



# Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

Programa de Maestría y Doctorado en  
Ciencias Bioquímicas

## **Papel del factor eIFiso4E en el mecanismo de infección por Potyvirus en *Arabidopsis thaliana*.**

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA:

Carlos Alberto Contreras Paredes



Tutora:  
Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

Comité tutorial:  
Dra. Laura Silva Rosales  
Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra



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.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 103 del conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova.

Les agradezco:

A Dios por darme la oportunidad de vivir para poder echar un vistazo a un poco de su infinita creación.

A mis queridos padres y hermanas Adi y Gracia por su apoyo en las buenas y en las malas.

A mi familia en general por preocuparse por mí y apoyarme.

A la Dra. Cesy por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por su amistad, apoyo y calidad humana que me ha brindado.

A la Dra. Laura Silva Rosales de Cinvestav Irapuato, por los inoculos virales, su amistad, el apoyo y atención que tuvo conmigo en la realización de mi trabajo.

A Susana Ruiz de Cinvestav Irapuato por el apoyo técnico que me brindo en este trabajo y por su amistad.

Al Dr. Javier Plasencia por formar parte de mi comité tutorial, por sus observaciones y asesoramiento siempre oportuno.

A la Dra. Estela Sánchez por sus recomendaciones, comentarios oportunos en los seminarios y su apoyo durante la realización de mi trabajo.

A mis revisores de tesis y miembros de mi jurado de examen, por su paciencia en la revisión de mi tesis, por sus observaciones, correcciones y apoyo para que me titulara.

A todos y cada uno de mis compañeros y amigos del laboratorio (Dra. Cesy, Alan, Valeria, Goyo, Susy, Pedro, Edson, Cesar A., Augusto, Erikita, Eder, Normita, Sara, Cesar D., Vero, Raúl, Dra. Sánchez) y demás camaradas de la Facultad de Química y del posgrado en Ciencias Bioquímicas que me apoyaron, aconsejaron, soportaron, regañaron, orientaron, escucharon, etc. cuando estaba haciendo este trabajo.

A mis amigos de toda la vida Abel, Gerardo, Ray, Blanca, Diana, Cristian y Abril, Victor, Julian y Blanca, Carolina, Leo, Alex, Edsel, Tony, Elías, por todo lo que se puede esperar de los amigos.

Esta tesis la dedico a mi abuelito Margarito, quien fue un hombre ejemplar en acciones, amante de Dios, su familia y la vida.

## INDICE

	PAG.
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. ANTECEDENTES	5
3.1. Mecanismo de iniciación de la traducción en eucariontes.	5
3.2. El factor de inicio de la traducción eIF4E.	6
3.2.1. Características y regulación del factor eIF4E.	6
3.2.2. Clasificación de los miembros de la familia eIF4E.	9
3.2.3. Estudios acerca de miembros de la familia eIF4E en diversos organismos.	11
3.2.3.1. Insectos	11
3.2.3.2. Nematodos	12
3.2.3.3. Mamíferos	12
3.2.3.4. Plantas	13
3.3. Concepto y clasificación taxonómica general de los virus.	14
3.3.1. Clasificación de los virus de plantas.	15
3.4. Los virus y su importancia en el campo mexicano.	16
3.5. Características y organización del genoma de virus de RNA	18
3.6. Los Potyvirus y su interacción con los factores de inicio de la traducción.	20
4. HIPÓTESIS	27
5. OBJETIVO GENERAL	27
6. OBJETIVOS PARTICULARES	27
7. MATERIALES Y MÉTODOS	28
7.1. Estrategia metodológica.	28
7.2. Material biológico.	30
7.2.1 Esterilización y siembra de semillas de <i>A. thaliana</i> .	30
7.2.2 Inoculación de plantas con los virus TEV y PapMV.	31
7.3. Medición de la germinación de semillas silvestres y mutantes eIFiso4E <sup>-/-</sup> de <i>A. thaliana</i> .	31

7.4. Obtención y análisis de ácidos nucleicos.	32
7.4.1. Extracción de DNA genómico.	32
7.4.2. Extracción de RNA total de <i>A. thaliana</i> .	32
7.4.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y Reacción de transcripción reversa acoplada a PCR (RT-PCR).	32
7.5. Obtención y análisis de perfiles polisomales a partir de hojas de <i>A. thaliana</i> .	34
7.5.1. Separación de fracciones ribosomales por gradientes de sacarosa.	34
7.5.2. Purificación de RNA a partir de fracciones ribosomales.	35
7.6. Extracción y análisis de proteínas.	35
8. RESULTADOS	37
8.1. Análisis de la mutante eIFiso4E <sup>-/-</sup> de <i>A. thaliana</i> .	37
8.1.1. Análisis de la mutación eIFiso4E <sup>-/-</sup> por PCR.	37
8.1.2. Medición de la germinación de semillas de <i>A. thaliana</i> eIFiso4E <sup>-/-</sup> en presencia y ausencia de sacarosa.	39
8.2. Determinación de la replicación, traducción y movimiento del RNA de TEV en plantas silvestres y mutantes eIFiso4E <sup>-/-</sup> de <i>A. thaliana</i> .	41
8.2.1. Sintomatología de plantas de <i>A. thaliana</i> silvestres y mutantes eIFiso4E <sup>-/-</sup> inoculadas con TEV.	41
8.2.2. Determinación de la presencia RNA viral a nivel de RNA total.	42
8.2.3. Determinación de la presencia de RNA viral en fracciones polisomales.	43
8.2.4. Determinación de la presencia de proteína de la proteína de la cápside de TEV (CP).	46
8.3. Determinación de la replicación, traducción y movimiento del RNA de PapMV en plantas silvestres y mutantes eIFiso4E <sup>-/-</sup> de <i>A. thaliana</i> .	47
8.3.1. Sintomatología de plantas de <i>A. thaliana</i> silvestres y mutantes eIFiso4E <sup>-/-</sup> inoculadas con PapMV.	47
8.3.2. Determinación de la presencia de RNA viral a nivel de RNA total.	47

8.3.3. Determinación de la presencia de RNA viral en fracciones polisomales.	48
9. DISCUSIÓN	51
10. CONCLUSIONES	55
11. PERSPECTIVAS	55
12. LITERATURA CITADA	56
13. Anexo I	65

## 1. RESUMEN

El factor eIF4E ha sido identificado en diversos organismos, eIFiso4E es uno de los miembros de la familia eIF4E en plantas que durante la iniciación de la traducción reconoce la estructura Cap en el extremo 5' de los mRNAs. Esta etapa de la traducción se ha considerado la etapa más regulada influyendo en la velocidad de síntesis proteica y por consecuencia en el crecimiento, proliferación y desarrollo celular. La presencia y distribución de eIF4E y eIFiso4E ha sido determinada en diferentes tejidos y etapas del desarrollo de diversas especies vegetales, observándose que existe predilección por algún tejido y etapa del desarrollo en particular.

Estudios de resistencia viral en plantas han identificado a eIFiso4E y eIF4E como factores asociados con la resistencia a enfermedades causadas por virus de RNA de cadena sencilla como los potyvirus. Estos virus presentan una proteína unida covalentemente a su genoma (VPg) en lugar de Cap con la cual tanto eIF4E como eIFiso4E son capaces de interactuar. Una mutante de *Arabidopsis thaliana* carente del eIFiso4E no presentó fenotipo diferente al de plantas silvestres bajo condiciones de laboratorio. Sin embargo, en inoculaciones con dos potyvirus, el virus del mosaico del nabo (TuMV) y el virus del mosaico de la lechuga (LMV), las plantas mutantes fueron resistentes a la infección a diferencia de las plantas silvestres. Se ha sugerido que la interacción VPg-eIFiso4E es un elemento crítico durante la infección viral, aunque no se conoce el proceso molecular en el cual esta interacción está involucrada.

En este trabajo se utilizaron las plantas que son mutantes nulas para el factor eIFiso4E inoculadas con un potyvirus (el virus del jaspeado de tabaco; TEV por tobacco etch virus) y con un potexvirus (el virus del mosaico de la papaya; PapMV por papaya mosaic virus). Se colectaron las hojas locales (inoculadas) y sistémicas (superiores a las inoculadas) a los 4 y 15 días post-inoculación. Se utilizaron plantas silvestres no inoculadas como controles. Se analizó la presencia

y movilidad del RNA viral mediante RT-PCR a partir del RNA total, y mediante un fraccionamiento polisomal se midieron los niveles de traducción del RNA viral. Los resultados indicaron que en las plantas carentes de eIFiso4E, el RNA de TEV está presente en hojas locales pero no en hojas sistémicas indicando que eIFiso4E es requerido para la movilidad del virus en la planta. Los niveles traduccionales de TEV en las hojas locales fueron similares a los detectados en plantas silvestres, por lo cual concluimos que la traducción de TEV no es dependiente de eIFiso4E. Por otro lado, la presencia, movilidad y traducción de un RNA viral que presenta Cap y no VPg en su extremo 5' (PapMV) fue similar en plantas silvestres y mutantes.

La traducción de RNA de TEV en *A. thaliana* no es afectada por la ausencia de eIFiso4E pero si su movimiento, por lo que eIFiso4E podría estar involucrado en el movimiento célula a célula o a larga distancia del RNA viral.



## 2. INTRODUCCIÓN

El factor de iniciación de la traducción eIFiso4E ha sido identificado en plantas y está involucrado en el inicio de la traducción de RNAs mensajeros (mRNA). Un mecanismo de regulación de la expresión génica es el control de la velocidad de traducción, lo cual tiene un papel crítico durante el crecimiento, proliferación, desarrollo y muerte celular. La rapidez con la que se lleva a cabo la traducción puede ser controlada en cualquiera de sus tres etapas (iniciación, elongación o terminación), siendo la de iniciación donde se lleva a cabo predominantemente la regulación (Gingras, *et al.*, 1999).

En células eucariontes, la mayoría de los mRNA poseen en el extremo 5' una estructura m<sup>7</sup>GpppN, conocida también como estructura Cap, la cual, además de la metilación en la posición 7 de la guanina, puede presentar otras metilaciones por ejemplo: m<sup>7</sup>GpppN<sup>m</sup>p o m<sup>7</sup>GpppN<sup>m</sup>pN<sup>m</sup>p (donde N representa cualquiera de los cuatro nucleótidos y m el grupo metilo); una región no codificante (UTR5') seguida de un marco de lectura y otra región no codificante (UTR3'), que termina comúnmente en una cola de adeninas (poliA). La estructura Cap juega un papel importante en el inicio de la traducción del mRNA, y en otros procesos como el de procesamiento del mRNA inmaduro, el transporte núcleo-citoplásmico de pequeños RNAs, posiblemente también del mRNA, y confiere estabilidad al mRNA. La cola de poliA del mRNA puede ser desde 50 bases (levaduras) hasta 200 bases de longitud (eucariontes superiores) y juega el papel de brindar estabilidad al mRNA así como hacer más eficiente su traducción (Gingras, *et al.*, 1999; Von der Haar, *et al.*, 2004; Miyoshi, *et al.*, 2005).

Además de estos componentes en el mRNA, existen otros elementos que actúan en *cis* durante el inicio de la traducción permitiendo la regulación de la síntesis proteica. Estas son secuencias que flanquean el codón de inicio, estructuras secundarias en la región UTR 5', sitios de unión a proteínas reguladoras entre otros (Gingras, *et al.*, 1999).

A diferencia de los mRNA celulares, los genomas de virus de RNA pueden presentar modificaciones en sus extremos 5' o 3'. En particular el virus del jaspeado del tabaco (TEV), miembro del género Potyvirus, presenta un genoma de RNA de cadena sencilla con sentido positivo, con una proteína de origen viral (VPg) unida covalentemente en su extremo 5' y en su extremo 3' una cola de poliA similar a un mRNA celular (Carrington, y Freed, 1990). En estudios hechos *in vitro* se ha observado que el factor eIFiso4E es capaz de interactuar con la proteína VPg de Potyvirus, provocándole cambios estructurales que disminuyen su afinidad por análogos de Cap, esto ha sugerido que puede existir una competencia entre la estructura Cap de los mRNA celulares y la proteína VPg, siendo la interacción VPg-eIFiso4E un elemento crítico durante la infección viral (Léonard, *et al.*, 2000; Miyoshi, *et al.*, 2005).

Se ha sugerido que el factor eIFiso4E puede ser relevante durante el ciclo infectivo de los Potyvirus, mediante su participación en la traducción del genoma viral, dando estabilidad o protegiendo de la degradación al RNA viral, y/o en la movilización del mensajero viral dentro del hospedero (Lellis, *et al.*, 2002).

En este trabajo se estudió a nivel molecular la relevancia del factor eIFiso4E en la replicación, traducción y movimiento de un aislado mexicano del virus TEV en *A. thaliana* ecotipo Columbia-0. Los resultados obtenidos sugieren que el factor eIFiso4E participa en el movimiento del mRNA de TEV pero es dispensable para su traducción y replicación.

### **3. ANTECEDENTES**

#### **3.1 Mecanismo de iniciación de la traducción en eucariontes.**

Para la traducción son requeridos diversos factores eucarióticos de iniciación (eIFs). La estructura Cap es reconocida por el factor eIF4E, el cual se asocia a eIF4G quien sirve como un andamio para formar el complejo eIF4F. A eIF4G se asocia el factor eIF4A quien tiene actividad de helicasa dependiente de ATP y se encarga de remover estructuras secundarias presentes en el mRNA con ayuda de eIF4B. Por otro lado, la subunidad ribosomal 40S es reconocida por el factor eIF3, un complejo multimérico compuesto por varias subunidades que sirve como andamio para unir al factor eIF2 asociado a una molécula de GTP y al tRNA iniciador cargado con metionina (Met-tRNA), formando así el complejo 43S. Este complejo se une al complejo eIF4F-mRNA mediante el reconocimiento de un dominio de unión en el factor eIF4G por parte del factor eIF3 formando el complejo 48S. Una vez que se ha ensamblado este complejo, la subunidad 40S comienza a recorrer la región 5' UTR hasta encontrar el codón de inicio en un contexto apropiado. La secuencia más relevante alrededor del codón de inicio es la presencia de una purina en la posición -3 del AUG (A/GXXAUG). Esto determina que la subunidad 40S se detenga y permita un apropiado reconocimiento codón-anticodón con el tRNA iniciador, que es verificado por eIF1A y eIF3. Una vez ocurrido esto, los factores eIF5 y eIF5B estimulan la hidrólisis de GTP, la liberación de eIF2-GDP y otros factores para unir la unidad ribosomal 60S, y formar el ribosoma 80S competente para la elongación. El complejo eIF4F que sigue asociado a la estructura Cap, proporciona estabilidad al mRNA a través de la interacción que se lleva a cabo entre el eIF4G y las proteínas que se unen a la cola de PoliA (PABP) quien como su nombre lo indica tiene afinidad por la PoliA del extremo 3' del mensajero, causando la circularización del mRNA (Figura 1), esto permite que los ribosomas que terminan la traducción del mRNA son desensamblados cerca del complejo de inicio de la traducción eIF4F, lo que facilita que sean nuevamente reclutados por la maquinaria traduccional (Merrick, 1992;

Browning, *et al.*, 1996; Gingras, *et al.*, 1999; Morino, *et al.*, 2000; Pestova, *et al.*, 2001; Robaglia y Caranta, 2005).

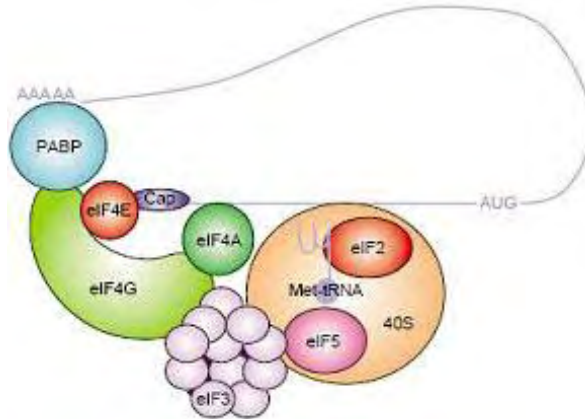


Figura 1. Modelo circular del complejo proteico de inicio de la traducción de eucariotes 48S (Tomado de Robaglia y Caranta, 2005).

### 3.2 El factor de inicio de la traducción eIF4E.

#### 3.2.1 Características y regulación del factor eIF4E.

El factor eIF4E ha sido identificado por su capacidad de interacción con Cap de los mRNA haciéndolo esencial para la traducción dependiente de Cap. Las estructuras tridimensionales de eIF4E de ratón, humano, levadura, y recientemente plantas han sido resueltas mediante diversos métodos, en cada caso ligadas a moléculas análogas a Cap. Se ha observado que la estructura de eIF4E consiste en 8 hojas  $\beta$  soportadas por 3  $\alpha$  hélices, dando la apariencia de un guante de beisbol (Figura 2) (Joshi, *et al.*, 2005).



Figura 2. Estructura tridimensional del factor eIF4E de mamíferos, se muestran en color gris, en la parte cóncava de la proteína los residuos de triptófano 56 y 102 involucrados en la interacción  $\pi$ - $\pi$  con el Cap de los mRNAs (tomado de Gao, *et al.*, 2004).

El sitio de interacción con la estructura Cap es una cavidad donde dos residuos de triptófano conservados (trp-56 y trp-102 en humano), son los causantes de la interacción con el anillo aromático de la guanina de la estructura Cap a través de un enlace llamado " $\pi$ - $\pi$ "; esta interacción es coordinada por puentes de hidrógeno entre la base nitrogenada de la guanina y un residuo de ácido glutámico (glu-103 en humano). Un tercer residuo de triptófano (trp-166 en humano) tiene interacción de tipo Van der Waals con el N-7-metil de la estructura Cap. Algunos residuos cargados positivamente del sitio de interacción con Cap (Arg-112, Arg-157 y Arg-162) estabilizan las cargas negativas de los átomos de oxígeno de los grupos fosfato (Gingras, *et al.*, 1999; Von der Haar, *et al.*, 2004).

