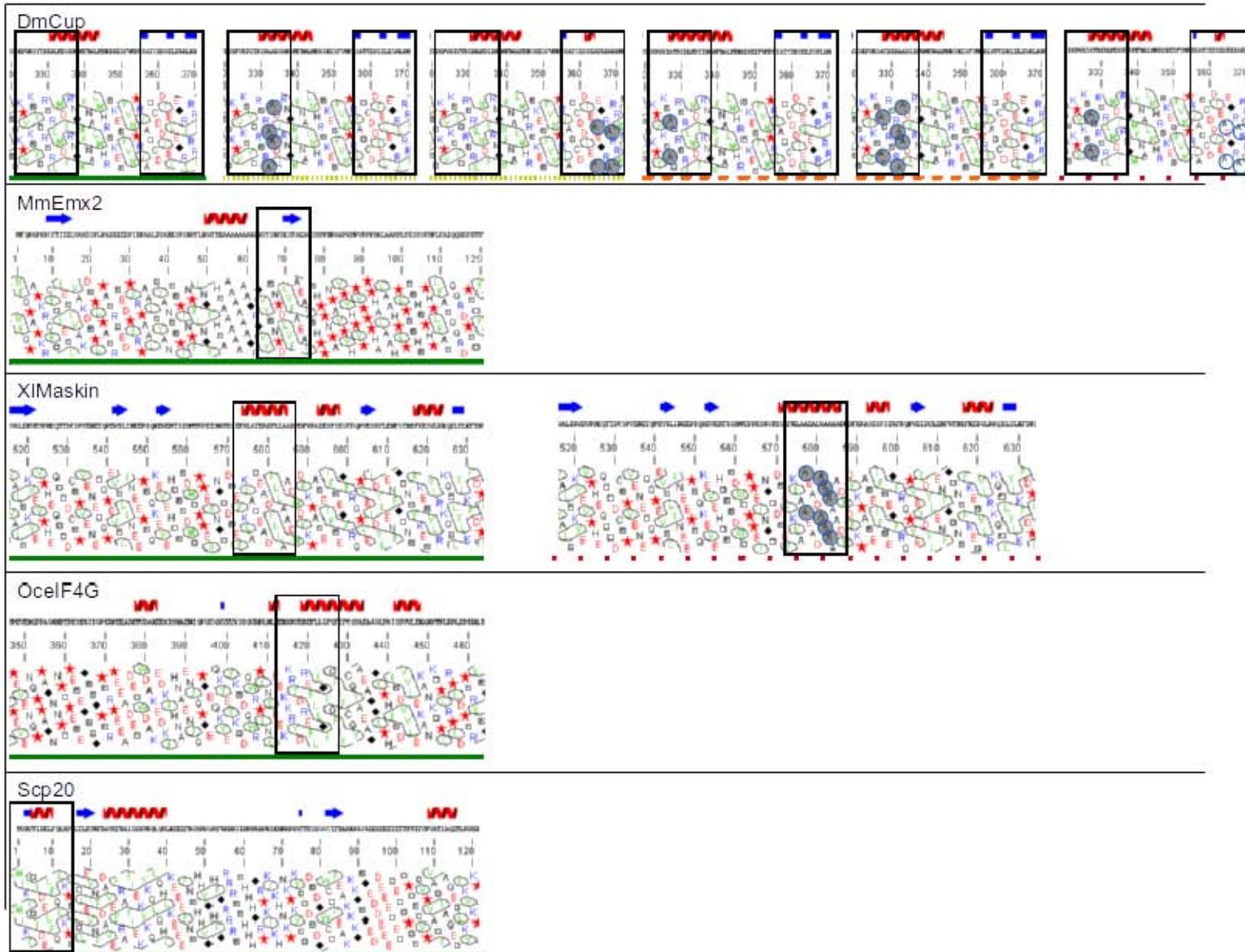


Figura 16. El motivo de unión a eIF4E no tiene un agrupamiento espacial hidrofóbico común (continuación).

