



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Obtención y caracterización de mutantes homocigas
de un miembro de la familia eIF4E: nCBP (novel
Cap-Binding Protein) en *Arabidopsis thaliana*

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
Q U Í M I C O
P R E S E N T A :
ALAN ARTURO HIDALGO MEJÍA



MÉXICO, D. F.

2007



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.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Prof. Guadalupe Vélez Pratt
Vocal	Prof. Rogelio Rodríguez Sotres
Secretario	Prof. Tzvetanka Dimitrova Dinkova
1er. Suplente	Prof. Eduardo Bonilla Espinosa
2°. Suplente	Prof. Luis Tonatihut Sánchez Linares

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 103
Conjunto E, Facultad de Química. UNAM

Asesor



Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

Sustentante



Alan Arturo Hidalgo Mejía

AGRADECIMIENTOS

A Dios por guiarme, bendecirme y nunca dejarme a lo largo de mi vida; así como por otorgarme una “buena estrella” y un gran carisma que me han permitido salir adelante en todos problemas que se me han presentado.

A mi familia: mi papá, mi mamá y mi hermana por su gran amor, apoyo y confianza que me han brindado incondicionalmente y por creer siempre en mí. No hay palabras suficientes para agradecerles toda la sabiduría, los valores y, en especial, la humildad que me inculcaron; así como su paciencia, honestidad y generosidad con la que me trataron desde niño que hicieron de mí una gran persona. Por todo ese empeño, esperanza, fe y tiempo que me han invertido para ser lo que soy hoy en día y llegar hasta esta importante etapa en mi vida.

A mis abuelitos, tíos y primos que siempre me han apoyado en cada nueva etapa que emprendo y por sus palabras de aliento y cariño que siempre me han brindado.

A la UNAM, que me otorgó una gran educación desde que entré a la preparatoria hasta hoy en día, así como una gran visión cultural, social y científica del mundo que me rodea, creando dentro de mí nuevas expectativas, inquietudes y actitudes hacia la vida.

A la Dra. Tzvetanka D. Dinkova (Cesy) por darme la oportunidad de trabajar con ella. Por toda su paciencia, ayuda e interés que me brindó durante el desarrollo de esta tesis. No pude finalizar de mejor manera mi carrera que realizando mi tesis con ella. Es una extraordinaria doctora.

A la profesora Guadalupe Vélez y al Dr. Rogelio Rodríguez por sus valiosas observaciones y críticas constructivas realizadas a mi trabajo de tesis. También agradezco mucho a la Dra. Sobeida Sánchez por sus consejos, la motivación que me brindó y las charlas amenas que tuvimos desde que la conozco.

A mis amigos y compañeros del L-103. Primero que nadie a Kathia, quién me ayudó a elegir un gran laboratorio donde finalizar con éxito la licenciatura y por otorgarme incondicionalmente toda su confianza, apoyo moral y honestidad en todo tipo de circunstancias desde que nos conocimos. Katy, eres una verdadera amiga.

A Valeria por ser una excelente maestra conmigo (mucho muy paciente, respetuosa, honesta y eficiente) al enseñarme a trabajar dentro del laboratorio, brindándome muchos consejos y trucos. Val, realmente agradezco tu infinito apoyo y amistad y la gran fortaleza que me diste en cada experimento que realicé aunque no fuese exitoso al primer intento.

A Carlos, cuya amistad y ayuda que me diste (en especial en el campo de la biología y fisiología vegetal) fue muy importante para mí. Eres una gran persona y un excelente amigo, agradezco cada una de tus críticas (siempre constructivas) y consejos para mejorar, replantear y dilucidar muchos aspectos respecto a mi proyecto de tesis.

A Susana por ser tan objetiva y honesta conmigo, por todas tus interesantes propuestas y críticas realizadas a mi trabajo, así como el gran apoyo que me brindaste en los seminarios y para la redacción de mi tesis. Muchas gracias Susy, no pudo quedar en mejores manos mi proyecto que en las tuyas.

A Margarita, Yazmín y César Aguirre, por los buenos momentos que pasamos en el laboratorio, por permitirme conocerlos mejor y por todo el apoyo que me han brindado. Son personas maravillosas y grandes químicos que estoy seguro lograrán todo lo que se propongan.

A César David, Julissa y Sara por sus valiosos consejos y por la ayuda que me otorgaron al realizar ciertos experimentos. También agradezco a Norma, Edson, Eder, Verónica, Esteban, Héctor y Augusto por su compañerismo en el laboratorio.

Agradezco también al Dr. Martín Vargas por todas las atenciones que tuvo conmigo y por sus consejos, al igual que al Maestro Raúl y a varios compañeros del conjunto E: Laura, Goyo, Yuridia, Claudia, Karla, Rodrigo, Ernesto, Alina, Félix y Alex.

Agradezco muchísimo a todos mis amigos y compañeros, en especial de la Facultad de Química, por su gran amistad, motivación, trabajo en equipo y sinceridad que me brindaron en todo tipo de circunstancias. Gracias: Nadia, Marlem, Paulina, Mariana, Ismael, Gerardo, Uriel, Elizabeth, Laura, Ninive, Gina, Edgar, Jorge, Adriana, Alfonso, Selene, Athziri, Chuy, Alejandro, Alejandra, Hilda, Cecilia, Jesús, Tania, Diana, Elisa, Moises, Karen, Miriam, Enrique, Rosario, Sandra, Manuel, Néstor, Rebeca, Daniel, Paola, Ariel, Ernesto, Pily, Rudy, Verónica, Ángel, Víctor, Esteban, Yazmín, Priscilla, Zoila, Alexandra, María, Cristian, Karla, Ruben, Deny, Chela, Fernando, Edith, Claudia, Alma, Gaby, Ramón, "Juanito", Diego, Sarasuadi, Erika, Lilian, Marco, Héctor, Mauricio, Zulema, Juan Carlos, Bianca, Ileana, Ana, Grecia, Kyoko, Beto, Tony, Daniela, Viridiana, Abigail, Bety, Alonso, Iván, David, Liliana, Rocío, entre muchos otros.

Quiero agradecer especialmente a Jessica, quien siempre ha sido conmigo una amiga honesta, leal, confiable y emotiva con la que he compartido un gran número de cosas y cuya amistad me abrió las puertas para conocer a mucha gente valiosa dentro de la Facultad y fuera de ella. Mil gracias por todo Jessy, ¡es todo un tesoro tu amistad para mí!

Agradezco que este proyecto fuera apoyado por CONACYT 46339-Q, así como por la beca que me otorgó, y PAPIIT IN208006.

ÍNDICE

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	3
II. ANTECEDENTES	6
II.1. Generalidades del proceso de traducción	
II.2. Diferencias entre los procesos de traducción en procariotes y eucariotes	9
II.2.1. Etapa de iniciación	11
II.2.2. Etapa de elongación	13
II.2.3. Etapa de terminación	
II.2.4. Inicio de la traducción en eucariotes	14
II.3.1. La familia eIF4E y su importancia en el inicio de la traducción	16
II.3.2. Familia eIF4E en plantas	19
II.4. La proteína nCBP (novel Cap-Binding Protein) y sus ortólogos	23
II.5. <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo vegetal para el estudio de la expresión y caracterización de genes en plantas	27
II.6. Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> por inserción de T-DNA	31
III. JUSTIFICACIÓN	35
IV. HIPÓTESIS	
V. OBJETIVOS	36
V.1. Objetivo general	
V.2. Objetivos particulares	
VI. MATERIAL Y METODOLOGÍA	37
VI.1. Material biológico	
VI.1.1. Siembra de semillas	

VI.1.2. Tratamiento de cada generación filial de plantas de <i>A. thaliana</i> WT y mutantes nCBP -/-	38
VI.2. Obtención del DNA	39
VI.2.1. Extracción de DNA para análisis genotípico	
VI.2.2. Extracción de DNA para la técnica de Southern blot	40
VI.3. Obtención de RNA total	41
VI.3.1. Extracción de RNA total de plántulas, hojas, pecíolos, raíces y flores de <i>A. thaliana</i>	
VI.3.2. Extracción de RNA total proveniente de silicuas y semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	42
VI.4. Cuantificación de ácidos nucleicos	43
VI.5. Amplificación del DNA	44
VI.5.1. PCR	
VI.5.2. RT-PCR	45
VI.6. Southern blot	46
VI.6.1. Obtención de sondas por purificación de bandas de PCR a partir de geles de agarosa	
VI.6.2. Digestión de DNA genómico para Southern blot	
VI.6.3. Transferencia, hibridación y revelado de la membrana para Southern blot	47
VI.7. Extracción de clorofila total de plantas de <i>A. thaliana</i>	48
VII. RESULTADOS	49
VII.1. Identificación de mutantes nCBP -/-	
VII.1.1. Análisis a nivel de DNA	
VII.1.1.1. Identificación de mutantes mediante PCR	
VII.1.1.2. Análisis mediante Southern blot	53
VII.1.2. Análisis a nivel de RNA mediante la técnica de RT-PCR	56
VII.2. Caracterización Fenotípica de plantas mutantes nCBP -/-	58
VII.2.1. Primera Caracterización	

VII.2.2. Segunda Caracterización	63
VII.2.3. Caracterización morfológica de las mutantes nCBP -/-	66
VII.2.3.1. Medición del radio de la roseta	67
VII.2.3.2. Medición del pecíolo de las hojas	
VII.2.3.3. Medición de la longitud y el ancho de las hojas	68
VII.2.3.4. Medición de la altura de la inflorescencia	69
VII.2.3.5. Medición de la clorofila total	70
VII.3. Expresión de nCBP y otros genes de la familia eIF4E durante el desarrollo de <i>Arabidopsis thaliana</i>	72
VII.3.1. Perfiles de expresión de los mRNAs de nCBP, eIF4E y eIF(iso)4E en <i>Arabidopsis thaliana</i>	
VII.3.1.1. Perfil de expresión de nCBP en <i>A. thaliana</i>	74
VII.3.1.2. Perfil de expresión de eIF4E en <i>A. thaliana</i>	75
VII.3.1.3. Perfil de expresión de eIF(iso)4E en <i>A. thaliana</i>	76
VII.3.2. Expresión de los factores eIF4E y eIF(iso)4E en plántulas mutantes nCBP -/- vs. plántulas silvestres de <i>Arabidopsis thaliana</i>	77
VII.3.2.1. Expresión del factor eIF4E en plántulas mutantes nCBP -/- vs. plántulas silvestres de <i>Arabidopsis thaliana</i>	
VII.3.2.2. Expresión del factor eIF(iso)4E en plántulas mutantes nCBP -/- vs. plántulas silvestres de <i>Arabidopsis thaliana</i>	78
VIII. DISCUSIÓN	80
IX. CONCLUSIONES	86
X. BIBLIOGRAFÍA	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación del Dogma Central de la Biología Molecular.	4
Figura 2. Código genético	7
Figura 3. Iniciación de la traducción en eucariotes.	15
Figura 4. Estructura del casquete (o Cap) 5' metilada del mRNA eucarionte.	17
Figura 5. Complejo de iniciación en plantas.	21
Figura 6. Fenotipo de la línea mutante <i>AtEIF(iso)4E-1</i> .	22
Figura 7. Alineamiento de las secuencias de 4EHP de <i>D. melanogaster</i> (d4EHP), humano (h4EHP), ratón (m4EHP), <i>X. laevis</i> (x4EHP), <i>C. elegans</i> (IFE-4) y <i>A. thaliana</i> (nCBP).	23
Figura 8. Fenotipo de mutantes en <i>C. elegans</i> de IFE-4.	25
Figura 9. El complejo d4EHP-Bicoid como modelo de represión en la traducción.	
Figura 10. Estructura tridimensional del sitio de unión a Cap de la proteína 4EHP humana (h4EHP) y su comparación con el factor eIF4E.	27
Figura 11. <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo de estudio.	30
Figura 12. Infección por parte de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> en plantas.	32
Figura 13. Ciclo de vida de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	39
Figura 14. Visualización de las bandas, como pares de bases (pbs), para identificar el tipo de mutación existente en cada individuo de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	50
Figura 15. Modelo del gen nCBP mutante.	
Figura 16. Gel de DNA.	51
Figura 17. Gel de PCR de las plantas mutantes nCBP.	
Figura 18. PCR control de mutantes nCBP de la F ₃ vs. plantas WT.	53
Figura 19. Esquema teórico de los sitios de restricción dentro del gen de nCBP.	54
Figura 20. Gel de digestión de los DNAs para realizar el Southern blot	
Figura 21. Southern blot.	55
Figura 22. Southern blot.	56
Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa de RNA total de plántulas nCBP	57
Figura 24. Gel de RT-PCR	

Figura 25. A la izquierda, planta mutante nCBP -/- y a la derecha planta WT en la fase vegetativa.	60
Figura 26. A la izquierda, planta mutante nCBP -/- y a la derecha planta WT en el inicio de la fase reproductiva de <i>A. thaliana</i> .	
Figura 27. Gráfico de la aparición de la inflorescencia en la primera caracterización.	61
Figura 28. Gráfico de la aparición de las silicuas en la primera caracterización.	
Figura 29. A la izquierda, plantas mutantes nCBP -/- y a la derecha plantas WT a los 99 días después de su transplantación a macetas.	62
Figura 30. Gráfico del deterioro de la roseta en la primera caracterización.	
Figura 31. Gráfico de la aparición de la inflorescencia en la segunda caracterización.	64
Figura 32. Gráfico de la aparición de las silicuas en la segunda caracterización.	
Figura 33. Gráfico del deterioro de la roseta en la segunda caracterización.	65
Figura 34. Mediciones realizadas en la roseta de las plantas caracterizadas.	66
Figura 35. Gráfico de la tendencia en el crecimiento de la roseta	67
Figura 36. Gráfico que muestra la tendencia en el crecimiento del pecíolo	68
Figura 37. Gráfico que muestra la tendencia del crecimiento en la longitud y ancho de las hojas de la roseta	69
Figura 38. Gráfico que muestra la tendencia del crecimiento en la longitud de la inflorescencia principal	70
Figura 39. Gráfico de la cantidad de clorofila total encontrada en hojas de roseta de plantas silvestres con respecto a las plantas nCBP -/- en <i>A. thaliana</i> .	71
Figura 40. Electroforesis en gel de agarosa del RNA total de diversos tejidos de plantas WT.	72
Figura 41. Gráfico de expresión del mRNA de la proteína nCBP en <i>Arabidopsis thaliana</i> silvestre disponible a partir de experimentos con microarreglos.	73
Figura 42. Perfil de expresión de la proteína nCBP en <i>A. thaliana</i> .	74
Figura 43. Perfil de expresión del factor <i>eIF4E</i> en <i>A. thaliana</i> .	75
Figura 44. Perfil de expresión del factor <i>eIF(iso)4E</i> en <i>A. thaliana</i> .	76
Figura 45. Perfil de expresión del factor <i>eIF4E</i> en plántulas de <i>A. thaliana</i> mutante nCBP -/- y silvestre.	78
Figura 46. Perfil de expresión del factor <i>eIF(iso)4E</i> en plántulas de <i>A. thaliana</i> mutante nCBP -/- y silvestre.	79

ABREVIATURAS

AcNa	Acetato de sodio
ATP	Adenosín trifosfato
DMF	Dimetilformamida
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	DNA complementario
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
eEF	Factores de elongación eucarióticos
eIF	Factores de iniciación eucarióticos
4EBP	4E Binding-Protein
4EHP	4E Homologous Protein
GDP	Guanosina difosfato
GTP	Guanosina trifosfato
DEPC	Diethyl pirocarbonato
kpbs	kilopares de bases
mRNA	RNA mensajero
MPM	Marcador de peso molecular
nCBP	novel Cap-Binding Protein (nueva proteína de unión a Cap)
pbs	Pares de bases
ORF	Región codificadora del mRNA
PABP	Proteína de unión a poly(A)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RF	Factores de liberación o terminación
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribosomal
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcriptasa reversa

S	Coeficiente de sedimentación
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SSC	Cloruro y citrato de sodio
T-DNA	DNA de transferencia
TOR	Blanco de rapamicina (Target Of Rapamycin)
tRNA	RNA de transferencia
UTR	Región no traducible del mRNA
WT	Silvestre (Wild-Type)
-/-	Mutación homóciga nula
Da	daltos
g	gramos
h	horas
L	litro
μL	microlitro
μg	microgramo
min	minutos
mL	mililitro
mg	miligramos
mV	milivolts
rpm	revoluciones por minuto
s	segundos
xg	unidad de fuerza centrífuga relativa (RFC o FCR)

RESUMEN

La traducción es el proceso mediante el cual la información contenida en el mRNA es decodificada para sintetizar alguna proteína. Dicho proceso es muy complejo debido a la interacción entre los distintos tipos de RNA, componentes ribosomales y factores proteicos en varios pasos secuenciales; lo que implica que requiere de mucha energía para que se lleve a cabo y, por tanto, debe estar regulado en concordancia con el estado metabólico de la célula.

La etapa de iniciación de la traducción en plantas está regulada por distintos factores de iniciación (eIFs) y, dependiendo de su función, pueden reclutar las subunidades ribosomales, reconocer los mRNAs, ayudar a transportar al RNA desde el núcleo al citoplasma, entre otras funciones. Entre estos factores, son de particular interés aquellos que pertenecen a la familia eIF4E, que se caracterizan por reconocer la estructura 5'Cap (7-metil GpppN en el extremo 5' del mRNA) para iniciar la traducción de los mensajes vía cap-dependiente. Las distintas proteínas conocidas de dicha familia en plantas superiores son: eIF4E, eIF(iso)4E y nCBP.

Estudios recientes han indicado que algunas de las proteínas eIF4E podrían participar en la regulación de la expresión genética bajo condiciones específicas de desarrollo o en respuesta a estrés por infección viral en plantas. En este trabajo, se obtuvieron mutantes homocigas nulas para uno de los miembros de dicha familia: nCBP; mediante la disrupción del gen que la codifica con la inserción de T-DNA. Se corroboró dicha mutación y, posteriormente, se caracterizó a las mutantes fenotípicamente con respecto a las plantas silvestres, encontrándose dos diferencias sutiles: la aparición tardía de la inflorescencia en plantas mutantes con respecto a las

silvestres (por 6 días) así como un rezago en la senescencia de la roseta en las mutantes comparada con la de rosetas de plantas silvestres.

El perfil de mRNA de nCBP mostró mayor expresión en las etapas tempranas del desarrollo (semilla, plántula, raíz), mientras que los perfiles obtenidos para los factores eIF4E y eIF(iso)4E indicaron que la expresión que presentan a lo largo del desarrollo de *A. thaliana* es muy similar entre sí, excepto en ciertos tejidos (como semilla y silicua). Esto indica que nCBP realiza una función particular en ciertos estadios del desarrollo en *A. thaliana*, a diferencia de los otros miembros de la familia eIF4E.

En conjunto, los resultados sugieren que nCBP es dispensable para el desarrollo y crecimiento de la *A. thaliana*, pero su función podría estar relacionada con la expresión de proteínas involucradas en el tiempo de floración o la redistribución de nutrientes de la roseta en *A. thaliana*.

I. INTRODUCCIÓN

El buen desarrollo, crecimiento y desempeño de una célula depende en gran medida de una buena regulación en su metabolismo, del transporte de moléculas, iones y nutrientes; de la transducción de señales, de sus mecanismos de defensa y de respuesta ante algún tipo de estrés, entre otros factores. Todo ello implica la participación principal de un tipo de biomoléculas: las proteínas; las cuales, pueden tener una función específica dentro de la célula, como: en su conformación estructural, en la catálisis de reacciones químicas (enzimas), en la movilidad celular (proteínas motoras), en el flujo de iones y moléculas pequeñas (transporte), en el reconocimiento y respuesta al entorno (señalización), y en el control de la actividad proteica (regulación) de distintos procesos. Por tanto, su estudio nos permite profundizar más en como un ser vivo mantiene regulada su homeostasis, su organización celular, así como su ciclo de vida.

Para comprender cómo es que de las cientos de miles de proteínas que existen en la naturaleza, sólo se encuentra una pequeña parte de ellas en ciertas células, el por qué hay cierto grado de homología entre las proteínas de plantas, animales y organismos unicelulares; el por qué ciertas proteínas están presentes sólo en determinadas etapas de crecimiento y desarrollo de los organismos; entre otras interrogantes, debemos conocer cómo es la regulación de la expresión de genes en la célula. Los genes son las unidades fundamentales, físicas y funcionales que dan origen a las proteínas, mediante el proceso global en el que la información codificada en el DNA (donde aquellos se localizan) es decodificada en las proteínas que caracterizan los diversos tipos de células. Éste flujo de información es conocido como Dogma Central de la Biología Molecular.

El Dogma Central de la Biología Molecular describe cómo la información genética logra manifestarse en proteínas funcionales a partir del DNA; para ello, se

ven implicados los siguientes procesos que favorecen a que se lleve a cabo de manera eficiente y muy controlada la expresión de los genes: la transcripción, que es la síntesis de RNA mensajero (mRNA) a partir de un molde de DNA y la traducción, que es la conversión de la información que proporciona el mRNA en una secuencia de aminoácidos que se convertirá en una proteína (figura 1).

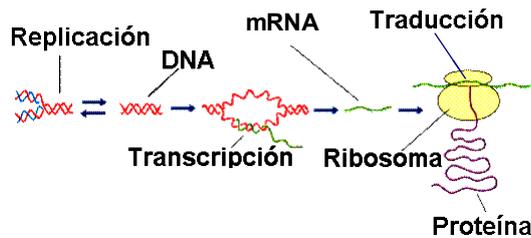


Figura 1. Representación del Dogma Central de la Biología Molecular. La información que contiene el DNA es transcrita al mRNA, el cual sale del núcleo para ser traducido a proteína en el citosol gracias a los ribosomas y a distintos factores proteicos que participan en la síntesis proteica (<http://www.efn.uncor.edu/dep/biologia/intrbiol/cendogma.gif>).

Tanto la transcripción como la traducción son procesos que requieren de una gran cantidad de energía para que puedan realizarse. La regulación de ambos procesos es necesaria para que la célula coordine perfectamente las síntesis de sólo aquellas proteínas que requiera en un momento dado. Éste control se puede llevar a cabo mediante la acción de ciertas proteínas y RNAs reguladores, además de aquellos que participan directamente en la decodificación de los genes (como las enzimas y factores transcripcionales y traduccionales). Todos estos factores están controlados mediante mecanismos como la modificación covalente y carga energética.

Todas las células de un organismo portan la misma información codificada en sus genes. No obstante, los mRNAs transcritos difieren entre las células de un organismo y las proteínas que las conforman. La regulación de la transcripción es reconocida como un evento esencial dentro de la expresión genética. Sin embargo, no todos los mRNAs transcritos son traducidos al mismo tiempo ni con igual eficiencia, lo cuál señala la relevancia de una regulación post-transcripcional.

Es de especial interés el control a nivel traduccional que la célula realiza, concretamente en la etapa de iniciación de la síntesis proteica, debido a los múltiples pasos secuenciales que conforman a dicho mecanismo, ofreciendo la posibilidad de coadyuvar el control de una respuesta eficaz ante diversos tipos de estímulos externos (como cambios ambientales, infección por virus, estímulos hormonales, etc.), sin la necesidad de involucrar la síntesis *de novo* de mRNAs de proteínas que son requeridas lo antes posible. La importancia de regular adecuadamente la etapa de iniciación reside en el hecho de que es más eficiente controlar un mecanismo al inicio; evitando así el desperdicio de energía, acumulación de intermediarios y reclutamiento de gran parte de la maquinaria traduccional. También, la regulación de ésta etapa puede inducir o reprimir selectivamente la traducción de ciertos mRNAs en determinados estadios del desarrollo en un organismo, así como en respuesta a distintos tipos de estrés ambientales y, a su vez, para tratar de explicar cómo y por qué ocurre la infección de cierto tipo de virus (como los *Potyvirus* que requieren de ciertos factores de iniciación traduccionales en plantas superiores para poder infectarlas) y la tumorigénesis en ciertos animales. Con todo lo antes explicado, podemos darnos cuenta de la importancia de la regulación de la expresión génica para la producción de proteínas que mantienen vivo a un organismo a lo largo de su ciclo de vida y frente a los cambios que ocurran en su entorno.

El inicio de la síntesis de proteínas, requiere del reconocimiento del mRNA que debe ser traducido así como el reclutamiento de las subunidades ribosomales y otros factores proteicos. Las proteínas o factores de inicio traduccionales (eIFs) son capaces de realizar dicha labor. El reconocimiento de los mRNAs se da a partir de la interacción de la estructura “Cap” (ubicada en el extremo 5’) con los factores pertenecientes a la familia eIF4E. Dicha interacción impide la degradación del mensajero, brindándole mayor estabilidad y permite el reclutamiento de otros

factores de inicio traduccionales así como de la subunidad ribosomal 40S para completar así el inicio del proceso de traducción.

El presente trabajo pretende indagar en la posible función que tiene una proteína que tiene relación con la familia del factor de inicio traduccional eIF4E, en plantas. Ésta proteína, llamada novel Cap-Binding Protein (nCBP), ha sido poco estudiada y podría estar involucrada en el reconocimiento de la estructura Cap de los mRNAs, para su posterior decodificación ya sea en un polipéptido o en una proteína como tal, en alguna etapa del desarrollo de las plantas; o bien, podría ser una proteína que cumple una función reguladora dentro del inicio de la traducción, bajo alguna condición dada en plantas superiores.

II. ANTECEDENTES

II.1. Generalidades del proceso de traducción.

La síntesis de proteínas es comúnmente conocida como traducción debido a que la información presente como una secuencia de nucleótidos (equivalente a 4 letras) proveniente de los ácidos nucleicos, se “traduce” a un lenguaje diferente (de 20 letras): la secuencia de aminoácidos de una proteína (Stryer et al., 2003). Este complejo proceso está mediado por la interacción coordinada de más de 100 macromoléculas, incluyendo los distintos tipos de RNA, aminoacil-tRNA sintetasas y otros factores proteicos. Dado que las proteínas contienen por regla general de 100 a 1000 aminoácidos, la frecuencia con la que se incorpora un aminoácido incorrecto en el curso de la síntesis proteica debe ser menor de 10^{-4} (Stryer et al., 2003). Como la mayoría de las actividades biológicas son realizadas por proteínas, el ensamblaje de los aminoácidos en el orden correcto es crítico para la producción de proteínas funcionales y, por tanto, para el funcionamiento correcto de células y organismos (Lodish et al., 2006).

El lenguaje genético que fue transcrito del DNA al mRNA necesita ser descifrado por la maquinaria traduccional a partir de la siguiente premisa: el código genético emplea una “clave” de 3 letras, la cual permite $4^3 = 64$ permutaciones, o “palabras”, que son suficientes para codificar tanto a los 20 aminoácidos como a las señales de inicio y paro de la síntesis de proteínas, equivalentes a la puntuación (Devlin, 1999). Estas palabras de tres bases se denominan codones y se representan en general como se muestra en la figura 2.

		Segunda posición				
		U	C	A	G	
Primera posición (extremo 5')	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA Stop UAG Stop	UGU } Cys UGC } UGA Stop UGG Trp	U C A G
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G
	A	AUU } AUC } Ile AUA } AUG Met	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G
						Tercera posición (extremo 3')

Figura 2. Código genético. Los codones de terminación de la síntesis de proteína, se muestran en color naranja, y el codón de comienzo habitual, AUG, en verde oscuro. Otros codones de comienzo, que rara vez se emplean, se indican en color verde claro (Mathews et al., 2003).

La multiplicidad de codones para un aminoácido es una muestra de la degeneración del código. Asimismo, cabe destacar que el código genético es casi universal, lo que implica que el mismo código de letras es utilizado en todos los organismos vivos, procariotes y eucariotes (Devlin, 1999). Los codones son reconocidos por los anticodones, es decir, las secuencias complementarias que se

encuentran en uno de los bucles que conforman a los tRNAs, responsables del reconocimiento, transferencia y adición de los 20 aminoácidos de manera específica para la elongación de la cadena polipeptídica durante la traducción.