El análisis estructural de eIF4E ha facilitado en gran medida el estudio molecular de las interacciones con el Cap de los mRNAs y proteínas reguladoras de su actividad. La estructura que presentan las proteínas eIF4E se ha conservado a lo largo de la evolución de los organismos; un dominio bien conservado de aproximadamente 170 aminoácidos presente en el extremo C-terminal contiene 8 triptófanos que brindan la importante tarea de reconocer la estructura Cap del mRNA, en ese mismo dominio se encuentra el sitio de unión al factor eIF4G y a

proteínas de unión a eIF4E (4E-BP), que impiden la interacción de eIF4E con eIF4G (Marcotrigiano, *et al.*, 1997).

Dentro de los mecanismos que regulan la actividad de eIF4E, se pueden citar principalmente 2: la fosforilación y la interacción con proteínas reguladoras. Estímulos extracelulares tales como hormonas, factores de crecimiento y mitogénos, promueven el crecimiento celular y la velocidad de traducción aumentando la fosforilación de eIF4E. Se ha observado que los patrones de fosforilación de eIF4E cambian a lo largo del ciclo celular: en G<sub>0</sub> el nivel de fosforilación es bajo, incrementa a lo largo de las fases G<sub>1</sub> y S, y es drásticamente reducido en la fase M; en directa correlación con los niveles traduccionales. La fosforilación de eIF4E disminuye por choques térmicos, a la vez que la actividad traduccional global se ve disminuida (Gingras, *et al.*, 1999). Estudios *in vitro* sugieren que eIF4E de mamíferos está sujeto a fosforilación en el residuo de serina 209 por las cinasas Mnk1 y Mnk2, integrantes de la ruta de las MAP-cinasas. Las Mnks interactúan directamente con la región carboxilo de eIF4G permitiendo una aproximación que afecta a eIF4E (Pyronnet, *et al.*, 1999). Otros estudios sugieren que bajo ciertas condiciones la fosforilación de la treonina 210 también es posible.

En respuesta a estímulos fisiológicos la actividad de eIF4E es controlada por reguladores negativos o proteínas de interacción con eIF4E (4E-BPs), que actúan inhibiendo la traducción dependiente de Cap, dado que las proteínas 4E-BP compiten con eIF4G por interaccionar con eIF4E. Esto es debido a que tanto las eIF4G como las 4E-BP presentan el motivo YXXXXLΦ (donde X es cualquier aminoácido y Φ un residuo hidrofóbico), a través del cual se lleva a cabo la interacción con eIF4E (Gingras, A. *et al.*, 1999). La actividad de 4E-BP es afectada por su nivel de fosforilación el cual es regulado por la vía de la cinasa TOR (target of rapamycin). Cuando 4E-BP se encuentra en estado hipofosforilado secuestra a eIF4E, mientras que en estado hiperfosforilado 4E-BP no interacciona con eIF4E y este puede participar en la traducción (Gingras, *et al.*, 2001). Un ejemplo donde la

traducción es regulada por la vía de 4E-BP es la infección por algunos picornavirus que inducen la desfosforilación de 4E-BP1 inhibiendo la traducción dependiente de Cap de mRNAs celulares, mientras se favorece la traducción viral dirigida por la presencia de un sitio de entrada interna del ribosoma (IRES) en la región UTR 5' del mensajero viral (Goodfellow, y Roberts, 2007).

### **3.2.2 Clasificación de los miembros de la familia eIF4E.**

A la fecha se han descrito varios miembros de la familia eIF4E en nemátodos, mamíferos, moscas y plantas. Considerando los residuos de triptófano en los miembros de la familia eIF4E que le confieren la habilidad de reconocer la estructura Cap del mRNA, Joshi, *et al.* (2005) realizaron, mediante un análisis filogenético, la agrupación de las distintas proteínas dentro de tres clases. Esta agrupación se realizó con base a la presencia o sustitución de los triptófanos 43 y 56 de acuerdo al eIF4E1 de humano (Figura 3).

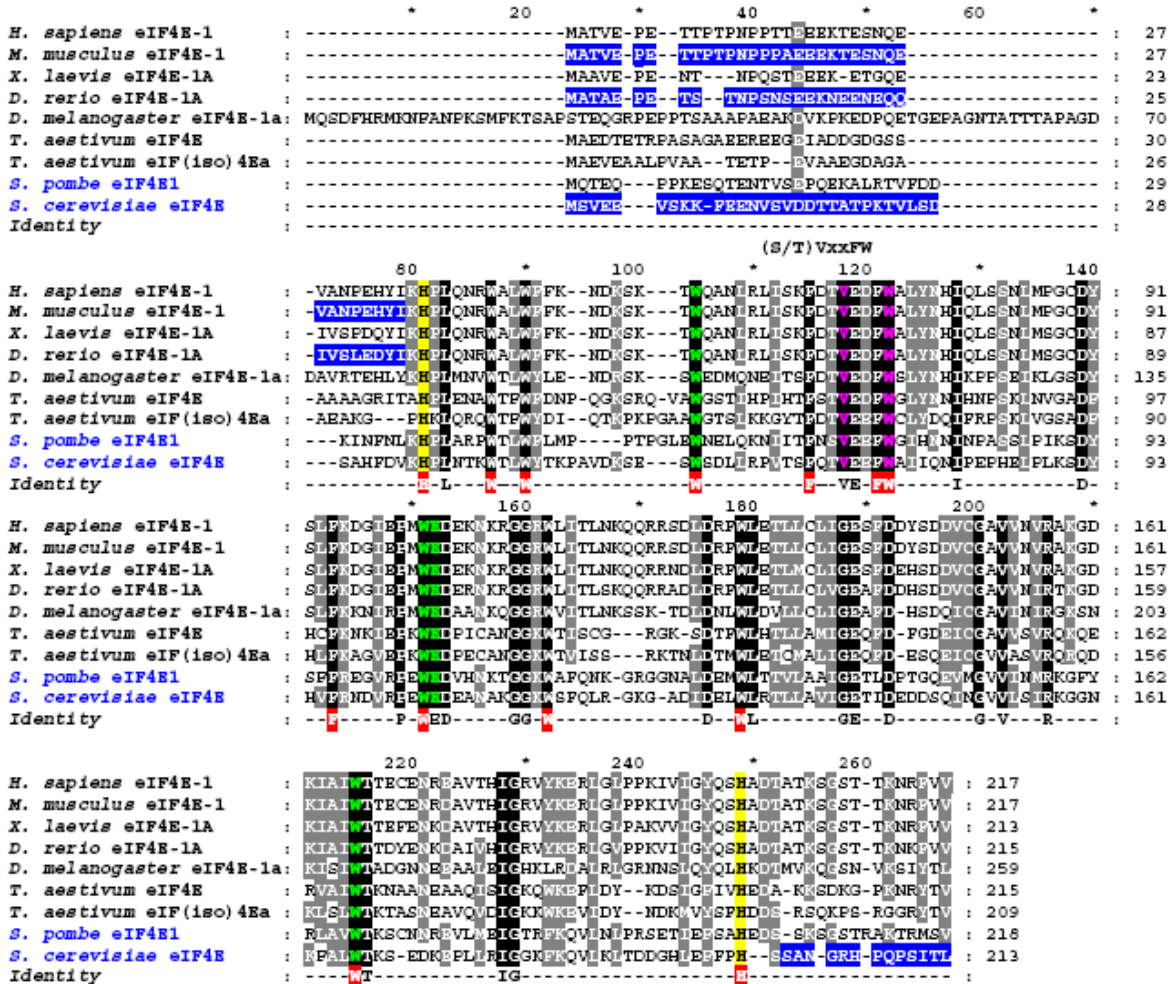


Figura 3. Alineamiento de las secuencias completas de aminoácidos de los eIF4E-1 de *H. sapiens*, *M. musculus*, *X. laevis*, *D. rerio*, *D. melanogaster*, *T. aestivum* (eIF4E), *T. aestivum* (eIFiso4E), *S. pombe*, *S. cerevisiae*. En rojo se muestran los aminoácidos aromáticos conservados, en gris los aminoácidos conservados en un 75%, en amarillo las Histidinas de que bordean el núcleo de la proteína eIF4E, en azul aparecen secuencias que se ha demostrado *in vitro* son dispensables para la función de eIF4E, los residuos en verde son los correspondientes a los triptófanos 56,102, 166 y el glutámico 103 de humano y ratón involucrados en la interacción con la estructura Cap, los residuos en morado son los encargados de interactuar con el factor eIF4G o con proteínas del tipo 4E-BPs (tomado de Joshi, *et al.* 2005).

Los miembros de la clase I presentan entre sí una identidad de ~35 - 40% y una similitud de ~60 - 65%. Se caracterizan por la conservación de los triptófanos 43 y 56 de acuerdo al eIF4E-1 de humano. Los miembros presentes en la clase II muestran aproximadamente un 50% de identidad y 70 - 80% de similitud con respecto a los miembros agrupados en la clase I. En los miembros de esta clase



existe una sustitución del triptófano 56 con respecto al eIF4E-1 de humano por un residuo hidrofóbico, pudiendo ser una tirosina, fenilalanina o leucina; también se ha observado que existen sustituciones del triptófano 43 en los miembros de esta clase, aunque no han sido bien determinadas. Dentro de los miembros que se agrupan en la clase III se pueden encontrar proteínas de unión a Cap que poseen entre el 25 – 30% de identidad y ~40 – 55% de similitud en comparación con los factores agrupados en la clase I y la clase II. En la clase III las proteínas mantienen conservado el triptófano 43 pero el 56 es sustituido por una cisteína o por una tirosina con respecto al eIF4E-1 de humano.

### **3.2.3 Estudios acerca de miembros de la familia eIF4E en diversos organismos.**

Casi todos los organismos eucariontes presentan más de un miembro de la familia eIF4E a excepción de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. A continuación se describen algunos estudios que abordan la función y regulación de miembros de la familia eIF4E en diferentes organismos.

#### **3.2.3.1 Insectos.**

En moscas adultas del género *Drosophila* se encontraron dos distintas proteínas que se unen a Cap utilizando cromatografía por afinidad con 7-metil-GTP-Sefarosa y electroforesis en gel de SDS-PAGE. La microsecuenciación de estas proteínas indicó que ambas diferían en su extremo amino terminal. Al analizar una biblioteca de cDNA se concluyó que las dos proteínas eIF4E provenían de un mismo mRNA que es sometido a tres procesos de edición (splicing) alternativos para dar origen a dos péptidos diferentes (Lavoie, *et al.*, 1996).

Posteriormente, a partir de la secuenciación del genoma de moscas, se encontraron varias secuencias pertenecientes a isoformas de eIF4E. De una biblioteca de cDNAs, se obtuvieron las secuencias de ocho miembros de la familia eIF4E (eIF4E1 a la 8). Las proteínas correspondientes fueron expresadas *in vitro* y al medir su afinidad hacia el 7metilGTP-sefarosa, se encontró que todas se unen a

la resina. Paralelamente, mediante el sistema de dos híbridos en levadura, se analizó la interacción de las ocho eIF4E con las proteínas eIF4G y 4E-BP de *Drosophila*. Se encontró que eIF4G interacciona fuertemente con eIF4E-1, eIF4E-2 y eIF4E-4, mientras que con eIF4E-3, eIF4E-5 y eIF4E-7 la interacción es menor y no se detectó interacción con eIF4E-6 y eIF4E-8. El mismo patrón de interacciones fue observado con 4E-BP (Hernández, *et al.*, 2005). Esto indica que las diferentes isoformas de eIF4E podrían cumplir funciones diferentes en el metabolismo del mRNA en *Drosophila* dado la capacidad que tienen para interaccionar con otras proteínas como eIF4G.

### **3.2.3.2 Nemátodos.**

En nemátodos se hizo la caracterización funcional de cinco isoformas del factor eIF4E, analizando el requerimiento de cada isoforma para la viabilidad, a través del silenciamiento específico para cada una mediante RNA de interferencia (RNAi). Se encontró que la isoforma IFE-3 tiene mayor parecido con el eIF4E-1 de mamíferos, teniendo afinidad solo por el Cap monometilado (<sup>7</sup>mGTP) y es esencial para la viabilidad. Las isoformas IFE-1, IFE-2 e IFE-5 tienen más parecido entre sí, que con eIF4E-1 con una identidad superior al 50%. Estas son capaces de reconocer a Cap trimetilado (<sup>2,2,7</sup>mGTP), y su función es parcialmente redundante. IFE-4 se une únicamente a Cap monometilado y es similar a eIF4E-2 de mamíferos. La isoforma IFE-4 de *C. elegans* no es esencial para la viabilidad (Keiper, *et al.*, 2000). En este mismo organismo se expresó IFE-4:GFP encontrándose preferencialmente en músculo y neuronas, también se hicieron mutantes knockout para *ife-4*, en las que se demostró mediante análisis con microarreglos de DNA que hay un grupo de mRNA afectados en su traducción por la ausencia de IFE-4 (Dinkova, *et al.*, 2005). Estos estudios sugieren la existencia de una función particular para cada miembro de la familia eIF4E.

### **3.2.3.3 Mamíferos.**

Por medio de bibliotecas genómicas de humano obtenidas de placenta, se pudieron aislar y caracterizar dos genes codificantes para dos miembros de la

familia eIF4E (eIF4E-1 y eIF4E-2), el primer gen está organizado en siete exones y seis intrones mientras que el segundo solo presenta un exón y carece de intrones. Ambos genes mostraron una expresión diferencial en cuatro líneas celulares humanas, se ha sugerido que además del linaje celular, pueden ser transcritos diferencialmente en respuesta a factores de crecimiento (Gao, *et al.*, 1998).

#### **3.2.3.4 Plantas.**

En extractos de germen de trigo, puntas de raíces de maíz e inflorescencias de coliflor se identificaron dos complejos eIF4F antigénicamente distintos: eIF4F (eIF4E de 26kDa y eIF4G de 180kDa), y su isoforma eIFiso4F (eIFiso4E de 28kDa y eIFiso4G de 86kDa). Ambos complejos pueden actuar en la iniciación de la traducción (Browning, *et al.*, 1992).

De una biblioteca de cDNAs de *Arabidopsis*, se aislaron dos genes codificantes para miembros de la familia eIF4E (eIF4E y eIFiso4E), cuyas secuencias de aminoácidos mostraron homología con los eIF4E de plantas, levadura y humanos. Se observó que el mRNA de cada isoforma se acumula diferencialmente en tejidos de la planta, siendo el mRNA de eIF4E más abundante en todos los tejidos menos en la zona de diferenciación de la raíz, mientras que el mRNA de eIFiso4E es abundante en órganos florales y en tejido en desarrollo como puntas de raíz. Estas evidencias sugieren que las isoformas tienen funciones distintas en el desarrollo de la planta (Rodríguez, *et al.*, 1998).

A finales de la década de los 90s', se identificó en *A. thaliana* una nueva proteína de unión a la estructura Cap (nCBP) capaz de soportar la traducción dependiente de Cap de mRNA que tiene a los ortólogos en animales: eIF4E-2 (*H. sapiens*), 4E-HP (*D. melanogaster*), IFE-4 (*C. elegans*). Aunque no es clara la función que desempeña, se ha propuesto que nCBP podría regular la traducción de algunos mRNA secuestrándolos y disminuyendo sus niveles de traducción. Algunos experimentos *in vitro* sugieren que podría existir competencia entre eIF4E, eIFiso4E y nCBP por algunos mRNA (Ruud, *et al.*, 1998).

Las diferentes isoformas de eIF4E se han encontrado en diversas especies vegetales como maíz, tabaco, chile, arroz, lechuga, jitomate, entre otras. En plantas de tabaco se encontraron las dos isoformas eIF4E y eIFiso4E, y se observó que cuando se purificaba eIFiso4E de un extracto de proteína soluble de hojas de tabaco mediante cromatografía con  $^7\text{mGTP}$  sefarosa y se detectaba por Western blot, se obtenían dos proteínas (eIFiso4Ea y eIFiso4Eb). Mediante Western blot, se midió la distribución de los factores eIF4E y eIFiso4E en un extracto de proteína soluble de diferentes tejidos de plantas de tabaco y se encontró que eIFiso4E y eIF4E son más abundantes en polen, anteras y raíz, en comparación con los niveles que hay en pétalos, sépalos hojas y semillas (Combe, *et al.*, 2005).

Se ha encontrado que durante el desarrollo de ejes embrionarios de maíz, existe un patrón de expresión diferencial en los niveles proteicos de las isoformas eIF4E y eIFiso4E. En semillas quiescentes la cantidad de eIFiso4E es mayor con respecto a la de eIF4E, quien alcanza niveles similares hasta las 24 horas de germinación (Dinkova y Sánchez de Jiménez, 1999).

Todos estos estudios confirman la presencia de distintos miembros de la familia eIF4E en diversos organismos, en donde dependiendo las condiciones, pueden regular la traducción afectando el crecimiento celular y el desarrollo.

### **3.3 Concepto y clasificación taxonómica general de los virus.**

Los virus han sido definidos como elementos genéticos que actúan como parásitos celulares especializados, compuestos por una o varias moléculas de ácidos nucleicos normalmente rodeadas por una cubierta protectora de proteínas o lipoproteínas que son capaces de organizar su propia replicación al situarse dentro de una célula hospedera. La gran diversidad de tipos de virus que existe en la naturaleza es, probablemente, solo un reflejo de la diversidad de tipos de genomas virales que han surgido durante la evolución (Vega y Rivera, 2001).

Considerando la naturaleza del genoma (DNA o RNA), el tipo de cadenas que lo componen (cadena sencilla o cadena doble), la polaridad de las cadenas nucleotídicas y la capacidad de transcripción reversa, se han caracterizado 240 géneros, de los cuales 211 se encuentran clasificados dentro de 68 familias. Los 29 restantes aún no han sido asignados a una categoría taxonómica mayor. Actualmente se han reconocido tres órdenes, los **Caudovirales** que incluyen a las familias *Myoviridae*, *Siphoviridae* y *Podoviridae*; el orden de los **Mononegavirales** en el cual se encuentran incluidas las familias *Bornaviridae*, *Filoviridae*, *Paramyxoviridae* y *Rhabdoviridae*; finalmente el orden de los **Nidovirales** que incluye a las familias *Coronaviridae* y *Arteriviridae*. Al resto de las familias aún no se les ha considerado dentro de un nivel taxonómico superior (Mayo, 2002; Pringle, 1999).