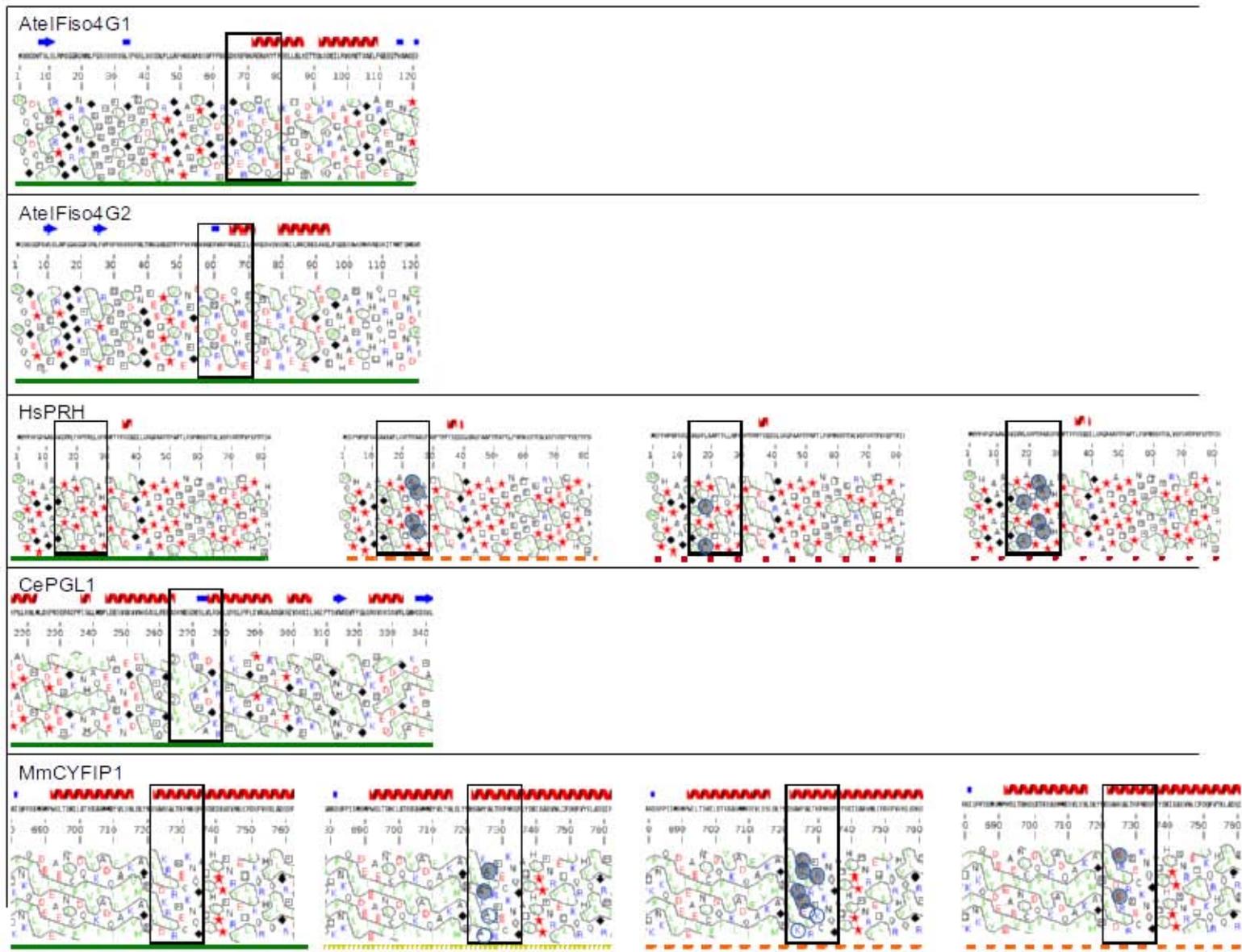


Figura 16. El motivo de unión a eIF4E no tiene un agrupamiento espacial hidrofóbico común (continuación).