La traducción es un proceso muy complejo, que ocurre en tres etapas:

- 1. Iniciación:** implica el reconocimiento y estabilización del mRNA por parte del complejo de preiniciación; reclutamiento de la maquinaria traduccional (subunidades ribosomales, más otros factores de iniciación); rastreo del codón de inicio, que será reconocido por un tRNA específico en el sitio P de la subunidad ribosómica menor, para comenzar la síntesis de la cadena polipeptídica.
- 2. Elongación:** involucra la adición ordenada de los aminoácidos, según lo expresado en el mRNA, para formar la cadena polipeptídica gracias a la interacción de los factores de elongación (EF) con los aminoacil-tRNAs en el ribosoma. La lectura del mRNA por parte del ribosoma, se realiza del extremo 5' al 3', lo que implica que la formación de la cadena polipeptídica siempre procede desde el extremo $-\text{NH}_3^+$ al $-\text{COO}^-$ terminal.
- 3. Terminación:** ocurre cuando el ribosoma llega a uno de los tres codones especiales de terminación o alto, los cuales no especifican aminoácido alguno, lo cual promueve la escisión de la cadena peptídica del tRNA en el sitio P, la liberación de los tRNAs y las dos subunidades ribosómicas (Lodish et al., 2006).

Cabe destacar que la formación del enlace peptídico requiere alrededor de $\frac{1}{20}$ de segundo, de manera que una proteína con tamaño promedio de 360 aminoácidos se completa en 18 segundos aproximadamente (Villée et al., 1996). El costo energético para la síntesis por mol de enlace peptídico es de 160 kJ/mol, + 20 kJ/mol. Teniendo en cuenta el cambio de energía libre que se requiere para

formar un enlace peptídico en disoluciones acuosas diluidas, el gasto de energía parece excesivo (Mathews et al., 2002); pero es justificado, tomando en cuenta la necesidad de elaboración específica de las secuencias proteicas. También, es importante mencionar que una molécula de mRNA puede dar lugar a múltiples moléculas de proteína (traducción eficiente). Las modificaciones postraduccionales pueden también añadirse al costo energético y tal vez habría que tomar en cuenta la energía necesaria para la biosíntesis del mRNA, tRNA, ribosomas y factores proteicos, aunque estos costos están distribuidos entre todas las proteínas formadas durante su período de existencia (Devlin, 1999).

Las proteínas recién formadas sufren a menudo procesos de maduración y modificaciones postraduccionales. Tales modificaciones modulan la actividad de la proteína e, incluso, pueden marcarla para que ésta pueda ser transportada a diferentes sitios dentro de la célula o secretada al exterior de la misma. Estos complejos procesos se llevan a cabo con una gran rapidez y precisión. Los niveles de traducción se regulan tanto de manera global como para cada proteína específica. Finalmente, cuando la proteína ya no se precisa o se convierte en no funcional, ésta es degradada y sus aminoácidos pueden ser reciclados para formar nuevas proteínas (Devlin, 1999).

II.2. Diferencias entre los procesos de traducción en procariotes y eucariotes

Las diferencias principales que existen en el proceso de traducción de los procariotes y eucariotes son las siguientes:

- ***Localización del proceso de traducción.*** En los organismos procariotes, la ausencia de núcleo permite que la traducción esté acoplada a la transcripción, por lo que la síntesis de proteínas se inicia en los mRNAs que

aún están siendo transcritos. En eucariotes, la transcripción ocurre dentro del núcleo, mientras que la síntesis de proteínas se lleva a cabo en el citoplasma, por lo que ambos procesos están desacoplados espacial y temporalmente (Sánchez de Jiménez et al., 2005).

- **El ribosoma.** Los ribosomas de los procariotes, poseen un coeficiente de sedimentación de 70S y una masa de aproximadamente 2.3×10^6 Da. Están formados por dos subunidades, una pequeña de 30S, la cual está formada por un rRNA 16S (1542 residuos de longitud) y posee 21 proteínas diferentes; y la subunidad grande de 50S la cual está formada por dos rRNA 23S y 5S (de 2904 y 120 residuos respectivamente) y posee 31 proteínas diferentes. Pero en los eucariotes, el ribosoma y sus subunidades son más grandes. Las subunidades 40S y 60S se combinan para formar el ribosoma 80S. La subunidad mayor 60S contiene tres rRNAs: 28S (26S en levaduras), 5S y 5.8S (Woll et al., 1996); el último de los cuáles no tiene equivalencia en los procariotas. La subunidad menor contiene un rRNA 18S y ambas subunidades contienen más proteínas que las correspondientes de los procariotes (Mathews et al., 2002).
- **El mRNA.** Mientras el mRNA procariote es policistrónico, es decir, puede codificar más de una proteína o cadena peptídica, el mRNA eucariote es monocistrónico, ya que sólo codifica una cadena polipeptídica o proteína. Así mismo, el mRNA eucariote tiene que ser procesado antes de ser exportado al citoplasma celular, lo cual se realiza por medio de una estructura denominada Cap (7-metil GpppN, donde N es cualquier nucleótido) en el extremo 5', así como una cola de poliadeninas (poliA) en el extremo 3'. Ambas estructuras le dan protección al mRNA para no ser degradado por acción de las nucleasas, al igual que capacidad de ser reconocido por la maquinaria traduccional. Dichas modificaciones podrían explicar el hecho de

que la vida media de los mRNAs eucarióticos oscila de 30 min a 24 h, mientras que los procarióticos su promedio de vida media es de 2 min (Villée et al., 1996). El pre-mRNA es el mRNA recién sintetizado y no modificado (presente sólo en eucariotes), el cual, tiene que ser procesado mediante un mecanismo llamado corte y empalme (splicing) del RNA; esto es, la escisión interna del transcrito para eliminar los intrones (secuencias *intermedias* que no codifican para la proteína), seguida por la ligación de los exones codificadores (Lodish et al., 2006). Este último proceso no se lleva a cabo en procariotes debido a que su mRNA no contiene intrones.

- **Factores traduccionales:** Existe una notable diferencia en la cantidad de factores tanto de inicio, elongación y terminación de la traducción que se encuentran en procariotes y eucariotes, así como de las funciones que pueden llevar a cabo estos en el control y regulación de la síntesis de proteínas. Dichas diferencias serán descritas con detalle posteriormente.

A continuación se describen las diferentes etapas de la traducción en organismos procariotes y eucariotes.

II.2.1. Etapa de iniciación

En procariotes, además del mRNA, los ribosomas y las moléculas específicas de tRNA, la iniciación requiere la participación de tres factores denominados factores de iniciación IF1, IF2 e IF3. El primer paso en la iniciación consiste en mantener separadas las subunidades ribosómicas 30S y 50S. El factor IF3 se une a 30S y la mantiene separada de 50S. Cuando no están ocupadas en la síntesis de proteínas, las subunidades ribosómicas están en equilibrio por las $[Mg^{2+}]$; su ensamblaje para formar ribosomas completos ocurre como resultado del proceso de iniciación.

El factor de iniciación IF2 se une a GTP y al $\text{tRNA}_i^{\text{Met}}$, estimulando la unión de éste último al complejo de iniciación y guiándolo hasta el sitio P (o peptidilo). Luego, una de las proteínas ribosómicas hidroliza el GTP unido a IF2, promoviendo así el ensamblaje de las dos subunidades ribosómicas. En ese momento, se disocian los factores IF2 e IF3. La función de IF1 es impedir que el $\text{tRNA}_i^{\text{Met}}$ ocupe el sitio A en el ribosoma.

John Shine y Lynn Dalgarno fueron los primeros en advertir que los verdaderos codones de iniciación (AUG) estaban precedidos por secuencias que emparejaban bien con el extremo 3' del rRNA 16S, llamándose así secuencia Shine-Dalgarno. Esta secuencia, además de permitir la unión entre el mRNA y el ribosoma, garantiza que el codón de iniciación quede ubicado en el sitio P, directamente. Entre los diferentes mRNAs pueden existir pequeñas diferencias en la secuencia Shine-Dalgarno, pero siempre son ricas en adenina y guanina. La estructura tridimensional que adopta esta secuencia también influye en la eficiencia de reconocimiento (Griffiths et al., 2002).

En eucariotes no hay secuencia Shine-Dalgarno, la selección del AUG iniciador se facilita por la presencia de nucleótidos específicos circundantes denominados la secuencia de Kozak, por Marilyn Kozak, quién la definió como: (5')ACCAAUGG(3'). La A que precede a AUG (subrayado) y la G que la sigue inmediatamente después son los nucleótidos más importantes que afectan la eficiencia de la iniciación de la traducción. En eucariotes, el codón de inicio AUG es reconocido por el $\text{tRNA}_i^{\text{Met}}$, que a diferencia de los procariotes no está formilado. Así mismo, se requieren de muchísimos más factores de iniciación (al menos 11) que los 3 requeridos en procariotes (Merrick y Hershey, 1996). Se profundizará más adelante en el proceso de iniciación de la traducción en eucariotes debido a la importancia que posee dentro del control traduccional celular y su relevancia en este trabajo.

II.2.2. Etapa de elongación

El mecanismo de elongación de la cadena polipeptídica parece ser muy semejante en eucariotes y procariotes. En procariotes, el factor de elongación EF-Tu media la entrada de los aminoacil-tRNA al sitio A del ribosoma, uniéndose primero a GTP. La hidrólisis del GTP a GDP favorece la unión del aminoacil-tRNA al sitio A, en cuyo momento se disocia el factor EF-Tu, dejando el nuevo tRNA en el sitio A. El factor de elongación EF-Ts media el recambio de EF-Tu-GDP y la regeneración de EF-Tu-GTP. En el paso siguiente, la translocación, el ribosoma cataliza la formación del enlace peptídico y la cadena polipeptídica queda ubicada sobre el tRNA en el sitio A. El ribosoma avanza un codón en el mRNA, al moverse en dirección 5' → 3'. Este paso está mediado por el factor de elongación EF-G y activado por la hidrólisis de GTP a GDP. En el proceso se libera el tRNA descargado del sitio P y se transfiere el peptidil-tRNA recién formado desde el sitio A al sitio P (Griffits et al., 2002). Cada uno de los tres factores de elongación presentes en procariotes (EF-Tu, EF-Ts y EF-G) tiene un equivalente eucariótico que desempeña un cometido semejante (eEF1 α , eEF1 $\beta\gamma$ y eEF2 respectivamente).

II.2.3. Etapa de terminación

La terminación de la cadena polipeptídica en eucariotes, contrasta con la terminación procariótica, debido a que sólo requiere dos factores proteicos, el eRF1 y el eRF3. Los procariotes cuentan con tres tipos de factores de liberación (RFs): RF-1, RF-2 y RF-3. El primero de ellos hidroliza el enlace entre el tRNA y la cadena peptídica en respuesta a los codones UAG y UAA; el segundo a los tripletes UGA y UAA, y el RF-3 es una GTPasa que permite la liberación de RF-1 y RF-2 (Devlin, 1999). Además, participan el factor de liberación del ribosoma RRF, IF3 y EF-G para el desensamblaje de todo el complejo de traducción.

II.2.4. Inicio de la traducción en eucariotes

Las subunidades ribosómicas 40S y 60S se encuentran separadas por la unión de un factor de inicio en la traducción denominado eIF3 (factor de anti-asociación ribosómico). Al complejo formado por la subunidad 40S con eIF3 se le une eIF1A y un complejo ternario de $\text{tRNA}_i^{\text{Met}}$, eIF2 y GTP, para formar el complejo de iniciación 43S. Las células pueden regular la síntesis proteica a través de la fosforilación de un residuo de serina sobre el eIF2 unido al GDP; el complejo fosforilado es incapaz entonces de intercambiar el GDP unido por GTP y no puede unir $\text{tRNA}_i^{\text{Met}}$, lo cual inhibe la síntesis de proteína.

Por otra parte, el factor de inicio eIF4E reconoce y se une a la estructura cap en el extremo 5' de un mRNA a ser traducido. Luego, el complejo mRNA-eIF4E es reclutado por la proteína de andamiaje eIF4G, la cual interacciona con eIF4A y eIF4B (ambas helicasas de RNA, ATP dependientes), para formar el complejo de unión a Cap eIF4F. Cuando eIF4F se une el complejo 43S, se forma el complejo de iniciación 48S; el cual, comienza a “deslizarse” a lo largo de la región 5'UTR del mRNA en busca del codón de inicio AUG. La actividad helicasa del factor eIF4A utilizando la energía de hidrólisis de ATP desenrolla las estructuras secundarias del RNA en 5'UTR. Dicho proceso es estimulado por eIF4B y, en mamíferos, también interviene otro factor: eIF4H. El rastreo se detiene cuando el anticodón $\text{tRNA}_i^{\text{Met}}$ reconoce el codón de inicio, el cual es el primer AUG con un entorno favorable (secuencia Kozak) río abajo a partir del extremo 5' en la mayoría de los mRNAs eucarióticos. El reconocimiento del codón de inicio conduce a la hidrólisis del GTP asociado con eIF2, un paso irreversible que evita rastreos posteriores. Una vez que la subunidad ribosómica menor, con el $\text{tRNA}_i^{\text{Met}}$ unido, se ubica correctamente en el codón de inicio, la unión con la unidad ribosómica mayor (60S) completa la formación del ribosoma 80S (véase figura 3). Esto requiere la acción de otro factor, eIF5, y la hidrólisis de un GTP asociado con éste. El acoplamiento de la reacción de

unión con la hidrólisis de GTP hace de este un paso irreversible, de manera tal que las subunidades ribosómicas no puedan disociarse hasta que todo el mRNA sea traducido y finalice la síntesis proteica (Pestova y Hellen, 2000; Gingras et al., 1999; Lodish et al., 2006; Sánchez de Jiménez et al., 2005).

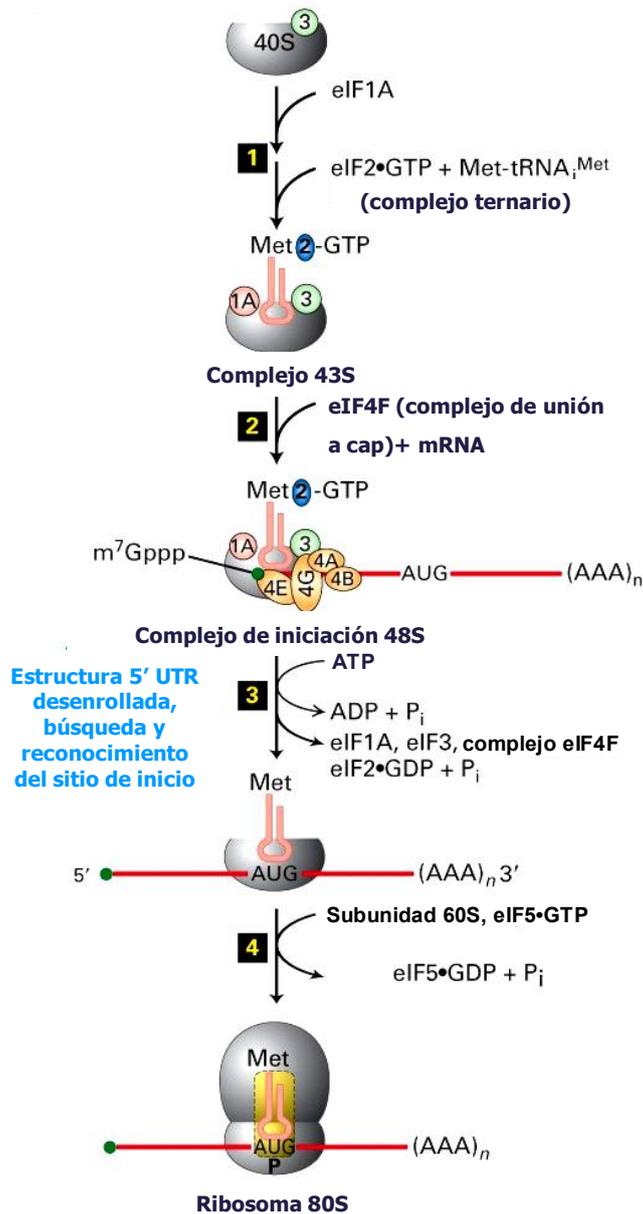


Figura 3. Iniciación de la traducción en eucariotes. Pasos 1 y 2: Adición secuencial de los componentes indicados al complejo 40S-eIF3, forma el complejo de iniciación. Paso 3: el rastreo del mRNA por parte del complejo de iniciación asociado lleva al posicionamiento de la subunidad menor y a la unión del tRNA_i^{Met} en el codón de inicio AUG. Paso 4: la asociación de la subunidad mayor (60S) forma al ribosoma 80S, listo para traducir el mRNA. Dos factores de iniciación, el eIF2 (paso 1) y el eIF5 (paso 4) son proteínas de unión a GTP, que hidrolizan sus GTPs unidos durante la iniciación de la traducción (tomado de Lodish et al., 2006).

La abundancia de mRNAs en el citoplasma celular no necesariamente corresponde de manera directa a la cantidad de polipéptidos o proteínas que se encuentran en la célula. El inicio de la traducción es regulado a tanto a nivel global como a nivel de mRNA-específicos, seguido por la etapa de elongación, sobre todo porque es un paso limitante dentro de todo el mecanismo de la síntesis de proteínas,. La regulación a nivel traduccional juega un papel crítico en el crecimiento, desarrollo y proliferación celular. Dicha regulación ocurre cuando el ribosoma es reclutado para traducir un mRNA; éste último es colocado en el codón de inicio mediante la interacción de diversos factores de inicio traduccionales, como se describió anteriormente (Gingras et al., 1999).

II.3.1 La familia eIF4E y su importancia en el inicio de la traducción

Los factores eIF4 son los responsables del reclutamiento del mRNA al ribosoma. El factor eIF4F es un complejo formado por otros tres factores: eIF4A, una ATPasa dependiente de RNA que funciona como una helicasa de RNA; eIF4E, una proteína de unión al Cap de los mRNAs y eIF4G, una proteína de alto peso molecular con sitios de unión o enlace para los factores eIF4E, eIF4A, eIF3 y PABP (Poly-A Binding Protein). Por tanto, eIF4FF es un complejo proteico que sirve de andamiaje para otros factores de inicio dando así inicio a la traducción. eIF4F es capaz de interactuar con el extremo 5' (cap) mediante eIF4E y con el ribosoma asociado con eIF3, a través de eIF4G. Es así como, eIF4F ejecuta la función esencial de unir al mRNA con el ribosoma (Gingras et al., 1999). Estudios recientes han establecido que ciertas proteínas eIF4 pueden promover o inhibir la traducción de mRNAs específicos y que algunos de éstos son activos en otros procesos aparte de la traducción (Hernández et al., 2005).

El factor eIF4E es una proteína de gran interés dada su versatilidad de funciones y de distintos miembros que tiene en diferentes especies eucariotes (Joshi

et al., 2005). Como se ha mencionado anteriormente, reconoce la estructura 5'Cap (véase figura 4), producto de una modificación postranscripcional propia de todos los mRNAs eucarióticos. El enlace que ocurre entre el m⁷GTP y el sitio de unión a eIF4E es mediante las interacciones π - π entre los grupos indol de dos triptófanos que envuelven al 7-metilguanilato, así como por la formación de tres puentes de hidrógeno e interacciones de van der Waals, con un tercer triptófano altamente conservado (von der Haar et al., 2006; Pestova y Hellen, 2000). La fosforilación de eIF4E en la serina 209 provoca un aumento en su enlace con el 5'Cap del mRNA y la estabilización de la interacción con eIF4G (Flynn y Proud, 1995).

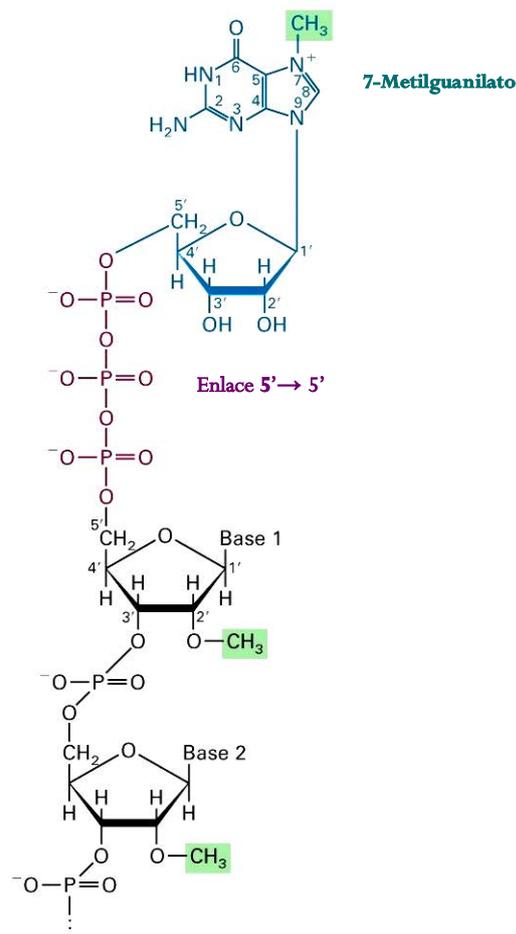


Figura 4. Estructura del casquete (o Cap) 5' metilado del mRNA eucarionte. Las características químicas distintivas son las uniones 5' → 5' de 7-metilguanilato al nucleótido inicial de la molécula de mRNA y el grupo metilo al hidroxilo 2' de la ribosa del primer nucleótido (Base 1). Estas dos características tienen lugar en todas las células animales y en las células de las plantas superiores; las levaduras carecen del grupo metilo en el nucleótido 1. La ribosa del segundo nucleótido (Base 2) también está metilada en los vertebrados (tomado de Lodish et al., 2006).

Los miembros de la familia eIF4E en todos los organismos eucarióticos han sido agrupados en tres distintas clases (Joshi et al., 2005):

- ✚ **Clase I:** se caracterizan por tener residuos de triptófano en las posiciones equivalentes a las de Trp-43 y Trp-56 de eIF4E-1 humano, y poseen ~35-40% de identidad y ~60-65 % de similitud entre ellos. Miembros de esta clase se encuentran prácticamente todos los organismos eucariotes estudiados (*Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Homo sapiens*, *Arabidopsis thaliana*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Mus musculus*, *Zea mays*, etc.)
- ✚ **Clase II:** los miembros de esta clase tienen un 50% de identidad y de un 70-80% de similitud entre ellos. Su estructura está conformada por aproximadamente ~160-170 aminoácidos y poseen un residuo hidrofóbico como tirosina, fenilalanina o leucina, pero no triptófano, en la posición equivalente del Trp-56 de eIF4E-1 humano. Se han encontrado en diversos organismos como *C. elegans*, *D. melanogaster*, *H. sapiens*, *A. thaliana*, *M. musculus* y en algunos hongos.
- ✚ **Clase III:** los miembros de esta clase poseen una cisteína (en vertebrados) o una tirosina en la posición equivalente del Trp-56 de eIF4E-1 humano y se han identificado en algunos moluscos, insectos y arácnidos, cordados y metazoarios.

Se pueden distinguir diversas proteínas de la familia eIF4E en cada eucariote, como por ejemplo el ser humano, que posee a eIF4E-1, eIF4E-2 (mejor conocido como 4EHP de eIF4E-Homologous Protein) y eIF4E-3; o *C. elegans* que tiene 5 proteínas de dicha familia (IFEs). Las diferencias en actividad entre las proteínas eIF4E de un organismo en particular dependen en parte de las diferentes afinidades que tienen hacia la estructura Cap, lo cual sugiere una selección de un tipo de mRNAs a ser traducidos, su interacción con eIF4G y proteínas específicas o bien, la

divergencia en su función, como represores de la traducción vía secuestro de mRNAs (Hernández et al., 2005).

Específicamente en miembros de la Clase I, la actividad de eIF4E está regulada por la acción de eIF4E-Binding Proteins (o 4E-BPs), las cuales comparten secuencias similares con el motivo de unión que tiene eIF4E con eIF4G ($Y_{xxxx}L\phi$, donde Y es tirosina, x cualquier aminoácido, L es leucina y ϕ representa a algún residuo hidrófobo); por tanto, las 4E-BPs actúan como inhibidores competitivos de la interacción eIF4E-eIF4G en mamíferos (Marcotrigiano et al, 1999; Ritcher y Sonenberg, 2005). La hiperfosforilación de las 4E-BPs ocurre siguiendo la estimulación de la vía de transducción de señales Akt/FRAP/TOR, que es activada por factores de crecimiento. Como resultado se observa una reducción de la afinidad de 4E-BP por eIF4E fosforilado, facilitando así la unión de eIF4E con eIF4G, lo que promueve el inicio del proceso de traducción (Gebauer y Hentze, 2004).

II.3.2 Familia eIF4E en plantas

La familia eIF4E en plantas superiores está conformada por las siguientes proteínas: eIF4E (eukaryotic Initiation Factor 4E), eIF(iso)4E y nCBP (novel Cap-Binding Protein). Los factores eIF4E y eIF(iso)4E pertenecen a la Clase I de la familia eIF4E, mientras que la proteína nCBP pertenece a la clase II (Joshi et al., 2005). A diferencia de otros eucariotes, en plantas existe otro complejo similar a eIF4F, denominado eIF(iso)4F, el cual no está presente en ningún otro eucariote estudiado. Este complejo está conformado por dos factores también únicos en plantas: eIF(iso)4E y eIF(iso)4G, y tiene una actividad muy similar a la de eIF4F *in vitro*. A pesar de que tanto eIF4E como eIF(iso)4E pertenecen a la misma clase (I) dentro de la familia eIF4E, éstas solamente presentan un 50% de identidad a nivel de aminoácidos. El significado funcional que tienen estas dos formas de eIF4F aun no ha

sido dilucidado. Se tiene evidencia bioquímica que muestra que las subunidades proteicas que conforman a eIF4F y a eIF(iso)4F son funcionalmente intercambiables y, a su vez, son capaces de discriminar entre distintos mRNAs *in vitro* (Browning K.S., 2004).

Algunas de las diferencias encontradas entre eIF4F y eIF(iso)4F se describen a continuación. Ambos complejos comparten un 45-50 % de identidad en la secuencia de sus aminoácidos; se ha observado que eIF(iso)4F traduce *in vitro* preferencialmente mRNAs que no tienen una 5'UTR larga y estructurada (Gallie y Browning, 2001). Además, se sabe que eIF(iso)4F tiene menor afinidad por análogos de Cap monometilados que por análogos de Cap dimetilados, mientras que eIF4F tiene mayor afinidad por análogos de Cap monometilados y menor afinidad por los dimetilados (Carberry y Goss, 1991). Asimismo eIF(iso)4F tiene una preferencia de unión a mRNAs que tienen una estructura lineal cerca de la estructura Cap, mientras que la unión por eIF4F es sensible a la posición y secuencia de estructuras tipo tallo-asa cerca de Cap (Kawaguchi et al., 2002). También, eIF(iso)4F tiene un estrecho pH óptimo (7.6) de unión a m⁷GTP, mientras que eIF4F no presenta diferencia alguna por la afinidad a Cap en el rango fisiológico de pH (6.8-7.6); (Carberry et al., 1991).

En general, no hay diferencias en cuanto al reconocimiento del mRNA y el reclutamiento del ribosoma en plantas con respecto al inicio de la traducción en otros organismos (véase figura 5). Por ejemplo, la unión de la cola de poliA con la proteína PABP (que a su vez es reclutada por eIF4G) para la circularización del mRNA promueve una traducción más eficiente, al conferirle mayor estabilidad al transcrito y reciclar más fácilmente a los componentes de la maquinaria traduccional para la síntesis *de novo* de una misma proteína; lo cual ocurre también en animales.

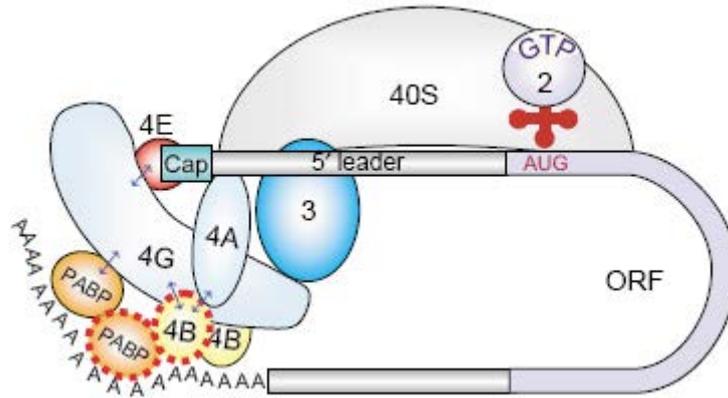


Figura 5. Complejo de iniciación en plantas. El factor eIF4E o eIF(iso)4E se une al factor eIF4G o eIF(iso)4G, y también reconoce y se enlaza a la estructura 5'-7mGpppN (cap) del mRNA. Las flechas indican las interacciones entre las subunidades eIF4 y PABP que dan como resultado la circularización del mRNA. eIF4B quizás también interactúe con la 5'UTR. La fosforilación de PABP y de eIF4B afecta las interacciones proteína-proteína y proteína-cola de poliA. Las fosfoproteínas están rodeadas de una línea punteada roja. Así mismo se denota la participación del factor eIF3 (representado con el número 3), eIF2 (representado con el número 2) y la subunidad ribosomal 40S para el rastreo de la 5'UTR hasta el codón de inicio AUG (tomado de Kawaguchi et al., 2002).