### 3.3.1 Clasificación de los virus de plantas.

Dentro de los virus que infectan plantas, solo un 10% poseen un genoma de DNA y pueden replicarse en el núcleo de la célula hospedera, mientras que el 90% poseen un genoma de RNA y llevan a cabo su ciclo de replicación en el citoplasma (Mathews, 1991).

Los virus de plantas han sido catalogados con base a los cuatro criterios taxonómicos generales: la naturaleza del genoma (DNA o RNA), el tipo de cadenas que lo componen (cadena sencilla o cadena doble), la polaridad de las cadenas nucleotídicas y la capacidad de ser sometidos a transcripción reversa durante la infección viral. Tomando en cuenta lo anterior, los virus de plantas se pueden agrupar en: (1) virus de DNA de cadena sencilla con dos familias representativas; (2) virus que llevan a cabo reverso transcripción que agrupan a tres familias; (3) virus de RNA de doble cadena que incluyen dos familias; (4) virus de RNA de cadena sencilla con sentido negativo que agrupan dos familias; y (5) los virus de RNA de cadena sencilla con sentido positivo donde pertenecen nueve familias (ver Tabla 1). Dentro de este último grupo se encuentra el género de los

Potyvirus de la familia *Potyviridae* y el género potexvirus miembro de la familia *Flexiviridae* (Mayo, y Brunt, 2005).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de las familias de virus de plantas.

<b>Virus de DNA ss</b>	<b>Virus de RNA ds</b>	<b>Virus de RNA ss (+)</b>
Geminiviridae	Reoviridae	Potyviridae
Nanoviridae	Partitiviridae	Flexiviridae
		Comoviridae
		Luteoviridae
		Timoviridae
		Tombusviridae
		Sequiviridae
		Closteroviridae
		Bromoviridae

### 3.4 Los virus y su importancia en el campo mexicano.

Cuando un virus infecta una planta hospedera, utiliza la maquinaria celular para poder llevar a cabo la traducción de las proteínas virales, replicar sus ácidos nucleicos, moverse fuera de las células inicialmente infectadas y esparcirse hacia otros tejidos de la planta. La mayor parte de los virus de plantas pueden infectar a sus hospederos por heridas hechas mecánicamente o por vectores, tales como insectos, hongos o nemátodos. Los virus de plantas se pueden transmitir por diferentes vías, sin embargo, la transmisión por insectos es la que tiene mayor repercusión principalmente en la producción agrícola (Gilbertson, *et al.*, 2001).

Los virus son causantes de grandes pérdidas en el ámbito agrícola, particularmente en la producción de hortalizas (Barba-de la Rosa, *et al.*, 2003). En México se realizó una inspección para estudiar la distribución geográfica de dos especies de Potyvirus, Virus del Mosaico Común del Frijol, BCMV y el Virus de la Necrosis en Mosaico Común del Frijol, BCMNV, empleando un grupo de oligonucleótidos diseñados para detectar el gen de la proteína de la cápside específicos para dichas especies virales. Ambos virus se encontraron presentes en distintos lugares de la República Mexicana, sin embargo, el BMCV se encontró

predominantemente en la región central del país; mientras que el BCMNV prolifera hacia el este de los estados tropicales de México (Flores-Estévez, *et al.*, 2003).

En una búsqueda que se realizó para detectar al Potyvirus de la mancha anular de la papaya (PRSV) en 15 estados a lo largo de la costa del Golfo de México y del Océano Pacífico que aportan el 98% de la producción nacional de papaya; se encontró en 157 de 267 muestras de hojas el PRSV. Adicionalmente se detectó el virus del mosaico de la papaya (PapMV), quien fue menos frecuente que PRSV. Ambos virus se pudieron encontrar en mezcla en papaya y otras especies vegetales susceptibles que podrían estar cumpliendo la función de reservorios de estos patógenos (Noa-Carrazana, *et al.*, 2006)

En plantas de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*, B.) que procedían de regiones productoras de los Estados de México, Puebla y Morelos, que mostraban síntomas de virosis, se lograron aislar y caracterizar parcialmente mediante pruebas de transmisión mecánica, injerto, por insectos vectores, serología y microscopía electrónica, varios virus de RNA de cadena sencilla, tales como el virus del jaspeado del tabaco (TEV). Los análisis serológicos realizados mostraron que infecciones en mezcla están ampliamente distribuidas en las zonas productoras de los Estados de México, Puebla y Morelos (De La Torre-Almaráz, *et al.*, 1998). En un trabajo posterior con plantas de tomate de cáscara cultivadas en la misma zona, se logró detectar al virus PHV; también se encontraron plantas infectadas, en forma individual o en mezcla, con los virus TEV, TRSV, TMV, CMV y TSWV, siendo el más frecuente el TEV (De La Torre-Almaráz, R., *et al.*, 2002). En un tercer estudio realizado en la misma región con plantas de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*, B.), jitomate (*Lycopersicon esculentum* L.), chile (*Capsicum annuum* L.) y crisantemo (*Dendrathera grandiflora* L.), que mostraban síntomas de manchas anulares cloróticas y necróticas en las hojas, así como necrosis en los tallos, se consiguió separar seis aislamientos del virus TSWV; también fueron encontrados el INSV, CMV, TRSV, TMV y TEV presentes en infecciones complejas. Los aislamientos de TMV y TEV fueron encontrados con

mayor frecuencia en las infecciones al ser detecciones serológicamente (De La Torre-Almaráz, *et al.*, 2002).

### **3.5 Características y organización del genoma de virus de RNA.**

Entre la gran diversidad de virus de RNA de sentido positivo, existe una amplia variedad de formas en las que la expresión del genoma es regulada. Parte de esta regulación se puede atribuir a las características existentes en los extremos 5' y 3' así como en las regiones UTR 5' y UTR 3' de los mensajeros virales haciéndolos diferentes de los mRNA celulares (Dreher y Miller, 2006).

Más de una tercera parte de los géneros virales de RNA de cadena positiva están provistos en su extremo 5' de estructura Cap, pero no poseen cola de poliA en el extremo 3'. Sin embargo, para algunos virus se ha observado que la región UTR 3' hace más eficiente la traducción del mensajero viral como lo hace la cola de poliA en un mRNA celular (Gallie y Walbot, 1990; Krab, *et al.*, 2005; Matsuda y Dreher, 2004).

En otros casos, los mensajeros virales pueden ser semejantes a los mRNAs celulares. Un caso particular de este tipo viral es el género *Potexvirus* miembros de la familia *Flexiviridae* que posee un genoma monopartita de aproximadamente 6 Kb y cinco marcos de lectura abiertos, presenta estructura Cap en su extremo 5' y cola de poliA en el extremo 3' (Huang, *et al.*, 2004). Se ha observado que la región UTR 5' está involucrada en la regulación de la síntesis de RNA subgenómico, en la encapsidación así como el transporte vía los plasmodesmata; por otro lado, la región UTR 3' desempeña algunas funciones durante la replicación viral. Dentro del genoma viral existe una región que codifica para tres péptidos involucrados durante el tránsito intracelular y se ha sugerido que esta región asegura la traducción del RNA viral (Verchot-Lubicz, *et al.*, 2007).

Un cuarto de los géneros de virus de RNA de cadena sencilla presentan unida covalentemente a su extremo 5' de su genoma una pequeña proteína de origen



viral (VPg) en lugar de estructura Cap. En algunos de estos virus la región UTR 5' se encuentra altamente estructurada y presentan elementos tipo IRES capaces de soportar la traducción independiente de Cap. Estos virus pertenecen al supergrupo de los picornavirus dada la organización y estrategias de expresión del genoma. Pueden presentar varios codones de inicio (AUG). A pesar de que estos virus comparten estas características con virus animales, se ha sugerido que la manera de reclutar la maquinaria traduccional es diferente (Goodfellow y Roberts, 2007). Un ejemplo de este último tipo de virus es el género *Potyvirus* perteneciente a la familia *Potyviridae*. El genoma de estos virus es monopartita y se encuentra constituido por una molécula de RNA de cadena sencilla con sentido positivo de longitud cercana a las 10 kb y es cubierto por aproximadamente 2000 unidades de proteína de la cápside formando una partícula con forma de varilla flexible. En el extremo 5' del RNA tiene unido covalentemente por un residuo de tirosina a la proteína VPg (viral genome-linked protein) de aproximadamente 25 KDa; en el extremo 3' presenta una cola de adeninas poly(A) similar a un mRNA (Figura 4).

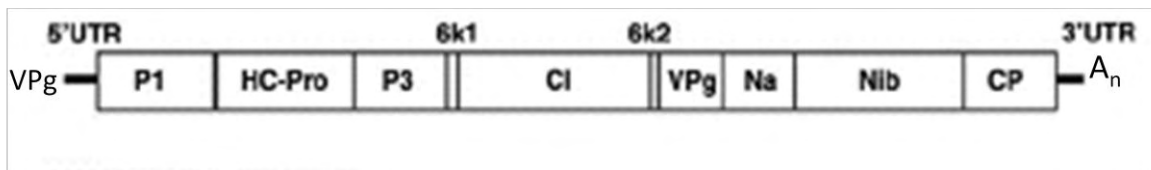


Figura 4. Diagrama de la organización del genoma de un Potyvirus, también se muestra la proteína VPg en el extremo 5' y la secuencia PoliA en el extremo 3' del genoma viral (Tomado de Urcuqui-Inchima, *et al* 2001).

El mRNA del genoma Potyvirus tiene un solo marco abierto de lectura que al ser traducido produce una poliproteína de aproximadamente 340 a 370 KDa la cual es procesada por proteasas virales para dar lugar a las diferentes proteínas virales (Urcuqui-Inchima, *et al.*, 2001; Dreher y Miller, 2006) (Tabla 2).

Tabla 2. Proteínas codificadas en el genoma de Potyvirus, se describen las funciones a las que se les ha asociado (Urcuqui-Inchima, *et al.*, 2001).

Proteína	Función
P1	Proteasa, sintomatología.
HC-Pro	Proteasa, transmisión por afidos, movimiento sistémico, supresión del silenciamiento génico, sinergismo y desarrollo de síntomas.
P3	Patogenicidad en plantas.
6k1	?, asociado a P3
CI	Movimiento de célula a célula.
6k2	?, asociado a NIa.
VPg	Replicación y traducción del genoma.
NIa	Proteasa, cuerpos de inclusión, localización celular.
NIb	Replicasa, cuerpos de inclusión, localización en el núcleo.
CP	Encapsidación, movimiento de célula a célula y sistémico

### 3.6 Los Potyvirus y su interacción con los factores de inicio de la traducción.

El éxito que tienen los virus de plantas al colonizar a un hospedero se debe en gran medida a las interacciones que se llevan a cabo entre las proteínas del hospedero y las proteínas provenientes del huésped. La información acerca de las proteínas involucradas en el ciclo infectivo de virus de plantas es limitada, no obstante, algunas de las interacciones entre proteínas del hospedero y las proteínas virales han sido documentadas (Roudet-Tavert, *et al.*, 2007).

Estudios realizados con mutantes nulas de los genes correspondientes a las isoformas del factor eIF4G de *A. thaliana*, evidenciaron que algunas isoformas son necesarias para llevar a cabo la infección por algunos Potyvirus. Cuando eIF4G está ausente, *A. thaliana* muestra resistencia al virus de la vena amarilla del clavel (CIYVV); al estar mutada eIFiso4G1, las plantas de *A. thaliana* adquirieron resistencia contra el virus del mosaico de la lechuga (LMV); finalmente la doble mutante eIFiso4G1 x eIFiso4G2 de *Arabidopsis*, fue resistente al virus del mosaico

del nabo (TuMV). Este trabajo sugirió que existe un reclutamiento selectivo de las isoformas de eIF4G dependiendo de la especie viral, al igual que para las isoformas del factor eIF4E, aunque no se sabe cuál es la tarea particular de cada factor durante la infección viral (Nicaise, *et al.*, 2007).

Mediante el análisis por RFLP de genes de resistencia a enfermedades causadas por agentes virales en cultivares de chile, se encontró que el locus *pvr2* confería resistencia al virus Y de la papa (PVY); dicho locus correspondía con el factor eIF4E. La secuencia del cDNA correspondiente al gen de resistencia *pvr2* presentaba de un 70% a un 86% de identidad con las secuencias de los factores eIF4E de otras plantas (Ruffel, *et al.*, 2002).

En la búsqueda de genes de resistencia contra virus de plantas, se han encontrado repetidamente mutaciones en los factores de iniciación de la traducción, particularmente con componentes de las familias eIF4E y eIF4G (Tabla 3); (revisado en Robaglia y Caranta, 2005). Sin embargo, el o los mecanismos por los que algún miembro de las familias de los factores de iniciación de la traducción participa en el ciclo de infección viral no son claros.

Tabla 3. Factores de iniciación de la traducción requeridos durante el proceso de infección por diferentes virus (Robaglia y Caranta, 2005; Nicaise, *et al.*, 2007).

<b>Genero</b>	<b>Virus</b>	<b>Planta</b>	<b>Factor de traducción</b>
Potyvirus	TuMV	<i>Arabidopsis</i>	eIFiso4E
		<i>Arabidopsis</i>	eIFiso4G1 x eIFiso4E2
	TEV	<i>Arabidopsis</i>	eIFiso4E
	LMV	<i>Arabidopsis</i>	eIFiso4E
	LMV	<i>Arabidopsis</i>	eIFiso4G1
	LMV	<i>Lactuca spp.</i>	eIF4E
	CIYVV	<i>Arabidopsis</i>	eIF4E
Potyvirus	PVY, TEV	<i>Capsicum spp.</i>	eIF4E
	PVMV	<i>Capsicum spp.</i>	eIFiso4E
	PPV	<i>Arabidopsis</i>	eIFiso4G1
	PSbMV	<i>Pisum sativum</i>	eIF4E
Cucumovirus	CMV	<i>Arabidopsis</i>	eIF4E y eIF4E
		<i>Arabidopsis</i>	eIF4E
Carmovirus	TCV	<i>Arabidopsis</i>	eIF4G
	MNSV	<i>Cucumis melo</i>	eIF4E
Bymovirus	BaYMV, BaMMV	<i>Hordeum vulgare</i>	eIF4E

En *Arabidopsis thaliana* se aisló una línea mutante nula para eIFiso4E mediante la inserción del transposon Spm de maíz en el segundo exón del gen *Ateifiso4e* (At5g35620). El elemento dSpm provoca la inserción de 3000 pb alterando el marco de lectura, conteniendo como elementos de selección el gen de fosfinotricina (BAR), que confiere resistencia al herbicida glufosinato de amonio (BASTA) y el gen de resistencia a espectinomicina (Spec) (Figura 5). Esta mutante no produce mRNA ni proteína del factor eIFiso4E, sin embargo, el fenotipo de estas plantas no es diferente al de plantas silvestres bajo condiciones de laboratorio. Mediante el análisis de perfiles polisomales se observó que los niveles de mRNA de la isoforma eIF4E que se traduce están incrementados en ausencia de eIFiso4E. Por otro lado, las plantas mutantes mostraron ser resistentes a dos

Potyvirus, TuMV y LMV, mientras que fueron susceptibles al virus del anillo negro de tomate (TBRV) y al virus CMV pertenecientes a géneros distintos (Duprat, *et al.*, 2002).

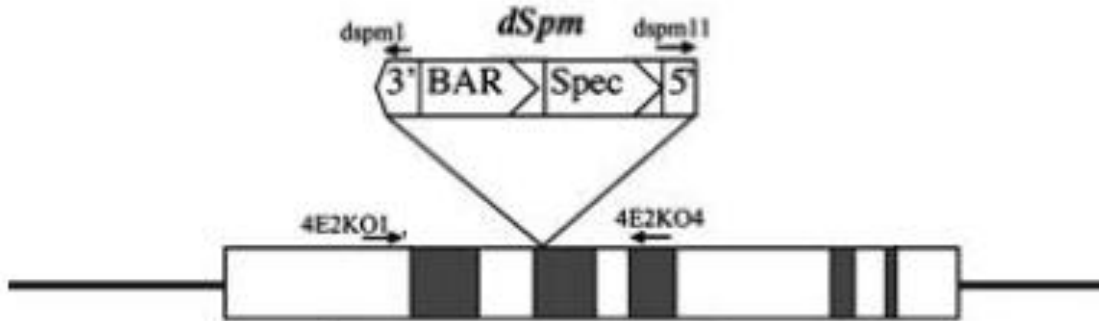


Figura 5. Diagrama que muestra la organización del gen *AteIFiso4E* y la inserción del elemento *dSpm* con los genes de resistencia *BAR* y *Spec*, en el segundo exón del gen. Se muestran en cajas oscuras los exones y en cajas claras los intrones (tomado de Duprat, *et al.*, 2002). Se muestran dentro de rectángulos verdes los oligonucleótidos empleados en las reacciones de amplificación por PCR, para detectar la inserción del transposón, así como los sitios blanco y la orientación que poseen.

En otro trabajo paralelo, también utilizando el sistema *Arabidopsis*-Potyvirus y mutagenesis inducida por etil metanosulfonato, se seleccionaron mutantes resistentes a la infección por TuMV y el virus del jaspeado de tabaco (TEV), pero susceptibles a infecciones por el virus del marchitamiento del nabo (TCV) perteneciente al género *Carmovirus*. El locus nombrado *lsp1* por loss of susceptibility to Potyvirus se identificó como el gen codificante para el factor eIFiso4E (Lellis, *et al.*, 2002).