## 12 Literatura citada

- Adenot, X. et al., 2006. DRB4-dependent TAS3 trans-acting siRNAs control leaf morphology through AGO7. *Current biology : CB*, 16(9), pp.927–32.
- Ahmad, A., Zhang, Y. y Cao, X.-F., 2010. Decoding the epigenetic language of plant development. *Molecular plant*, 3(4), pp.719–28.
- Ala-Poikela, M. et al., 2011. Helper component proteinase of the genus Potyvirus is an interaction partner of translation initiation factors eIF(iso)4E and eIF4E and contains a 4E binding motif. *Journal of virology*, 85(13), pp.6784–94.
- Allen, E. et al., 2005. microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell*, 121(2), pp.207–21.
- Allen, E. y Howell, M.D., 2010. miRNAs in the biogenesis of trans-acting siRNAs in higher plants. *Seminars in cell y developmental biology*, 21(8), pp.798–804.
- Altmann, M. et al., 1997. A novel inhibitor of cap-dependent translation initiation in yeast: p20 competes with eIF4G for binding to eIF4E. *The EMBO journal*, 16(5), pp.1114–21.
- Amiri, A. et al., 2001. An isoform of eIF4E is a component of germ granules and is required for spermatogenesis in *C. elegans*. *Development (Cambridge, England)*, 128, pp.3899–3912.
- Axtell, M.J. et al., 2006. A two-hit trigger for siRNA biogenesis in plants. *Cell*, 127(3), pp.565–77.
- Baerenfaller, K. et al., 2012. Systems-based analysis of Arabidopsis leaf growth reveals adaptation to water deficit. *Molecular systems biology*, 8(606), p.606.
- Bailey, T.L. et al., 2009. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic acids research*, 37(Web Server issue), pp.W202–8.
- Bateman, A., 2002. The SGS3 protein involved in PTGS finds a family. *BMC Bioinformatics*, 3(21), pp.1–4.
- Baulcombe, D., 2004. RNA silencing in plants. *Nature*, 431(7006), pp.356–63.
- Besse, F. y Ephrussi, A., 2008. Translational control of localized mRNAs: restricting protein synthesis in space and time. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(12), pp.971–80.
- Bewley, J.D., 1997. Seed Germination and Dormancy. *The Plant cell*, 9(July), pp.1055–1066.
- Borsani, O. et al., 2005. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in Arabidopsis. *Cell*, 123(7), pp.1279–91.
- Chen, M., Lv, S. y Meng, Y., 2010. Epigenetic performers in plants. *Development, growth & differentiation*, 52(6), pp.555–66.

- Chen, X., 2012. Small RNAs in development - insights from plants. *Current opinion in genetics & development*, 22(4), pp.361–7.
- Chitwood, D.H. y Timmermans, M.C.P., 2010. Small RNAs are on the move. *Nature*, 467(7314), pp.415–9.
- Cho, P.F. et al., 2005. A new paradigm for translational control: inhibition via 5'-3' mRNA tethering by Bicoid and the eIF4E cognate 4EHP. *Cell*, 121(3), pp.411–23.
- Cohen, N. et al., 2001. PML RING suppresses oncogenic transformation by reducing the affinity of eIF4E for mRNA. *The EMBO journal*, 20(16), pp.4547–59.
- Dostie, J. et al., 2000. A novel shuttling protein, 4E-T, mediates the nuclear import of the mRNA 5' cap-binding protein, eIF4E. *The EMBO journal*, 19(12), pp.3142–56.
- Douglas, R.N. et al., 2010. ragged seedling2 Encodes an ARGONAUTE7-like protein required for mediolateral expansion, but not dorsiventrality, of maize leaves. *The Plant cell*, 22(5), pp.1441–51.
- Du, Z. et al., 2011. p2 of Rice stripe virus ( RSV ) interacts with OsSGS3 and is a silencing suppressor. *Molecular Plant Pathology*, pp.1–7.
- Dyballa, N. y Metzger, S., 2009. Fast and sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteins in polyacrylamide gels. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (30), pp.2–5.
- Elkashef, S. y Ding, S.-W., 2009. Possible new RNA intermediate in RNA silencing. *Nature chemical biology*, 5(5), pp.278–9.
- Elmayan, T. et al., 2009. A neomorphic sgs3 allele stabilizing miRNA cleavage products reveals that SGS3 acts as a homodimer. *The FEBS journal*, 276(3), pp.835–44.
- Ex, F. Van, Jacob, Y. y Martienssen, R.A., 2011. Multiple roles for sRNA during plant reproduction. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(5), pp.588–593.
- Fierro-Monti, I. et al., 2006. Quantitative proteomics identifies Gemin5, a scaffolding protein involved in ribonucleoprotein assembly, as a novel partner for eukaryotic initiation factor 4E. *Journal of proteome research*, 5(6), pp.1367–78.
- Fischer, P.M., 2009. Cap in hand. *Cell Cycle*, 8(August), pp.2535–2541.
- Freire, M. a et al., 2000. Plant lipoxygenase 2 is a translation initiation factor-4E-binding protein. *Plant molecular biology*, 44(2), pp.129–40.
- Freire, M.A., 2005. Translation initiation factor (iso) 4E interacts with BTF3, the beta subunit of the nascent polypeptide-associated complex. *Gene*, 345(2), pp.271–7.
- Gaboriaud, C. et al., 1987. Hydrophobic cluster analysis: an efficient new way to compare and analyse amino acid sequences. *FEBS letters*, 224(1), pp.149–55.
- Gasteiger, E. et al., 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In *John M. Walker (ed):*