La investigación de la función de los distintos miembros de la familia eIF4E en plantas ha planteado que su presencia podría ser indispensable para el reclutamiento de distintos mRNAs y, por consiguiente, la traducción diferencial de distintas proteínas en etapas determinadas del desarrollo de las plantas. Se han hecho algunos estudios en maíz encontrando una expresión diferencial de eIF4E y eIF(iso)4E durante la germinación, lo que implica la traducción selectiva de los mRNAs (Dinkova y Sánchez de Jiménez, 1999). Sin embargo, ha sido arduo el determinar la función específica de cada factor por la dificultad de obtener mutantes en maíz.

Se ha descrito que en *A. thaliana* la expresión a nivel mRNA de eIF4E ocurre en todos los tejidos, excepto en algunas células de la raíz; mientras, para eIF(iso)4E, se ve notablemente enriquecido en tejidos jóvenes y en flores (Rodríguez et al., 1998). También, se ha caracterizado una mutante homociga nula para eIF(iso)4E y se encontró que no se afecta la morfología o el desarrollo de la mutante con

respecto a la *A. thaliana* silvestre a nivel general (véase figura 6). Sin embargo, en esta línea mutante (llamada *AteIF(iso)4E-1*) se observó un incremento en la cantidad de proteína de eIF4E, lo cual podría promover la formación del complejo eIF4E/eIF(iso)4G que funcione en lugar del complejo eIF(iso)4F (Duprat et al., 2002).

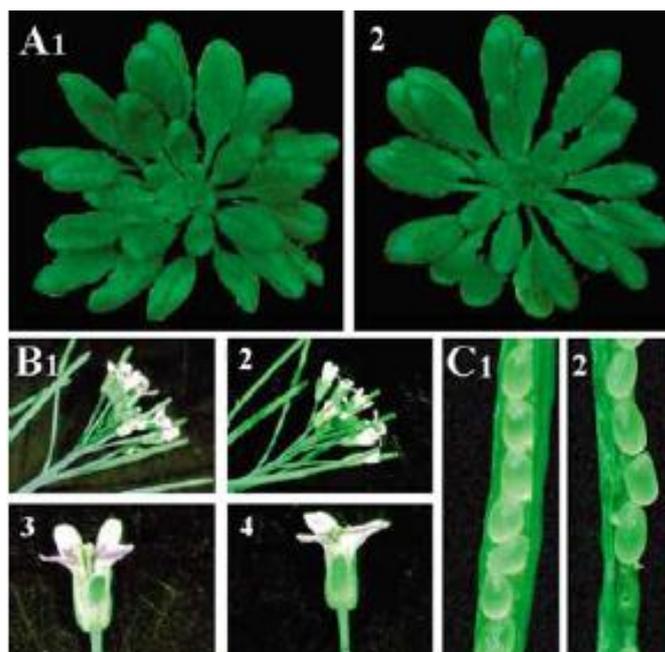


Figura 6. Fenotipo de la línea mutante *AteIF(iso)4E-1*. Fotografías A1, B1, C1 y 3 muestran las características del fenotipo silvestre de *A. thaliana* en roseta, inflorescencia, silicuas y flor respectivamente. Fotografías A2, B2, C2 y 4 muestran las características del fenotipo de una línea mutante homociga nula, *AteIF(iso)4E-1*; también en roseta, inflorescencia, silicuas y flor respectivamente. Nótese que esta línea mutante no posee un fenotipo particular con respecto a la planta silvestre de *A. thaliana* (tomado de Duprat A., et al. 2002).

Una aportación importante en cuanto a la función de los factores eIF(iso)4E y eIF4E es la participación de éstos en la infección viral, porque se descubrió que la carencia del factor eIF(iso)4E inhibe el ciclo de infección de los virus TuMV (virus del mosaico del nabo) y LMV (virus del mosaico de la lechuga) en *A. thaliana*, ya que distintas especies de *Potyvirus* emplean las distintas proteínas de la familia eIF4E para infectar y replicarse en sus respectivos huéspedes (Duprat et al., 2002). Esto es muy interesante y es importante el profundizar en este estudio, ya que se podría

aplicar dicho conocimiento en la manipulación de mecanismos de defensa para las plantas, haciéndolas más resistentes a la infección de distintos tipos de virus.

II.4. La proteína nCBP (novel Cap-Binding Protein) y sus ortólogos

La proteína nCBP ha sido la menos estudiada de la familia eIF4E en plantas. Ésta proteína se descubrió relativamente hace poco tiempo (Ruud et al., 1998) en *Arabidopsis thaliana* y está presente en todas las plantas superiores. Estructuralmente, se diferencia del resto de la familia principalmente en la sustitución de dos de los ocho residuos de triptófano altamente conservados en las otras proteínas de la familia eIF4E, por otros aminoácidos aromáticos (véase figura 7); en este caso, por fenilalanina (en lugar del triptófano #1) y tirosina (en lugar del triptófano #3), siendo éste último un residuo que es capaz de interactuar con la estructura 5'-Cap de los mRNAs junto con otros dos triptófanos de forma directa (Ruud et al., 1998).

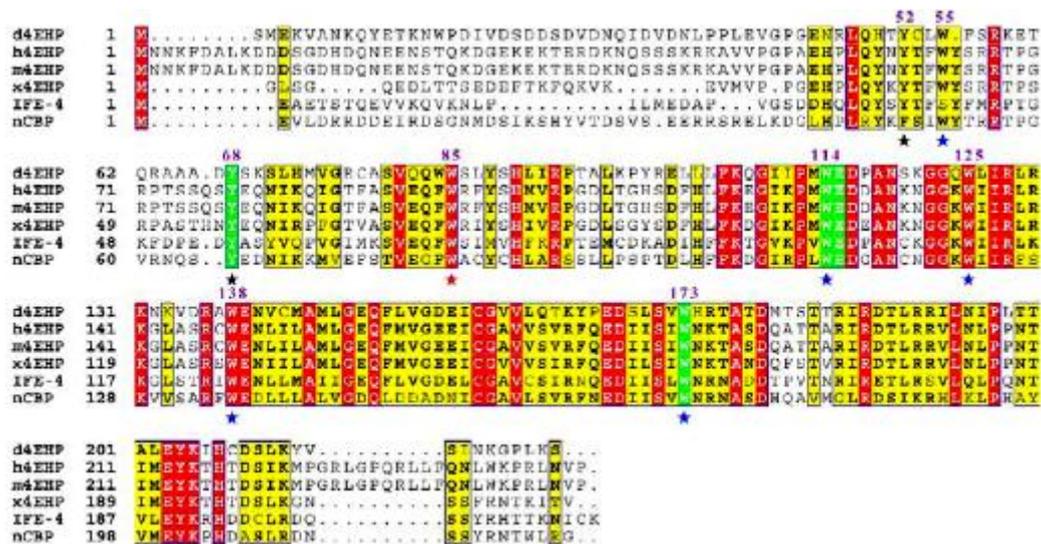


Figura 7. Alineamiento de las secuencias de 4EHP de *D. melanogaster* (d4EHP), humano (h4EHP), ratón (m4EHP), *X. laevis* (x4EHP), *C. elegans* (IFE-4) y *A. thaliana* (nCBP). Aminoácidos idénticos en todas las especies están resaltados en color rojo, mientras que los conservados están resaltados en amarillo. Residuos que participan en la unión a cap están resaltados en color verde. Las estrellas indican la posición de los ocho residuos de triptófano conservados en eIF4E a través de la evolución; Trp43 y Trp56 son reemplazados por tirosinas en 4EHP (estrellas negras). En eIF4E el residuo de Trp73, crítico para su interacción con eIF4G y 4E-BP en ratón y, por analogía, en moscas, se indica aquí con una estrella roja (tomado de Cho P. F., et al. 2005).

En *A. thaliana*, el gen que codifica a la proteína nCBP (denominado At5g18110) se encuentra en el cromosoma V y su secuencia genómica completa la conforman 1935 nucleótidos. La proteína nCBP está formada por 221 aminoácidos (www.arabidopsis.org). Posee un 32% de identidad y un 58% de similitud con el factor eIF4E de *A. thaliana* (Joshi et al., 2005). Además; se sabe que nCBP es capaz de unirse al factor eIF(iso)4G, pero no interacciona con eIF4A y eIF4B, además, puede mantener el inicio de la traducción cerca del 30% al nivel de eIF(iso)4E *in vitro*; lo cual implica que, no sólo puede unirse a la estructura Cap de los mRNAs, sino que también forma un complejo funcional con eIF(iso)4G. Sin embargo, no está claro si la baja actividad en la síntesis de proteínas es una característica propia de nCBP, o está determinada por alguna interacción aún desconocida. Sus características sugieren que su función podría ser la de una proteína secuestradora de ciertos mRNAs, que prevenga o disminuya su traducción (Ruud et al., 1998).

Proteínas ortólogas de nCBP, también pertenecientes a la Clase II de la familia eIF4E, han sido recientemente caracterizadas en organismos como *C. elegans* y *D. melanogaster* (Joshi et al, 2005). En *C. elegans* a la proteína ortóloga de nCBP se le conoce como factor IFE-4. Éste se expresa en la cola faríngea y neuronal, en músculo, en la espermateca y en la vulva del nematodo, lo que sugiere que posee una función particular. Cuando se redujo el nivel de expresión de éste factor por RNA_i o por obtención de mutantes nulos del mismo, se produce un fenotipo pleiotrópico que incluye un defecto en la colocación de los huevos dentro del nematodo (véase figura 8). El análisis de microarreglos de mRNAs traducidos en ausencia de IFE-4 indica que IFE-4 es requerido para la traducción de un subconjunto de mRNAs (Dinkova et al., 2005).

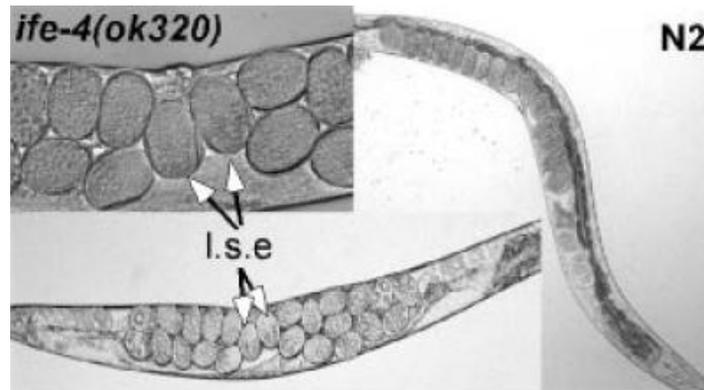


Figura 8. Fenotipo de mutantes en *C. elegans* de IFE-4. Retención de los huevos de individuos *C. elegans* mutantes *ife-4(ok320)*, homocigotos nulos, comparado con los animales N2 (silvestres). Se muestra a los embriones en su estado tardío, o l.s.e del inglés late-stage embryos (tomado de Dinkova, et al. 2005).

Al parecer, la proteína d4EHP en *D. melanogaster* tiene una función regulatoria, porque el correcto desarrollo del embrión de esta mosca requiere una distribución asimétrica de una proteína, denominada Caudal. El mRNA de Caudal se encuentra uniformemente distribuido en dicho embrión. Cuando d4EHP se enlaza a la estructura 5'Cap del mRNA de Caudal, d4EHP se une a la proteína Bicoid, la cual interactúa con el extremo 3', impidiendo así la traducción del mRNA de Caudal (véase figura 9). Por tanto, la expresión de Caudal es dependiente de las concentraciones locales del complejo d4EHP-Bicoid, lo cual explica la distribución asimétrica de Bicoid (Cho et al., 2005; Rosettani et al., 2007).

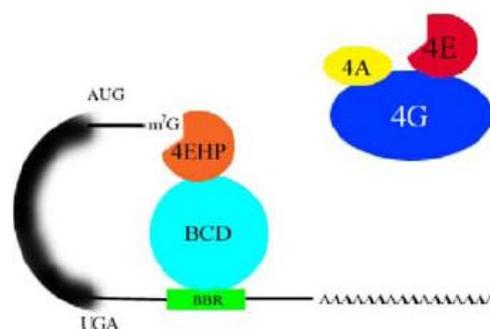


Figura 9. El complejo d4EHP-Bicoid como modelo de represión en la traducción. La proteína d4EHP enlaza directamente a la estructura cap para inhibir la traducción de un mRNA específico. La interacción simultánea de d4EHP con la estructura 5' cap del mRNA y BCD (Bicoid) con la BBR (Bcd Binding Region), ubicada en la 3'UTR del mRNA de Caudal, provoca su inactivación, impidiendo ser reclutado por el complejo eIF4F para su traducción (tomado de Cho et al., 2005).

La importancia que tiene el grupo metilo en el GTP de la estructura 5'-Cap, con respecto al GTP sin el metilo es muy relevante, debido a que la carga positiva formada por la alquilación de la guanina en la posición 7, aumenta la interacción del enlace π - π entre el nitrógeno metilado y el residuo aromático del sitio de unión, siendo mayor la afinidad para el triptófano, seguido por la tirosina y después la fenilalanina (Rosettani et al. 2007). Estudios cristalográficos en h4EHP (humano), otra proteína ortóloga de nCBP en humanos, muestran que la interacción del m⁷G, la ribosa y el trifosfato del enlace 5'→5' con el primer nucleótido del mRNA (véase figura 4) tiende a ser ligeramente distinta, ya que la conformación de eIF4E y h4EHP varía en ciertos residuos que están presentes en una de las proteínas pero en la otra no; lo que explica que las afinidades de ambas proteínas por la estructura 5'-cap son distintas (véase figura 10), así como por otras proteínas como eIF4G-2 y 4E-BP1; siendo en todos los casos mayor la afinidad que presentan dichas proteínas y el 5'-Cap con eIF4E, que con h4EHP. Esto es debido a que ciertos residuos de carácter ácido, básico o polar se encuentran en eIF4E y no en h4EHP, formando mayores interacciones tipo puentes salinos, puentes de hidrógeno, etc.; en los motivos de unión, lo que confiere mayor estabilidad a la unión del Cap, eIF4G-2 y 4E-BP1 con eIF4E. Sin embargo, a pesar de la baja afinidad de h4EHP por eIF4G-2, lo que sugiere que h4EHP no compite con eIF4E en su enlace con la maquinaria traduccional y por 4E-BP1 no quiere decir que no juegue un papel fisiológicamente relevante dentro del proceso de traducción, sobre todo con esta última proteína, con la cual se especula que h4EHP pueda modular la traducción por secuestro de proteínas inhibitorias de eIF4E, pese a la menor afinidad que posee con respecto a eIF4E por 4E-BP1 (Rosettani et al. 2007).

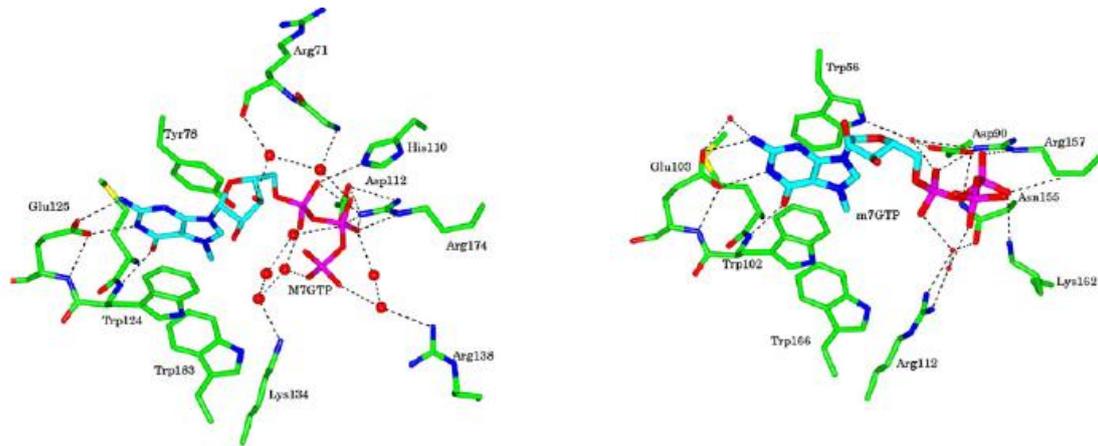


Figura 10. Estructura tridimensional del sitio de unión a Cap de la proteína 4EHP humana (h4EHP) y su comparación con el factor eIF4E. En color azul claro se muestra al m⁷G y al anillo de ribosa; en color rosa se muestra al trifosfato y en color verde los residuos que interactúan con la estructura Cap. Las líneas punteadas muestran los puentes de hidrógeno, puentes salinos e interacciones de van der Waals que se forman durante la unión de Cap a h4EHP (estructura izquierda) y a eIF4E (estructura derecha). Las esferas representan moléculas de H₂O atrapadas que promueven una red de puentes de hidrógeno estable en el sitio de unión (tomado de Rosettani et al. 2007).

Dada la información que se ha mostrado de las proteínas ortólogas de nCBP, cuya secuencia y características particulares están muy conservadas (véase figura 7), el interés de estudiar la función de dicha proteína en plantas resulta muy valioso para entender el por qué la evolución la ha conservado, su posible papel en la participación del inicio de la traducción o en la regulación de la misma, tal vez en etapas específicas del desarrollo de la planta, como se ha visto en *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* (Cho et al., 2005 y Dinkova et al., 2005).

II.5. *Arabidopsis thaliana* como modelo vegetal para el estudio de la expresión y caracterización de genes en plantas

Los estudios realizados en *Arabidopsis thaliana* se deben a que es una pequeña mala hierba dicotiledónea (de la familia de las crucíferas) que ha llegado a ser uno de los más importantes sistemas para el estudio de muchos aspectos de la biología de las plantas. Las plantas dicotiledóneas tienen las siguientes características. Sus semillas poseen 2 cotiledones u hojas embrionarias y suelen carecer de endospermo; sus

hojas suelen estar formadas por un limbo ancho (porción expandida de la hoja) y aplanado, con haces vasculares ramificados y con pecíolo; y sus partes florales se presentan en múltiplos de cuatro o de cinco (Villée et al., 1996; Bernstein y Bernstein, 1998).

A continuación, se describen algunas características morfológicas típicas de *Arabidopsis thaliana*. Posee una altura normalmente entre los 20 y 30 cm. El tallo es erecto y desde la base de la planta está cubierto de pelos ramificados, dispuestos muy densamente y cortos, que van desapareciendo o se reduce su densidad a medida que se aproxima a las inflorescencias. En *Arabidopsis thaliana* existe una fase vegetativa de crecimiento, la cual produce órganos no destinados a la reproducción, es decir, las hojas (Blázquez M.A., 2000). Las hojas tienen forma elíptica-oval y son de dos tipos: las basales, de hasta 2 cm de largo por 0,5 cm de ancho, arrosadas (pegadas al suelo y formando una roseta, de cuyo centro saldrá el escapo floral) y las caulinares (las que están a lo largo de la inflorescencia o escapo floral), las cuales son más pequeñas y sésiles, esto es, carentes de pecíolo o bien, la estructura que une a la hoja con el tallo de la planta (Meyerowitz, 1994). Las hojas de la roseta y las caulinares pueden apreciarse en la figura 11.

Las inflorescencias se presentan en racimos, en el extremo de las ramas o el tallo, no demasiados compactos, éstas se van separando unas de otras a medida que el tallo crece, por lo que los pedúnculos de los frutos maduros estarán separados del orden de un centímetro entre ellos. Sus flores son hermafroditas, de unos 0.5 cm de diámetro, normalmente con cuatro pétalos blancos, espatulados. Se distinguen en ella sin dificultad todos los órganos florales. Su fruto es una silicua linear que aparece del centro de la flor. Es alargado, de unos 3 cm de longitud y 1 mm de anchura, cilíndrico, un poco arqueado y sin pelos. Éstos contienen dos cavidades en las que se alojan las semillas ovoideas en hilera, sin tocarse entre ellas, en número elevado; unas 30 por silicua. Cuando las semillas maduran tienen un color

anaranjado son lisas y miden medio milímetro aproximadamente. Todas estas características se pueden apreciar en la figura 11 (Meyerowitz, 1987).

Arabidopsis thaliana ofrece una serie de ventajas al considerarla como modelo de investigación. Tiene un ciclo de vida muy corto (6-8 semanas), puede autofecundarse y produce numerosas semillas que permanecen viables durante muchos años. Su rápido crecimiento permite el análisis de un gran número de individuos en un mínimo espacio y, por lo tanto, la consiguiente amplificación rápida de los genotipos útiles para posteriores estudios (Gómez-Campo, 1976).

Al completar toda la secuencia genómica de *Arabidopsis thaliana*, se ha preparado el camino para numerosas investigaciones de genética reversa para la determinación de la función de sus genes; por tanto, esta planta brinda la facilidad de una gran colección de mutantes. En muchos casos, la identificación de mutaciones de interés se logra a través de procedimientos sencillos y, a veces, por medio de laboriosas técnicas experimentales (Krysan et al., 1999).

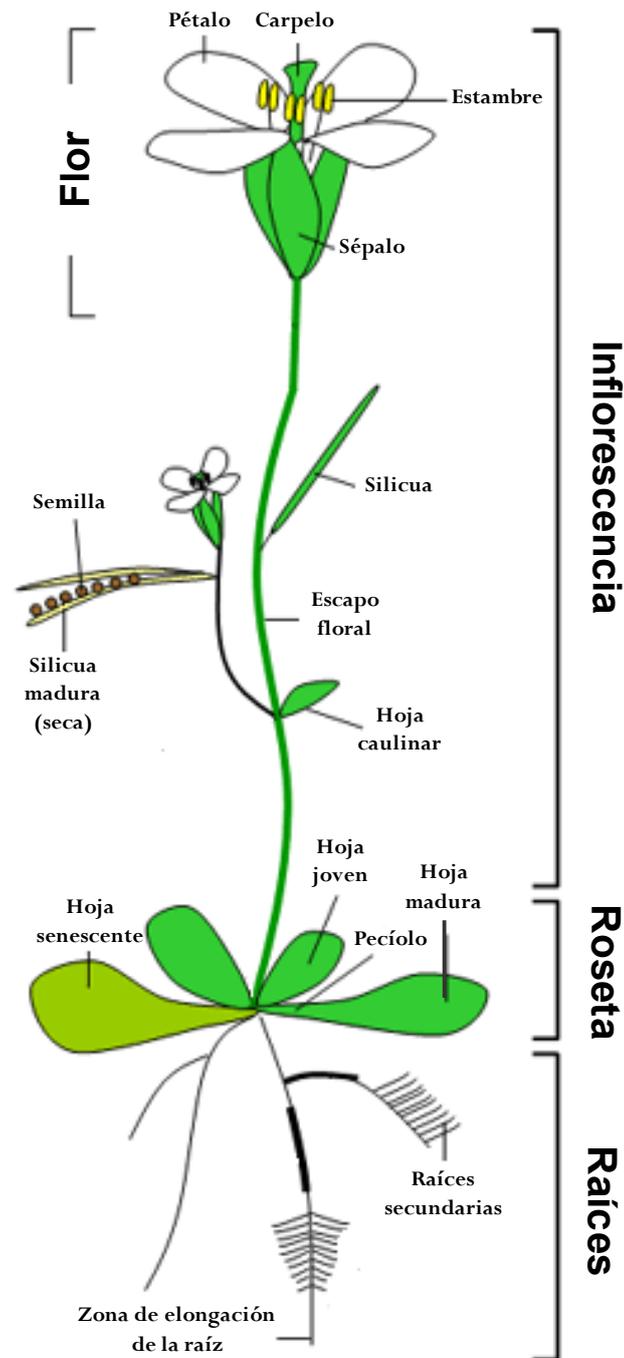


Figura 11. *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio. En esta imagen se muestra claramente cada uno de los tejidos que conforma a la *Arabidopsis thaliana* (<https://www.geneinvestigator.ethz.ch/>).

Arabidopsis es, desde el punto de vista del tiempo de floración, una planta facultativa de día largo; es decir, que puede florecer en un régimen de días cortos (unas 8-10 h de luz diarias equivalente a los días de otoño/invierno), aunque en los días largos (unas 16 h de luz diarias equivalente a los días de primavera/verano) promueven una floración mucho más temprana, aproximadamente de tres semanas

después de la germinación de las semillas frente a dos meses en días cortos (Blázquez M.A., 2000).

II.6. Transformación de *Arabidopsis thaliana* por inserción de T-DNA

En la última década, la biotecnología de transformación genética se ha convertido en una de las herramientas más prometedoras, no sólo para la mejora genética de las plantas, sino también para investigar los mecanismos que controlan su desarrollo y su respuesta a factores de estrés biótico y abiótico. Una planta transformada genéticamente (o planta transgénica), es aquella a la que se le ha introducido un fragmento de DNA foráneo en el genoma de sus células, éste al expresarse, puede conferir a la planta un carácter o caracteres nuevos que antes no poseía (Azcón-Bieto y Talón, 2003).

Los vectores que se utilizan de frecuentemente para producir plantas transgénicas derivan de una bacteria gramnegativa del suelo denominada *Agrobacterium tumefaciens*. Esta bacteria infecta a las plantas en lugares donde hay heridas y causa la enfermedad de la agalla de la corona, provocando en la planta infectada un crecimiento local descontrolado (tumores o agallas), normalmente en la base (corona) de la planta. Después del ataque, la bacteria sintetiza rápidamente microfibrillas de celulosa que actúan de anclaje para las células al lugar de la herida; las bacterias quedan atrapadas y dan lugar a un voluminoso agregado bacteriano sobre la superficie de la célula vegetal, permitiendo el paso del plásmido de la bacteria a la planta. El responsable de la formación de tumores es un plásmido de DNA circular de gran tamaño (200 kb) llamado plásmido Ti (del inglés *tumor-inducing*, inductor de tumor). Cuando la bacteria infecta una célula de la planta, una parte del plásmido Ti denominada T-DNA (DNA de Transferencia), se transfiere e inserta, aparentemente al azar, en el genoma de la planta huésped (véase figura 12).

Los genes que determinan los productos requeridos para esta transferencia están situados en el plásmido Ti, pero fuera del T-DNA. No obstante, el T-DNA contiene varios genes de función clave, entre los que se incluyen los relacionados con la producción del tumor y con la síntesis de unos compuestos denominados opinas (Griffiths et al., 2002). En realidad, las opinas son sintetizadas por la planta infectada, pero bajo la dirección del T-DNA. Luego, la bacteria ocupa las opinas para su propio beneficio, como fuente de carbono y nitrógeno, gracias a los genes para su utilización situados en el plásmido Ti. La nopalina y la octopina son dos de las opinas más importantes y se producen al ser codificadas por plásmidos Ti distintos, ya que el tipo de opina producida no está determinada por la planta hospedera sino por la cepa bacteriana huésped (Old y Primrose, 1987).