A través de un estudio con los factores eIF4E y eIFiso4E recombinantes de *A. thaliana* y *Triticum aestivum* se observó que la proteína VPg-Pro o NIa (un precursor de VPg) del virus TuMV puede llevar a cabo una eficiente interacción con el factor eIFiso4E de *Arabidopsis* y con eIFiso4E de trigo y aunque con menor eficiencia también con las isoformas eIF4E de *Arabidopsis* y de trigo, lo que indica que VPg puede unirse a cualquier isoforma y podría existir competencia entre VPg y los mRNA celulares por los factores eIF4E. Por otro lado se mapeo el sitio de interacción de VPg con los factores eIF4E, encontrando que una secuencia de 35

aminoácidos conservada en las proteínas VPg de distintos Potyvirus, es la responsable de la interacción VPg con eIFiso4E y que al sustituir un residuo de ácido aspártico, se inhibe la interacción (Léonard, *et al.*, 2000). Otros estudios *in vitro* muestran que existe una competencia entre la proteína viral VPg y el análogo de Cap <sup>7</sup>mGTP por el factor eIFiso4E de *A. thaliana* predominando la interacción entre VPg y eIFiso4E. Además se observó que esta interacción es viable para formar el complejo VPg-eIFiso4E-eIFiso4G, lo que sugiere que este complejo podría participar en la traducción del genoma viral (Miyoshi, *et al.*, 2005).

En otros experimentos, mediante traducción en sistemas *in vivo* e *in vitro* del gen reportero codificante de la β-glucuronidasa con la región no traducible 5' del TEV que incluye los primeros 144 nucleótidos, se demostró que esta región no traducible puede promover una traducción independiente de Cap (Carrington y Freed, 1990; Zeenko y Gallie, 2005). La secuencia de los 143 nucleótidos del extremo 5' del RNA genómico de TEV favorece un plegamiento formando dos dominios compuestos por pseudonudos (PK1, PK2 y PK3) los cuales pueden soportar la traducción independiente de Cap. Al medir *in vitro* la interacción del pseudonudo PK1 con los factores de iniciación de la traducción eIF4G y eIFiso4G, provenientes de extractos de germen de trigo, se evidenció que la afinidad de eIF4G hacia PK1 es ~30 veces mayor que la de eIFiso4G y aún superior es la afinidad de los complejos eIF4F y eIFiso4F, con mayor afinidad de eIF4F hacia PK1 (Ray, *et al.*, 2006).

Los antecedentes anteriores permiten concluir que el factor eIFiso4E es importante durante el proceso de infección por Potyvirus, dependiendo del virus y del hospedero. Sin embargo, no es claro en qué momento de la infección pueda ser relevante (Figura 6). Se han propuesto algunos modelos que tratan de explicar la participación del factor eIFiso4E durante la infección viral, el primero proviene del conocimiento de que el factor eIFiso4E está involucrado en la iniciación de la traducción. Su asociación a la proteína VPg viral permitiría esta función por la analogía de la interacción de eIF4E con el Cap. La segunda función que podría

tener el factor, es la de proporcionar estabilidad al genoma viral mediante la interacción de eIFiso4E con la VPg, ya que se ha observado que en levaduras la interacción de eIF4E con la estructura Cap de los mensajeros protege de enzimas que cortan el Cap (DCP1p) y exonucleasas (XRN1p) que degradan el mRNA. El tercer papel donde podría estar involucrado el factor eIFiso4E es la localización y transporte intracelular, ya que se sabe, a través d ensayos de reconstitución, que el factor eIFiso4E interactúa con el factor eIFiso4G, y en trigo este último interactúa con los microtúbulos (Noueiry, *et al.*, 2000). Los tres modelos fueron propuestos por Lellis, *et al.*, (2002), sin embargo hasta el momento no se conoce cuál es el papel *in vivo* de la interacción de VPg con eIFiso4E durante el ciclo de infección viral.

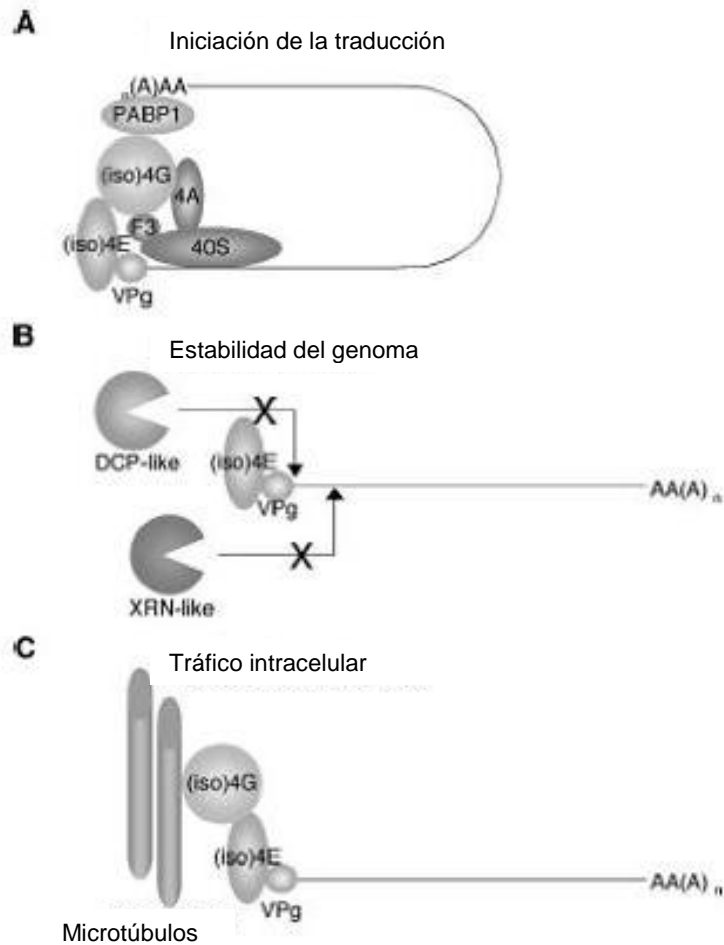


Figura 6. Se ilustran los modelos propuestos del factor eIFiso4E durante el proceso de infección por Potyvirus. A) En el inicio de la traducción del genoma viral mediante la interacción con VPg y el reclutamiento de la maquinaria traduccional. B) En la estabilización del genoma viral cuando eIFiso4E se asocia a VPg impidiendo la acción de nucleasas. C) Para el tráfico intercelular, la asociación de VPg con eIFiso4F puede promover la movilización del genoma viral a diferentes partes del hospedero (Lellis, *et al.*, 2002).



#### **4. HIPÓTESIS**

Dado que plantas mutantes nulas para el factor eIFiso4E de *Arabidopsis thaliana*, han mostrado resistencia contra infecciones por algunos Potyvirus, este factor será necesario para llevar a cabo la traducción, replicación y/o movimiento del virus del jaspeado del tabaco (TEV) en *A. thaliana*.

#### **5. OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la participación del factor eIFiso4E a nivel molecular en el proceso de infección por el virus del jaspeado del tabaco en *Arabidopsis thaliana*.

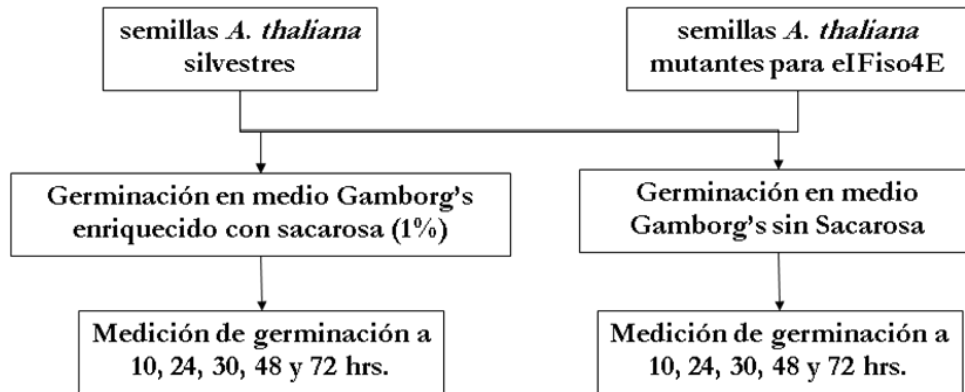
#### **6. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Caracterizar la velocidad de germinación de la mutante nula para el factor eIFiso4E de *A. thaliana*.
2. Analizar la participación de eIFiso4E en el movimiento del virus del jaspeado del tabaco en *A. thaliana* a distancia.
3. Analizar la participación de eIFiso4E en la traducción del RNA del virus del jaspeado del tabaco.
4. Comparar el papel de eIFiso4E en la traducción y movimiento de un potyvirus (virus del jaspeado del tabaco) con un potexvirus (virus del mosaico de la papaya) en *A. thaliana*.

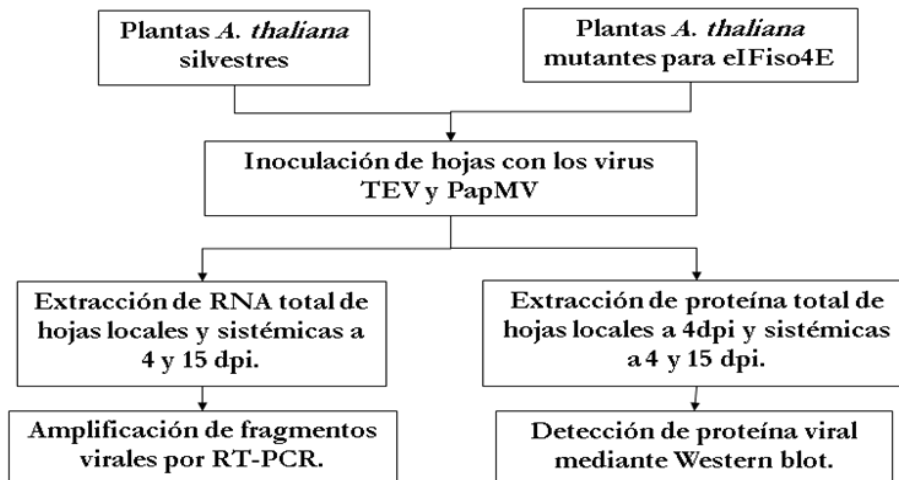
## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Estrategia Metodológica.

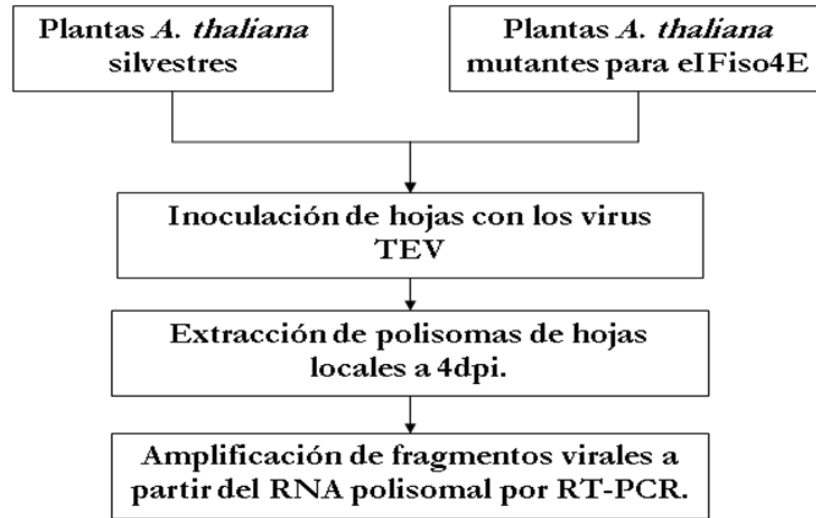
Caracterización de la germinación de semillas de la mutante nula para el factor eIFiso4E de *Arabidopsis thaliana*.



Participación del factor eIFiso4E en la replicación y/o movimiento del virus del jaspeado del tabaco (TEV) y del virus del mosaico de la papaya (PapMV) en *A. thaliana*.



**Participación de eIFiso4E en la traducción del virus del jaspeado del tabaco (TEV) en *A. thaliana*.**



## **7.2 Material Biológico.**

En este trabajo se utilizaron plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia y plantas mutantes nulas para el factor elFiso4E (elFiso4E<sup>-/-</sup>) del mismo ecotipo reportadas en Duprat, A. *et al.*, (2002). Para la propagación de TEV se utilizaron plantas de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi y el PapMV fue mantenido en plantas de *Carica papaya* var. Maradol, ambos bajo condiciones de invernadero. Los aislamientos mexicanos de PapMV y TEV fueron proporcionados por la Dra. Laura Silva-Rosales, del departamento de Ingeniería Genética del Cinvestav-Irapuato, México.

### **7.2.1 Esterilización y siembra de semillas silvestres y mutantes elFiso4E<sup>-/-</sup> de *A. thaliana*.**

Las semillas fueron colocadas en un tubo de 1.5 mL, se agregó 1 mL de hipoclorito de sodio (20%) y 1  $\mu$ L de Tween 20 (0.1 %) y se agitó vigorosamente durante 20 minutos. El tubo con las semillas se centrifugó en una minifuga por aproximadamente 10 segundos, se eliminó el sobrenadante con micropipeta. Se lavaron las semillas 5 veces con 1 mL agua estéril durante 30 segundos. Después de los lavados se agregó 500  $\mu$ L de agua estéril.

Semillas silvestres o mutantes elFiso4E<sup>-/-</sup> de *A. thaliana*, fueron sembradas en cajas petri con medio Gamborg's B-5 (Sigma), agar al 1% y sacarosa 1%, dichas cajas con las semillas fueron envueltas en papel aluminio e incubadas a 4°C por 48 horas para sincronizar su germinación. Posteriormente fueron puestas en una cámara de incubación a 22°C con un fotoperíodo de 8 horas luz por 16 horas de oscuridad. Después de 15 días de crecimiento dentro de las cajas, las plántulas se trasplantaron a macetas con sustrato Metro Mix 200 humedecido con agua estéril. En otros experimentos se colocaron semillas silvestres o mutantes elFiso4E<sup>-/-</sup> de *A. thaliana* en una maceta que contenía sustrato Metro Mix 200 humedecido con agua estéril; las macetas con las semillas fueron cubiertas con papel aluminio e incubadas a 4°C por 48 horas, al término de la incubación el papel aluminio fue retirado y fueron puestas en una cámara de incubación a 22°C

con un fotoperíodo de 8 horas luz por 16 horas de oscuridad para la óptima germinación de las semillas. Las plántulas obtenidas fueron mantenidas bajo las mismas condiciones de fotoperíodo por 30 días y regadas con agua estéril.

### **7.2.2 Inoculación de plantas con TEV y PaPMV.**

Para las inoculaciones virales, se tomaron como inóculos hojas de plantas hospederas infectadas (*N. tabacum* para TEV y *C. papaya* para PaPMV) que mostraban síntomas de virosis y se maceraron en un mortero estéril agregándoles un volumen de agua desionizada y estéril hasta obtener una mezcla homogénea. Con un hisopo de algodón se aplicó la mezcla en hojas jóvenes de plantas de *A. thaliana* silvestres y mutantes elFiso4E-/- de 30 días de crecimiento, procurando dejar una herida sobre la hoja. Las plantas fueron mantenidas en una cámara de incubación a 22°C con un fotoperíodo de 16 horas luz por 8 de oscuridad. Las hojas inoculadas (locales) y la primera hoja posterior a la inoculada (hoja sistémica) fueron colectadas a 4 días postinoculación (dpi), también se colectaron hojas sistémicas de plantas inoculadas a 15 dpi.

### **7.3 Medición de la germinación de semillas silvestres y mutantes elFiso4E-/- de *A. thaliana*.**

La germinación de las semillas de plantas de *A. thaliana* silvestres y mutantes elFiso4E-/- se midió en presencia y ausencia de sacarosa como fuente de carbono. Se colocaron 100 semillas estériles por caja petri con medio Gamborg's B-5 (Sigma), agar al 1% con o sin sacarosa al 1%. Después de sincronizar la germinación, las cajas fueron puestas en una cámara de incubación a 22°C con un fotoperíodo de 8 horas luz por 16 horas de oscuridad. La germinación de las semillas se midió por la observación de la protrusión de la radícula a 10, 12, 18, 24, 30, 48 y 72 horas.

## **7.4 Obtención y análisis de ácidos nucleicos.**

### **7.4.1 Extracción de DNA genómico.**

El DNA genómico de plantas jóvenes de *A. thaliana* silvestres y mutantes elFiso4E-/- se extrajo a partir de 50 mg de hojas frescas, con el kit de extracción de DNA de la marca PUREGENE (Gentra Systems; Minesota, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA extraído se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro DU 650 (Beckman, USA). El DNA se almacenó a -70°C hasta su uso.

### **7.4.2 Extracción de RNA total de *A. thaliana*.**

El RNA total se extrajo a partir de 100 mg de tejido vegetal fresco. se empleó la técnica de Trizol (Invitrogen Corporation; California, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El RNA total extraído se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro DU 650 (Beckman, USA). El RNA total fue separado electroforéticamente en un gel de agarosa (1%) para comprobar su integridad y se almacenó a -70°C hasta su uso.

### **7.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y Reacción de transcripción reversa acoplada a PCR (RT-PCR).**

Las secuencias de todos los oligonucleótidos utilizados se muestran en la tabla 3. Las condiciones específicas de reacción para cada amplificación se muestran en el Anexo 1. Para las reacciones de PCR se utilizó la enzima Taq-DNA polimerasa (Invitrogen Corporation; California, USA), con las sugerencias del fabricante. Para las reacciones de RT-PCR se utilizó el kit SuperScript One-Step RT-PCR con Platinum Taq (Invitrogen Corporation; California, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones fueron realizadas en un termociclador Mastercycler gradient (Eppendorff; Hamburgo, Alemania), y los productos de las reacciones se analizaron es geles de agarosa (1%).

Para corroborar que las plantas mutantes elFiso4E-/- de *A. thaliana* presentaran la inserción del transposon que interrumpe el gen *Ateifiso4e*, se amplificaron

mediante PCR a partir del DNA genómico fragmentos de 560 pb y 370 pb, empleando dos combinaciones de oligonucleotidos dspm1/4E2KO1 y dspm11/4E2KO4 respectivamente. Los sitios de reconocimiento para los oligonucleótidos se muestran en la Figura 5.