*The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press. pp. 571–607.*

- Gebauer, F. y Hentze, M.W., 2004. Molecular mechanisms of translational control. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(10), pp.827–35.
- Glick, E. et al., 2008. Interaction with host SGS3 is required for suppression of RNA silencing by tomato yellow leaf curl virus V2 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(1), pp.157–61.
- Gosselin, P. et al., 2013. Tracking a refined eIF4E-binding motif reveals Angel1 as a new partner of eIF4E. *Nucleic acids research*, 41(16), pp.7783–92.
- Hunter, C. et al., 2006. Trans-acting siRNA-mediated repression of ETTIN and ARF4 regulates heteroblasty in *Arabidopsis*. *Development (Cambridge, England)*, 133(15), pp.2973–81.
- Imataka, H., Olsen, H.S. y Sonenberg, N., 1997. A new translational regulator with homology to eukaryotic translation initiation factor 4G. *The EMBO journal*, 16(4), pp.817–25.
- Jackson, R.J., Hellen, C.U.T. y Pestova, T. V., 2010. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(2), pp.113–27.
- Jauvion, V. et al., 2012. RDR2 Partially Antagonizes the Production of RDR6-Dependent siRNA in Sense Transgene-Mediated PTGS P. Meyer, ed. *PLoS ONE*, 7(1), p.e29785.
- Joshi, B. et al., 2005. Phylogenetic analysis of eIF4E-family members. *BMC evolutionary biology*, 5, p.48.
- Jouannet, V. et al., 2012. Cytoplasmic *Arabidopsis* AGO7 accumulates in membrane-associated siRNA bodies and is required for ta-siRNA biogenesis. *The EMBO Journal*, pp.1–10.
- Juarez, M.T., Kui, J.S., et al., 2004. microRNA-mediated repression of rolled leaf1 specifies maize leaf polarity. *Nature*, 428(March), pp.84–88.
- Juarez, M.T., Twigg, R.W. y Timmermans, M.C.P., 2004. Specification of adaxial cell fate during maize leaf development. *Development (Cambridge, England)*, 131(18), pp.4533–44.
- Jung, M.-Y., Lorenz, L. y Richter, J.D., 2006. Translational control by neuroguidin, a eukaryotic initiation factor 4E and CPEB binding protein. *Molecular and cellular biology*, 26(11), pp.4277–87.
- Kaikkonen, M.U., Lam, M.T.Y. y Glass, C.K., 2011. Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. *Cardiovascular research*, 90(3), pp.430–40.
- Katiyar-Agarwal, S. et al., 2006. A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(47), pp.18002–7.
- Kinkelin, K. et al., 2012. Crystal structure of a minimal eIF4E-Cup complex reveals a general mechanism of eIF4E regulation in translational repression. *RNA (New York, N.Y.)*, 18(9), pp.1624–34.
- Kumakura, N. et al., 2009. SGS3 and RDR6 interact and colocalize in cytoplasmic SGS3/RDR6-bodies. *FEBS*

*letters*, 583(8), pp.1261–6.