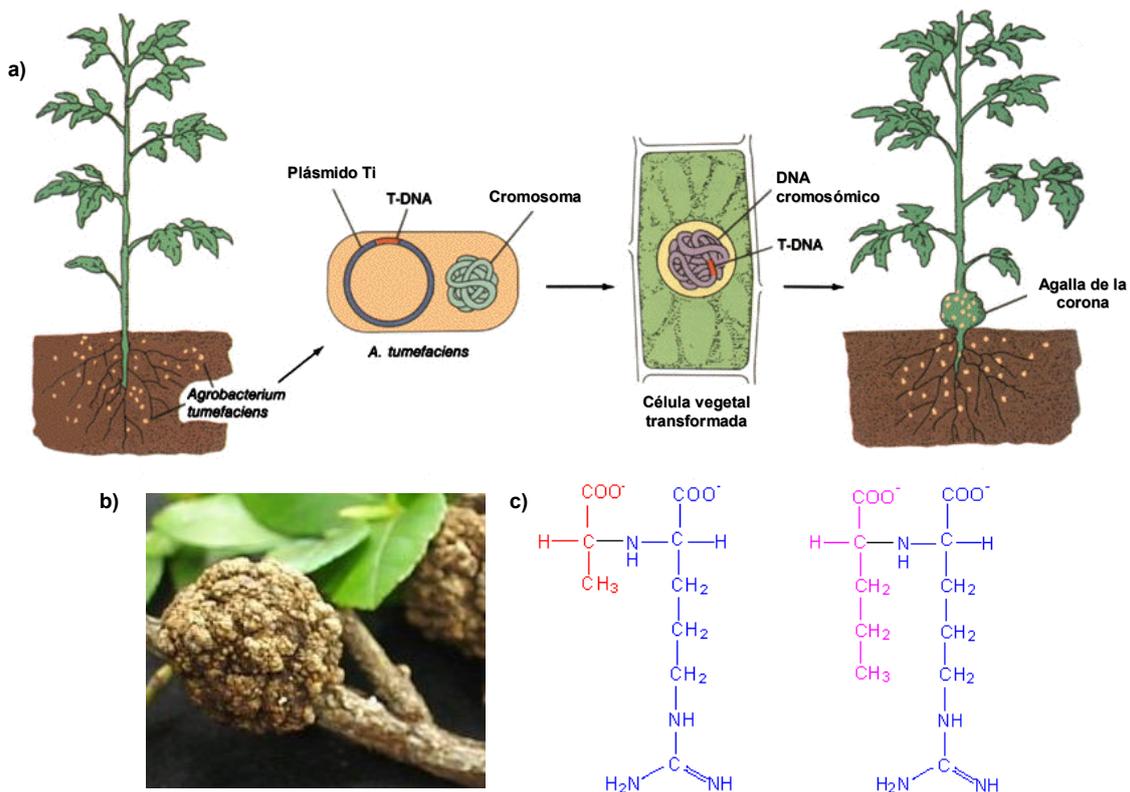


Figura 12. Infección por parte de *Agrobacterium tumefaciens* en plantas. (a) Para causar la enfermedad de la agalla de la corona, la bacteria *A. tumefaciens* inserta una parte de su plásmido, Ti denominada T-DNA en un cromosoma de la planta hospedera. (b) Agalla de la corona causada por *A. tumefaciens* (Keefer, 2001). (c) Estructura de las opinas comúnmente sintetizadas por *A. tumefaciens*: octopina (izquierda) y nopalina (derecha).

Los componentes genéticos de *Agrobacterium tumefaciens* necesarios para la infección y transferencia del DNA a las células vegetales son tres: el T-DNA y la región de virulencia o región *vir*, ambos incluidos en el plásmido Ti, así como los genes de virulencia *chv*, localizados en el cromosoma.

El T-DNA posee un tamaño aproximado de 5-25 kpbs y se encuentra delimitado por repeticiones directas e imperfectas de 25 pares de bases, conocidas como bordes derecho e izquierdo del T-DNA. La región *vir* está fuera del T-DNA y está formada por un conjunto de genes cuyos productos regulan la expresión de otros genes, llamados *virA*, *virB*, *virD*, *virG*, *virC* y *virE* (Azcón-Bieto y Talón, 2003).

Para poder hacer uso del T-DNA por medio del plásmido Ti para transformar genéticamente a una planta vía *Agrobacterium*, es necesario atenuar (o desarmar) al plásmido Ti, incorporar el vector intermediario por recombinación, el cual deberá contener un gen bacteriano de resistencia a un antibiótico, por ejemplo kanamicina. Una vez que los vectores intermediarios se han introducido en las células de *Agrobacterium* portadoras del plásmido Ti atenuado (mediante conjugación con *E. coli*), los recombinantes entre ambos plásmidos se seleccionan mediante siembra en presencia de kanamicina. Tras la selección de los cointegrados con kanamicina, las bacterias portadoras de estos plásmidos recombinantes se utilizan para infectar porciones de tejidos de las plantas (como hojas o flores) para dar origen a plantas transformadas con T-DNA (Griffits et al., 2002).

Feldman and Marks (1987) elaboraron un método para producir líneas transgénicas de T-DNA independientes vía transformación de semillas. El desarrollo de métodos basados en sumergir plantas enteras dentro de suspensiones de *Agrobacterium* se ha empleado más recientemente, para la producción de mutantes en plantas (Krysan et al., 1999). El método de infiltración de *Agrobacterium* al vacío o “Floral dipping”, es relativamente nuevo y sencillo, y se ha utilizado para la

transformación de *Arabidopsis thaliana*. En esta técnica, las flores se sumergen en un cultivo de *Agrobacterium* y la bacteria transforma las células de la línea germinal que producen los gametos femeninos. Éste procedimiento simplifica el método tradicional de la transformación mediada por *Agrobacterium*.

Los pasos para ello son:

1. Cultivo de *Arabidopsis* hasta que florezca.
2. Remoción o "uprooting" de la planta.
3. Aplicación de *Agrobacterium* a través de una infiltración al vacío en un medio de sacarosa al 5% con 500 $\mu\text{L/L}$ del tensoactivo Silwet L-77 (Clough et al., 1998)
4. Replantación de la planta.
5. Colección de las semillas después de unas semanas de cultivo.
6. Identificación de la progenie deseada al crecer selectivamente en un medio de antibióticos o herbicidas.

La transformación de *A. thaliana* por medio de la inserción del T-DNA fue realizada en el Salk Institute Genomic Analysis Laboratory (SIGnAL). La inserción del T-DNA para obtener la línea mutante de la proteína nCBP en *A. thaliana*, se realizó por infiltración al vacío en plantas tipo Columbia (Col-0) con *A. tumefaciens*, transformado con el vector pROK2. La kanamicina se empleó como agente de selección para las plantas que tuvieran el T-DNA y cada planta transformada de la F₁ (primera generación) se mantuvo individualmente en SIGnAL. La secuencia de DNA de cada región flanqueada del T-DNA fue generada de plántulas crecidas a partir de la misma muestra de semillas que son suministradas para su distribución (F₃).

III. JUSTIFICACION

La proteína nCBP, tal y como sus ortólogos en otros organismos, podría participar en el inicio de la traducción en plantas como una proteína inhibitoria para la traducción de ciertos mRNAs en alguna(s) etapa(s) específica(s) de su desarrollo, pudiendo ser crucial o no para su supervivencia. Por ello, se hizo uso de la genética reversa, a partir del gen que codifica a nCBP, se indujo la interrupción de su expresión mediante el T-DNA, para analizar las consecuencias fenotípicas a las que conllevó el hacerlo, con lo que se intenta dilucidar la función de la proteína nCBP en la planta. Aunado lo anterior con la obtención de un perfil de expresión de su transcrito en plantas silvestres, dicho perfil podría aportar información acerca del nivel de expresión de su gen dentro de distintos tejidos a lo largo del desarrollo de la planta, para indagar en cual de ellos es más probable que su función sea requerida para algún proceso en particular.

Con todo esto, la posible deducción de la función de la proteína nCBP podría ser fuente de estudios posteriores que ayuden a la mejora genética de diversas especies de plantas. Al entender dicha función, quizás se pudiera favorecer la respuesta de las plantas a varios tipos de estrés, infecciones de virus, producción de alimentos, etc.; en pro del bien humano.

IV. HIPÓTESIS

Si la proteína nCBP participa en algún nivel en la regulación de la expresión génica en plantas, como *Arabidopsis thaliana*, su ausencia podría alterar el fenotipo y/o el desarrollo de las plantas mutantes de manera general o particular (tejido o etapa de desarrollo específica).

V. OBJETIVOS

V.1. OBJETIVO GENERAL

- Estudiar la función que desempeña la proteína nCBP en el desarrollo y fenotipo de *Arabidopsis thaliana* a partir de individuos mutantes (homócigos nulos) de esta proteína

V.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener e identificar individuos de *Arabidopsis thaliana* que sean homócigos nulos (-/-) de la proteína nCBP.
- Verificar la mutación -/- por medio de la extracción de RNA total y posterior RT-PCR, así como por la técnica de Southern blot.
- Caracterizar fenotípicamente mutantes nCBP -/-, comparando simultáneamente y bajo las mismas condiciones el desarrollo y crecimiento de éstas con respecto a individuos WT (wild type = silvestres) de *A. thaliana*.
- Obtener un perfil de expresión transcripcional de las proteínas: nCBP, eIF4E y eIF(iso)4E en individuos silvestres de *A. thaliana*.

VI. MATERIAL Y METODOLOGÍA

VI.1. Material biológico

La variedad de *Arabidopsis* utilizada fue la tipo Columbia (Col-0), tanto para tener plantas silvestres como mutantes. Para ello, se emplearon semillas de *A. thaliana* transformadas mediante la inserción del T-DNA, para generar individuos que a través de las generaciones filiales tuvieran genotípicamente una mutación homóciga nula para el gen que codifica a la proteína nCBP.

VI.1.1 Siembra de semillas

Para la siembra de semillas de *A. thaliana* se empleó el siguiente procedimiento. En un tubo eppendorf de 1.5 mL, se colocaron unas cuantas semillas (20 – 60 aproximadamente). Posteriormente, se adicionaron 1 mL de NaClO (Clorox) al 20% y 1 μ L de Tween 20 al 0.1% en condiciones asépticas (dentro de una campana de flujo laminar y trabajando detrás del mechero) y se agitó el tubo vigorosamente durante 20 min. El tubo con las semillas se centrifugó entre 5-10 s en una picofuga y se eliminó el sobrenadante. Después se le adicionó otro mL de NaClO al 20%, se agitó vigorosamente durante 10 min, se volvió a centrifugar en la picofuga y se eliminó el sobrenadante. A continuación, se procedió a enjuagar las semillas (hasta por 5 veces), cada vez con 1 mL de agua estéril, agitándose vigorosamente durante 1 min, seguido de una centrifugación durante unos segundos en la picofuga, se descartó el sobrenadante, hasta eliminar completamente el Tween y el hipoclorito. Después del último lavado, se agregó agua a las semillas para resuspenderlas. Las semillas desinfectadas se sembraron en cajas Petri con medio Gamborg's B-5 [3 g/L], sacarosa al 1% y agar al 1%, con un pH = 5.4 ajustado con KOH 0.01 M, en condiciones estériles y con ayuda de una micropipeta de 1 mL.

VI.1.2. Tratamiento de cada generación filial de plantas de *A. thaliana* WT y mutantes nCBP -/-

Las cajas con las semillas se cubrieron con papel aluminio y se mantuvieron a 4°C durante 48 h. Posteriormente, las cajas se transfirieron a una cámara de incubación (temperatura de 22°C, 60% de humedad relativa con fotoperíodo de 16 h de oscuridad y 8 h de luz) durante 2 semanas.

Transcurridas las 2 semanas, las plántulas fueron transplantadas a macetas con sustrato Metro Mix 200 humedecido en agua estéril. Su desarrollo se efectuó bajo las mismas condiciones en las que se encontraban dentro de la caja Petri y se regaban cada 2 días. Las macetas se cubrieron durante una semana con un domo para favorecer las condiciones de humedad y la aclimatación al nuevo sustrato. Las plantas se trataron con fertilizante (Oosmocote) a los 15 días después de su transplantación.

Cuando la roseta de las plantas se desarrolló totalmente (véase figura 13), se trasladaron a la cámara de floración, la cual, tenía las mismas condiciones de humedad y temperatura que la cámara de desarrollo, excepto por el fotoperíodo que fue de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. Con ello se favoreció la floración de las plantas, las cuales se fertilizaron generalmente por autofecundación debido a la ausencia de algún agente polinizador (insectos) para originar los frutos (silicuas) y, por tanto, nuevas semillas disponibles para conformar una nueva generación filial a estudiar y para tener más plantas como fuente de algún tejido o semillas (véase figura 13).

Cabe aclarar que cuando se llevó a cabo la caracterización fenotípica de las plantas mutantes nCBP -/- con respecto a las silvestres, ambos tipos de plantas se sembraron, cuidaron y mantuvieron bajo las mismas condiciones y, al mismo

tiempo, con el fin de que no interfirieran en el estudio tantas variables dentro de su análisis morfológico.

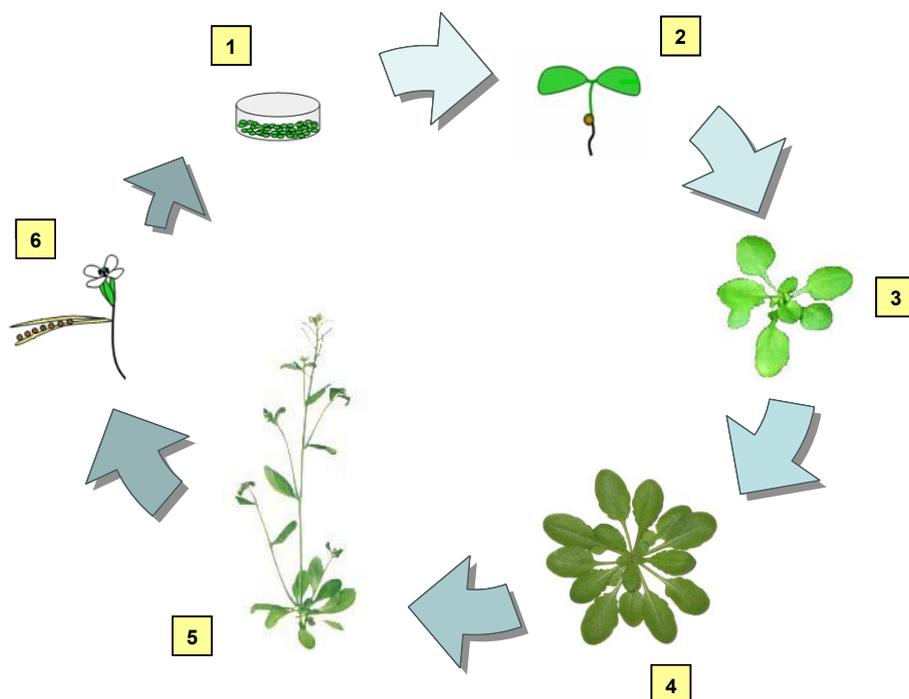


Figura 13. Ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana*. Etapa 1: siembra de semillas en caja Petri; etapa 2: plántula desarrollada a los 15 días después de la siembra, la cual ya puede ser transplantada a maceta. Etapa 3: *A. thaliana* a las 6 semanas de desarrollo, donde se observa la aparición de más hojas y su continuo crecimiento. Etapa 4: desarrollo total de la roseta a los 2 meses de vida. Etapa 5: madurez y desarrollo de la inflorescencia a las 11 semanas desde su siembra. Etapa 6: reproductiva; donde las flores fecundadas dan origen a las silicuas (su fruto). Cuando las silicuas han madurado completamente, se abren y liberan las semillas que formaran parte de una nueva generación de plantas.

VI.2. Obtención del DNA

VI.2.1 Extracción de DNA para análisis genotípico

La extracción del DNA se realizó con el kit **PUREGENE® DNA Purification**, a partir de las hojas de 1 mes o más de edad. De éstas, se tomaron unos 60 -100 mg, se congelaron con nitrógeno líquido y trituraron en tubos eppendorf estériles de 1.5 mL, con ayuda de pequeñas varillas de plástico estériles. Posteriormente, se adicionaron 600 μ L de Solución de Lisis Celular, y se incubó 1 h a 65°C. A la

postre, se agregaron 3 μL de solución de RNAsa A y se incubaron a 37°C, 30 min. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadieron 200 μL de Solución para Precipitación de Proteínas; se agitó vigorosamente 20 s y se incubó en hielo 10-15 min. Se centrifugó a 15 800 x g 3 min y el sobrenadante fue puesto en un nuevo tubo eppendorf estéril de 1.5 mL.

La precipitación y purificación del DNA se realizó al adicionar 600 μL de isopropanol al 100%, se invirtió 50 veces y se centrifugó 1 min a 15 800 x g. El precipitado de DNA se lavó con 600 μL de EtOH al 70%, se centrifugó a 15 800 x g, se eliminó con cuidado el sobrenadante, y se dejaron secar los tubos sobre papel absorbente 15 min. El DNA se resuspendió con 50 μL de Solución de Hidratación de DNA por 1 h a 65°C y se dejó toda la noche a 4°C. Se corrió un gel de agarosa al 1 % preparado con TBE 0.5X (Tris 44.5 mM/Borato 44.5 mM/EDTA 1 mM), cargando 5-10 μL de muestra de DNA, para observar la pureza e integridad del DNA. El DNA se conservó a -20°C hasta nuevo uso.

VI.2.2 Extracción de DNA para la técnica de Southern blot

La extracción de DNA se realizó empleando el protocolo de Shure *et al.* (1983) y consistió en lo siguiente: a partir de hojas de roseta madura, se tomaron 250-300 mg del tejido, los cuales se molieron en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo muy fino que se depositó en un tubo eppendorf de 1.5 mL. Enseguida se añadieron 500 μL de la disolución de extracción (Urea 7 M, NaCl 0.35 M, Tris-HCl 0.05M pH = 8, EDTA 0.02 M y sarcosilo al 1%), se homogenizó en vórtex y se dejó en agitación suave durante 45 min a temperatura ambiente. Al término de dicha agitación, se adicionaron 5 μL de RNAsa A a la disolución, se agitó y se dejó incubar por 30 min a 37°C. Después se adicionaron 500 μL de una mezcla fenol-cloroformo (1:1), se agitó unos segundos y luego la fase acuosa se separó por centrifugación a 12 000 rpm, durante 5 min. El DNA se purificó añadiendo 250 μL

de AcNH_4 7.5 M e incubando durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 12 000 rpm durante 15 min y se recuperó la fase acuosa. Para precipitar al DNA se adicionaron 600 μL de isopropanol absoluto, se agitó y centrifugó a 12 000 rpm durante 10 min, desechando completamente el sobrenadante. El precipitado se lavó con 600 μL de EtOH al 70%, se agitó vigorosamente y centrifugó a 12 000 rpm durante 5 min y se eliminó con cuidado el sobrenadante. Se dejó secar brevemente sobre papel absorbente y se resuspendió entre 50 a 100 μL de agua desionizada y estéril o en buffer de TE 1X (10 mM Tris pH = 7.4 y 1 mM EDTA pH = 8).

VI.3. Obtención de RNA total

VI.3.1 Extracción de RNA total de plántulas, hojas, pecíolos, raíces y flores de *A. thaliana*

Para la extracción de RNA total, se siguió la técnica recomendada por el fabricante del reactivo Trizol[®] (Invitrogen[™]) la cual se describe a continuación. Se pesaron 100 mg de tejido (plántula, hoja, pecíolo, flor o raíz) y se congelaron con nitrógeno líquido y se pulverizaron en un mortero previamente lavado y tratado con $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{Conc})}$, esterilizado, horneado a 120°C toda una noche y enfriado a 4°C. Una vez pulverizado hasta lograr un polvo muy fino, se colocó el tejido en un tubo eppendorff de 1.5 mL y se le agregó 1 mL de Trizol[®] (reactivo monofásico de fenol e isotiocianato de guanidina). La mezcla se agitó con vórtex hasta total resuspensión. Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente; después se adicionaron 200 μL de cloroformo y se agitó vigorosamente por 15 segundos. Posteriormente, se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos y se centrifugó a 11 500 x g por 15 minutos a 4°C, la fase acuosa (incolora) se transfirió a un tubo nuevo. Se precipitó el RNA adicionando 500 μL de isopropanol absoluto, se dejó incubar a temperatura ambiente por 10 minutos y se centrifugó a 11 500 x g

durante 10 minutos a 4°C, donde el RNA precipita (precipitado gelatinoso y traslúcido). Se removió el sobrenadante y se lavó el precipitado con 1 mL de etanol al 75%. Se agitó y luego se centrifugó a 7 300 x g durante 5 minutos a 4°C, eliminando el sobrenadante, y dejando secar sobre papel absorbente. Se resuspendió el RNA en agua con DEPC (dietil pirocarbonato).

Para observar la integridad y pureza del RNA, se analizó en un gel de agarosa al 1 % con TBE 0.5 X disuelto en agua de DEPC, en presencia de bromuro de etidio. El RNA se dividió en alícuotas y se almacenó a -70 °C, para su uso posterior.

VI.3.2 Extracción de RNA total proveniente de silicuas y semillas de *Arabidopsis thaliana*

La técnica empleada fue tomada de Suzuki et al. (2004), debido a la dificultad que presenta extraer RNA total de silicuas y semillas de *A. thaliana*. La técnica consiste en moler con nitrógeno líquido y una pequeña cantidad de arena (lavada previamente con ácido sulfúrico concentrado) 100 mg del tejido deseado, hasta pulverizarlo finamente procurando que nunca se descongele. Se transfirió a un tubo Falcon de 50 mL y se añadió 2 mL de amortiguador de extracción (100 mM Tris-HCl pH = 9.5; 10 mM EDTA pH = 8; dodecil sulfato de litio al 2% (p/v); 0.6 M NaCl; 0.4 M citrato de sodio y β -mercaptoetanol al 5% (v/v)); se mezcló en vórtex y se transfirió 1 mL de la disolución a 2 tubos eppendorf de 2 mL, respectivamente, y se centrifugó a 13 000 xg durante 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a otro tubo de 2 mL y se añadieron 900 μ L de una mezcla de Cloroformo: Isoamil alcohol (CIA) en una proporción 24:1, respectivamente. Se mezcló por inversión 15 veces y se centrifugó a 13 000 xg, 10 min a 4°C. La fase acuosa se pasó a un tubo limpio y se añadieron 850 μ L de la mezcla de fenol (fenol saturado con agua de DEPC, con 35% de tiocianato de guanidina y 1/10 vol NaAc 2M a pH= 4), se mezclaron e incubaron a temperatura ambiente durante 3 min y,

posteriormente, se añadió $\frac{1}{2}$ volumen de la solución de CIA, se agitó vigorosamente 15 s manualmente y se centrifugó a 13 000 xg 10 min a 4°C. Se tomó la fase acuosa y se depositó en un tubo eppendorf de 1.5 mL, se adicionó 0.6 mL de isopropanol absoluto; se mezcló y después se incubó 10 min a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 13 000 xg, 15 min a 4°C. Se removió el sobrenadante y se lavó el precipitado con 0.6 mL de etanol al 75%. Se agitó y luego se centrifugó a 7 300 x g durante 5 minutos a 4°C, eliminando el sobrenadante, y dejando secar sobre papel absorbente. Se resuspendió el RNA en 100 μ L de agua de DEPC (uniendo las soluciones de ambos tubos) y se añadieron 26 μ L de LiCl 10M, se mezcló y se dejó incubando toda la noche a 4°C. Pasado ese tiempo, se centrifugaron las muestras a 13 000 xg, 30 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante, y el precipitado fue resuspendido en 100 μ L de agua de DEPC, y se agregaron 10 μ L de AcNa 3M pH = 5.2 y 110 μ L de isopropanol al 100%, se mezcló, y se dejó incubar durante 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 13 000 xg, 15 min a 4°C. Nuevamente se lavó el precipitado con 0.6 mL de EtOH 75%, se agitó y luego se centrifugó a 7 300 x g durante 7 minutos a 4°C, eliminando el sobrenadante, y dejando secar brevemente al aire. Finalmente, se resuspendió el RNA en 30 μ L de agua de DEPC.

VI.4. Cuantificación de ácidos nucleicos

Para cuantificar los ácidos nucleicos, se tomó 1 μ L de muestra de DNA o RNA total para hacer una dilución 1:100 en agua estéril (para DNA) o DEPC (en el caso de RNA total). La dilución se realizó en un volumen final de 100 μ L, cuyo blanco fue el agua empleada, y se midió su absorbancia en una celda de cuarzo especial de 100 μ L, en un espectrofotómetro de UV, a 260 y 280 nm. A 260 nm se leyó la absorbancia del ácido nucleico presente en la muestra, mientras que a 280 nm se leyó la absorbancia de las proteínas. Una relación que también arrojó el espectrofotómetro de UV con cada lectura, era la de 260/280; la cuál nos dio un

indicio del grado de pureza de las muestras, siendo lo óptimo una relación ≥ 2.0 . Sabiendo que $A = 1 = 40 \mu\text{g/mL}$ (para RNA total) = $50 \mu\text{g/mL}$ (para DNA), tomando en cuenta también el factor de dilución, se obtuvo la concentración final de las muestras.

VI.5. Amplificación del DNA

VI.5.1 PCR

La PCR del DNA extraído se realizó con un volumen total de $15 \mu\text{L}$ conformado por: $1.5 \mu\text{L}$ de buffer 10 X, $0.6 \mu\text{L}$ de MgCl_2 50 mM, $1.2 \mu\text{L}$ de dNTPs 25 mM, $0.75 \mu\text{L}$ de oligonucleótido LP, $0.75 \mu\text{L}$ de oligonucleótido LB, $0.75 \mu\text{L}$ de oligonucleótido RP, $4.2 \mu\text{L}$ de agua estéril, $0.25 \mu\text{L}$ de *Taq* polimerasa y $5 \mu\text{L}$ de una dilución 1:10 del DNA extraído. El tiempo de desnaturalización fue de 5 min a 94°C , seguido de 30 ciclos que consistieron en 30 s a 94°C (desnaturalización), 1 min a 60°C (hibridación) y 1 min a 72°C (polimerización); finalmente, un período de 7 min a 72°C seguido de un tiempo a 4°C para que la reacción se detenga.

Los geles de electroforesis se realizaron con agarosa al 1.5% y solución de TBE 0.5X. Asimismo, se tiñeron con 1-2 μL de solución de bromuro de etidio concentrado y se les aplicó un voltaje de 60-70 mV para que migraran a una velocidad adecuada.

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para las PCRs

Nombre del cebador	Secuencia 5' → 3'
LP -AtnCBP	GGTTTTGCGAATTTGTTTAGAT
RP-AtnCBP	TCTCACCTGATGGTCAGAAGC
LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG
LBb1	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT

VI.5.2 RT-PCR

Para realizar dicha reacción, se siguió el protocolo de un paso con el sistema “Superscript One Step RT-PCR with Platinum *Taq*” de Invitrogen utilizando un termociclador marca Eppendorff, modelo “Master Cyclor”. Se empleó un volumen final de 12.5 μL , que consistió en: 6.25 μL de buffer 2X Reaction Mix, 0.45 μL de MgSO_4 50 mM, 0.25 μL del oligonucleótido en sentido (Fw) 10 μM , 0.25 μL del oligonucleótido en antisentido (Rv) 10 μM , 0.25 μL de la RT/PLATINUM *Taq* Mix, 4.05 μL agua de DEPC y 1 μL de RNA total que tenga una concentración de aproximadamente 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Primero, la reacción fue sometida a una temperatura de 50°C durante 30 min, para que la transcriptasa inversa convirtiera al mRNA en cDNA (DNA sin secuencias de intrones). Es entonces cuando comenzaron los ciclos de desnaturalización (a 94°C, 30 s), alineamiento (1 min a 60 °C) y polimerización de la cadena (72°C durante 1 min); en general fueron 28 ciclos en total, dependiendo de los oligonucleótidos empleados. Los productos del RT-PCR se cargaron en geles de electroforesis, que se realizaron en agarosa al 1% con solución de TBE 0.5X. Asimismo, se tiñeron con 1-2 μL de solución de bromuro de etidio concentrado y se dejaron migrar con un voltaje de 60-70 mV.

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para las RT-PCRs

Nombre del cebador	Secuencia 5' \rightarrow 3'
NCBP-F	CAGGGACTCGGGAAACATGGACAGC
NCBP-R	GCCGCTTGATTGAGTCTCTCAAACCCATCAC
eIF4Ereverse	GGCGGTAGAAGACACTCCCAAATCTGTTC
eIF4Eforward	CCTGTTCGAGCTTCTTCGCATCCTCATGG
pENTR-iso4E1	CACCATGGCGACCGATGATGTG
pENTR-iso4E2	GACAGTGAACCGGCTTCTTCTGG
Fw18Smaiz	GGAACTTACCAGGTCCAGACATAG
Rv18Smaiz	GTGGCCTAAACGGCCATAGTCCCTC

VI.6. Southern blot

VI.6.1 Obtención de sondas por purificación de bandas de PCR a partir de geles de agarosa

La extracción de DNA a partir del gel de agarosa se realizó siguiendo la metodología recomendada para el sistema QIAquick Gel Extraction (QUIAGEN) que se describe a continuación. Se extrajo del gel el fragmento de DNA visualizado por el bromuro de etidio con una navaja limpia, se colocó en un tubo eppendorff y se pesó (el peso no debe ser mayor de 400 mg por columna). Se agregó 300 μL de amortiguador QG por cada 100 mg de gel y se dejó incubando a 50°C por aproximadamente 10 min o hasta que estuviera perfectamente disuelto el gel, agitando de vez en cuando para homogenizar la suspensión. Una vez que se disolvió completamente se agregó 100 μL de isopropanol absoluto por cada 100 mg de gel, se mezcló perfectamente y se colocó en una columna previamente insertada al tubo colector. Se centrifugó a 13 000 rpm durante 1 minuto y se descartó el eluato. Se colocó la columna en el tubo colector y se lavó adicionando 0.75 mL de amortiguador PE y se centrifugó por 1 minuto a 13 000 rpm. Se colocó la columna en un tubo nuevo y se eluyó el DNA en 100 μL de agua estéril, dejando reposar 5 minutos antes de centrifugar 2 minutos a 13000 rpm. Para concentrar el DNA se colocó en el tubo en el concentrador a vacío marca SpeedVac y se dejó secar. Posterior a esto se resuspendió en 25-30 μL de agua estéril.