Para verificar la ausencia de mRNA correspondiente a elFiso4E en las mutantes, se realizaron ensayos de RT-PCR con RNA total extraído de plantas silvestres y mutantes elFiso4E-/- de *A. thaliana* empleando los oligonucleótidos elFiso4E5' y elFiso4E3' (Tabla 3) específicos para amplificar un fragmento de 600 pb del mRNA.

Con los RNAs totales obtenidos de las hojas locales y sistémicas de plantas infectadas con los virus TEV y PapMV, se realizaron reacciones de RT-PCR con oligonucleotidos específicos para amplificar fragmentos de TEV, PapMV y como control de carga, la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (G3FD) de *A. thaliana*. Los oligonucleótidos para detectar fragmentos virales fueron suministrados por la Dra. Laura Silva-Rosales del Cinvestav-Irapuato, México.

Tabla 3. Secuencia de los oligonucleotidos empleados para amplificar mediante PCR o RT-PCR fragmentos de mRNA celulares y virales.

Oligonucleotido	Secuencia 5' → 3'	Tamaño esperado
dspm1	CTTATTTTCAGTAAGAGTGTGGGGTTTTGG	560 pb
4E2KO1	TTGACCCAATAGAGTCCAGAAAT	
dspm11	GGTGCAGCAAACCCACACTTTTACT	370 pb
4E2KO4	CTCTCCAATCAAAGCCATCAACTA	
TEV 5'	ATAGCCATGGGATAATAGCTTGTTTAAGGGACC	720 pb
TEV 3'	CGACCTGCAGCCTGGATCCTCATTGCGAGTACACC	
PapMV 5'	TTCCTCACACCACCTCCCGACCACAGTAAG	1173 pb
PapMV 3'	CAAATAGTGCTAAACAACGGGCTGGGTCAAG	
elFiso4E 5'	GGATCCGCGAAGAATATGGCGACCGATG	600 pb
elFiso4E 3'	GACAGTGAACCGGCTTCTTCTGGCCATGG	
AtG3FD 5'	TCGGCATCAGGAACCCTGAGGAC	680 pb
AtG3FD 3'	CAATGCAATCCCAGCCTTGGC	

## **7.5 Obtención y análisis de perfiles polisomales a partir de hojas de *A. thaliana*.**

### **7.5.1 Separación de fracciones ribosomales en gradientes de sacarosa.**

La separación de polisomas se realizó de acuerdo a Abe y Daves (1998). Se colectó y se molió 1 gramo de las hojas inoculadas con virus (locales) de *A. thaliana* silvestres y mutantes elFiso4E-/- (a 4dpi), se molieron con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino que se transfirió a tubos de 1.5 mL. Se agregó 1 mL de buffer de extracción (200mM tris- HCl pH 8.5, 50mM KCl, 25mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM EGTA, 100µg/mL Heparina, 2% PTE, 1% Nonidet P40 y 0.5mg/mL Cicloheximida), y se agitó. La mezcla se centrifugó a 18 000 g en una centrífuga Beckman GS-15R durante 20 min a 4°C. El sobrenadante fue colectado, aforado a 4 mL. y puesto en un tubo de policarbonato sobre 1mL de una solución de sacarosa al 60% (40 mM Tris-HCl pH 8.5, 40mM KAc, 20mM MgAc, 1.5 M sacarosa 0.5mg/mL Cicloheximida), se centrifugó a 275 000 g en una ultracentrífuga Beckman, rotor 75Ti, por 3 horas a 4°C. Al cabo de la centrifugación, el sobrenadante se desechó y el precipitado se resuspendió en 400µL de buffer que contenía 40 mM Tris-HCl pH 8.5, 40mM KAc, 20mM MgAc 0.5mg/mL Cicloheximida.

Se preparó un gradiente de sacarosa con dos soluciones de sacarosa (60% y 15% en 40 mM Tris-HCl pH8.5, 40mM KAc, 20mM MgAc). Las soluciones fueron colocadas en un tubo, primero la de 60% y enseguida la de 15%, se selló y se rotó 90° durante 2 horas a temperatura ambiente para permitir la formación de un gradiente continuo (Figura 7). Los 400 µL de la resuspensión se colocaron sobre el gradiente y se centrifugaron a 250 000 g por 1h a 4°C en una ultracentrífuga Beckman, rotor SW55Ti. Las fracciones del gradiente se colectaron utilizando un fraccionador Auto Densi-flow (Labconco; USA) conectado a un detector de absorbancia a 260 nm Econo UV Monitor Modelo EM-1 (BioRad; USA) acoplado a un graficador LKB 2210 (Pharmacia, Suecia). Las fracciones polisomales se recuperaron en tubos estériles de 1.5 mL mediante un colector de fracciones modelo 2110 (BioRad; USA). Se recuperaron 9 fracciones polisomales de



aproximadamente 500  $\mu$ L que se sometieron a separación electroforética en geles de agarosa (1%). El material extraído se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

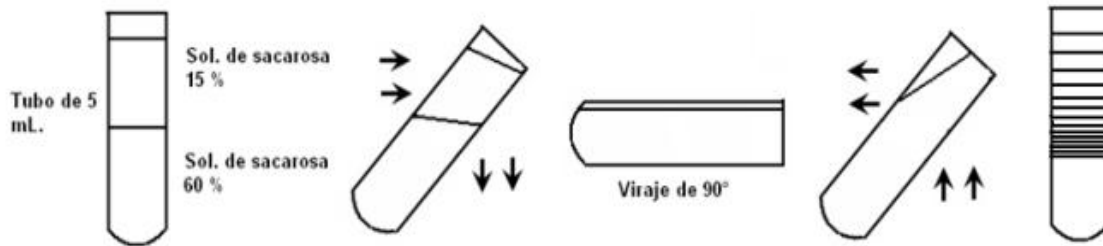


Figura 7. Se muestra la manera de formación del gradiente de sacarosa continuo empleado en la separación de fracciones polisomales.

### 7.5.2 Purificación de RNA a partir de fracciones polisomales.

Las fracciones polisomales colectadas se descongelaron en hielo, y se les agregó 25  $\mu$ L de solución de SDS (10%) y 1  $\mu$ L de proteinasa K (10 mg/mL). La mezcla se agitó e incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 min. La mezcla se desproteinizó con 250  $\mu$ L de fenol saturado con buffer TE (10mM Tris, 1mM EDTA pH 8.0) y 250  $\mu$ L de cloroformo-isoamílico (49 : 1), agitando vigorosamente por 15 segundos y centrifugando a 13 000 g durante 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante se recuperó en tubos estériles nuevos y se repitió la extracción fenólica. A la fracción acuosa final se le agregó 70  $\mu$ L de LiCl (10M) y 470  $\mu$ L de isopropanol frío, se mezcló e incubó a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 60 minutos. Después de la incubación, la mezcla se centrifugó a 18 000 g por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante se desechó y la pastilla se lavó por dos ocasiones con etanol al 70% centrifugando a 18 000 g por 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . El precipitado se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 30  $\mu$ L de agua tratada con Dietil-pirocarbonato (DEPC). La integridad del RNA polisomal obtenido se verificó electroforéticamente y se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### 7.6 Extracción y análisis de proteínas.

La extracción de proteína total se llevó a cabo como describe Nieto-Sotelo (1999). Tejido fresco de Arabidopsis (0.3 g) se molió con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. El polvo se transfirió a un tubo y se le agregó 1 mL de buffer de

extracción (100mM Tris-HCl pH 8, 25mM KCl, 4mM CaCl<sub>2</sub>, 0.05mg/mL BSA, 1.12mg/mL inhibidores de proteasas TM Complete de Roche) y se agitó. La mezcla se centrifugó a 11 200 g, durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió cuidadosamente a un tubo limpio. La concentración de proteína total se midió de acuerdo al método de Bradford. Para corroborar la calidad de la proteína total, 20 µg del extracto fueron separados electroforéticamente en geles desnaturizantes de acrilamida (SDS-PAGE) al 12%, y posteriormente fueron teñidos con azul de Coomassie.

Para el análisis por Western blot, 30 µg de extracto de proteína total de hojas locales (4dpi) y sistémicas de plantas de *A. thaliana* silvestres y mutantes eIFiso4E-/- inoculadas con TEV (a los 4 y 15 dpi) se separaron en SDS-PAGE 12% y las proteínas se transfirieron a una membrana PVDF Immobilon-P-Transfer (Millipore Corporation; Bedford MA, USA). Para el ensayo de Western blot, la membrana fue re-hidratada en metanol por 10 segundos y por 30 min a temperatura ambiente en Buffer salino de fosfatos 1X (PBS). La membrana se bloqueó con una solución de PBS 1X, 5% de leche durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavó rápidamente tres veces con Buffer PBS 1X. Posteriormente, se agregó el anticuerpo policlonal contra la proteína de la cápside (CP) del virus TEV (AGDIA Incorporated Elkhart; Indiana, USA) en una dilución 1:5 000 en Buffer PBS 1X con leche al 5% y se mantuvo en agitación durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente se retiró el anticuerpo y la membrana fue lavada cinco veces por 10 min con PBS 1X, 0.1% Tween 20. Se agregó un segundo anticuerpo policlonal anticonejo que posee acoplada una peroxidasa, se dejó incubando en agitación por 1 hora a temperatura ambiente. Se retiró el anticuerpo y la membrana se lavó cinco veces por 10 min con PBS 1X, 0.1% Tween 20. Finalmente la membrana se incubó con el sustrato quimioluminiscente Immobilon Western (Millipore; Bedford MA, USA) y se reveló en placas fotográficas Kodak utilizando una solución reveladora Kodak.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Análisis de la mutante eIFiso4E<sup>-/-</sup>.

#### 8.1.1 Análisis de la mutación eIFiso4E<sup>-/-</sup> por PCR.

Para poder llevar a cabo el análisis molecular de la mutante eIFiso4E<sup>-/-</sup> de *A. thaliana*, se extrajo el DNA genómico de hojas de plantas silvestres y mutantes eIFiso4E<sup>-/-</sup>, (Figura 8 panel A). También se extrajo el RNA total de *A. thaliana* silvestres y mutantes eIFiso4E<sup>-/-</sup> (Figura 8, panel B), el análisis de la separación electroforética del material mostró la cantidad de material obtenido así como su integridad.

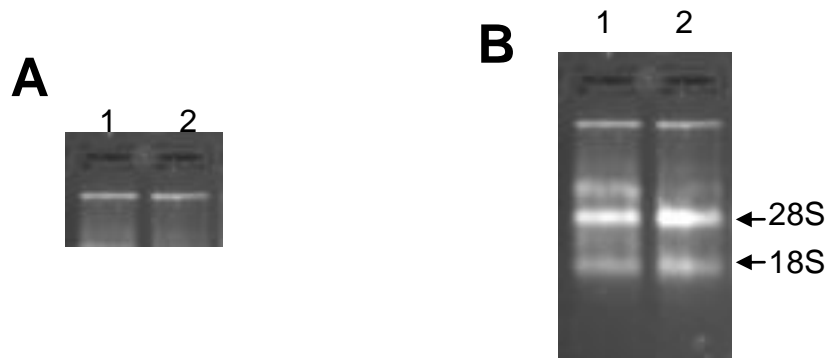


Figura 8. Patrones electroforéticos del DNA (A) y RNA total (B) de *A. thaliana* 1: plantas silvestres, 2: plantas mutantes eIFiso4E<sup>-/-</sup>.

El DNA obtenido permitió detectar, mediante reacciones de PCR, la inserción del transposón dentro del segundo exón del gen codificante para eIFiso4E de *A. thaliana* (At5g3620). La figura 9, muestra la amplificación de dos fragmentos (560 pb y 370 pb) únicamente a partir del DNA de las plantas mutantes eIFiso4E<sup>-/-</sup> al emplear las combinaciones de oligonucleótidos dspm1/4E2KO1, dspm11/4E2KO4 (Figura 9 carriles 3 y 4 respectivamente), tal como lo describe Duprat, A. y colaboradores (2002) para las plantas mutantes eIFiso4E<sup>-/-</sup>.

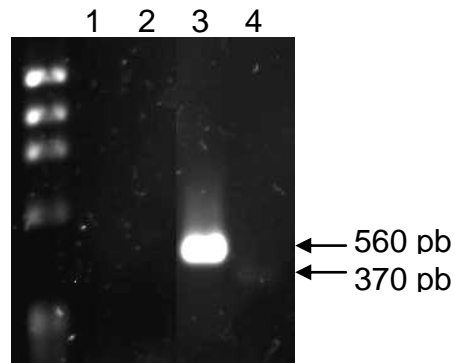


Figura 9. Perfiles electroforéticos de los productos de PCR para detectar la inserción del transposón en el gen codificante para elFiso4E (At5g35620) con las combinaciones de oligonucleótidos dspm1/4E2KO1, dspm11/4E2KO4. 1 y 2: DNA de plantas silvestres 3 y 4: DNA de plantas mutantes elFiso4E<sup>-/-</sup>.

Con del RNA total extraído de plantas silvestres y mutantes elFiso4E<sup>-/-</sup> de *A. thaliana* se realizaron ensayos de RT-PCR para comprobar la ausencia del mRNA del factor elFiso4E en las plantas mutantes elFiso4E<sup>-/-</sup>. Se observó la amplificación de un fragmento de aproximadamente 600pb en la reacción donde se utilizó RNA total de *A. thaliana* silvestre (Figura 10 carril 1), mientras que en la reacción donde se utilizó el RNA total de *A. thaliana* mutante elFiso4E<sup>-/-</sup> no se observó la amplificación de algún fragmento (Figura 10, panel A, carril 2), También se realizaron amplificaciones del mRNA de de la enzima gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (G3FD) para corroborar que la cantidad de RNA puesto en las reacciones fuera la misma (Figura 10 panel B). Estos resultados indican que la interrupción hecha por transposón en el segundo exón del gen At5g35620 es estable y que las plantas con las que se ha llevado a cabo el presente trabajo no expresan el mRNA.

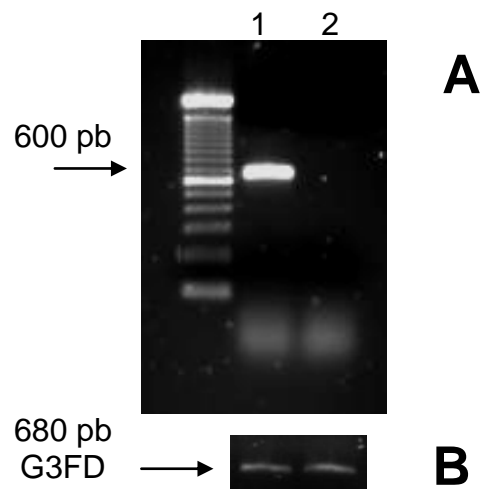


Figura 10. A: Producto de RT-PCR con los oligonucleótidos elFiso4E 5' y elFiso4E 3' a partir de RNA total de plantas de *A. thaliana*: 1) silvestre 2) mutante elFiso4E<sup>-/-</sup>. B: Amplificación del control interno G3FD.

### 8.1.2 Medición de la germinación de semillas de *A. thaliana* mutantes elFiso4E<sup>-/-</sup> en presencia y ausencia de sacarosa.

Dado que se ha observado que el factor elFiso4E es abundante desde etapas tempranas de la germinación de semillas de maíz (Dinkova, T. D. y Sánchez de Jiménez, E., 1999), y participa en la traducción selecta de mRNA, se decidió medir la germinación de semillas de *A. thaliana* con el objeto de corroborar si el factor elFiso4E es relevante durante la germinación de esta planta. Se germinaron 100 semillas de *A. thaliana* silvestres y 100 semillas mutantes elFiso4E<sup>-/-</sup>, se realizó el conteo de las semillas germinadas a 10, 24, 30, 48 y 72 horas (Figura 11). Acorde a las gráficas obtenidas, no se observó diferencia significativa en la velocidad de germinación de las semillas mutantes elFiso4E<sup>-/-</sup> en comparación a las semillas silvestres.

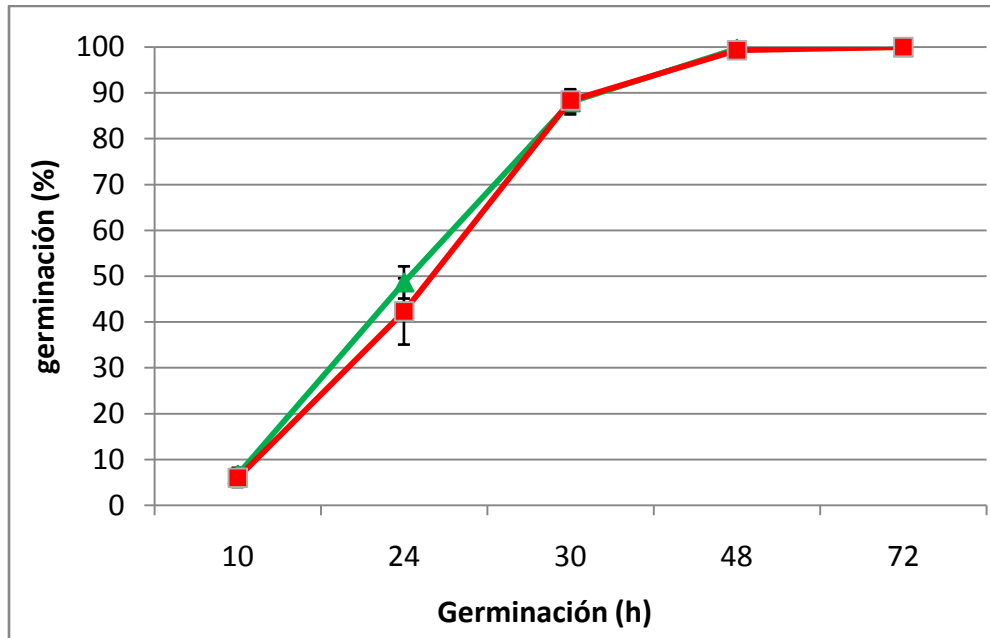


Figura 11. Velocidad de germinación de las semillas mutantes de *eIFiso4E*<sup>-/-</sup> (■) comparadas con las semillas silvestres (▲) de *A. thaliana*.