- Lam, P. et al., 2012. RDR1 and SGS3, components of RNA-mediated gene silencing, are required for the regulation of cuticular wax biosynthesis in developing inflorescence stems of *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 159(4), pp.1385–95.
- Lampheart, B.J. et al., 1995. Mapping of Functional Domains in Eukaryotic Protein Synthesis Initiation Factor 4G (eIF4G) with Picornaviral Proteases. *Journal of Biological Chemistry*, 270(37), pp.21975–21983.
- Lázaro-Mixteco, P. y Dinkova, T.D., 2012. Identification of Proteins from Cap-Binding Complexes by Mass Spectrometry During Maize (*Zea mays* L.) Germination. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 56(1), pp.36–50.
- Lellis, A.D. et al., 2010. Deletion of the eIFiso4G subunit of the *Arabidopsis* eIFiso4F translation initiation complex impairs health and viability. *Plant molecular biology*, 74(3), pp.249–63.
- Li, D. et al., 2013. Deep sequencing of maize small RNAs reveals a diverse set of microRNA in dry and imbibed seeds. *PLoS one*, 8(1), p.e55107.
- Lieutaud, P., Canard, B. y Longhi, S., 2008. MeDor: a metasever for predicting protein disorder. *BMC genomics*, 9 Suppl 2, p.S25.
- Mackow, E.R. et al., 1990. DNA amplification-restricted transcription-translation: Rapid analysis of rhesus rotavirus neutralization sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(January), pp.518–522.
- Mader, S. et al., 1995. The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins. *Molecular and cellular biology*, 15(9), pp.4990–7.
- Madin, K. et al., 2000. A highly efficient and robust cell-free protein synthesis system prepared from wheat embryos: plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(2), pp.559–64.
- Marcotrigiano, J. et al., 1999. Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G. *Molecular cell*, 3(6), pp.707–16.
- Marin, E. et al., 2010. miR390, *Arabidopsis* TAS3 tasiRNAs, and their AUXIN RESPONSE FACTOR targets define an autoregulatory network quantitatively regulating lateral root growth. *The Plant cell*, 22(4), pp.1104–17.
- Martínez-Salas, E. et al., 1993. A single nucleotide substitution in the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus leads to enhanced cap-independent translation in vivo. *Journal of Virology*, 67(7), pp.3748–55.
- Mayberry, L.K. et al., 2007. Expression and Purification of Recombinant Wheat Translation Initiation Factors

- eIF1, eIF1A, eIF4A, eIF4B, eIF4F, eIF(iso)4F, and eIF5. In J. L. B. T.-M. in *Enzymology*, ed. *Translation Initiation: Reconstituted Systems and Biophysical Methods*. Academic Press, pp. 397–408.
- Mecchia, M. a et al., 2012. MicroRNA miR396 and RDR6 synergistically regulate leaf development. *Mechanisms of development*, (August).
- Moerke, N.J. et al., 2007. Small-molecule inhibition of the interaction between the translation initiation factors eIF4E and eIF4G. *Cell*, 128(2), pp.257–67.
- Montgomery, T. a et al., 2008. Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. *Cell*, 133(1), pp.128–41.
- Mornon, J.-P. et al., 2002. Structural features of prions explored by sequence analysis I. Sequence data. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 59(8), pp.1366–1376.
- Mourrain, P. et al., 2000. Arabidopsis SGS2 and SGS3 Genes Are Required for Posttranscriptional Gene Silencing and Natural Virus Resistance. *Cell*, 101, pp.533–542.
- Muangsan, N. et al., 2004. Geminivirus VIGS of endogenous genes requires SGS2/SDE1 and SGS3 and defines a new branch in the genetic pathway for silencing in plants. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 38(6), pp.1004–14.
- Nagasaki, H. et al., 2007. The small interfering RNA production pathway is required for shoot meristem initiation in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(37), pp.14867–71.
- Nakamura, A., Sato, K. y Hanyu-nakamura, K., 2004. Drosophila Cup Is an eIF4E Binding Protein that Associates with Bruno and Regulates oskar mRNA Translation in Oogenesis. *Developmental Cell*, 6, pp.69–78.
- Napoli, I. et al., 2008. The fragile X syndrome protein represses activity-dependent translation through CYFIP1, a new 4E-BP. *Cell*, 134(6), pp.1042–54.
- Nédélec, S. et al., 2004. Emx2 homeodomain transcription factor interacts with eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) in the axons of olfactory sensory neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(29), pp.10815–20.
- Nelson, M.R., Leidal, A.M. y Smibert, C. a, 2004. Drosophila Cup is an eIF4E-binding protein that functions in Smaug-mediated translational repression. *The EMBO journal*, 23(1), pp.150–9.
- Nguyen, T.N. y Goodrich, J. a, 2006. Protein-protein interaction assays: eliminating false positive interactions. *Nature methods*, 3(2), pp.135–9.
- Niessing, D., Blanke, S. y Jäckle, H., 2002. Bicoid associates with the 5'-cap-bound complex of caudal mRNA and represses translation. *Genes & development*, 16(19), pp.2576–82.
- Nogueira, F.T.S. et al., 2009. Regulation of small RNA accumulation in the maize shoot apex. *PLoS genetics*,

5(1), p.e1000320.