VI.6.2 Digestión de DNA genómico para Southern blot

Para la digestión del DNA se utilizaron tubos eppendorf de 1.5 mL; se pusieron respectivamente 50 μL de DNA genómico [\sim 50-100 mg/ μL] (mutante o silvestre), 10 μL de amortiguador de reacción 10X de acuerdo a la enzima de restricción elegida; 2 μL de la enzima de restricción concentrada (EcoRI o HindIII) y 38 μL de

agua destilada y estéril, para tener un volumen final de 100 μ L para la digestión del DNA. Las muestras se incubaron a 37°C, durante al menos 16 h. Posteriormente para su purificación, se adicionó 10 μ L de NaAc 3 M y también 1 mL de etanol absoluto, se dejó incubando 2 h a -20°C. Se centrifugó a 13 000 xg, 5 min a 4°C, se removió parte del sobrenadante, se volvió a centrifugar a 13 000 xg, 5 min a 4°C, quitando el poco sobrenadante que había. No se dejó secar y el precipitado de DNA se disolvió en 20 μ L de buffer TE. A continuación, se preparó un gel (24 x 13 cm) de agarosa al 1%, a cada muestra se le adicionaron entre 5 a 10 μ L de TAE 5X (buffer de carga), se cargaron las muestras en el gel junto con un MPM de 1 kb y una escalera radioactiva en un extremo del gel, y se dejaron correr a 20 mV por 14 h. Transcurrido ese tiempo, se fotografió el gel en el Fluor-S y se procedió a realizar la transferencia del DNA digerido.

VI.6.3 Transferencia, hibridación y revelado de la membrana para Southern blot

La transferencia se realizó en medio alcalino, usando como buffer de transferencia una solución de NaOH 0.4 M y una membrana de Nylon Hybond-N⁺ (Amersham). La sonda empleada fue un fragmento de PCR cuyo peso era de 960 pbs que correspondía a la amplificación del gen que codifica a nCBP con sus alelos silvestres (sin T-DNA), fue purificada con el sistema QIAquick Gel Extraction (descrito anteriormente) y fue marcada con ³²P con el kit de cebadores al azar (Random priming; Amersham) utilizando ddCTP³² (Amersham). La transferencia se efectuó entre 3 – 4 h, se verificó en el transiluminador UV que no hubiera ninguna banda en el gel, se dejó secar la membrana en papel 3 MM, se cubrió con plastipack hasta nuevo uso. Se prehibridó la membrana durante 2 h con 40 mL de la solución de hibridación (SSC 20X, solución Denhardt's 50X, SDS 10% y 200 μ L de DNA de esperma de salmón o ballena) en un tubo de hibridación a 65°C con agitación suave. Se desechó dicha solución y se agregaron 40 mL de nueva solución de hibridación junto con la sonda marcada (desnaturalizada previamente por calor), se dejó

incubando toda la noche a 65°C con agitación suave. Después se hicieron 2 prelavados, de 5 min y 30 min respectivamente, con una solución de SSC 2X y 0.1% SDS, a 65°C con agitación rápida. Luego, se hicieron 2 lavados astringentes, también el primero de 5 min y el segundo de 30 min, con una solución de SSC 0.2X y 0.1% SDS, a 65°C y con agitación rápida. La membrana marcada se dejó revelar durante 3 días con pantalla amplificadora de la señal (Amersham). Posteriormente, la autorradiografía se obtuvo exponiendo la pantalla en el Phosphorimager-FX (BioRad) para visualizar las distintas bandas predichas por el estudio teórico del patrón de digestión del gen nCBP con las enzimas de restricción utilizadas (véase Resultados, Southern blot).

VI.7. Extracción de clorofila total de plantas de *A. thaliana*

Para la extracción de clorofila total se etiquetaron y nombraron tubos eppendorf de 1.5 mL y se les adicionó 800 µL de DMF (dimetilformamida) en la campana de extracción. Se cortaron entre 4-4.5 mg de tejido de hojas de roseta de plantas de *A. thaliana* (tanto silvestre como mutante) y se anotó su peso. Dicho tejido fue puesto en los tubos con DMF durante toda la noche, en oscuridad y a 4°C. Posteriormente, se tomó una alícuota de la solución de clorofila extraída en cada tubo y se leyó (sin necesidad de diluir) a una absorbancia tanto de 647 nm como de 664 nm, en un espectrofotómetro (con luz blanca) y empleando una celda de cuarzo para 100 µL de muestra. La ecuación utilizada para el cálculo de la cantidad de clorofila total [µg/mg] fue la siguiente:

$$\text{Clorofila total por mg de tejido} = (17.67A^{647} + 7.17A^{664})/\text{mg de tejido pesado}$$

VII. RESULTADOS

VII.1. IDENTIFICACIÓN DE MUTANTES nCBP -/-

VII.1.1. Análisis a nivel de DNA

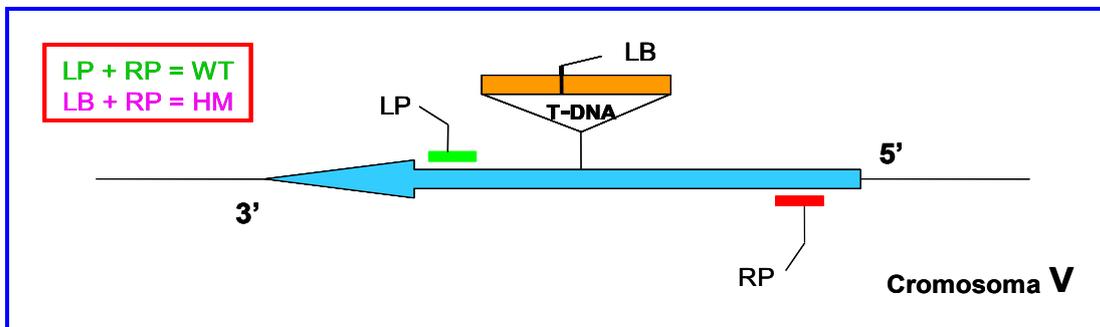
VII.1.1.1. Identificación de mutantes mediante PCR

Como se mencionó en los antecedentes, las semillas de plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana* con la inserción del T-DNA en el gen de nCBP (At5g18110) fueron obtenidas del banco Salk (SALK_131503, donde el T-DNA está insertado en el tercer exón del gen de nCBP). Se sembraron todas las semillas (aproximadamente 25), las plantas fueron analizadas mediante extracción de su DNA y posterior amplificación de nCBP por la técnica de PCR. El análisis mostró la presencia de plantas heterocigas y silvestres en esta F₁. Se recolectaron sólo las semillas de las plantas heterocigas, las cuales se sembraron (aproximadamente 100 de ellas) y, por el mismo método de identificación, se hallaron a tres mutantes cuyo genotipo fue homocigo para la inserción del T-DNA en esta F₂. Se les aisló y resguardó de otras plantas de *A. thaliana* para evitar que se polinizaran con plantas heterocigas o silvestres, fomentado así su autopolinización y la conservación genotípica de la mutación deseada. Utilizando el protocolo de **“Salk T-DNA primer design”** (signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html). Se emplearon 3 oligonucleótidos para identificar mutantes en nCBP (Tabla 1) que permiten obtener después de una amplificación por PCR el esquema mostrado en la figura 14. Por otro lado, en la figura 15 se muestra la zona de alineamiento aproximada de los oligonucleótidos empleados para las PCRs en el gen de nCBP, así como la ubicación de la inserción del T-DNA. La amplificación de distintas bandas en las PCRs se debe a la combinación de oligonucleótidos mostrada en la tabla de la figura 15, dependiendo

si la inserción del T-DNA está en uno, en dos o en ninguno de los alelos de nCBP en *Arabidopsis thaliana*.



Figura 14. Visualización de las bandas, como pares de bases (pbs), para identificar el tipo de mutación existente en cada individuo de *Arabidopsis thaliana*. WT: silvestre, HZ: heterocigótico y HM: homocigótico nulo ó -/-.



Combinación de oligonucleótidos (primers)	Genotipo
LP (Left Primer) + RP (Right Primer)	WT (silvestre)
LB (Border Primer del T-DNA) + RP	HM (homócigo nulo)
(LP + RP = WT) + (LB + RP = HM)	HZ (heterócigo)

Figura 15. Modelo del gen nCBP mutante. Se muestran los oligonucleótidos que flanquean gran parte del gen: LP y RP, que en PCR amplifican la banda WT, siempre y cuando, no haya T-DNA en algún alelo del cromosoma V de *A. thaliana*, de lo contrario se amplifica una banda de menor peso molecular a partir de los oligos LB y RP, que de estar presente en ambos alelos implica un genotipo homócigo nulo como se muestra en la tabla.

Se sembraron varias semillas de dichas mutantes, para obtener 17 plantas mutantes que presentaron las características homócigas de la mutación al amplificar el gen de interés. Para ello, primero se extrajo y purificó el DNA de cada individuo

y se observó la integridad y pureza de cada uno al poner una muestra de los mismos a correr en un gel de agarosa al 1% como se muestra en la figura 16, donde la integridad del DNA en todos los carriles es buena y no hay evidencia de degradación o de la presencia de RNA en los mismos.

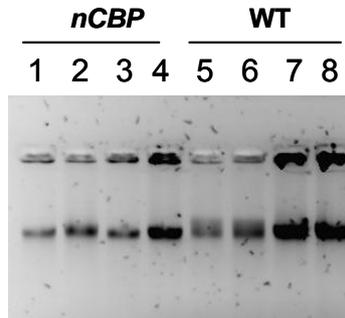


Figura 16. Gel de DNA. Carriles 1-4 corresponden al DNA de mutantes *nCBP* $-/-$; y los carriles 5-8 corresponden al DNA de plantas silvestres de *A. thaliana*.

En la F_3 de mutantes *nCBP* se identificaron a todos los individuos como homocigos nulos a partir de la amplificación del gen *nCBP* mutado con el T-DNA por medio de la técnica de PCR. En la figura 17 se observa un ejemplo de los varios resultados de la amplificación de los DNAs provenientes de las mutantes a identificar por el tipo de bandas visualizadas en el gel de agarosa. Las bandas muestran que varios de estos individuos poseen una mutación homociga nula al sólo observarse una banda alrededor de los 500 pares de bases.

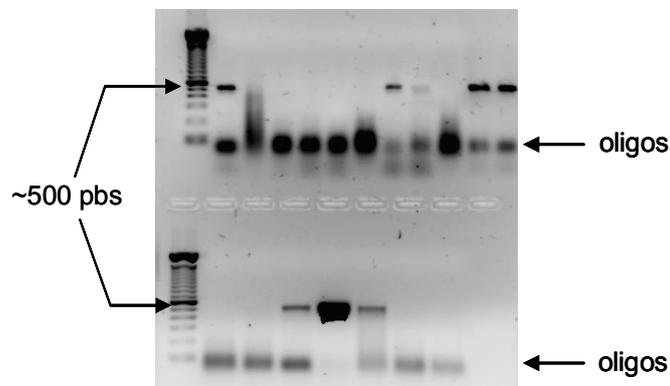


Figura 17. Gel de PCR de las plantas mutantes *nCBP*. Amplificación de la banda característica (~500 pbs) de mutantes homocigas nulas en *nCBP*.

El control usado en las PCRs fue el agua estéril empleada, como control negativo y nunca se observó alguna banda presente en su carril, lo cual implica que los resultados vistos en los geles son confiables y los reactivos no estaban contaminados con DNA. En algunos casos, se efectuaron repeticiones de la PCR debido a que las bandas que mostraban los geles no eran muy claras o no aparecían. Las repeticiones verificaron que las plantas mutantes sí eran homocigas nulas.

Es así como las mutantes de la F₃ fueron seleccionadas para dejar que crecieran, inflorescieran y produjeran semillas para caracterizar la cuarta generación filial de las mismas. En total, fueron 22 plantas las que conformaron a la F₃ que, como se esperaba, fue totalmente -/- con respecto a nCBP.

Cabe destacar que la banda mostrada en la amplificación de la F₃ de plantas mutantes (~500 pbs) con respecto a la mostrada en el gel de la figura 18 (~700 pbs), es de distinto peso debido al uso de dos diferentes oligonucleótidos que se alinean con el T-DNA insertado, el oligo LB. En el gel de la figura 17 se empleó el oligonucleótido LBb1, mientras que para la figura 18 se empleó el oligonucleótido LBA1 (véase Tabla 1).

La tercera y la cuarta generación filial (F₃ y F₄) tenían un genotipo -/- para nCBP. Para asegurarse de que la información genotípica fuera confiable con respecto a las amplificaciones realizadas con los oligonucleótidos LP, RP y LB (véase Tabla 1), se realizaron geles control de PCR. Es decir, la limitación de uno de los cebadores en la PCR sólo podía amplificar cierto patrón genotípico (silvestre u homocigo nulo) según sea el caso, utilizando como controles DNAs de plantas de *Arabidopsis* WT (véase figura 15).

La amplificación teórica de los oligonucleótidos LB, LP y RP se comprobó como se observa en la figura 18, donde las bandas de los carriles 3 y 5 (~700 pbs)

muestran una mutación $-/-$ del DNA de las mutantes nCBP; mientras que los carriles 2 y 4 estaban cargados con DNA silvestre. Se aprecia que en el carril 2 no hubo ninguna amplificación debido a que los oligonucleótidos adicionados tan solo pueden amplificar al genotipo mutante (tanto heterocigótico como homocigótico) pero en el carril 4 se observa la banda WT característica (1000 pbs), porque poseía todos los oligonucleótidos empleados en la reacción y nuevamente en el carril 5 el DNA mutante pudo amplificarse por la presencia de los oligonucleótidos LB y RP. Esto también demuestra que el oligonucleótido LB no participa definitivamente en la amplificación del DNA silvestre; así como el LP no interviene en la amplificación del DNA de las mutantes $-/-$.

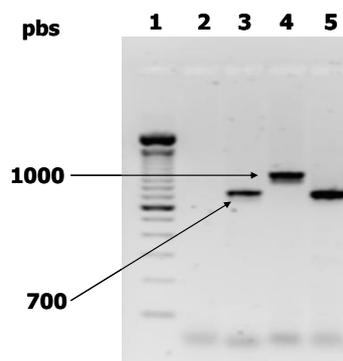
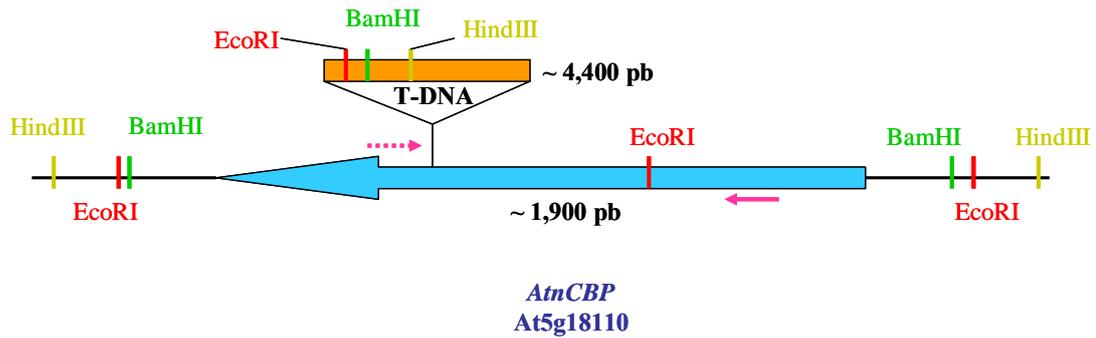


Figura 18. PCR control de mutantes nCBP de la F₃ vs. plantas WT. Carril 1: marcador de peso molecular; carril 2: DNA WT con oligos LB y RP; carril 3: DNA nCBP con oligos LB y RP; carril 4: DNA WT con oligos LP, LB y RP; carril 5: DNA nCBP con oligos LP, LB y RP.

VII.1.1.2. Análisis mediante Southern blot

Se realizó un estudio teórico que muestra los sitios de corte de diversas enzimas de restricción dentro del gen de nCBP y su entorno genómico en *A. thaliana*. Dentro del mismo mapa de restricción, se contempló la inserción del T-DNA así como los sitios de corte por parte de las enzimas de restricción; de tal forma que se logró predecir los distintos tipos de fragmentos que se iban a formar. y algunos de éstos serán de distinto peso molecular entre los DNAs mutantes y silvestres, pero serían reconocidos por una sonda en común (figura 19).



Enzima	WT	Mutante
<i>EcoRI</i>	1,812 1,454	4,380 1,857 1,454
<i>HindIII</i>	3,891	4,220 3,234
<i>BamHI</i>	3,098	5,443 2,080

Figura 19. Esquema teórico de los sitios de restricción dentro del gen de nCBP. La flecha azul representa al gen nCBP; las flechas rosas representan la zona que reconoce la sonda, delimitada por los oligos LP (punteada) y RP (sólida). También se destacan los sitios de corte de las enzimas EcoRI, HindIII y BamHI tanto en el gen como en su entorno y dentro del T-DNA. Abajo, tabla de los fragmentos que puede reconocer la sonda (teóricamente) de acuerdo a la digestión realizada con cada enzima de restricción.

Para realizar esta técnica, primero se extrajo el DNA de plantas silvestres y mutantes nCBP *-/-* (véase metodología); el cual, fue sometido a un tratamiento con enzimas de restricción, EcoRI y HindIII, para digerirlo y después separarlo en los fragmentos formados gracias a una electroforesis en gel de agarosa realizada en una noche a bajo voltaje (figura 20).

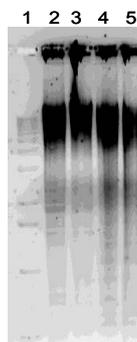


Figura 20. Gel de digestión de los DNAs para realizar el Southern blot. Carril 1: marcador de peso molecular en kpbs; carril 2: DNA WT digerido con EcoRI; carril 3: DNA *nCBP -/-* digerido con EcoRI; carril 4: DNA WT digerido con HindIII; carril 5: DNA *nCBP -/-* digerido con HindIII.

Una de las membranas del Southern blot mostró al menos una diferencia significativa en el peso de un fragmento de digestión. Dicho fragmento es más pesado en el DNA mutante que en el silvestre (figura 21). Las flechas punteadas señalan fragmentos reconocidos por la sonda en el DNA de la mutante, algunos diferentes del DNA WT (flechas enteras), indicando la inserción del T-DNA en la mutante *nCBP* *-/-*.

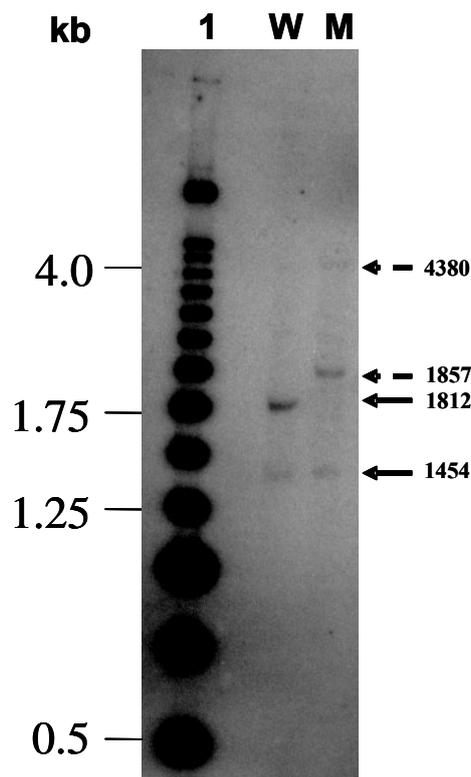


Figura 21. Southern blot. Carril 1: marcador de peso molecular; carril W: DNA WT digerido con EcoRI; carril M: DNA *nCBP* *-/-* digerido con EcoRI. Las flechas sólidas marcan los fragmentos obtenidos en el DNA silvestre y las flechas punteadas muestran los fragmentos del DNA de las mutantes *nCBP* *-/-*. Los valores mostrados junto a las flechas representan el peso de cada una en pares de bases.

La otra membrana, que contiene al DNA digerido con HindIII, también presenta una diferencia significativa entre el DNA silvestre y mutante como se muestra en la figura 22. Se observa una diferencia significativa entre las únicas bandas que se aprecian en la membrana, predichas en el estudio teórico (véase tabla de la figura 19).

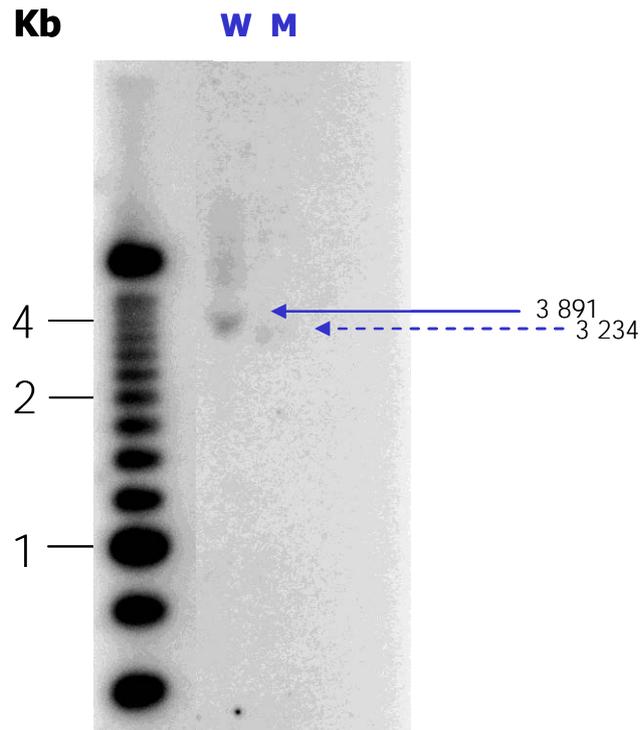


Figura 22. Southern blot. Primer carril: marcador de peso molecular; carril W: DNA WT digerido con HindIII; carril M: DNA *nCBP* *-/-* digerido con HindIII. Las flechas azul marca el fragmento visualizado en el DNA silvestre, y la flecha punteada muestra el fragmentos del DNA mutante *nCBP* *-/-*. Los valores mostrados junto a las flechas representan el peso de cada una en pares de bases.

VII.1.2. Análisis a nivel de RNA mediante la técnica de RT-PCR

Los RT-PCRs fueron realizados a partir de la extracción de RNA total de plántulas de 14 días (véase Metodología) tanto de individuos WT como *nCBP* *-/-*. En un gel de agarosa hecho con agua de DEPC, se cargaron 3 μ L de RNA total tanto silvestre como mutante y se dejó correr a un voltaje bajo (50-65 mV) para poder observar la integridad y la pureza del mismo. Como se aprecia en la figura 23, el RNA estaba íntegro y libre de DNA.

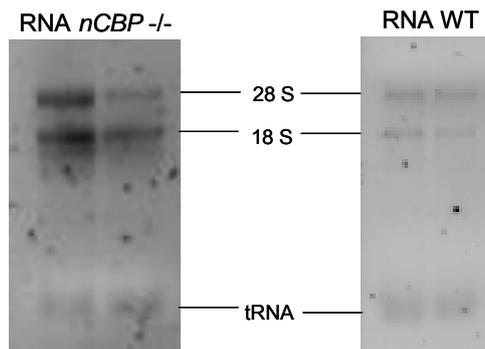


Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa de RNA total de plántulas *nCBP* *-/-* (izquierda) y plántulas WT (derecha). Se distinguen claramente las bandas del rRNA y del tRNA en ambos casos.

En el experimento de RT-PCR (figura 24) se demostró que no hay mRNA de la proteína *nCBP* en las plántulas mutantes *-/-* al no amplificar una banda característica (carril 2) proveniente del cDNA recién sintetizado en presencia de los oligonucleótidos *nCBP* (Tabla 2), como la apreciada en el carril 3 (550 pbs) del cDNA WT que sí tenía mRNA de dicha proteína. Éste resultado es confiable porque el carril del control negativo está limpio (carril 4) y el control de carga (rRNA 18S) tanto del RNA total *nCBP* *-/-* (carril 5) como del RNA total WT (carril 6) salió positivo y con la misma intensidad.

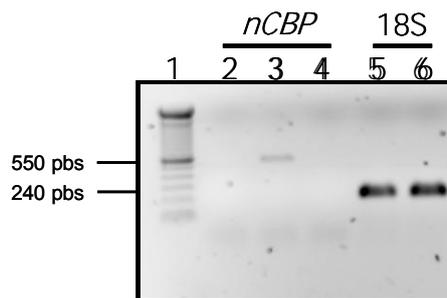


Figura 24. Gel de RT-PCR. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2: cDNA *nCBP* *-/-* con oligonucleótidos *nCBP*; carril 3: cDNA WT con oligonucleótidos *nCBP*; carril 4: control (-); carril 5: cDNA *nCBP* *-/-* con oligonucleótidos del rRNA 18S y carril 6: cDNA WT con oligonucleótidos del rRNA 18S.

VII.2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE PLANTAS MUTANTES nCBP -/-.

La caracterización fenotípica se realizó a partir desde la generación F₄ de las mutantes nCBP -/- y consistió en comparar las posibles diferencias morfológicas, de crecimiento y desarrollo de estas plantas con respecto al de las plantas silvestres de *A. thaliana* al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones de temperatura (21°C), humedad relativa (65%) y fotoperíodo, desde su siembra en caja Petri, hasta su senescencia y muerte en la cámara de floración, alrededor de 3-4 meses después de su siembra. Las observaciones se realizaron cada dos días (al igual que el riego de ambos tipos de plantas), encontrándose lo que se describe a continuación.

VII.2.1 Primera Caracterización (Junio-Octubre 2006)

La primera caracterización se realizó con 8 individuos mutantes y ocho silvestres sembrados en la misma caja Petri. Todos los individuos germinaron al mismo tiempo (entre 0-3 días) y crecieron hasta convertirse en plántulas, sin mostrar diferencias apreciables entre la línea silvestre y la línea mutante. Quince días después fueron transplantados 5 individuos de cada tipo de planta al sustrato en macetas individuales, de los cuales sobrevivieron 3 mutantes -/- y 4 WT. Las plantas de esta generación estuvieron bajo un fotoperíodo de día corto (8 h de luz, 16 h de oscuridad) del día 0 al 69 para favorecer el crecimiento y desarrollo de la roseta. Del día 70 en adelante estuvieron bajo un fotoperíodo de día largo (16 h de luz, 8 h de oscuridad) para favorecer la floración y desarrollo de la inflorescencia.

La caracterización a lo largo del desarrollo se puede resumir de la siguiente manera:

- **Germinación:** No se observó alguna diferencia en la germinación de las semillas. Como se mencionó anteriormente, entre el tercer y el cuarto día habían germinado por completo todas las semillas sembradas, tanto de las mutantes *ncbp -/-* como de las plantas silvestres.

- **Formación de la plántula:** El desarrollo de los nuevos individuos a partir de las semillas germinadas hasta la formación de plántulas (~4-15 días en la caja Petri) tanto en individuos silvestres como mutantes fue muy similar; poseían aproximadamente el mismo número de hojas (entre 4 y 5) y una altura muy semejante, así como un estado de desarrollo relativamente parecido entre todos los individuos.

- **Fase vegetativa:** Comprende el desarrollo de las hojas de la roseta y la raíz para el aprovechamiento eficiente de los nutrientes, promoviendo también la reserva de los mismos en las hojas y la síntesis de carbohidratos a partir de la fotosíntesis. Esta fase termina cuando la inflorescencia se presenta en la planta y todas las reservas de nutrientes se destinan al desarrollo de las flores. Fue en esta etapa del desarrollo donde se observaron diferencias sutiles. La primera y más importante, se presenta en la interfase del fin de la fase vegetativa y el comienzo de la reproductiva y es el evidente atraso en la aparición de la inflorescencia entre las plantas mutantes con respecto a las silvestres (6 días después) como se ve claramente en la figura 26. La segunda fue una ligera diferencia en la tonalidad verde de las hojas; más clara para las plantas *nCBP -/-* con respecto a las WT (véase la figura 25). También en dicha etapa, se observó que la planta mutante tiene una roseta aparentemente más frondosa, abultada, con más hojas, a pesar de no mostrar diferencias significativas con respecto a las plantas silvestres al realizar un promedio del número de hojas que hay en la roseta de las plantas silvestres respecto al de las mutantes *nCBP -/-* de esta caracterización.