Existen antecedentes (Nicolai, *et al.*, 2006), en donde indican que la falta de una fuente de carbono afecta el desarrollo de *A. thaliana* y otras especies vegetales como maíz, afectándose la regulación de la expresión genética a nivel de transcripción y traducción, por tal motivo, en un experimento paralelo, se pusieron a germinar semillas de *A. thaliana* silvestres y mutantes *eIFiso4E*<sup>-/-</sup> en medio carente de sacarosa con la finalidad de analizar si la ausencia del factor *eIFiso4E* afectaba la germinación cuando falta una fuente de carbono. De acuerdo con la figura 12 no se aprecia cambio significativo en las velocidades de germinación entre las semillas de *A. thaliana* silvestres y mutantes *eIFiso4E*<sup>-/-</sup> puestas en medio sin sacarosa. En estas condiciones las semillas silvestres y mutantes *eIFiso4E*<sup>-/-</sup>, germinaron más rápido que las semillas en medio con sacarosa aunque posteriormente las plántulas se desarrollaron de forma más lenta.

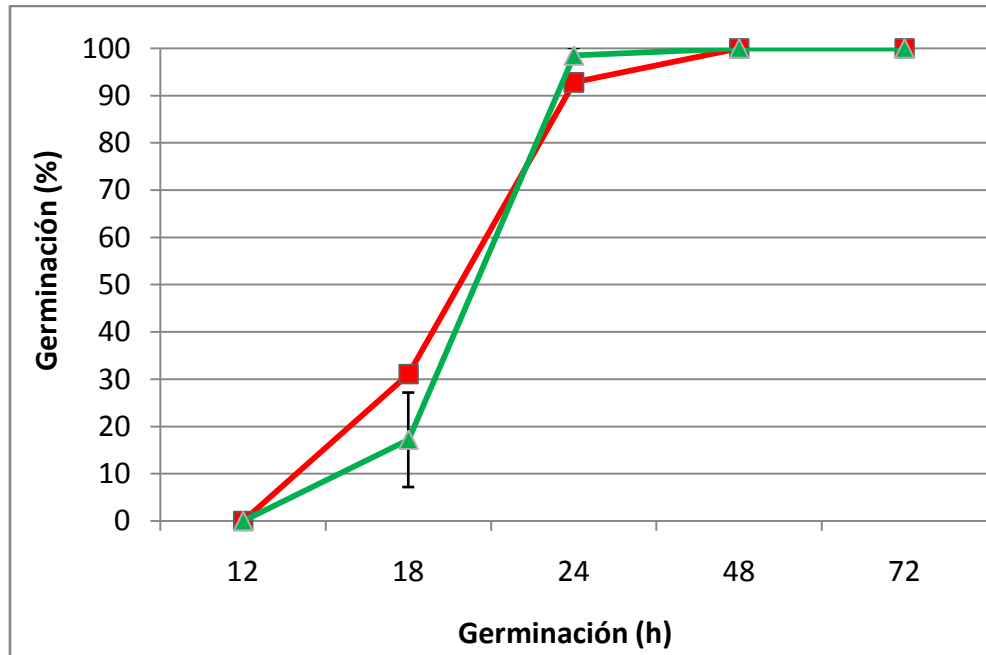


Figura 12. Velocidad de germinación de las semillas mutantes de *elFiso4E*<sup>-/-</sup> (■) comparadas con las semillas silvestres (▲) de *A. thaliana* crecidas en medio sin sacarosa.

Estos resultados indicaron que *elFiso4E* no es indispensable para la germinación de semillas de *A. thaliana* en condiciones de laboratorio.

## 8.2 Determinación de la replicación, traducción y movimiento del RNA de TEV en plantas silvestres y mutantes *elFiso4E*<sup>-/-</sup> de *A. thaliana*.

### 8.2.1 Sintomatología de plantas de *A. thaliana* silvestres y mutantes *elFiso4E*<sup>-/-</sup> inoculadas con TEV.

El virus del jaspeado del tabaco es uno de los potyvirus más estudiados a nivel molecular con relación a los mecanismos de replicación y traducción del genoma viral y su dispersión en plantas hospederas. Aunque *A. thaliana* no es su hospedero natural, es capaz de ser infectada por TEV. En este trabajo se aprovecharon las ventajas de ambos modelos (virus y planta) para dilucidar a nivel molecular el papel de *elFiso4E* en el ciclo viral.

Después de 15 días de haber inoculado plantas de *A. thaliana* silvestres y mutantes elFiso4E-/- con un inóculo de plantas de tabaco infectadas con TEV, no se observaron síntomas de virosis o deformación de las hojas contrario a lo observado en plantas de tabaco donde las hojas presentan manchas amarillas características de la infección por TEV (Figura 13), tal como se ha demostrado anteriormente con otros aislamientos de TEV (Lellis, *et al.*, 2002).

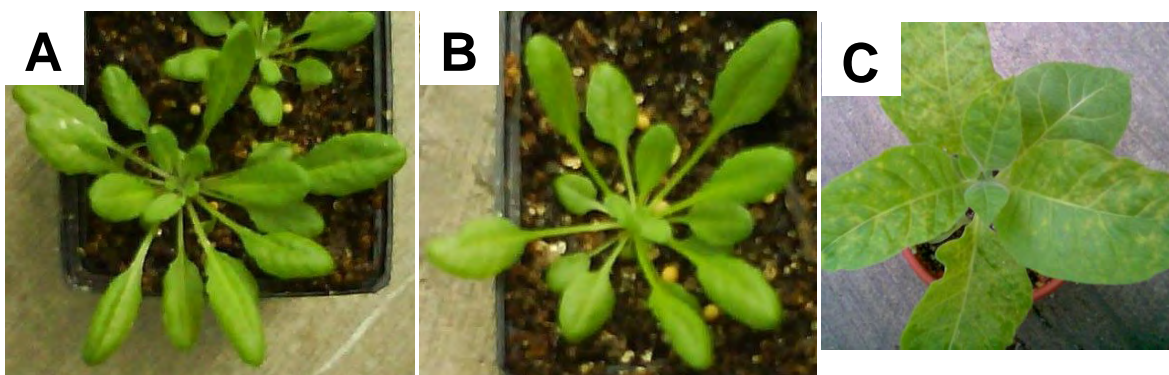


Figura 13. Plantas de *A. thaliana* silvestre (A), mutante elFiso4E-/- (B) y tabaco (C) a 15 dpi con TEV.

### 8.2.2 Determinación de la presencia de RNA viral en el RNA total de hoja.

Para este análisis se compararon los niveles de RNA viral de TEV en hojas locales, hojas sistémicas colectadas a 4 dpi, y hojas sistémicas colectadas a 15 dpi de plantas de *A. thaliana* silvestres y mutantes elFiso4E-/- inoculadas con TEV. El fragmento amplificado mediante RT-PCR fue de 720 pb abarcando la secuencia del cistrón de N1a dentro del genoma viral (Figura 4). Los resultados indicaron la presencia de TEV en el RNA total de las hojas locales de las plantas tanto silvestres como mutantes (Figura 14 A). Sin embargo, en las hojas sistémicas de 4 dpi o de 15 dpi, solamente se detectó RNA viral para las plantas silvestres, y no para las plantas mutantes en elFiso4E-/-. Con la finalidad de verificar que la cantidad de RNA total fuera la misma en las distintas reacciones, se realizó un RT-PCR empleando oligonucleótidos específicos para un fragmento de 680 pb del mRNA de G3FD; el perfil electroforético de los productos de estas



reacciones mostraron que la cantidad de RNA puesto en las reacciones es similar (Figura 14 B).

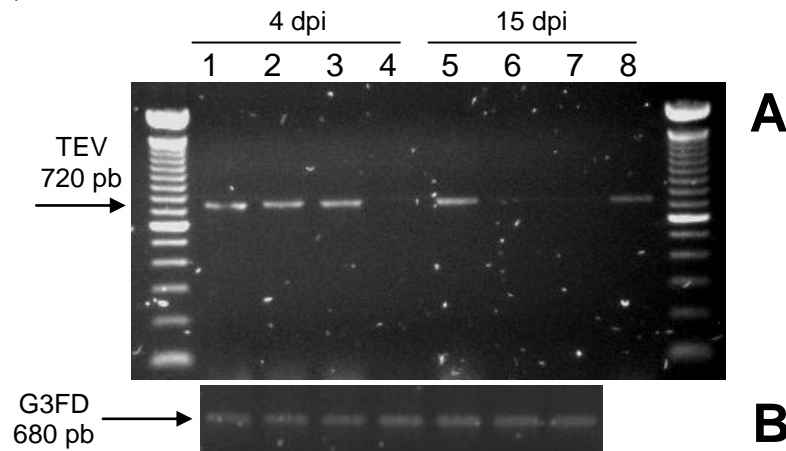


Figura 14. Detección del RNA viral (TEV) en plantas de *A. thaliana* en hojas locales en el panel A en hojas locales de plantas silvestre (1) y *elFiso4E*<sup>-/-</sup> (2) a 4dpi. TEV en 1ª hoja sistémica de plantas silvestre (3) y *elFiso4E*<sup>-/-</sup> (4) a 4dpi. TEV en hojas sistémicas de plantas silvestre (5) y *elFiso4E*<sup>-/-</sup> (6) a 15 dpi. Tabaco inoculado con agua (7). TEV en hojas sistémicas de tabaco (8). En B se muestran la amplificación del mRNA de G3FD de *A. thaliana* de las hojas antes mencionadas.

### 8.2.3 Determinación de la presencia de RNA viral en fracciones polisomales.

Con la finalidad de averiguar si existían cambios en los niveles de traducción de proteínas virales debido a la ausencia del factor *elFiso4E*, se obtuvieron los perfiles polisomales de las hojas locales de plantas de *A. thaliana* silvestres y mutantes *elFiso4E*<sup>-/-</sup> inoculadas con TEV (4dpi) (Figura 15 A) donde se muestra también la integridad del RNA polisomal purificado de cada fracción (1-9) (Figura 15 B). Con el RNA polisomal se amplificó el fragmento de 720 pares de bases correspondiente al fragmento del RNA correspondiente al cistron N1a de TEV (Figura 15C). Se observó que el RNA viral se encuentra distribuido desde las fracciones no polisomales hasta las polisomales de manera similar en las hojas inoculadas de plantas silvestres y mutantes *elFiso4E*<sup>-/-</sup>. En comparación al RNA viral, el mRNA celular correspondiente a G3FD (Figura 15D), está preferencialmente localizado en las fracciones más pesadas (con mayor número de ribosomas unidos al RNA), lo que indica que su traducción es más activa que la del RNA viral.

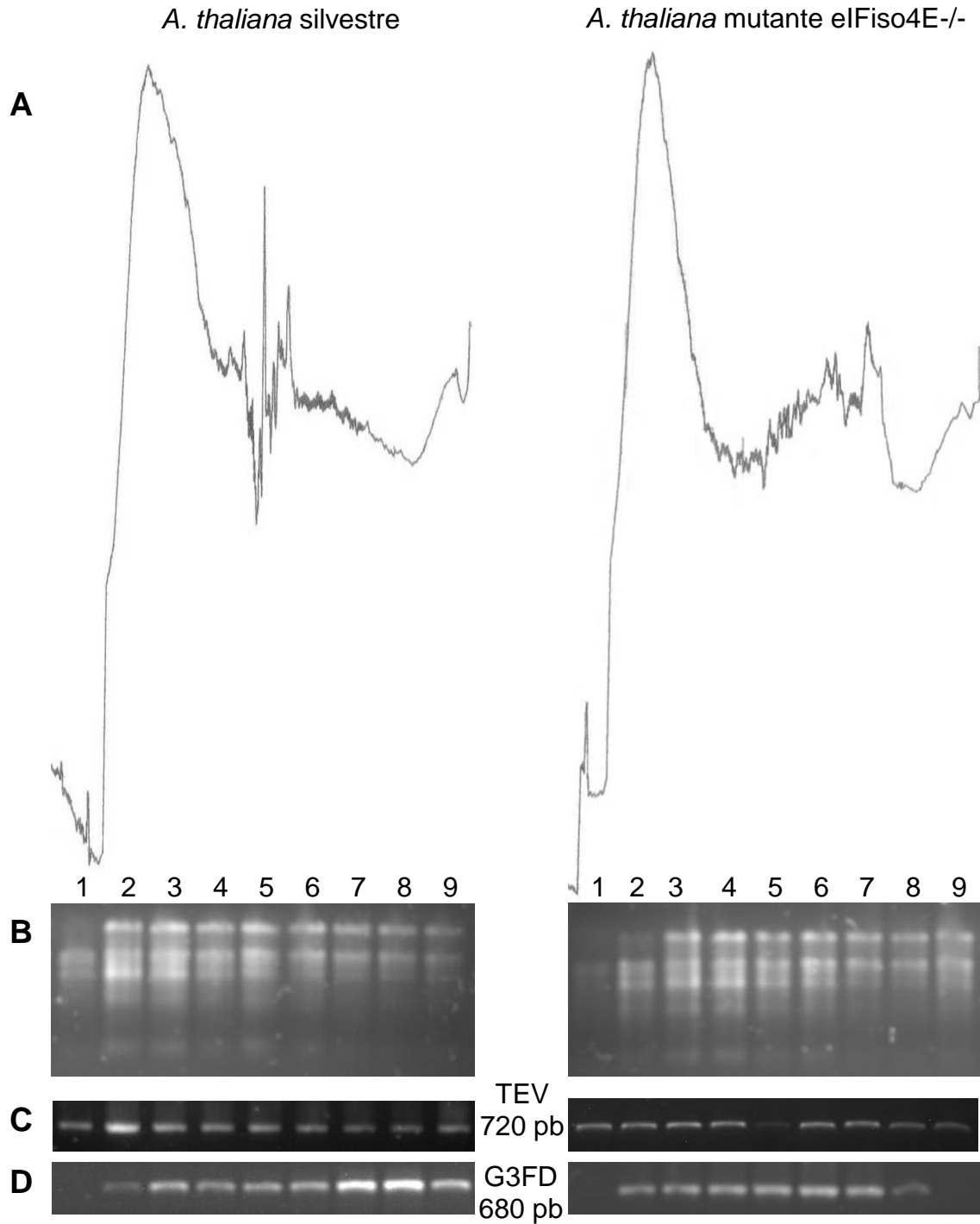


Figura 15. A: Perfiles de absorbancia a 260 nm de plantas silvestres y mutantes eIFiso4E<sup>-/-</sup> de *A. thaliana*. B: Integridad del RNA polisomal obtenido de plantas silvestres y mutantes eIFiso4E<sup>-/-</sup>. C: Distribución del RNA viral en el perfil polisomal. D: Patrón de distribución del mRNA de G3FD dentro del perfil polisomal.

Se realizó un análisis densitométrico para evaluar la distribución de RNA de TEV y G3FD en las fracciones polisomales (Figura 16): a partir de este análisis se calculó la cantidad de RNA total (la suma de todas las fracciones), que hay en cada fracción. Los resultados mostraron que aproximadamente 46 % del mRNA viral se encuentra en polisomas (fracciones traduccionalmente activas) en plantas silvestres, y un 56 % en polisomas de plantas mutantes en eIFiso4E (Figura 16 A y B). En cambio, la distribución de un mRNA celular (G3FD), indica una traducción más activa en plantas silvestres (86 % en polisomas) que en plantas mutantes eIFiso4E<sup>-/-</sup> (76 % en polisomas) como se puede observar en la Figura 16 C y D.

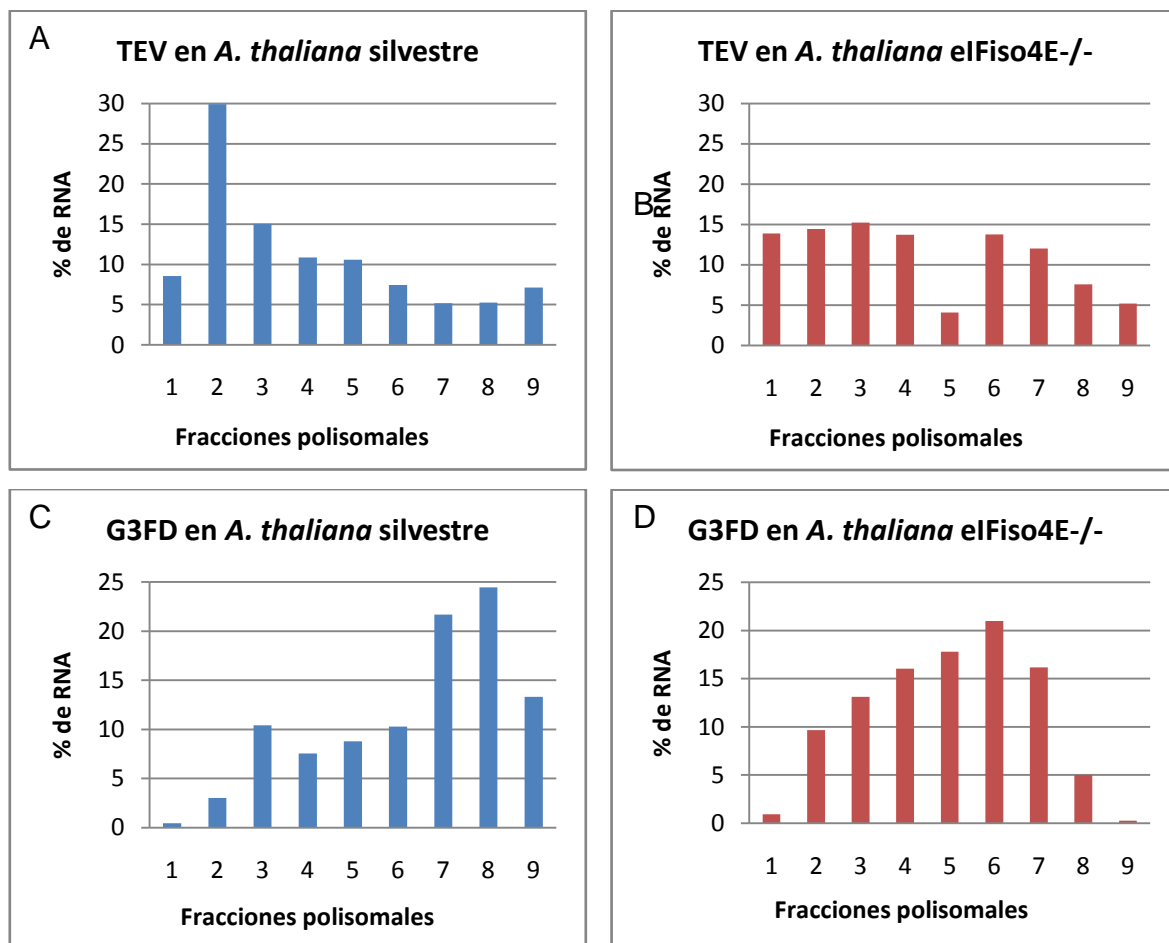


Figura 16. Análisis de la distribución de TEV y G3FD en las fracciones polisomales. Graficas de los análisis densitométricos de los productos de RT-PCR para TEV (A y B) y para G3FD (C y D) a partir del RNA polisomal de hojas locales de plantas silvestres y mutantes eIFiso4E<sup>-/-</sup> de *A. thaliana* inoculadas con el virus TEV a 4dpi.