- Nogueira, F.T.S. et al., 2007. Two small regulatory RNAs establish opposing fates of a developmental axis. *Genes & development*, 21(7), pp.750–5.
- Nogueira, F.T.S. y Timmermans, M.C.P., 2007. An Interplay Between Small Regulatory RNAs Patterns Leaves. *Plant Signaling & Behavior*, 2(6), pp.519–521.
- Padilla-Noriega, L. et al., 1995. Identification of two independent neutralization domains on the VP4 trypsin cleavage products VP5\* and VP8\* of human rotavirus ST3. *Virology*, 206, pp.148–154.
- Paku, K.S. et al., 2012. A conserved motif within the flexible C-terminus of the translational regulator 4E-BP is required for tight binding to the mRNA cap-binding protein eIF4E. *The Biochemical journal*, 441(1), pp.237–45.
- Parent, J.-S., Martínez de Alba, A.E. y Vaucheret, H., 2012. The origin and effect of small RNA signaling in plants. *Frontiers in plant science*, 3(August), p.179.
- Peragine, A. et al., 2004. SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes & development*, 18(19), pp.2368–79.
- Rajeswaran, R. et al., 2012. Sequencing of RDR6-dependent double-stranded RNAs reveals novel features of plant siRNA biogenesis. *Nucleic acids research*, 40(13), pp.6241–6254.
- Rajeswaran, R. y Pooggin, M.M., 2012. RDR6-mediated synthesis of complementary RNA is terminated by miRNA stably bound to template RNA. *Nucleic acids research*, 40(2), pp.594–9.
- Rajjou, L. et al., 2012. Seed germination and vigor. *Annual review of plant biology*, 63, pp.507–33.
- Rhoads, R., 2009. eIF4E: new family members, new binding partners, new roles. *The Journal of biological chemistry*, 284(25), pp.16711–5.
- Richter, J.D. y Sonenberg, N., 2005. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature*, 433(7025), pp.477–80.
- Schmid, M. et al., 2005. A gene expression map of Arabidopsis thaliana development. *Nature genetics*, 37(5), pp.501–6.
- Schwab, R. y Voinnet, O., 2010. RNA silencing amplification in plants: size matters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(34), pp.14945–6.
- Sekhon, R.S. et al., 2011. Genome-wide atlas of transcription during maize development. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 66(4), pp.553–63.
- Shen, D. et al., 2009. Molecular phylogeny of miR390-guided trans-acting siRNA genes (TAS3) in the grass family. *Plant Systematics and Evolution*, 283(1-2), pp.125–132.
- Shih, J.-W. et al., 2008. Candidate tumor suppressor DDX3 RNA helicase specifically represses cap-dependent

- translation by acting as an eIF4E inhibitory protein. *Oncogene*, 27(5), pp.700–14.
- Sonenberg y Hinnebusch, 2009. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell*, 136(4), pp.731–45.
- Sonenberg, N. y Gingras, A., 1998. The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. *Current opinion in cell biology*, 10(2), pp.268–75.
- Stebbins-Boaz, B. et al., 1999. Maskin is a CPEB-associated factor that transiently interacts with eIF-4E. *Molecular cell*, 4(6), pp.1017–27.
- Timmermans, M.C.P. et al., 1998. Leafbladeless1 is required for dorsoventrality of lateral organs in maize. *Development (Cambridge, England)*, 125(15), pp.2813–23.
- Topisirovic, I. et al., 2011. Cap and cap-binding proteins in the control of gene expression. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 2(2), pp.277–98.
- Topisirovic, I. et al., 2003. The proline-rich homeodomain protein, PRH, is a tissue-specific inhibitor of eIF4E-dependent cyclin D1 mRNA transport and growth. *The EMBO journal*, 22(3), pp.689–703.
- Umenaga, Y. et al., 2011. Identification and function of the second eIF4E-binding region in N-terminal domain of eIF4G: comparison with eIF4E-binding protein. *Biochemical and biophysical research communications*, 414(3), pp.462–7.
- Usami, T. et al., 2009. The more and smaller cells mutants of *Arabidopsis thaliana* identify novel roles for SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE genes in the control of heteroblasty. *Development (Cambridge, England)*, 136(6), pp.955–64.
- Vaucheret, H., 2005. MicroRNA-dependent trans-acting siRNA production. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, 2005(300), p.pe43.
- Vazquez, F. et al., 2003. Arabidopsis HEN1: A Genetic Link between Endogenous miRNA Controlling Development and siRNA Controlling Transgene Silencing and Virus Resistance. *Current Biology*, 13, pp.843–848.
- Vazquez, F. et al., 2004. Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of Arabidopsis mRNAs. *Molecular cell*, 16(1), pp.69–79.
- Villaescusa, J.C. et al., 2009. Cytoplasmic Prep1 interacts with 4EHP inhibiting Hoxb4 translation. *PloS one*, 4(4), p.e5213.
- Walbot, V. y Evans, M.M.S., 2003. Unique features of the plant life cycle and their consequences. *Nature reviews. Genetics*, 4(5), pp.369–79.
- Woodcock, S., Moron, J.P. y Henrissat, B., 1992. Detection of secondary structure elements in proteins by hydrophobic cluster analysis. *Protein Eng.*, 5, pp.629–635.