Figura 25. A la izquierda, planta mutante nCBP -/- y a la derecha planta WT en la fase vegetativa. Nótese la diferencia cualitativa entre las tonalidades verdes de ambas plantas y cómo en apariencia, la roseta de la planta mutante posee más hojas que la silvestre.

- **Fase reproductiva:** una vez que aparece la inflorescencia de forma diferencial entre mutantes y silvestres (véase figura 26), en esta fase se nota claramente la desigualdad entre la presencia de las primeras flores y, como consecuencia directa, la formación de silicuas y posteriormente de las semillas. Todo esto ocurrió primero en las plantas WT, como se observa en las figura 26 y 27. A pesar de ello, la producción de semillas fue muy semejante entre plantas mutantes y silvestres, así como el tamaño de las plantas y el número de ramificaciones inflorescentes.



Figura 26. A la izquierda, planta mutante nCBP -/- y a la derecha planta WT en el inicio de la fase reproductiva de *A. thaliana*. La inflorescencia en la planta silvestre es muy evidente, así como la diferencia en las tonalidades verdes de ambas plantas se sigue distinguiendo sutilmente.

Inicio de la fase reproductiva en *A. thaliana* WT y nCBP -/-

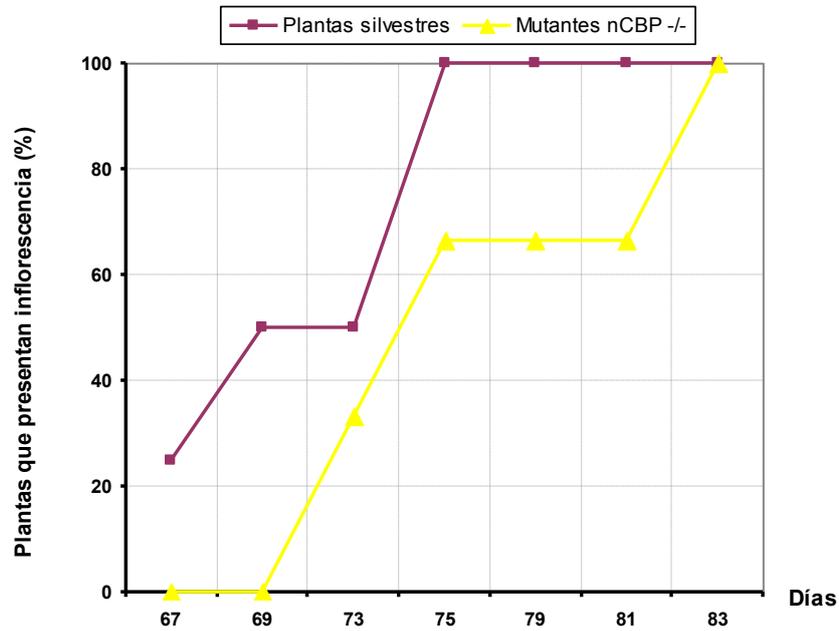


Figura 27. Gráfico de la aparición de la inflorescencia en plantas silvestres (color ciruela) con respecto a las mutantes nCBP -/- (color amarillo) en la primera caracterización.

Aparición de silicuas en *A. thaliana* WT y nCBP -/-

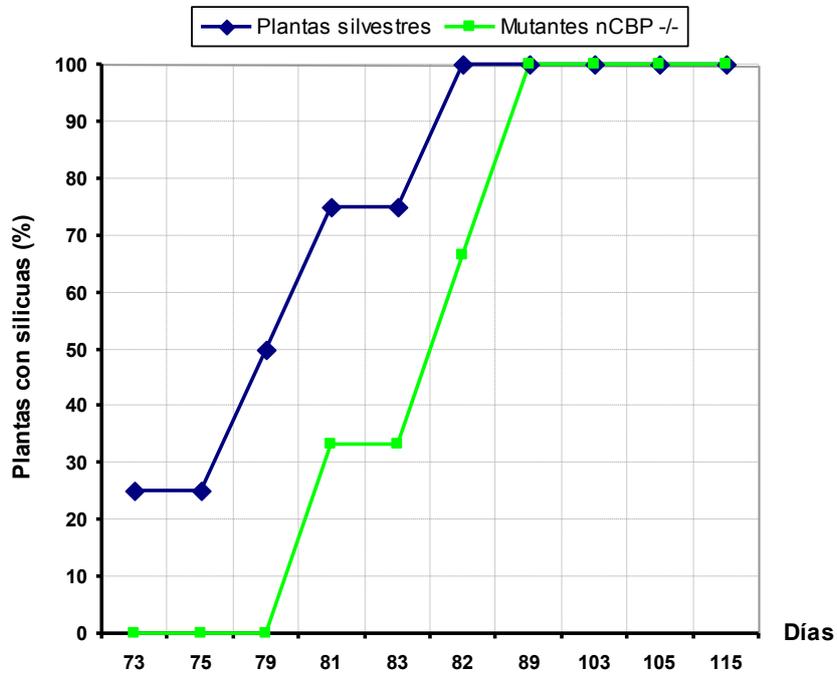


Figura 28. Gráfico de la aparición de las silicuas en plantas silvestres (color azul fuerte) con respecto a las mutantes nCBP -/- (color verde) en la primera caracterización.

- **Senescencia y muerte de las plantas:** Otra notable diferencia se pudo apreciar en esta etapa. Una vez que la planta ha desarrollado inflorescencias las hojas de la roseta comienzan a deteriorarse, ya que toda la materia y energía disponible se destina a la reproducción de la planta. Se observó que las plantas mutantes conservan por más tiempo algunas hojas en la roseta, mientras que las silvestres no (figuras 29 y 30). Nótese en la figura 29, cómo la roseta de la planta silvestre está mucho más deteriorada que la mutante *-/-* mes y medio después de la aparición del escapo floral en las plantas WT.

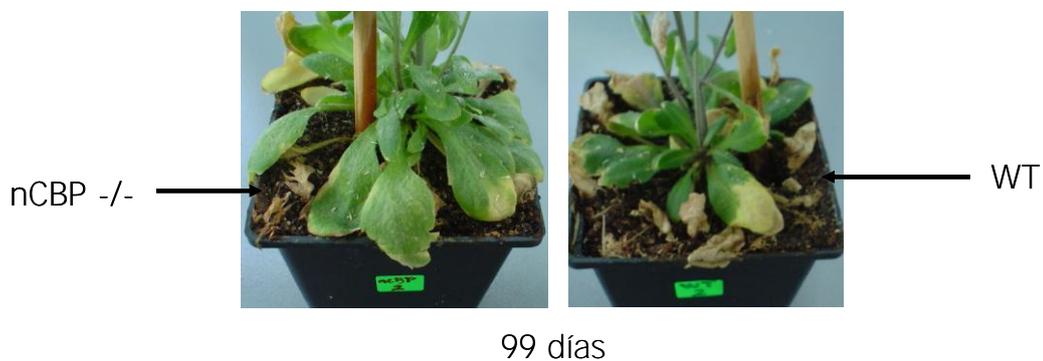


Figura 29. A la izquierda, plantas mutantes *nCBP -/-* y a la derecha plantas WT a los 99 días después de su transplatación a macetas. La senescencia de la roseta se hace evidente poco después de la aparición de la inflorescencia en las plantas silvestres, pero en las plantas mutantes no.

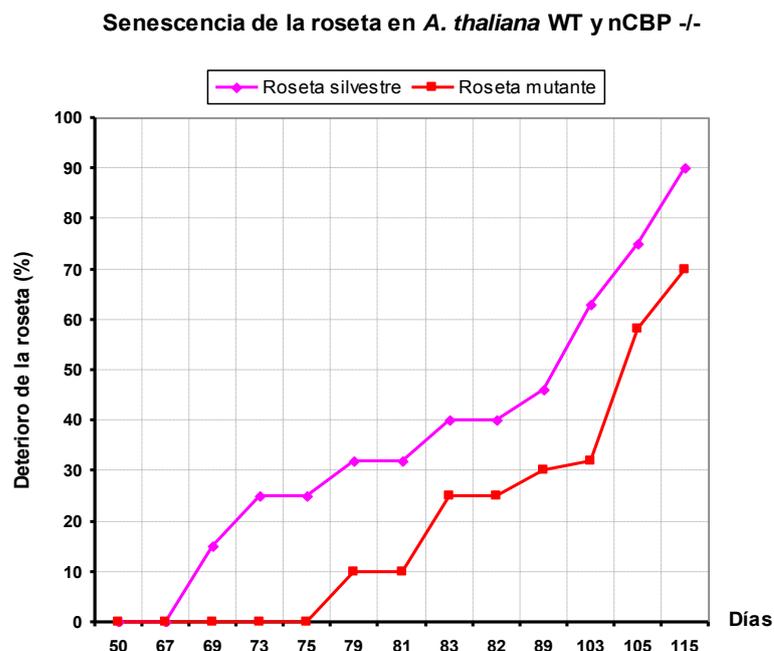


Figura 30. Gráfico del deterioro de la roseta en plantas silvestres (color rosa) con respecto a las mutantes *nCBP -/-* (color rojo) en la primera caracterización.

VII.2.2. Segunda Caracterización (Agosto 2006 – Febrero 2007)

Para la segunda caracterización se utilizaron otras semillas provenientes de la F₃ de mutantes nCBP -/-. Se sembraron 30 individuos mutantes y 30 silvestres en la misma caja Petri. Quince días después fueron transplantados 11 individuos de cada tipo de planta, de los cuales sobrevivieron hasta la etapa senescente 4 mutantes -/- y 4 WT debido a una plaga de hongos que afectó al resto de los individuos. Al comparar los resultados obtenidos en la segunda caracterización con los de la primera caracterización, se observó un fenotipo sutil pero reproducible respecto a la floración en las plantas mutantes (compárese la figura 27 con la 31) y la senescencia tardía en la roseta de las plantas mutantes respecto a las silvestres (compárese la figura 30 con la 33).

En esta generación de mutantes y plantas silvestres caracterizadas, hubo algunos cambios con respecto a la primera generación caracterizada. Hubo un cambio en el fotoperíodo, de día corto a día largo, que ocurrió a los 60 días en las plantas, debido a la necesidad de desalojar la cámara de desarrollo en la que se encontraban; por lo cual, todas las plantas sufrieron el cambio de fotoperíodo 10 días antes que la caracterización anterior. Dicho cambio en el fotoperíodo de día corto a día largo, favoreció la inflorescencia de las plantas silvestres con respecto a las mutantes antes de tiempo si se compara con la primera caracterización. Para este segundo análisis fenotípico hay que tomar en cuenta que la aparición de la plaga de hongos y la aplicación de fungicida, tanto a plantas silvestres como mutantes, las sometió a un estrés que pudo alterar la etapa de desarrollo en la que se encontraban.

Sin embargo, se observaron las mismas manifestaciones de la primera caracterización, que consistieron en la aparición de la inflorescencia primero en las plantas silvestres y 6 días después en las mutantes, con el consiguiente retraso en la

aparición de las flores (véase figura 31), silicuas (véase figura 32) y semillas en las plantas mutantes con respecto a las silvestres.

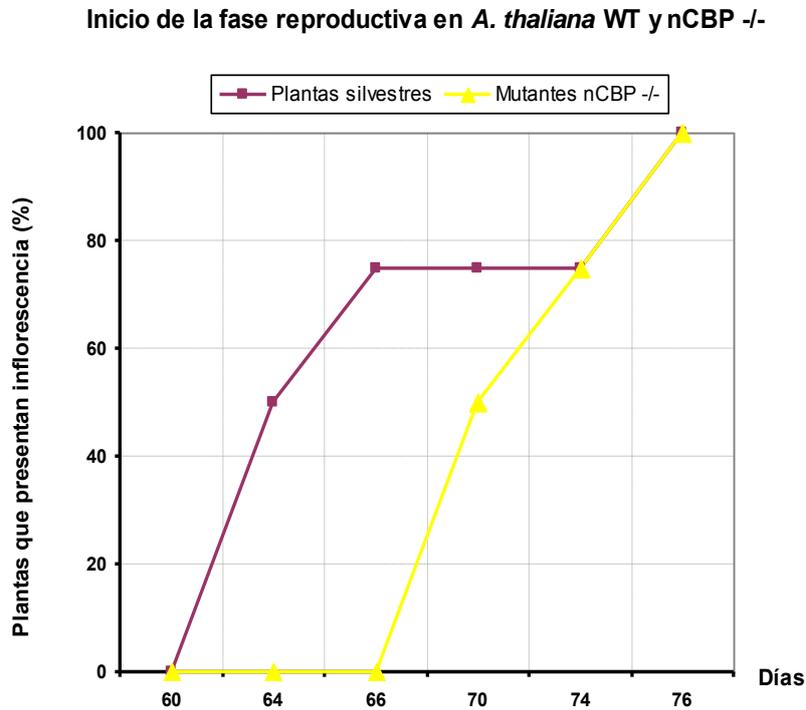


Figura 31. Gráfico de la aparición de la inflorescencia en plantas silvestres (color ciruela) con respecto a las mutantes nCBP -/- (color amarillo) en la segunda caracterización.

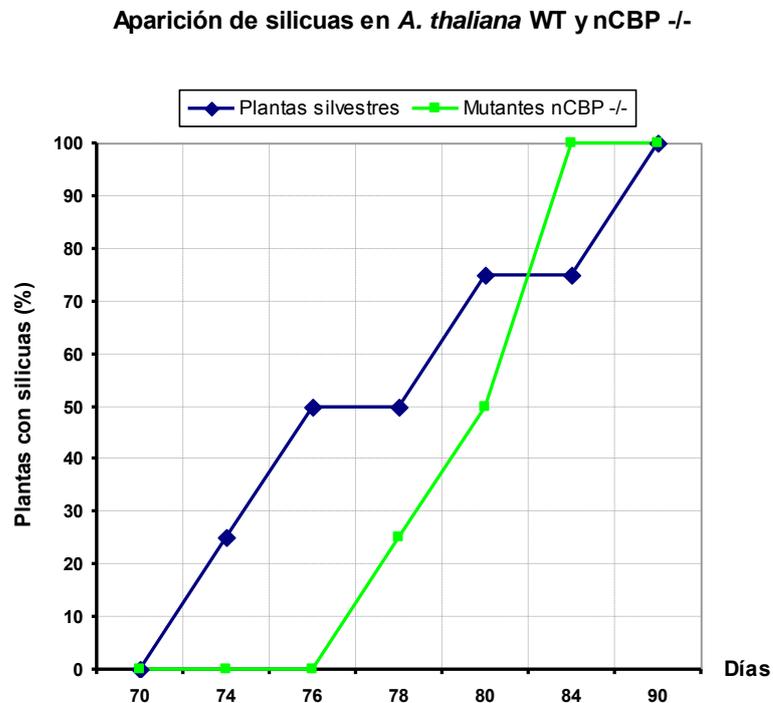


Figura 32. Gráfico de la aparición de las silicuas en plantas silvestres (color azul fuerte) con respecto a las mutantes nCBP -/- (color verde) en la segunda caracterización.

El deterioro de la roseta comenzó inclusive en una etapa más temprana que en la primera caracterización en las plantas silvestres y, por los mismos días, en las plantas mutantes de la proteína nCBP (véase figura 33). La tonalidad verde clara aún se conserva en las plantas mutantes de esta caracterización frente a una más oscura que se observó de igual forma en los individuos WT. Por obvias razones, este segundo estudio fenotípico entre plantas silvestres y mutantes nCBP $-/-$ reveló una característica que no se había observado: las plantas nCBP $-/-$ son tan resistentes como las WT frente a una plaga de hongos (cuya especie se desconoce).

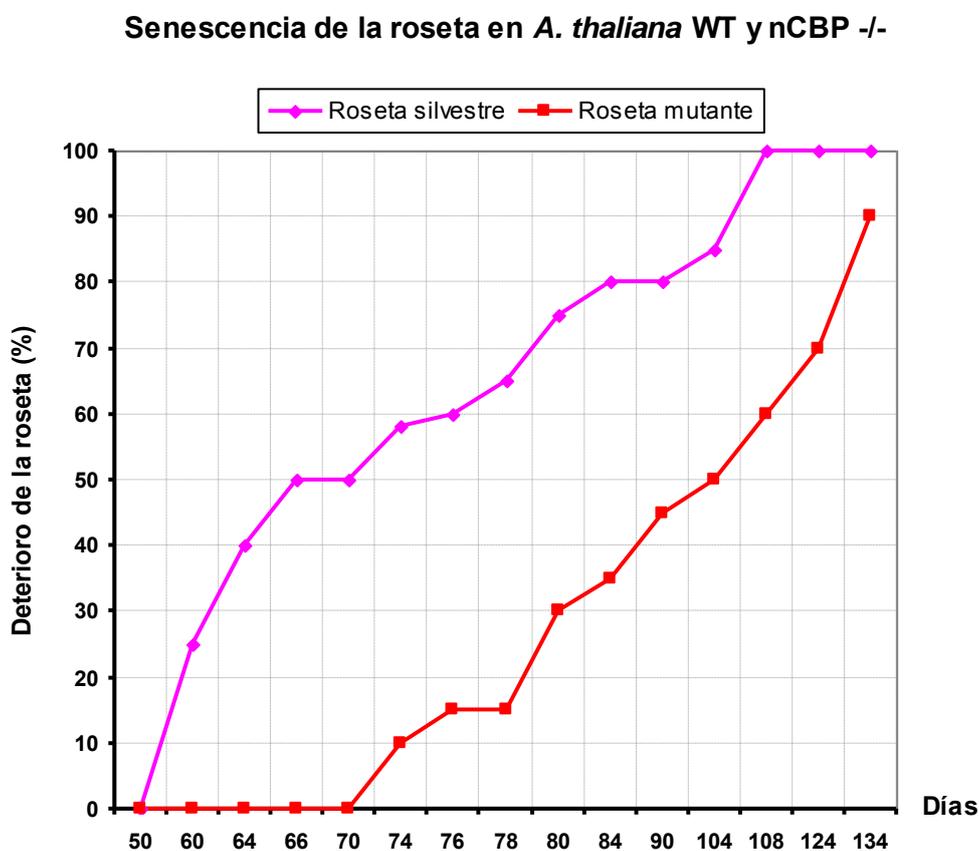


Figura 33. Gráfico del deterioro de la roseta en plantas silvestres (color rosa) con respecto a las mutantes nCBP $-/-$ (color rojo) en la segunda caracterización.

Los resultados representados en las gráficas de las figuras 27, 28, 30-33 no se sometieron a un análisis estadístico, porque cada caracterización es independiente una de otra debido a las condiciones a las que estuvieron sometidas (que fueron muy distintas entre sí). Por tanto, son experimentos independientes que no deben

tomarse como equivalentes, ya que de haberlo hecho, el error estándar obtenido hubiese sido muy grande debido a todas las variables que influyeron en una de las caracterizaciones, pero en la otra no.

VII.2.3. Caracterización morfológica de las mutantes nCBP -/-

A continuación, se presentan algunos resultados con el correspondiente análisis estadístico únicamente para las plantas que formaron parte de la primera caracterización del desarrollo, ya que la información recabada de la segunda caracterización no es del todo confiable por las razones antes expuestas en el apartado anterior. En la figura 34 se aprecian algunos de los parámetros mesurables hechos en la roseta de las plantas de *A. thaliana* durante ambas caracterizaciones. Cabe señalar que dichas mediciones mostradas en la figura 34 se realizaron una vez por semana hasta la aparición del tallo inflorescente.

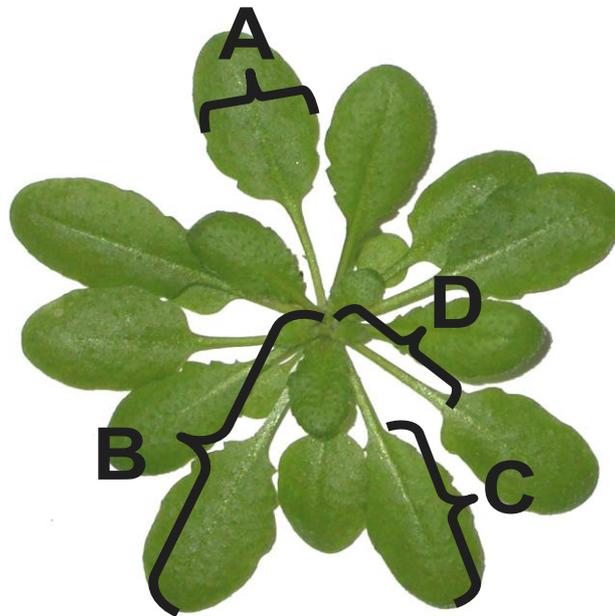


Figura 34. Mediciones realizadas en la roseta de las plantas caracterizadas. A) Medición del ancho de las hojas. B) Medición del radio de la roseta. C) Medición de la longitud del limbo de la hoja. D) Medición de la longitud del pecíolo.

VII.2.3.1. Medición del radio de la roseta

Este parámetro se midió a partir del día 35 de desarrollo, hasta el día 77 donde la inflorescencia había aparecido en prácticamente todos los individuos tanto mutantes como silvestres a caracterizar. La figura 35 muestra el gráfico obtenido a partir de las mediciones realizadas como promedio para plantas silvestres y mutantes. Tomando en cuenta los errores estándar calculados no hay una diferencia significativa en el radio de la roseta en plantas mutantes con respecto a las WT, durante el período analizado.

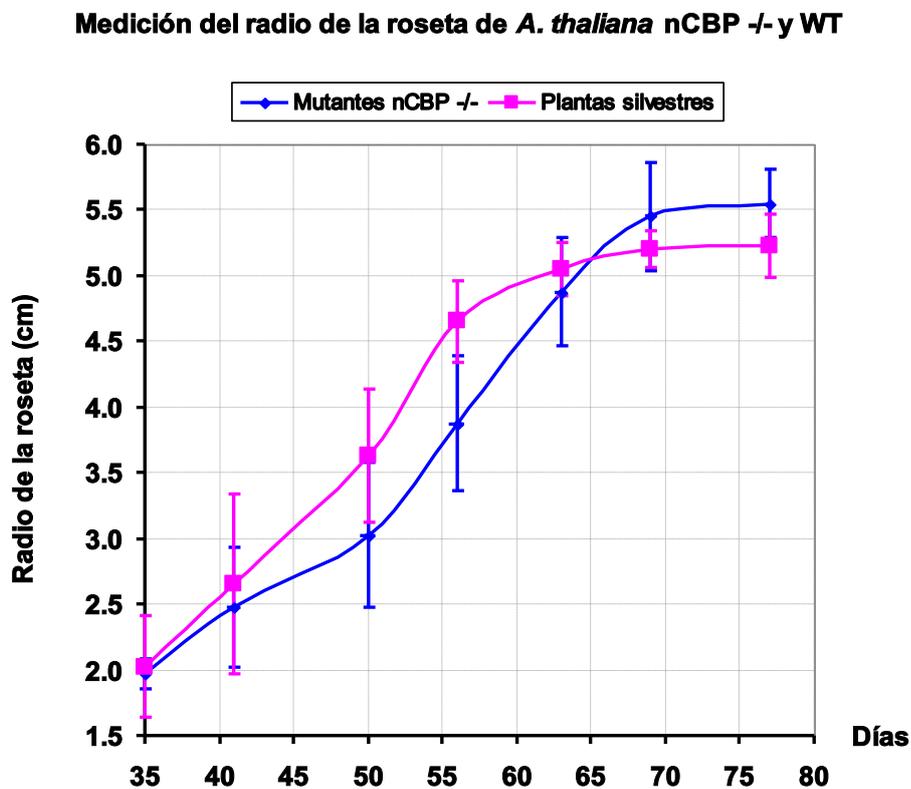


Figura 35. Gráfico de la tendencia en el crecimiento de la roseta de las plantas mutantes (color azul) con respecto al de las plantas WT (color rosa).

VII.2.3.2. Medición del pecíolo de las hojas

En este punto, se creyó que si podía existir una diferencia notable entre las plantas silvestres y las mutantes ya que parecía, en el caso de las plantas silvestres, que la

longitud de sus pecíolos era significativamente mayor que la de las mutantes a temprana edad (figura 26). Sin embargo, la figura 36 muestra que dicha característica no fue significativa debido, como en el caso anterior, al error estándar estimado. La medición de los pecíolos fue hecha en hojas distintas cada semana y se tomó registro de dos medidas por cada individuo (los dos más desarrollados, que siempre fueron los mismos) en ambas líneas de plantas a caracterizar.

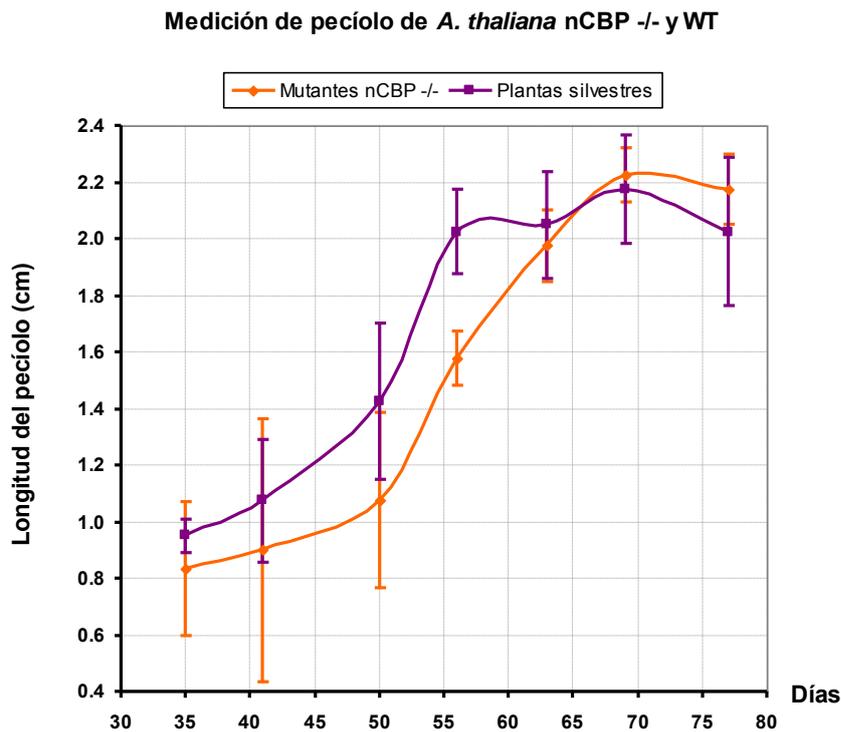


Figura 36. Gráfico que muestra la tendencia en el crecimiento del pecíolo de las plantas mutantes (color naranja) con respecto al de las plantas WT (color violeta).

VII.2.3.3. Medición de la longitud y el ancho de las hojas

Igual que en el caso anterior, parecía que las hojas de las plantas mutantes eran más anchas que las silvestres y, con respecto a éstas últimas, tenían una menor longitud. Pero en la figura 37 se muestra una tendencia similar a las presentadas con anterioridad, observándose que no hay ninguna diferencia apreciable de forma estadística tanto en la longitud como en el ancho de las hojas de la roseta de ambos tipos de líneas vegetales. A las hojas que se les midió la longitud del pecíolo,

también les fueron realizadas las mediciones de la longitud y ancho de hoja; por tanto, presentan las mismas características descritas en la medición de los pecíolos.