#### 8.2.4 Determinación de la presencia de la proteína de la cápside de TEV (CP).

Con la finalidad de ver si los productos del genoma viral de TEV se encontraban en diferentes tejidos de plantas de *A. thaliana* silvestres y mutantes eIFiso4E inoculadas con el virus, se extrajo la proteína total de las hojas locales, de la primera hoja sistémica a 4dpi y de hojas sistémicas diferentes a la primera a 15 dpi. Un análisis por Western-blot con el anticuerpo contra la proteína de la cápside (CP) permitió detectar la CP de TEV en hojas locales de *A. thaliana* tanto silvestre como mutante. Sin embargo, en la primera hoja sistémica a 4dpi, o en hojas sistémicas a 15 dpi, solo se detectó la proteína en las plantas silvestres (Figura 17). Este resultado fue consistente con la detección del RNA viral a nivel total y a nivel de fracciones polisomales.

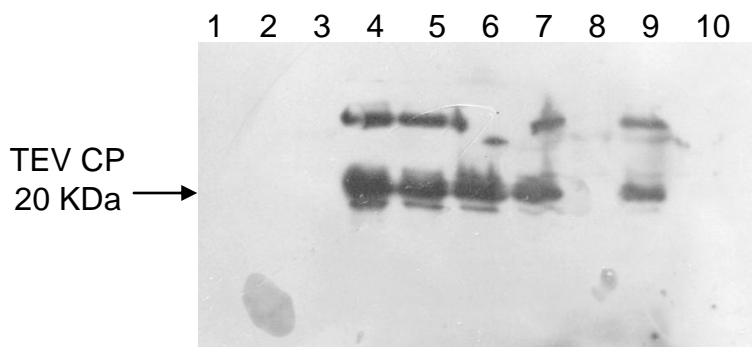


Figura 17. Presencia de CP de TEV en plantas inoculadas con TEV. 1 y 2: *A. thaliana* silvestre y mutante eIFiso4E<sup>-/-</sup> sin inocular. 3 y 4: Tabaco sin inocular e inoculado. 5 y 6: hoja local de *A. thaliana* silvestre y mutante eIFiso4E<sup>-/-</sup> 4 dpi. 7 y 8: 1<sup>a</sup> hoja sistémica de *A. thaliana* silvestre y mutante eIFiso4E<sup>-/-</sup> 4dpi. 9 y 10: hoja sistémicas de *A. thaliana* silvestre y mutante eIFiso4e<sup>-/-</sup> 15 dpi.

Se observó la presencia de dos bandas reconocidas por el anticuerpo contra CP de TEV. La proteína madura de 20 KDa está indicada, la banda de mayor peso molecular podría corresponder a un fragmento precursor, dado que las distintas proteínas virales se originan de la traducción de una poliproteína.

### 8.3 Determinación de la replicación, traducción y movimiento del RNA de PapMV en plantas silvestres y mutantes eFiso4E<sup>-/-</sup> de *A. thaliana*.

#### 8.3.1 Sintomatología de plantas de *A. thaliana* silvestres y mutantes eFiso4E<sup>-/-</sup> inoculadas con PapMV.

Con la finalidad de observar si la falta del factor eFiso4E afectaba a alguna especie viral distinta a los Potyvirus, se inocularon plantas de *A. thaliana* silvestres y mutantes eFiso4E<sup>-/-</sup> con el virus PapMV miembro del género Potexvirus, quien posee un genoma compuesto por RNA de cadena sencilla, en su extremo 5' una estructura Cap y en su extremo 3' la secuencia PoliA semejante a un mRNA celular. A 10 dpi, las plantas no mostraron algún síntoma de virosis como se observa en la figura 18, mientras que plantas de Papaya que fueron utilizadas para mantener el aislado viral, mostraban síntomas de infección en sus hojas a los 10 dpi.

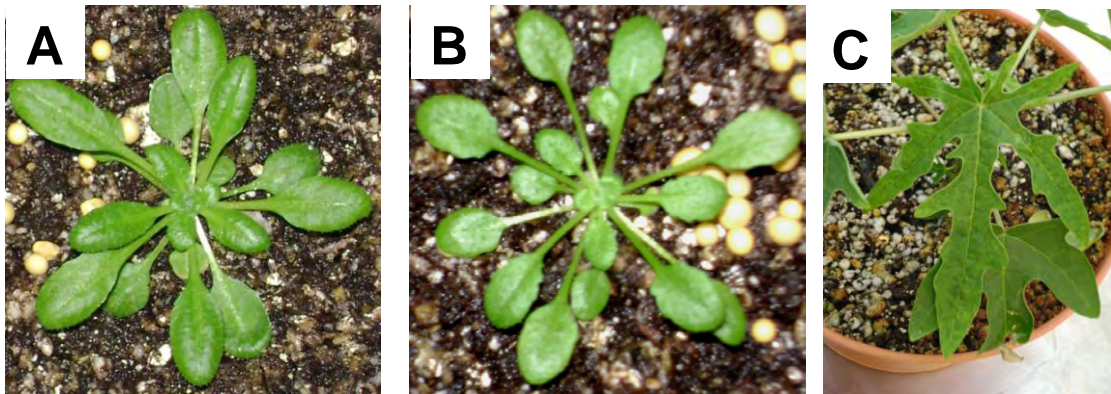


Figura 18. Plantas de *A. thaliana* silvestres (A), mutantes eFiso4E<sup>-/-</sup> (B) y papaya (C) a 10 dpi con el PapMV.

#### 8.3.2 Determinación de la presencia de RNA viral a nivel de RNA total.

A partir de las plantas de *A. thaliana* inoculadas con PapMV, se aisló RNA total a 4 dpi de la hoja local y de la primera hoja sistémica. Mediante reacciones de RT-PCR se amplificó un fragmento de 1173 pb perteneciente al RNA de la proteína de la cápside de PapMV, lo que indicó que el virus está presente en ambas hojas y en cantidades similares para las plantas silvestres y mutantes eFiso4E<sup>-/-</sup> (Figura 19A). La amplificación de un control interno (G3FD) indicó que la cantidad de RNA total fue la misma en las distintas reacciones (Figura 19B). Estos resultados

indican que a pesar de la ausencia de síntomas, PapMV es capaz de infectar *A. thaliana*, y al parecer no requiere a eIFiso4E para su replicación o movimiento.

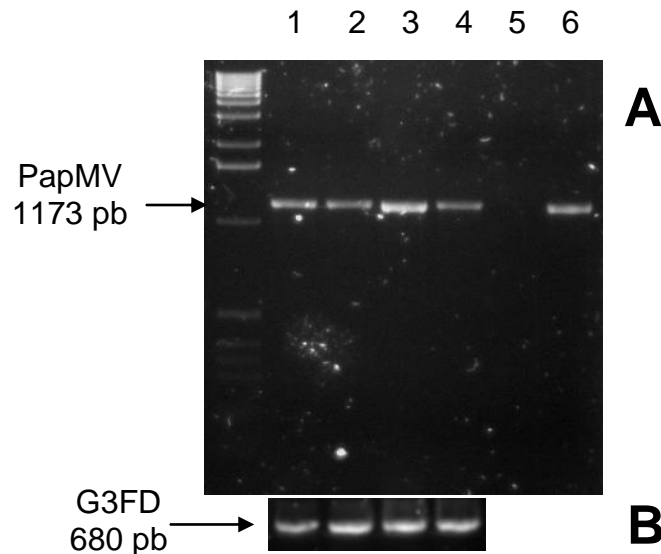


Figura 19. A detección del RNA viral de PapMV en *A. thaliana*. 1 y 2: PapMV en hojas locales de plantas silvestres y mutantes eIFiso4E<sup>-/-</sup> a 4dpi. 3 y 4: PapMV en la primer hoja sistémica de plantas silvestres y mutantes eIFiso4E<sup>-/-</sup> a 4dpi. 5: papaya inoculada con agua. 6: PapMV en papaya. En B se muestra el producto de la amplificación de G3FD de *A. thaliana*.

### 8.3.3. Determinación de la presencia de RNA viral en fracciones polisomales.

Con el objeto de examinar si los niveles traduccionales de proteínas virales eran afectados por la falta del factor eIFiso4E, se obtuvieron los perfiles polisomales de las hojas locales de plantas de *A. thaliana* silvestres y mutantes eIFiso4E<sup>-/-</sup> inoculadas con PapMV (4dpi) (Figura 20 A). Con el RNA polisomal que se obtuvo, se amplificó el fragmento de 1173 pb perteneciente al RNA de PapMV (Figura 20 C), los datos indicaron que el RNA viral está presente principalmente en fracciones polisomales de hojas de plantas silvestres y mutantes eIFiso4E<sup>-/-</sup> de *A. thaliana*. Al comparar la distribución del RNA viral con la del RNA de G3FD (Figura 20 D), se observó que de igual manera es más abundante en fracciones polisomales, lo que indica que la traducción del RNA viral y del RNA celular es activa a pesar de la ausencia del factor eIFiso4E.

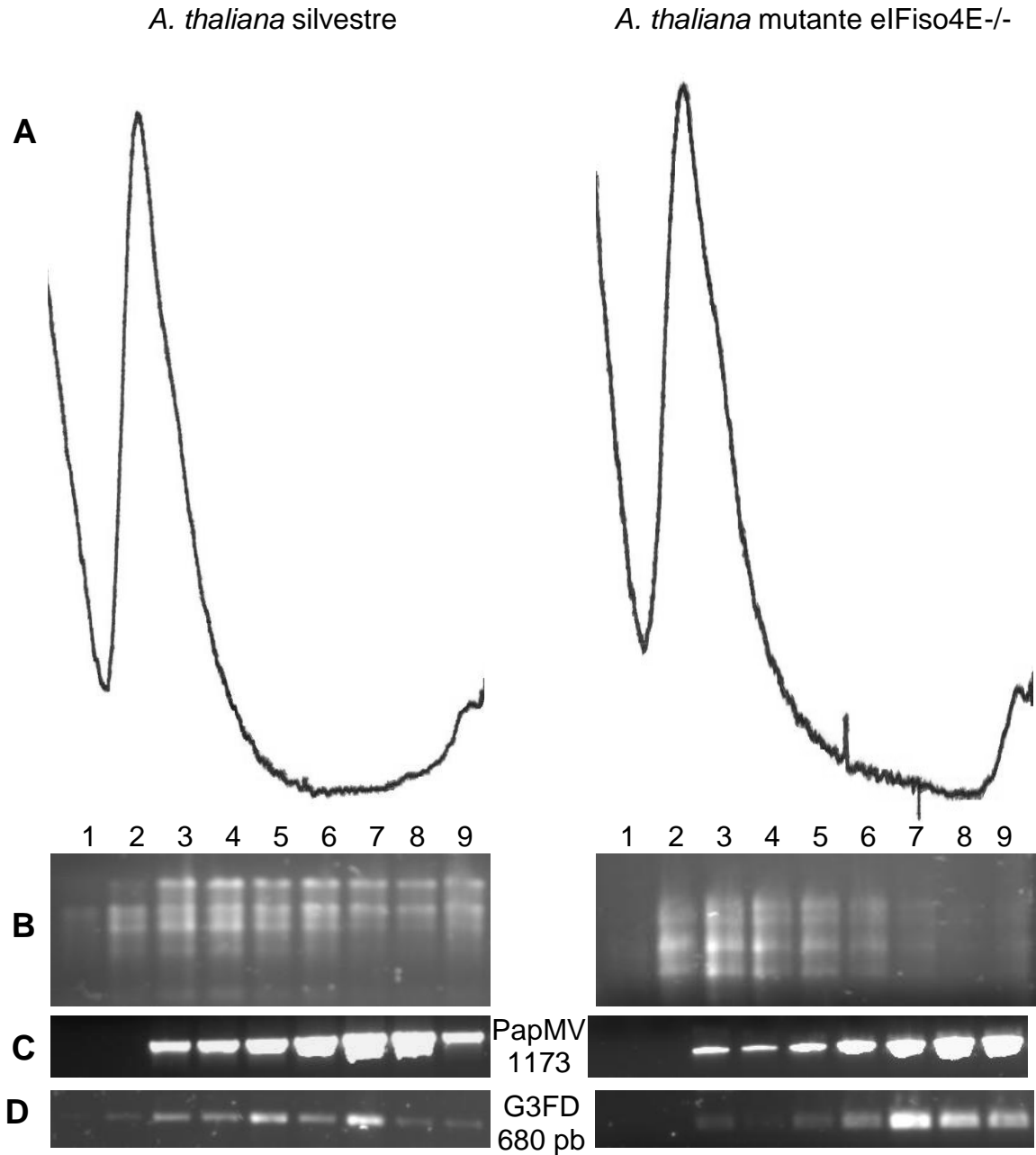


Figura 20. A: Perfiles de absorbancia a 260 nm obtenidos de hojas infectadas con PapMV (4dpi) de plantas silvestres y mutantes eIFiso4E<sup>-/-</sup> de *A. thaliana*. B: Muestra la separación electroforética de los RNAs polisomales. C: Muestra la distribución del RNA de PapMV en el perfil polisomal. D: Patrón de distribución del mRNA de G3FD dentro del perfil polisomal.

La distribución del RNA viral de PapMV en polisomas de hojas locales de plantas silvestres y mutantes eIFiso4E<sup>-/-</sup> de *A. thaliana* se analizó mediante densitometrías (Figura 21). El resultado del análisis mostró que en las hojas

locales inoculadas de plantas silvestres aproximadamente el 89 % del RNA viral es movilizado hacia polisomas, mientras que en hojas locales inoculadas de plantas mutantes eIFiso4E<sup>-/-</sup> de *A. thaliana*, un 90 % de del RNA viral es traducido activamente (Figura 21 A y B). El análisis densitométrico también permitió observar que la cantidad del mRNA celular G3FD de las hojas locales de plantas silvestres (89 %) es ligeramente menor que en el perfil polisomal de hojas de plantas mutantes eIFiso4E<sup>-/-</sup> (96 %), contrario a lo que se había observado en los perfiles polisomales de hojas inoculadas con TEV (Figura 16).

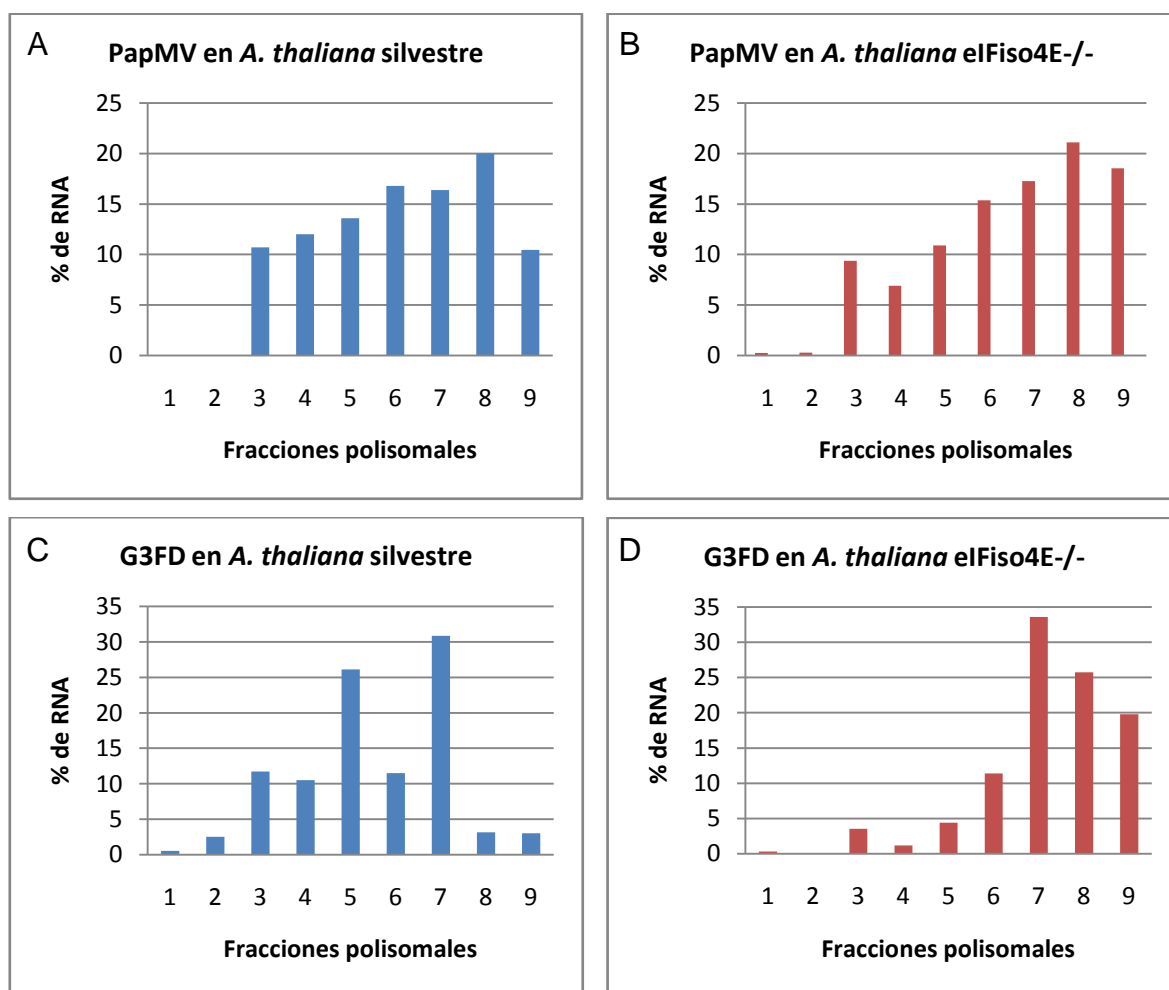


Figura 21. Perfiles densitométricos realizados a los productos de RT-PCR para PapMV (A y B) y G3FD (C y D) a partir del RNA polisomal de hojas locales de plantas silvestres y mutantes eIFiso4E<sup>-/-</sup> de *A. thaliana* (4dpi).