- Wu, L., Mao, L. y Qi, Y., 2012. Roles of DICER-LIKE and ARGONAUTE Proteins in TAS-Derived Small Interfering RNA-Triggered DNA Methylation. *Plant physiology*, 160(2), pp.990–9.
- Xia, R. et al., 2012. Apple miRNAs and tasiRNAs with novel regulatory networks. *Genome biology*, 13(6), p.R47.
- Xie, M., Ren, G., Costa-Nunes, P., et al., 2012. A subgroup of SGS3-like proteins act redundantly in RNA-directed DNA methylation. *Nucleic acids research*, 40(10), pp.4422–31.
- Xie, M., Ren, G., Zhang, C., et al., 2012. The DNA- and RNA-binding protein FACTOR of DNA METHYLATION 1 requires XH domain-mediated complex formation for its function in RNA-directed DNA methylation. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 72(3), pp.491–500.
- Xie, Z. y Qi, X., 2008. Diverse small RNA-directed silencing pathways in plants. *Biochimica et biophysica acta*, 1779(11), pp.720–4.
- Xing, H. et al., 2011. Genome-wide identification and expression profiling of auxin response factor (ARF) gene family in maize. *BMC genomics*, 12(1), p.178.
- Xu, L. et al., 2006. Genetic interaction between the AS1-AS2 and RDR6-SGS3-AGO7 pathways for leaf morphogenesis. *Plant & cell physiology*, 47(7), pp.853–63.
- Yan, J. et al., 2010. The REDUCED LEAFLET genes encode key components of the trans-acting small interfering RNA pathway and regulate compound leaf and flower development in *Lotus japonicus*. *Plant physiology*, 152(2), pp.797–807.
- Yifhar, T. et al., 2012. Failure of the Tomato Trans-Acting Short Interfering RNA Program to Regulate AUXIN RESPONSE FACTOR3 and ARF4 Underlies the Wiry Leaf Syndrome. *The Plant cell*, 24(9), pp.3575–89.
- Yoffe, Y. et al., 2009. Evolutionary changes in the Leishmania eIF4F complex involve variations in the eIF4E-eIF4G interactions. *Nucleic acids research*, 37(10), pp.3243–53.
- Yoshikawa, M. et al., 2005. A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes & development*, 19(18), pp.2164–75.
- Zhai, J. et al., 2011. MicroRNAs as master regulators of the plant NB-LRR defense gene family via the production of phased, trans-acting siRNAs. *Genes & development*, 25(23), pp.2540–53.
- Zhang, C., Li, G., et al., 2012. Identification of trans-acting siRNAs and their regulatory cascades in grapevine. *Bioinformatics*, 28(20), pp.2561–2568.
- Zhang, C., Ng, D.W.-K., et al., 2012. Roles of target site location and sequence complementarity in trans-acting siRNA formation in Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 69(2), pp.217–26.
- Zhang, D. y Trudeau, V.L., 2008. The XS domain of a plant specific SGS3 protein adopts a unique RNA recognition motif (RRM) fold. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 7(14), pp.2268–70.