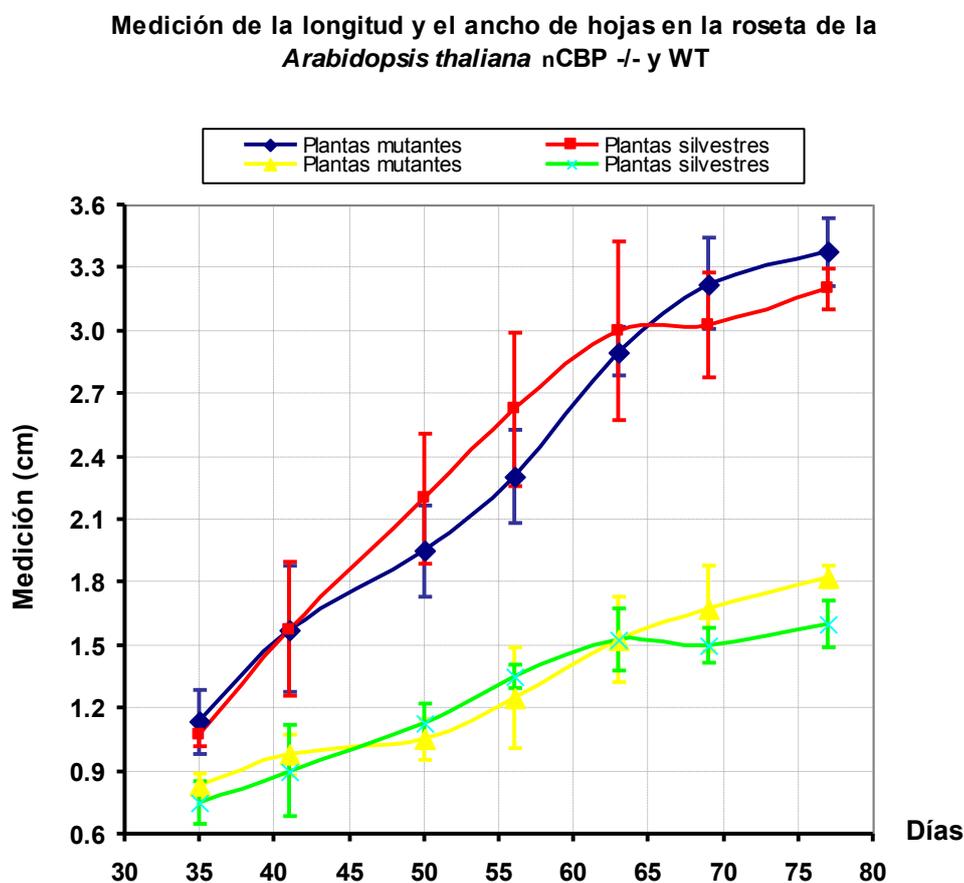


Figura 37. Gráfico que muestra la tendencia del crecimiento en la longitud de las hojas de la roseta en las plantas mutantes (en azul marino) con respecto al de las plantas WT (en rojo); así como del crecimiento a lo ancho de las hojas de la roseta de las plantas mutantes (en amarillo) con respecto al de las plantas silvestres (en verde).

VII.2.3.4. Medición de la altura de la inflorescencia

Debido a la expectativa mostrada con anterioridad donde se observó cómo la aparición de la inflorescencia ocurría primero en las plantas silvestres y posteriormente en las mutantes, se llegó a esperar que pudiese haber una diferencia en cuanto a la longitud de la inflorescencia principal entre plantas WT y mutantes nCBP ^{-/-}. A pesar de ello, sólo se observa un ligero atraso no significativo (debido al error estándar estimado) en el crecimiento de la inflorescencia en las plantas mutantes con respecto a las silvestres (véase la figura 38).

Medición de la longitud de la inflorescencia principal en *A. thaliana* nCBP -/- y WT

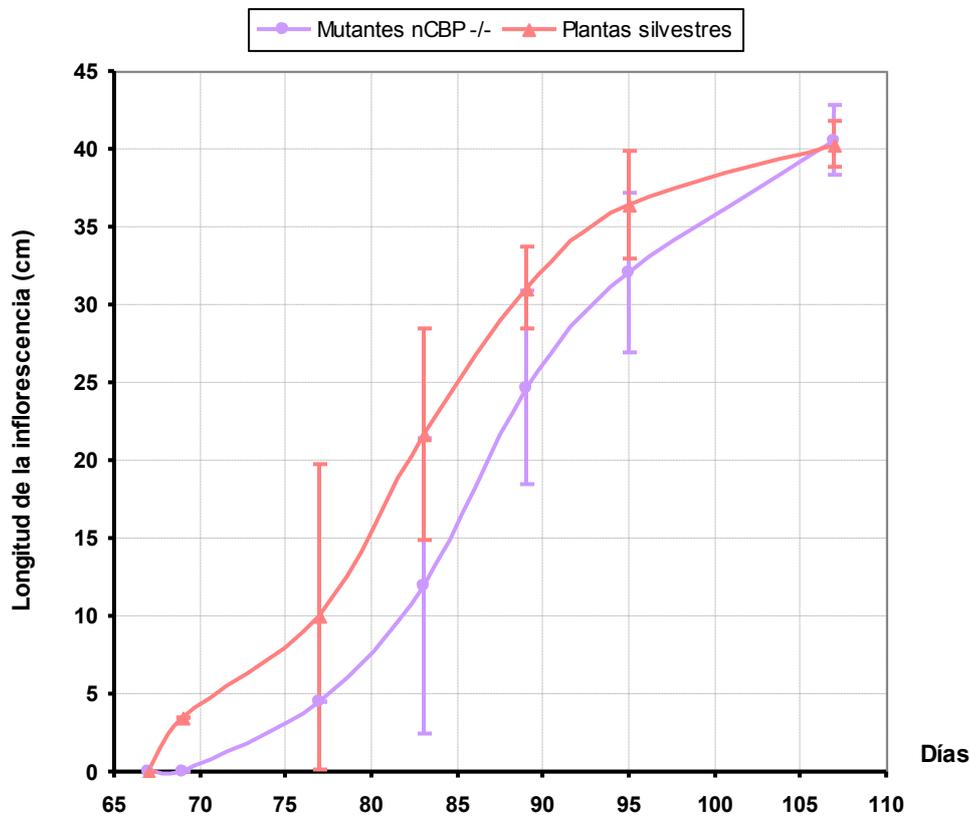


Figura 38. Gráfico que muestra la tendencia del crecimiento en la longitud de la inflorescencia principal de las plantas mutantes (en color lila) con respecto al de las plantas WT (en color salmón).

VII.2.3.5. Medición de la clorofila total

La cantidad de clorofila total que poseen las plantas silvestres propuso que pudo ser mayor con respecto a la de plantas mutantes -/- . Se extrajo la clorofila de hojas que aproximadamente tuviesen el mismo desarrollo en la roseta, de plantas jóvenes (mes y medio de edad) tanto silvestres como mutantes, que estuvieron bajo las mismas condiciones de luz y temperatura durante todo ese tiempo y, aparentemente, como lo observado en ambas caracterizaciones fenotípicas, la tonalidad en el color verde seguía siendo más clara para las plantas nCBP -/- que para las WT. De acuerdo a la gráfica presentada en la figura 39, la diferencia en la

tonalidad verde no es significativa debido al error estándar estimado, pero sólo con respecto a la cantidad de clorofila total, es decir, sin incluir dentro de estas mediciones algún otro pigmento presente también en las hojas.

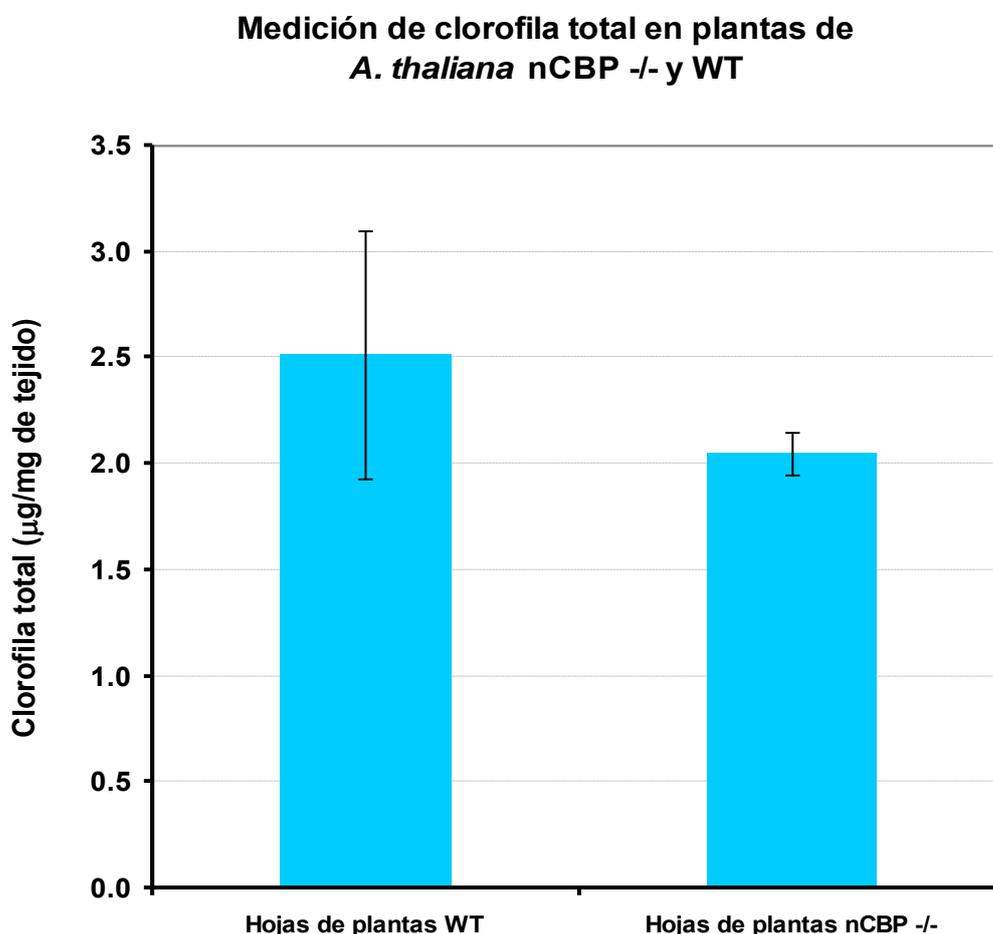


Figura 39. Gráfico de la cantidad de clorofila total encontrada en hojas de roseta de plantas silvestres (a la izquierda) con respecto a las plantas nCBP -/- (a la derecha) en *A. thaliana*.

Otros parámetros como el número de hojas, el número de ramificaciones y la muerte de las plantas mutantes nCBP -/- con respecto a las silvestres, no mostraron diferencias significativas. Cabe mencionar que no hubo alteraciones morfológicas en la forma de las hojas, en la conformación de los pétalos, estambres y estigma de las flores de las plantas mutantes, así como en la estructura de las silicuas y de las semillas (al igual que su color) con respecto a las plantas silvestres, lo cual indica que la ausencia de la proteína nCBP no se traduce en alteraciones morfológicas en el fenotipo de la mutante -/-.

VII.3. EXPRESIÓN DE *nCBP* Y OTROS GENES DE LA FAMILIA *eIF4E* DURANTE EL DESARROLLO DE *Arabidopsis thaliana*.

VII.3.1. Perfiles de expresión de los mRNAs de *nCBP*, *eIF4E* y *eIF(iso)4E* en *Arabidopsis thaliana*

Para obtener dichos perfiles, primero se extrajo el RNA total de los siguientes tejidos de la *Arabidopsis thaliana* silvestre: semilla, plántula, raíz (de 15 días), hoja madura (~mes y medio de edad), pecíolo, flor y silicua inmadura. La figura 40 muestra la integridad y pureza de dichos RNAs totales empleados para la realización de los perfiles.

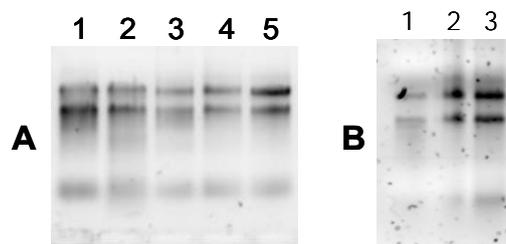


Figura 40. Electroforesis en gel de agarosa del RNA total de diversos tejidos de plantas WT. (A) Carril 1: RNA plántula; carril 2: RNA raíz; carril 3: RNA hoja madura; carril 4: RNA pecíolo y carril 5: RNA flor. (B) Carril 1 y 2: RNA semilla y carril 3: RNA silicua inmadura. En ambos geles se aprecian las bandas del rRNA 28 y 18S (bandas más pesadas) así como la del tRNA (banda más ligera).

Actualmente la base de datos de *Arabidopsis thaliana* cuenta con perfiles de expresión para la mayoría de los genes de esta planta obtenidos mediante microarreglos de DNA (<http://www.geneinvestigator.ethz.ch/>). La figura 41 muestra el perfil del mRNA de *nCBP* en ciertos tejidos, acorde a esta base de datos. En este trabajo se seleccionaron algunos de estos tejidos para comprobar la expresión de *nCBP* y compararla con la expresión de otros miembros de la familia *eIF4E*.

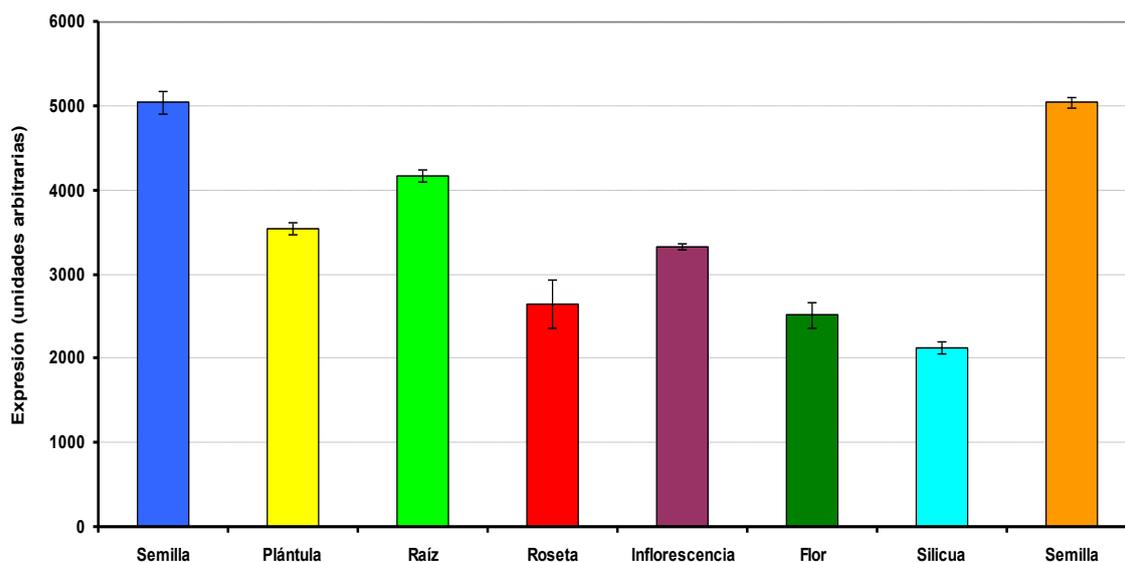


Figura 41. Gráfico de expresión del mRNA de la proteína nCBP en *Arabidopsis thaliana* silvestre disponible a partir de experimentos con microarreglos.

Para que los diversos perfiles de expresión fuesen confiables, se empleó como control de carga los oligonucleótidos del rRNA 18S (véase Tabla 2) y los patrones de expresión observados después de haber hecho el RT-PCR con los respectivos oligonucleótidos de los miembros de la familia eIF4E en *A. thaliana*, fueron normalizados con este control de carga gracias a la realización de una densitometría previa con el equipo Fluor-S. Posteriormente, se graficaron los valores obtenidos en la normalización y se comparó el nivel de expresión que posee cada factor, respectivamente, en ciertos tejidos y estadios del desarrollo de la planta. Las condiciones de reacción empleadas son las descritas en el apartado de RT-PCRs en la metodología, excepto para el caso de la amplificación con los oligonucleótidos del rRNA 18S donde se emplearon 25 ciclos de reacción en vez de 28, para evitar su saturación y así observar un patrón real de su expresión.

VII.3.1.1. Perfil de expresión de *nCBP* en *A. thaliana*

Se realizaron cuatro RT-PCRs usando los oligonucleótidos de la proteína *nCBP* (véase Tabla 2), a los que se les realizó una densitometría y se les normalizó. De acuerdo a los resultados obtenidos en las densitometrías y efectuando el análisis estadístico correspondiente (promedio y desviación estándar), el perfil de expresión semicuantitativo de *nCBP* se puede observar en la figura 42.

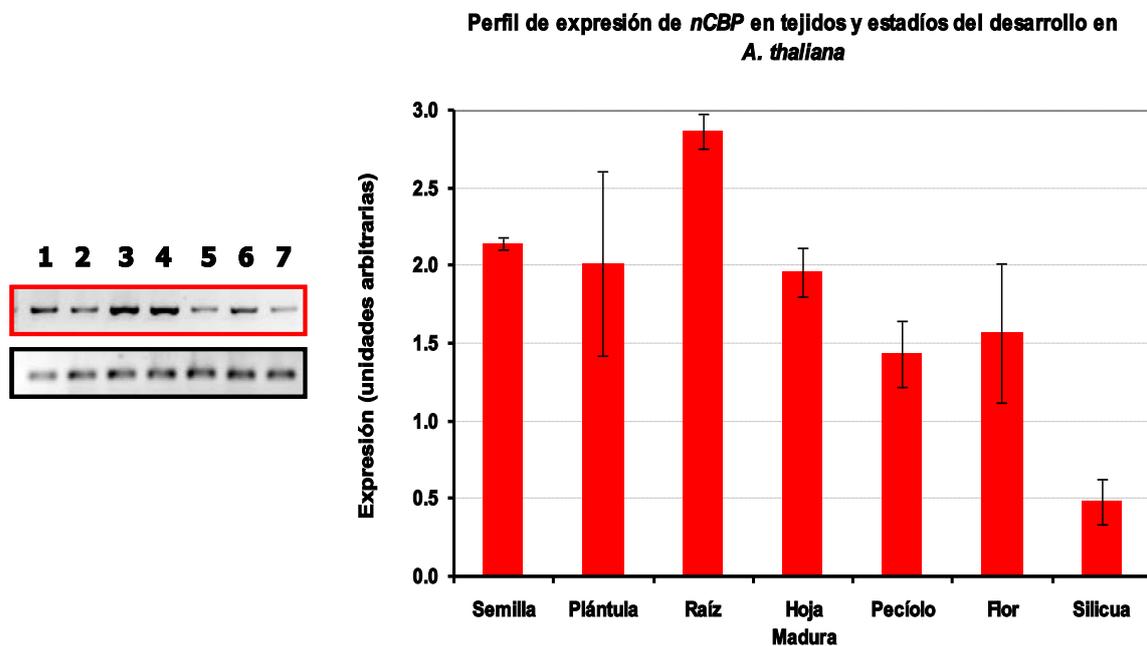


Figura 42. Perfil de expresión de la proteína *nCBP* en *A. thaliana*. A la izquierda, carril 1: RNA semilla; carril 2: RNA plántula; carril 3: RNA raíz; carril 4: RNA hoja madura; carril 5: RNA pecíolo; carril 6: RNA flor y carril 7: RNA silicua inmadura. En el recuadro rojo se observa el perfil a nivel transcrito de la proteína *nCBP*. En el recuadro negro se aprecia el control de carga con el rRNA 18S. A la derecha, gráfico del perfil de expresión de *nCBP* tomando en cuenta los 4 experimentos realizados.

En el gráfico del perfil de la figura 42, se observa cómo hay un gran nivel de expresión de *nCBP* en etapas tempranas del desarrollo como lo es la semilla y la plántula, así como en el tejido de la raíz; mientras que en el resto de los tejidos hay una disminución notable de su expresión.

VII.3.1.2. Perfil de expresión de *eIF4E* en *A. thaliana*

Se realizaron tres RT-PCRs usando los oligos del factor *eIF4E* (véase Tabla 2), a los que se les realizó una densitometría y también se les normalizó. De igual manera, se realizó el cálculo del promedio y la desviación estándar de los tres experimentos y de esta forma se obtuvo el perfil de expresión semicuantitativo de *eIF4E*, que se observa en la figura 43.

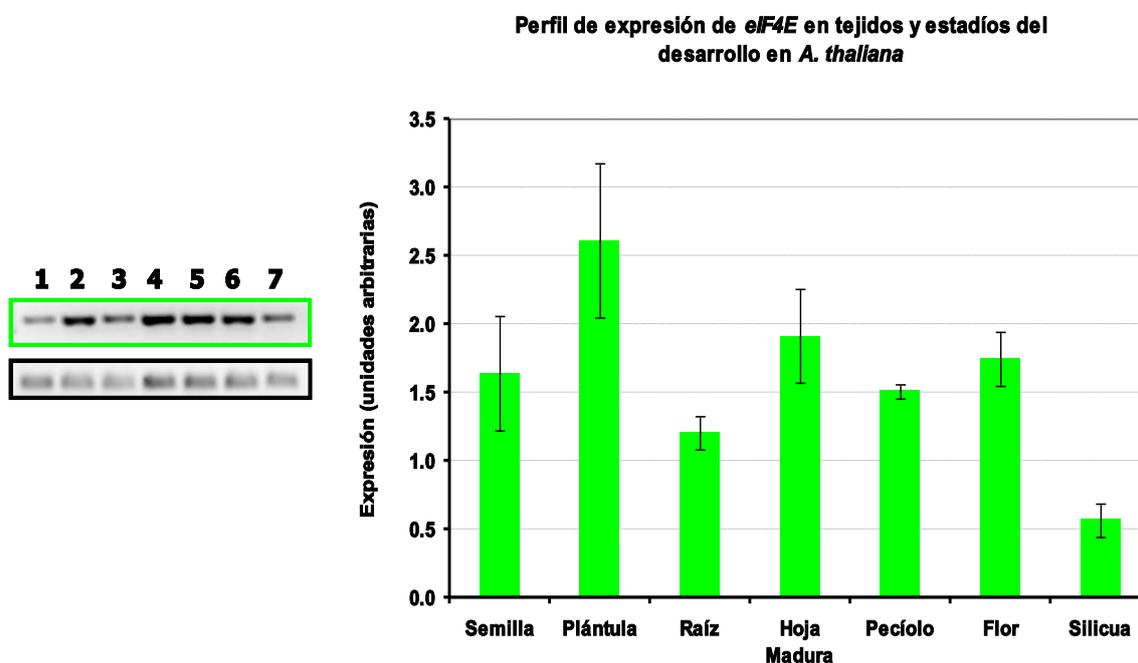


Figura 43. Perfil de expresión del factor *eIF4E* en *A. thaliana*. A la izquierda, carril 1: RNA semilla; carril 2: RNA plántula; carril 3: RNA raíz; carril 4: RNA hoja madura; carril 5: RNA pecíolo; carril 6: RNA flor y carril 7: RNA silicua inmadura. En el recuadro verde se observa el perfil a nivel transcrito del factor *eIF4E*. En el recuadro negro se aprecia el control de carga con el rRNA 18S. A la derecha, gráfico del perfil de expresión de *eIF4E* tomando en cuenta los 3 experimentos realizados.

De acuerdo a lo observado en la figura 43, el factor *eIF4E* es expresado de manera similar en todos los tejidos y estadios del desarrollo en *A. thaliana*, excepto en plántula donde se aprecia un alto nivel de expresión y en silicua donde el nivel de expresión de su mRNA disminuye considerablemente.

VII.3.1.3. Perfil de expresión de *eIF(iso)4E* en *A. thaliana*

Se realizaron tres RT-PCRs usando los oligos del factor *eIF(iso)4E* (véase Tabla 2), a los que se les realizó una densitometría e igualmente se les normalizó con respecto al control de carga (rRNA 18S). Después de realizar el análisis estadístico correspondiente, el perfil de expresión semicuantitativo de éste factor quedó finalmente como se observa en la figura 44.

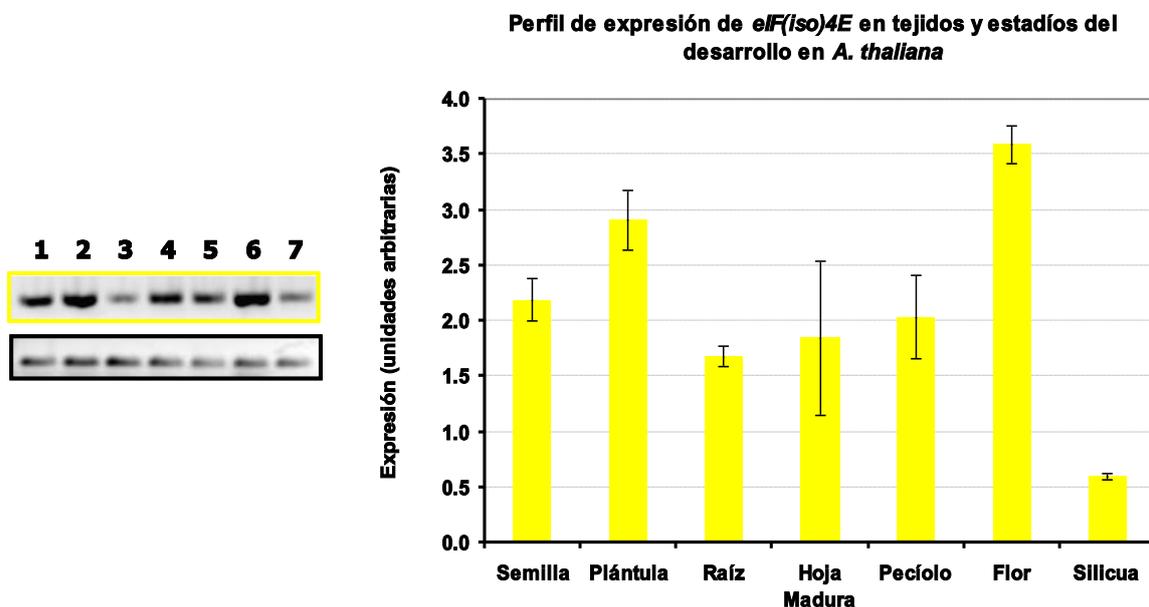


Figura 44. Perfil de expresión del factor *eIF(iso)4E* en *A. thaliana*. A la izquierda, carril 1: RNA semilla; carril 2: RNA plántula; carril 3: RNA raíz; carril 4: RNA hoja madura; carril 5: RNA pecíolo; carril 6: RNA flor y carril 7: RNA silicua inmadura. En el recuadro amarillo se observa el perfil a nivel transcrito del factor *eIF(iso)4E*. En el recuadro negro se aprecia el control de carga con el rRNA 18S. A la derecha, gráfico del perfil de expresión de *eIF(iso)4E* tomando en cuenta los 3 experimentos realizados.

En este perfil de expresión del factor *eIF(iso)4E*, se observa un patrón de expresión muy similar en todos los tejidos. Sin embargo, hay mayor cantidad del transcrito de dicha proteína en plántula y flor; que coincide con lo reportado en la literatura (Rodríguez et al., 1998). El menor nivel de expresión se aprecia en el tejido de silicua.

VII.3.2. Expresión de los factores *eIF4E* y *eIF(iso)4E* en plántulas mutantes *nCBP* *-/-* vs. plántulas silvestres de *Arabidopsis thaliana*

Resulta interesante saber cómo se expresan los factores *eIF4E* y *eIF(iso)4E* cuando la proteína *nCBP* no está presente, frente al patrón de expresión que comúnmente tienen dichas proteínas cuando las tres están presentes, como en la planta silvestre. Para ello, se escogió como modelo la plántula, dado que en este estadio los tres miembros de la familia *eIF4E* se expresan considerablemente, además de obtener fácilmente tejido de esta etapa del desarrollo. Se empleó el RNA extraído para demostrar la ausencia del mRNA de la proteína *nCBP* en plántulas *nCBP* *-/-*, así como el de plántula WT extraído como control positivo de dicha prueba.

VII.3.2.1 Expresión del factor *eIF4E* en plántulas mutantes *nCBP* *-/-* vs. plántulas silvestres de *Arabidopsis thaliana*

Se realizaron tres perfiles de expresión usando los oligonucleótidos de *eIF4E* para RNA (Tabla 2) y como control de carga los oligonucleótidos del rRNA 18S (Tabla 2). A partir de la densitometría de cada experimento, normalizada con los valores obtenidos del control de carga, se tomó como el 100% el valor arbitrario de expresión que presentan las plántulas silvestres; se realizó el análisis estadístico correspondiente y se observó el patrón mostrado en la figura 45.

Expresión de *eIF4E* en plántula *nCBP* *-/-* y WT

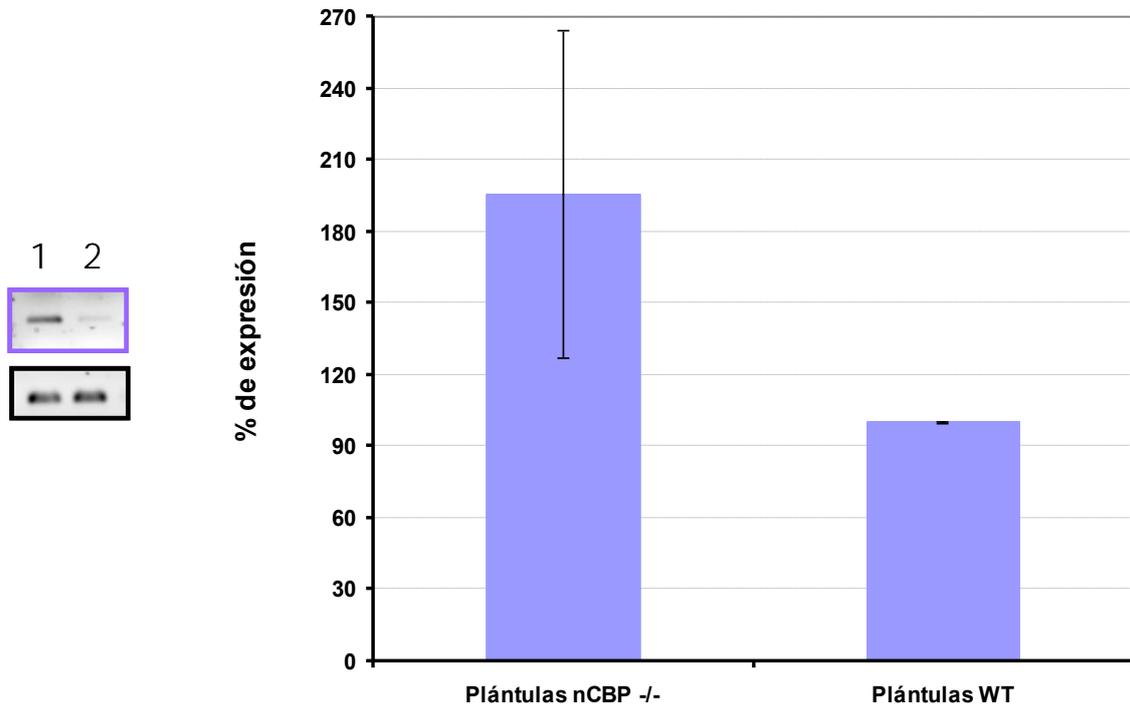


Figura 45. Perfil de expresión del factor *eIF4E* en plántulas de *A. thaliana* mutante *nCBP* *-/-* y silvestre. A la izquierda, carril 1: RNA de plantas *nCBP* *-/-* y carril 2: RNA de plántula WT. En el recuadro lila se observa el perfil a nivel transcrito del factor *eIF4E*. En el recuadro negro se aprecia el control de carga con el rRNA 18S de cada RNA empleado. A la derecha, gráfico del perfil de expresión de *eIF4E* en plántulas *nCBP* *-/-* y WT tomando en cuenta los 3 experimentos realizados.

Se aprecia un incremento en el transcrito de *eIF4E* en las plántulas *nCBP* *-/-* con respecto al nivel que normalmente posee *eIF4E* en las plántulas silvestres.

VII.3.2.2 Expresión del factor *eIF(iso)4E* en plántulas mutantes *nCBP* *-/-* vs. plántulas silvestres de *Arabidopsis thaliana*

Se realizaron tres perfiles de expresión usando los oligos de *eIF(iso)4E* para RNA y como control de carga los oligos del rRNA 18S. Se realizó la densitometría de cada experimento y se normalizó con los valores obtenidos del control de carga. Así como con el perfil de *eIF4E* se estableció como el 100% el valor arbitrario de

expresión que presentan las plántulas silvestres de *eIF(iso)4E*. Posteriormente, se realizó el análisis estadístico correspondiente, observando el patrón mostrado en la figura 46.

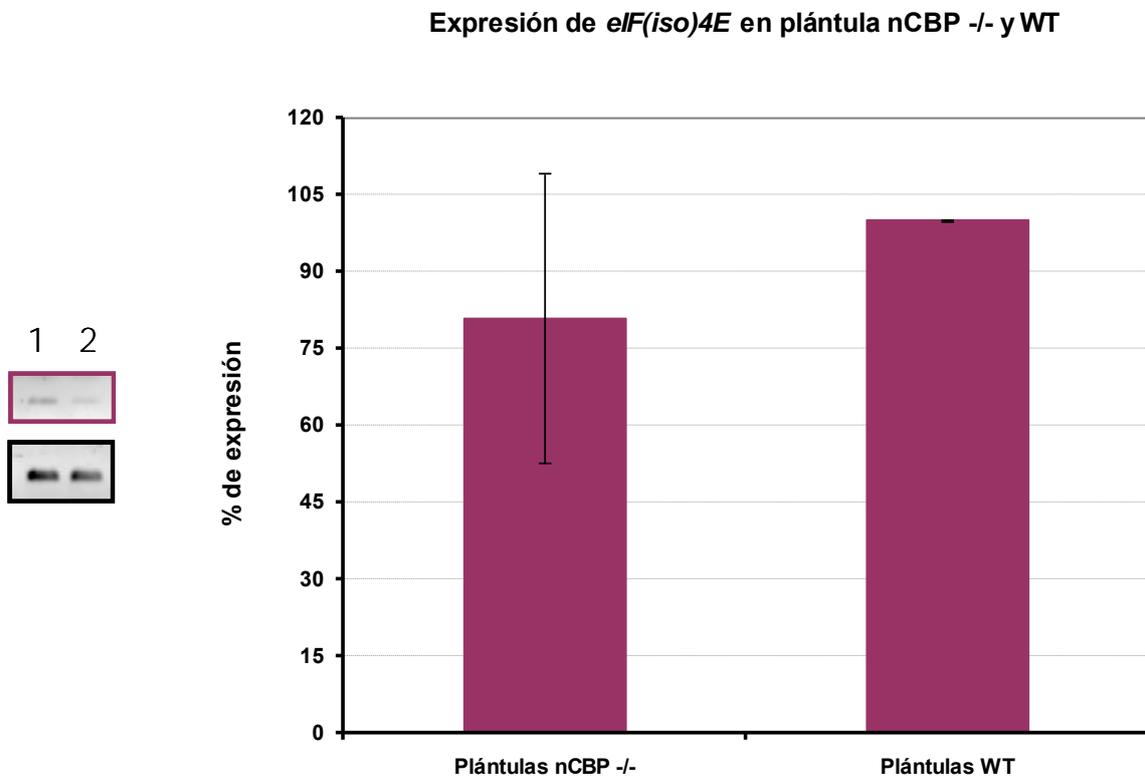


Figura 46. Perfil de expresión del factor *eIF(iso)4E* en plántulas de *A. thaliana* mutante nCBP ^{-/-} y silvestre. A la izquierda, carril 1: RNA de plantas nCBP ^{-/-} y carril 2: RNA de plántula WT. En el recuadro violeta se observa el perfil a nivel transcrito del factor *eIF(iso)4E*. En el recuadro negro se aprecia el control de carga con el rRNA 18S de cada RNA empleado. A la derecha, gráfico del perfil de expresión de *eIF(iso)4E* en plántulas nCBP ^{-/-} y WT tomando en cuenta los 3 experimentos realizados.

En el patrón de expresión observado en la figura anterior, a diferencia del mostrado para *eIF4E*, indica que no existe una diferencia significativa en la expresión del transcrito de *eIF(iso)4E* en las plántulas mutantes nCBP ^{-/-} con respecto a las silvestres.

VIII. DISCUSIÓN

Dada la obtención e identificación exitosa de individuos de *A. thaliana* nCBP $-/-$ y la respectiva corroboración de tal hecho, se puede deducir que la mutación no fue letal para dichas mutantes, lo cual indica que este miembro de la familia eIF4E no es requerido para procesos vitales en, por lo menos, esta planta. Esto está en concordancia con lo que se ha observado para ortólogos de nCBP en otros organismos como *Drosophila melanogaster* (Cho et al., 2005) y *Caenorhabditis elegans* (Dinkova et al., 2005). La obtención de plantas homocigas y su conservación por varias generaciones mediante autofecundación (Martienssen, 1998) brindan la posibilidad de estudiar la función particular que esta proteína puede desempeñar en *Arabidopsis thaliana*.

El análisis molecular de las plantas mutantes mediante PCR, Southern blot y RT-PCR demostró que se trata de una mutación nula, es decir, no hay expresión de nCBP. Sin embargo, sería recomendable realizar un Southern blot con una sonda correspondiente al T-DNA para demostrar que no exista alguna otra inserción en el genoma del T-DNA que pudiera estar afectando otro gen. A pesar de que no se estudió el nivel de proteína debido a la falta de anticuerpos contra nCBP en *A. thaliana*, lo observado con los experimentos de RT-PCR (como ya se explicó) junto con los correspondientes al DNA, parecen coincidir en que no hubo posibilidad de que esta proteína haya estado presente en las plantas nCBP homocigas nulas. Un estudio de los factores miembros de la familia eIF4E de las mutantes $-/-$ sería útil para demostrar la falta de nCBP y quizás, un cambio en la expresión de eIF4E y eIF(iso)4E a nivel de proteína en las mutantes con respecto a plantas silvestres.

El análisis fenotípico de las mutantes $-/-$ de nCBP mostró ciertas diferencias con las plantas WT de *A. thaliana*. En particular, dos de las características

fenotípicas analizadas fueron altamente reproducibles en más de una condición de desarrollo. Estas características fueron el retraso por 6 días en la aparición de la inflorescencia en las plantas mutantes nCBP -/- respecto a plantas silvestres y el retraso de la senescencia en hojas de la roseta después de la aparición del tallo floral. Este fenotipo puede deberse directamente a la ausencia de la proteína nCBP, que podría estar regulando la expresión de una o más proteínas clave para que la planta estimule el desarrollo de la inflorescencia y dé paso a su fase reproductiva. Sin embargo, no es nada fácil deducir cuál proteína podría ser en particular ya que diversos estudios realizados en *A. thaliana* han encontrado que la estimulación de la inflorescencia en ésta planta está regulada por varias señales como el fotoperíodo, la vernalización, la temperatura, estímulos hormonales (giberelinas) y otros que no dependen de su entorno (Ausín et al., 2005; Boss et al., 2004 y Wilson et al., 1992). Esto conlleva a, primero, tratar de dilucidar con cual (o cuales) de todas las proteínas involucradas con la estimulación de la floración pudiese(n) estar relacionada(s) con nCBP, teniendo en cuenta que ésta última podría actuar para promover o inhibir selectivamente su traducción e, inclusive, estar regulando la expresión génica a nivel transcripcional o posttranscripcional de manera indirecta. Con respecto al atraso de la senescencia de la roseta en las plantas mutantes -/- surgen también otras interrogantes que pudiesen estar relacionadas con la posible función de nCBP. La senescencia foliar implica una redistribución de los nutrientes presentes en las hojas hacia otros tejidos vegetales (como semillas, flores, frutos, etc.) antes de la muerte celular total (Zavaleta-Mancera et al., 1999). Al igual que la inflorescencia, la senescencia está regulada por estímulos hormonales (etileno), factores ambientales y condiciones de estrés (Azcón-Bieto et al, 2001). En este caso, la proteína nCBP podría regular la traducción de una o varias proteínas que estén directamente involucradas con el proceso de senescencia, o con la redistribución y transporte de los nutrientes de las hojas a tejidos que requieren gran cantidad de ellos como la inflorescencia. O podría ser que su ausencia en las mutantes -/- impida la represión de ciertos genes que promueven el crecimiento y

desarrollo de las hojas de la roseta en un tiempo determinado y atrase la señalización del tiempo de floración en *A. thaliana*, provocando así una demora en esta etapa que trae como consecuencia una aparición tardía del escapo floral, que a su vez conlleva a un desarrollo tardío de las flores, frutos (silicuas) y producción de semillas respecto a las plantas silvestres, sin involucrar la fertilidad de las plantas mutantes, sino sólo un retraso significativo (dado el ciclo de vida tan corto de *Arabidopsis*) en el desarrollo durante la etapa reproductiva.

Muchas de las otras características fenotípicas analizadas mostraron desviaciones estándar considerables, por lo que no fueron significativas las diferencias entre plantas mutantes y silvestres. Sería recomendable homogenizar las condiciones en los experimentos para repetir algunos análisis y tomar en cuenta otras variables que también podrían tener efecto en las características fenotípicas encontradas. Tal es el caso de la cuantificación de la clorofila total, ya que no se contempló que la aparente diferencia en la tonalidad verde de las plantas mutantes respecto a las WT, no solo podría deberse al contenido de clorofila total de las hojas, sino también pudiera corresponder a la presencia de otros pigmentos que se encuentran en las hojas como la antocianina, los carotenos, entre otros; que quizás, no se encuentran en la misma cantidad en plantas nCBP $-/-$ y WT. Por otro lado, no se utilizó el mismo tejido de hojas, es decir, que tuviesen la misma edad y desarrollo; así como la intensidad de la luz que recibían pudo ser distinta de acuerdo a su tamaño y posición dentro de la roseta, en ambas líneas vegetales, lo que dio al experimento un grado de error considerable. De la misma forma, el crecimiento desigual entre los individuos de una misma línea (silvestre o mutante); el no haber analizado más allá de cuatro individuos por generación a caracterizar, así como las condiciones no siempre bien controladas dentro del invernadero (temperatura, luz, mantenimiento y control de plagas) propició que los factores climáticos influyeran de manera muy particular sobre cada generación caracterizada. Todas esas variables

afectaron notablemente las mediciones obtenidas y descritas en los resultados, lo que podría explicar el por qué tienen un alto valor en el error estándar estimado.

Por lo anterior, la caracterización fenotípica en condiciones normales de las mutantes nCBP *-/-* vs. la plantas WT de *A. thaliana* no está finalizada. Se necesita analizar un mayor número de plantas, tal vez entre 30-40 individuos, y en condiciones más controladas. Se realizaron otros dos estudios fenotípicos que no pudieron formar parte de los resultados, pese a que se contaba con mayor número de individuos, debido a que a la tercera caracterización la afectó una plaga de moscas y a la cuarta caracterización la perturbaron cambios repentinos en el fotoperíodo y condiciones de temperatura en el invernadero. Cambios súbitos en el entorno estresan a las plantas e impiden que su estudio fenotípico sea confiable al tratar de caracterizarlas en condiciones normales de desarrollo.

Estudios realizados con mutantes *-/-* de eIF(iso)4E en *Arabidopsis* mostraron que ese factor es dispensable para el desarrollo de la planta y la ausencia del mismo no produce alteraciones severas en el fenotipo de *A. thaliana* en condiciones normales de crecimiento (Duprat et al, 2002). Por otra parte, en este trabajo se comprobó que nCBP también es dispensable para la supervivencia de *A. thaliana*. Esto sugiere que su papel dentro del desarrollo de la planta es particular y quizás, sea relevante en alguna etapa del desarrollo que aún no se ha podido dilucidar.

Muchas de las proteínas miembros de la familia eIF4E presentan expresión diferencial durante el desarrollo (Gingras et al, 1999; Ritcher y Sonenberg, 2005; Dinkova et al, 2005; von der Haal et al, 2004; Joshi et al, 2004) lo cual correlaciona con su actividad regulatoria. En el caso de plantas, se ha observado expresión diferencial para eIF4E y eIF(iso)4E (Dinkova y Sánchez de Jiménez, 1999; Gallie y Browning 2001). En este trabajo, se observó que nCBP muestra un patrón de expresión transcripcional (mostrado en la figura 42) con un alto grado de expresión

en etapas tempranas del desarrollo de *A. thaliana* (semilla, plántula y raíz de 15 días) y su nivel en los tejidos subsecuentes disminuye notablemente. Comparando los niveles de expresión registrados de nCBP en *A. thaliana* por microarreglos (figura 41) con los del perfil obtenido, coinciden casi en todos los aspectos, mostrando un importante nivel de expresión en semillas. Sin embargo, dicha característica no parece coincidir con el fenotipo visto en las mutantes *-/-* porque la germinación y el desarrollo de la plántula no se vio afectado con respecto al de plantas silvestres. Quizás un estudio más minucioso con respecto a la medición de la germinación podría ayudar a dilucidar la posible función que nCBP pudiese llevar a cabo en dicho estadio. No obstante, pudiese también existir alguna correlación entre el apreciable nivel de expresión que posee en flores con la aparición de la inflorescencia y el inicio de la etapa reproductiva. Si se comparan dichas propuestas con las descritas para sus ortólogos, 4EHPs e IFE-4, donde se ha observado que éstas proteínas de unión a Cap intervienen en etapas tempranas del desarrollo, regulando la expresión particular de ciertos mRNAs (Cho et al., 2005; Dinkova et al., 2005); parece haber cierta concordancia también en plantas, sólo que aún no se puede deducir si nCBP regula o no la traducción de ciertos mensajeros como sus ortólogos y, de ser así, tampoco se sabe a cuales mRNAs regula en específico y exactamente en que etapa de su desarrollo. Otros ensayos con microarreglos de tejido de plantas mutantes y silvestres, podrían ayudar a tratar de dilucidar la expresión de genes que pudiese regular nCBP en condiciones normales de desarrollo.

En cuanto a los perfiles obtenidos de los factores eIF4E y eIF(iso)4E se interpretó lo siguiente. Parece ser que el factor eIF4E tiene un papel importante a lo largo de todo el desarrollo de la *A. thaliana*, porque sus niveles de expresión se mantienen relativamente altos y parejos en todas las etapas de la vida de ésta planta, excepto en raíz y silicua (véase figura 43). Por otro lado, la expresión de eIF(iso)4E pareciera ser mucho menos similar u homogénea a lo largo de la ontogenia de *A. thaliana* que la de eIF4E (véase figura 44). Como era de esperarse el nivel de

expresión de este factor es notable en estadíos y tejidos como plántula y flor en los cuales se ha descrito que su expresión es significativa (Rodríguez et al, 1999).

En estudios previos con una mutante nula de eIF(iso)4E, se observó que eIF4E se encuentra sobreexpresado (Duprat et al., 2002). En la mutante nCBP también se observó un incremento notable en la expresión del factor eIF4E en las plántulas mutantes respecto a las WT de cerca del doble del promedio y aún con el error estándar que presentaron los experimentos de RT-PCR semicuantitativo, no es equiparable con el nivel de expresión de eIF4E endógeno silvestre (véase figura 45). Por otro lado, la expresión del factor eIF(iso)4E aparentemente no se altera por la ausencia de nCBP, al comparar su expresión frente a las plántulas silvestres (véase figura 46). Respecto a lo observado con eIF4E se pueden plantear varias hipótesis. Quizás, nCBP regule la expresión del mRNA de eIF4E negativamente, de ahí que su ausencia promueva aún más la expresión de eIF4E en dichas condiciones, así como su estabilidad a nivel de transcrito. Otra posibilidad sería que la sobreexpresión de eIF4E se deba a otro tipo de circunstancias que pueden estar o no directamente relacionadas con la falta de la proteína nCBP en los individuos mutantes $-/-$, ante ciertos estímulos ambientales, hormonales, de estrés, etc. Sea cual fuese el caso, primero se debería de comprobar que dicha característica sea reproducible a nivel de proteína para que fuese más significativa la supuesta diferencia en la expresión de eIF4E en plántulas mutantes respecto a las silvestres. Esto abre camino a una nueva investigación, no sólo para tratar de dilucidar la función de nCBP, sino también del resto de los miembros de la familia eIF4E en plantas.

IX. CONCLUSIONES

- ✓ La viabilidad de las mutantes -/- indicó que la proteína nCBP es dispensable para el desarrollo de *A. thaliana*.
- ✓ Existe un fenotipo en las mutantes nCBP -/- muy sutil, lo que sugiere que dicha proteína podría llevar a cabo una función particular en *A. thaliana*.

X. BIBLIOGRAFÍA

Ausín I., Alonso-Blanco C. y Martínez-Zapater J.M. (2005) Environmental regulation of flowering; *Int. J. Dev. Biol.* **49**, 689-705.

Azcón-Bieto J. y Talón M. (2003) *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Primera Edición. McGraw- Hill/Interamericana, Madrid España; pp. 1-3, 465-479.

Bailey-Serres J. (1999) Selective translation of cytoplasmic mRNAs in plants; *Trends Plant Sci.* **4**, 142-148.

Bernstein R. y Bernstein S. (1998) *Biología*. Décima edición, McGrawHill; pp. 254

Blázquez M.A. y Weigel D. (2000) Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*; *Nature* **404**, 889-892.

Boss P.K., Bastow R.M., Mylne J.S. y Dean C. (2004) Multiple pathways in the decision to flower: enabling, promoting, and resetting; *Plant Cell* **16**, S18-S31.

Browning K. S. (2004) Plant translation initiation factors: it is not easy to be green; *Biochem. Soc. Soc.Trans.* **32**. Pt 4: 589-91.

Carberry S. E., Darzynkiewicz E. y Goss D.J. (1991) A comparison of the binding of methylated cap analogues to wheat germ protein synthesis initiation factors 4F and (iso)4F; *Biochem.* **30** (6), 1624-27.

Carberry S. E. y Goss D.J. (1991) Wheat germ initiation factors 4F and (iso)4F interact differently with oligoribonucleotide analogues of rabbit alpha-globin mRNA; *Biochem.* **30** (18), 4542-4545.

Cho P. F., Poulin F. Cho-Park Y.A., Cho-Park I.B., Chicoine J.D., Lasko P. y Sonenberg N. (2005) A new paradigm for translational control: inhibition via 5'-3' mRNA tethering by Bicoid and the eIF4E cognate 4EHP; *Cell* **121**, 411-23.

Claros M. G., Ávila C., Gallardo F. y Cánovas F. M. (2001) *Bioquímica Aplicada: Manual para el diseño experimental y el análisis de datos en bioquímica y biología molecular*; España; pp. 106-125.

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

De la Torre Díaz S. (2007) *Establecimiento del sistema de RNA interferente para el silenciamiento del gen que codifica al factor de iniciación de la traducción eIF4E en maíz*; Tesis de Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica, Facultad de Química, UNAM.

Devlin T. M. (1999) *Bioquímica. Libro de Texto con Aplicaciones Clínicas*. Volumen #2; Tercera Edición. Editorial Reverté, Barcelona España; pp. 714-733.

Dinkova, T.D., Keiper B.D., Korneeva, N.L., Aamodt E.J. y Rhoads R.E. (2005) Translation of a small subset of *Caenorhabditis elegans* mRNAs is dependent on a specific eIF4E isoform; *Mol. Cell. Biol.* **25**, 100-113.

Dinkova T.D. y Sánchez de Jiménez E. (1999) Differential expression and regulation of translation initiation factors α 4E and β 4E during maize germination; *Physiol. Plant.* **107**, 419-425.

Duprat A., Caranta C., Revers F., Menand B., Browning K. S. y Robaglia C. (2002) The *Arabidopsis* eukaryotic initiation factor (iso) α 4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses; *Plant J.* **32**, 927-934.

Flynn A. y Proud C.G. (1995) Serine 209, not serine 53, is the major site of phosphorylation in initiation factor eIF-4E in serum-treated Chinese hamster ovary cells; *J. Biol. Chem.* **270**, 21684-21688.

Gallie D.R. y Browning K.S. (2001) eIF4G functionally differs from eIF4G in promoting internal initiation, Cap-independent translation, and translation of structured mRNAs; *J. Biol. Chem.* **276**, 36951-36960.

Gebauer F. y Hentze M.W. (2004) Molecular mechanisms of translational control; *Mol. Cell. Biol.* **5**, 827-834.

Gingras A.C., Raught B. y Sonenberg N. (1999) eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation; *Ann. Rev. Biochem.* **68**, 913-963.

Gómez-Campo C. (1976) Conservation techniques and crucifer seed banks; *Arabid. Inf. Serv.* **13**, 18-21.

Griffits A. J. F., Millar J. H., Susuki D. T., Lewontin R. C. y Gelbart W. M. (2002) *Genética*; Séptima Edición, McGraw Hill – Interamericana, Madrid España; pp. 2-22, 415-419.

Hernández G. y Vázquez –Pianzola P. (2005) Functional diversity of the eukaryotic translation initiation factors belonging to eIF4 families; *Mech. Dev.* **122**, 865-876.

Joshi B., Lee K., Maeder D. L. y Jagus R. (2005) Phylogenetic analysis of eIF4E-family members; *BMC Evol. Biol.* **5** (48), 2-20.

- Kawaguchi R. y Bailey-Serres J. (2002) Regulation of translational initiation in plants; *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 460-465.
- Keefer J. (2001) Genetic modification in nature. A natural way of genetically modifying organisms *Agrobacterium tumefaciens*; <http://courses.washington.edu/z490/gmo/natural.html>
- Krystan P.J., Young J. C. y Sussman M. R. (1999) T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*; *Plant Cell* **11**, 2283-2290.
- Lodish H., Berk A., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C. A., Krieger M., Scott M. P., Zipursky S. L. y Darnell J. (2006) *Biología Celular y Molecular*; Quinta Edición, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires Argentina; pp. 493-523.
- Marcotrigiano J., Gingras A.C., Sonenberg N. y Burley S.K. (1999) Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G; *Mol. Cell* **3**, 707-716.
- Martienssen R.A. (1998) Functional genomics: Probing plant gene function and expression with transposons; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 2021-2026.
- Mathews C.K., Van Holde K.E. y Ahern K.G. (2002) *Bioquímica*; Tercera Edición. Editorial Addison Wesley. Madrid España; pp. 1162-1190.
- Merrick W.C. y Hershey J.W.C. (1996) *Translational control*. En Hershey J.W.B., Mathews M.B. y Sonenberg N. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; pp. 31-69.
- Meyerowitz E.M. (1987) *Arabidopsis thaliana*; *Ann. Rev. Genet.* **21**, 93-111.
- Meyerowitz E.M. (1994) Pattern formation in plant development: four vignettes; *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**, 602-608.
- Old R.W. y Primrose S.B. (1987) *Principios de manipulación genética. Introducción a la ingeniería genética*; Tercera Edición. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza España; pp. 200-213.
- Pestova T.V. y Hellen C.U.T. (2000) The structure and function of initiation factors in eukaryotic protein synthesis; *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 651-674.
- Ritcher J.D. y Sonenberg N. (2005) Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins; *Nature* **433**, 477-480.
- Rodríguez C.M., Freire M.A., Camilleri C. y Robaglia C. (1998) The *Arabidopsis thaliana* cDNAs coding for eIF4E and eIF(iso)4E are not functionally equivalent for yeast complementation and are differentially expressed during plant development; *Plant J.* **13** (4), 465-473.

Rosettani P., Knapp S., Vizmara M.G., Rusconi L. y Cameron A.D. (2007) Structures of the human eIF4E Homologous Protein, h4EHP, in its m⁷GTP-bound and unliganded forms; *J. Mol. Biol.* **368**, 691-705.

Ruud K. A., Kuhlow C., Goss D. J., y Browning K. S. (1998) Identification and characterization of a novel Cap Binding Protein from *Arabidopsis thaliana*; *J. Biol. Chem.* **273**, 10325-10330.

Sánchez de Jiménez E., Dinkova T. D. y Reyes de la Cruz H. (2005) Mecanismos de control traduccional en la germinación del maíz; *Mensaje bioquímico* **Vol XXIX**, 1-15.

Shure M., Wessler S. y Federoff N. (1983) Molecular identification and isolation of the waxy locus in maize; *Cell* **3**, 225-233.

Stryer L., Berg J. M. y Tymoczko J. L. (2003) *Bioquímica*; Quinta Edición, Editorial Reverté, Barcelona España; pp. 839-840.

Suzuki Y., Kawazu T. y Koyama H. (2004) RNA isolation from siliques, dry seeds and other tissues of *Arabidopsis thaliana*; *BioTechniques* **37**, 542-544.

Villée C. A., Solomon E.P, Berg L.R. y Martin Ch. (1996) *Biología de Villée*; Tercera Edición, Interamericana McGraw Hill, México D.F.; pp. 216-236.

von der Haar T., Gross J.D., Wagner G. y McCarthy J.E.G. (2004) The mRNA cap-binding protein eIF4E in post-transcriptional gene expression; *Nature Struct. Mol. Biol.* **11** (6), 503-511.

von der Haar T., Oku Y., Ptushkina M., Moerke N., Wagner G., Gorss J.D. y McCarthy J.E. (2006) Folding transitions during assembly of the eukaryotic mRNA cap-binding complex; *J. Mol. Biol.* **356**, 982-992.

Wool I.G., Chan L. y Glück A. (1996) Mammalian ribosomes: the structure and the evolution of the proteins. En Hershey J.W.B., Mathews M.B. y Sonenberg N. *Translational control*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; pp. 685-732.

Wilson R.N., Heckman J.W. y Somerville C.R. (1992) Gibberellin is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days; *Plant Physiol.* **100**, 403-408.

Zavaleta-Mancera H.A., Franklin K.A., Ougham H.J., Thomas H. y Scott I.M. (1999) Regreening of senescent *Nicotiana* leaves; *J. Exp. Bot.* **50**, 1677-1682.