## 9. DISCUSIÓN

Estudios anteriores han indicado que los mRNA de los factores de traducción eIF4E y eIFiso4E de plantas, tienen una distribución diferente en distintos tejidos de *A. thaliana* (Rodríguez, *et al.*, 1998). Por otra parte, se ha demostrado que existen cambios en los niveles de mRNA y de proteína de estos factores durante el transcurso de la germinación de semillas de maíz (Dinkova, y Sánchez de Jiménez, 1999), mostrando mayor abundancia eIFiso4E. Estos datos han sugerido que ambos factores podrían participar en una traducción selectiva de mRNAs durante el desarrollo de la planta. Sin embargo, a pesar de que eIFiso4E es más abundante en semillas y en tejido en crecimiento, su presencia no es imprescindible para la germinación de *A. thaliana* en presencia o ausencia de sacarosa. Esto indica que posiblemente los factores eIF4E y nCBP son capaces de suplir la función de eIFiso4E en esta etapa del desarrollo de la planta, por lo menos bajo las condiciones de este trabajo. No se descarta que bajo otras condiciones eIFiso4E tenga una función particular en la germinación de *A. thaliana* u otras especies de semillas como el maíz donde su requerimiento puede ser diferente.

Recientemente se descubrió un papel selectivo de eIF4E y eIFiso4E en la infección viral de diversas especies de plantas. Los miembros de la familia eIF4E son necesarios durante el ciclo infectivo de algunas especies de Potyvirus dependiendo del hospedero en el que se encuentren. Mutaciones en eIF4E, eIFiso4E, o ambos, que han ocurrido de manera natural o que han sido provocadas, han brindado a diferentes especies vegetales la capacidad de evadir la infección por determinado Potyvirus, por lo que a estas isoformas de eIF4E se les ha considerado genes de resistencia viral (Ruffel, *et al.*, 2006; Yeam, *et al.*, 2007). Particularmente el factor eIFiso4E es necesario durante la infección por TuMV, LMV y TEV en *A. thaliana* (Robaglia y Caranta, 2005; Duprat, *et al.*, 2002; Sato, *et al.*, 2005). Esto ha incrementado los esfuerzos para entender cuál es el mecanismo subyacente a la selectividad de estos por distintos RNAs.

*A. thaliana* ha sido utilizada como modelo para estudiar la relación TuMV-eIFiso4E y TEV-eIFiso4E. En el caso de TuMV se conoce que eIFiso4E es necesario no solo para la propagación del virus, sino también para la permanencia del RNA viral en el sitio de inoculación. En el caso de TEV no se conoce exactamente cuál es el papel de eIFiso4E durante el ciclo viral, aunque se sabe que este factor es requerido para la propagación viral. En este trabajo se evidenció que para la replicación, estabilidad y traducción de un aislamiento mexicano de TEV el factor eIFiso4E es dispensable. Se pudo observar que el virus mantiene la infección en la hoja inoculada de las plantas de *A. thaliana* mutantes eIFiso4E<sup>-/-</sup> (Figuras 14 y 17), lo que indica que la estabilidad del RNA viral no se ve afectada por la ausencia del factor eIFiso4E, las proteínas virales pueden ser sintetizadas (Figura 15) ,y se puede llevar a cabo la replicación del genoma viral, esto parece ser distinto a lo que ocurre con otros Potyvirus como TuMV y LMV en las mismas mutantes (Duprat, *et al.*, 2002), en donde se ha visto que a nivel local el RNA viral está ausente. Como los resultados indican, es posible que la función de eIFiso4E durante la infección del aislamiento mexicano de TEV sea principalmente a nivel de movimiento del RNA viral o de las partículas virales. Las pruebas realizadas no permiten discriminar si la ausencia de eIFiso4E ha afectado el movimiento de TEV a nivel de una célula a célula o solamente a larga distancia.

Interesantemente, se observó que al inocular las plantas con el Potexvirus PapMV, cuyo genoma es de RNA de cadena sencilla, presenta Cap en el extremo 5' y secuencia PoliA en el extremo 3'; el RNA viral pudo ser detectado en hojas locales como sistémicas de plantas silvestres y mutantes eIFiso4E<sup>-/-</sup> (Figura 19), esto indica que durante la infección de PapMV el factor eIFiso4E es dispensable tal como ha ocurrido anteriormente al infectar la mutante eIFiso4E<sup>-/-</sup> con otros virus de RNA como el virus del anillo negro del tomate o el virus del mosaico del pepino (Duprat, *et al.*, 2002); esto sugiere que la expresión del genoma de este virus podría estar mediada por eIF4E. Cabe añadir que el mecanismo por el cual se lleva a cabo el movimiento y propagación de PapMV es diferente al de TEV, dado que dentro del genoma viral se encuentran codificadas proteínas específicas para

el movimiento y dispersión viral, lo que explica que la ausencia de eIFiso4E no repercute en este mecanismo. También se pudo observar que el patrón de traducción de G3FD en las plantas de *A. thaliana* inoculadas con PapMV, difiere al de las plantas inoculadas con TEV, lo que indica que la expresión de los genomas virales comprometen diferencialmente la expresión del genoma del hospedero.

Se ha examinado en condiciones *in vitro*, que la región UTR 5' en el virus TEV es capaz de soportar la traducción por la vía independiente de Cap del RNA de la proteína luciferasa (Carrington, y Freed, 1990), reclutando preferencialmente al factor eIF4G, lo que ha sugerido que TEV podría llevar a cabo su traducción mediante esta vía (Ray, *et al.*, 2006). Además, se ha observado que cuando uno o más de los miembros de la familia eIF4G de *A. thaliana* no está presente, la infección por algunos Potyvirus como TuMV, LMV, CIYVV y PPV se afecta (Nicaise, *et al.*, 2007). En este trabajo se observó que el RNA de TEV en las hojas locales de plantas mutantes eIFiso4E<sup>-/-</sup> de *A. thaliana* (Figura 15), es movilizado hacia fracciones traduccionalmente activas, lo que conduce a pensar que: 1) el factor eIFiso4E es dispensable para la traducción del RNA de TEV *in planta*, 2) la traducción de TEV puede ser independiente de Cap mediada tal vez por eIF4G y 3) posiblemente eIFiso4E intervenga durante otra etapa de la infección por TEV.

La mayoría de los estudios realizados sobre regulación de la expresión del genoma de Potyvirus han sido *in vitro*. Estos estudios sugieren que existen mecanismos específicos durante la infección por Potyvirus en los que eIFiso4E en complejo con la proteína VPg, podría permitir el movimiento viral dentro del hospedero, la estabilidad y la traducción del RNA viral (Lellis, *et al.*, 2002). Un estudio reciente basado en el sistema de traducción *in vitro* sugirió que VPg podría ser relevante para secuestrar a eIF4E o eIFiso4E para disminuir la traducción de mRNAs celulares, mientras que el RNA viral es traducido preferencialmente vía independiente de Cap utilizando el factor eIF4G (Khan, *et al.*, 2008). Aunque esta hipótesis aún está por demostrarse, los resultados de este trabajo no favorecen la teoría de estrategia viral para reducir la traducción celular favoreciendo la del RNA

viral, al menos para el sistema TEV - *A. thaliana*. En cambio, la distribución del RNA y proteínas virales en ausencia de eIFiso4E apoya la teoría de que este factor participa en el transporte de RNA viral ya sea de célula a célula o a distancia.

Por otro lado existen trabajos que indican que una vez dada la infección en el hospedero, VPg es removida del RNA viral por una enzima hasta el momento desconocida, otros estudios han demostrado la participación de VPg en la formación del virion, el movimiento a larga distancia, la acumulación en el floema y a nivel celular; indirectamente se ha visto también involucrada en el movimiento de célula a célula del virus a través de los plasmodesmata (Schaad, *et al.*, 1997; Rajamäki, y Valkonen, 2002; Dunoyer, *et al.*, 2004). En este trabajo se observó que la ausencia de eIFiso4E no afecta la traducción del RNA de TEV en hojas locales de plantas de *A. thaliana* (Figura 15), sin embargo, su ausencia afectó la movilidad del RNA de TEV (Figura 14). Dado que a la fecha no se ha dilucidado completamente la función de VPg, posiblemente en alguna etapa de la infección viral existan dos subpoblaciones de RNA viral, una en la que VPg está unida al extremo 5' y otra en donde no está unida, esto permitiría que eIFiso4E intervenga en el movimiento del RNA viral que pose unida a VPg valiéndose de la capacidad que tiene para interactuar con esta proteína, además es probable que esta labor sea llevada a cabo con otras proteínas, como eIFiso4G o alguna otra proteína del tipo 4EBP.

## **10. CONCLUSIONES**

El factor eIFiso4E es dispensable para la germinación de semillas de *A. thaliana* en presencia y ausencia de sacarosa.

La traducción de RNA de TEV en *A. thaliana* no es afectada por la ausencia de eIFiso4E pero si su movimiento, por lo que eIFiso4E podría estar involucrado en el movimiento célula a célula o a larga distancia del RNA viral.

El factor eIFiso4E es dispensable para la infección por PapMV en *A. thaliana*.

## **11. PERSPECTIVAS**

Este trabajo permitió observar que el factor eIFiso4E es relevante para el movimiento del RNA de TEV, por lo que se propone estudiar el papel que podría tener eIFiso4E en el movimiento de TEV a nivel de célula a célula o a larga distancia, y si la interacción eIFiso4E-VPg está involucrada en el proceso de movimiento viral.

## 12. LITERATURA CITADA

Abe, S. y Daves, E. 1998. Quantitative analysis of polysomes using a baseline from uncentrifuged blank gradients. *Memories of the College of Agriculture, Ehime University*. 31: 187 - 199.

Barba-de la Rosa. A. P., Ng, J., Day, J. y McPherson, A. 2003. Caracterización estructural del RNA del virus satélite del mosaico del tabaco. *Agrociencia*. 37: 503 - 510.

Browning, K. S. 1996. The plant translational apparatus. *Plant Molecular Biology* 32: 107 - 144.

Browning, K. S., Webster, C., Roberts, J. K. M. y Ravel, J. M. 1992. Identification of an isozyme form of protein synthesis initiation factor 4F in plants. *Journal Biological Chemistry*. 267: 10096 - 10100.

Carrington, J. C. y Freed, D. D. 1990. Cap-independent enhancement of translation by a plant Potyvirus 5' nontranslated region. *Journal of Virology*. 64 (4): 1590 - 1597.

Combe, J. P., Petracek, M. E., Eldik, G. V., Meulewaeter, F. y Twell. D. 2005. Translation initiation factors eIF4E and eIFiso4E are required for polysome formation and regulate plant growth in tobacco. *Plant Molecular Biology* 57: 749 - 760.

De La Torre-Almaráz, R., Cervantes-Díaz, L., Houston, H. A. y Valverde, R. 2002. Variación fenotípica de algunos aislamientos mexicanos del virus de la marchitez manchada del tomate (TSWV). *Agrociencia*. 36: 211 - 221.

De la Torre-Almaráz, R., Téliz, O. D., Barrón, R. B., Cárdenas, S. E., García L. E. 1998. Identificación de un complejo viral en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* B.) en la región centro de México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 16(1): 1 - 11.

De La Torre-Almaráz, R., Valverde, R., Méndez-Lozano, J., Ascencio-Ibañez, J. T. y Rivera-Bustamante, R. F. 2002. Caracterización preliminar de un geminivirus en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* B.) en la región centro de México. *Agrociencia*. 36 (4): 471 - 481.

Dinkova, T. D. y Sánchez de Jiménez, E. 1999. Differential expression and regulation of translation initiation factors -4E and -iso4E during maize germination. *Physiology Plantarum*. 107: 419 - 425.

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 eukaryotic translation initiation factor 4E isoform. *Molecular and Cellular Biology*. 25 (1): 100 - 113.

Dreher, T. W. y Miller, W. A. 2006. Translation control in positive strand RNA plant virus. *Virology*. 344 (1): 185 - 197.

Dunoyer, P., Thomas, C., Harrison, S., Revers, F y Maule, A. 2004. A cysteine-rich plant protein potentiates *Potyvirus* movement through an interaction with the virus genome-linked protein VPg. *Journal of Virology*. 78 (5): 2301 - 2309.

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

Flores-Estévez, N., Acosta-Gallegos, J. A. y Silva-Rosales, L. 2003. *Bean Common Mosaic and Virus and Bean Common Mosaic Necrotic Virus* in Mexico. *Plant Disease* 87(1): 21 - 25.

Gallie, D.R., y Walbot, V. 1990. RNA pseudoknot domain of tobacco mosaic virus can functionally substitute for a poly(A) tail in plant and animal cells. *Genes Development* 4:1149 - 1157.

Gao, M., Rychlik, W. y Rhoads, R. E. 1998. Cloning and characterization of human eIF4E genes. *The Journal of Biological Chemistry*. 273 (8): 4622 - 4628.

Gao, Z., Johansen, E., Evers, S., Thomas, C. L., Ellis T. H. N. y Maule, A. J. 2004. The potyvirus recessive resistance gene, *sbm1*, identifies a novel role for translation initiation factor eIF4E in cell-to-cell trafficking. *The Plant Journal*. 40: 376 - 385.

Gilbertson, R. L., Ruiz-Medrano, R., Sudarshana, M. R. y Lucas, W. J. 2001. Virus Movement. En Maloy, O. C. y Murray, T. D. *Encyclopedia of Plant Pathology*. 2: 1116 - 1125.

Gingras, A. C., Raught, B., Gygi, S. P., Niedzwiecka, A., Miron, M., Burley, S. K., Polakiewicz, R. D., Wyslouch-Cieszynska, A., Aebersold, R., Sonenberg, N. 2001. Hierarchical phosphorylation of the translation inhibition 4E-BP1. *Genes Development*. 15 (21): 2852 - 2864.

Gingras, A. C., Raught, B. y Sonenberg N. 1999. eIF4 initiation factors: Effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annual Reviews Biochemistry*. 68: 913 - 963.

Goodfellow, I. G. y Roberts, L. O. 2007. Eukaryotic initiation factor 4E. *The international Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 39: 1 - 6.



Hernández, G., Altmann, M., Sierra, J. M., Urlaub, H., Diez del Corral, R., Schwartz, P. y Rivera-Pomar, R. 2005. Functional analysis of seven genes encoding eight translation initiation factor 4E (eIF4E) isoforms in *Drosophila*. *Mechanisms of Development*. 122: 529 - 543.

Huang, Y. L., Han, Y. T., Chang, Y. T., Hsu, Y. H. y Meng, M. 2004. Critical residues for GTP methylation and formation of the covalent m7GMP-enzyme intermediate in the capping enzyme domain of bamboo mosaic virus. *Journal of Virology*. 78: 1271 - 1280.

Joshi, B., Lee, K., Maeder, D. L. y Jagus, R. 2005. Phylogenetic analysis of eIF4E-family members. *BMC Evolutionary Biology*. 5 (48): 1 - 20.

Khan, M. A., Miyoshi, H., Gallie, D. R. y Goss, D. J. 2008. Potyvirus genome-linked protein, VPg, directly affects wheat germ *in vitro* translation: interactions with translation initiation factors eIF4F and eIFiso4F. *The Journal of Biological Chemistry*. 283 (3): 2301 - 2309.

Keiper, B. D., Lamphear, B. J., Deshpande, A. M., Jankowska-Anyszka, M., Aamodt, E. J., Blumenthal, T. y Rhoads R. E. 2000. Functional characterization of five eIF4E isoforms in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Biological Chemistry*. 275 (14): 10590 - 10596.

Krab, I. M., Caldwell, C., Gallie, D.R. y Bol, J.F. 2005. Coat protein enhances translational efficiency of Alfalfa mosaic virus RNAs and interacts with the eIF4G component of initiation factor eIF4F. *J. Gen. Virol.* 86. 1841 - 1849.

Lavoie, C. A., Lachance, P. E. D., Sonenberg, N. y Lasko, P. 1996. Alternatively spliced transcripts from the *Drosophila* eIF4E gene produce two different Cap-binding proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 271 (27): 16393 - 16398.

Lellis, A. D., Kasschau, K. D., Whitham, S. A., y Carrington, J. C. 2002. Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF(iso)4E during Potyvirus infection. *Current Biology*. 12: 1046 - 1051.

Léonard, S., Plante, D., Wittmann, S., Daigneault, N., Fortin, M. G., y Laliberte, J. 2000. Complex formation between Potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *Journal of Virology*. 74 (17): 7730 - 7737.

Marcotrigiano, J., Gingras, A. C., Sonenberg, N. y Burley, S. K. 1997. Cocystal structure of the messenger RNA 5' Cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP. *Cell*. 89: 951 -961.

Matsuda D. y Dreher T.W. 2004. The tRNA-like structure of Turnip yellow mosaic virus RNA is a 3'-translational enhancer. *Virology*. 321: 36 - 46.

Matthews, R. E. F. 1991. *Plant Virology*, Academic Press, USA.

Mayo, M. A. 2002. Virus taxonomy – Houston 2002. *Archives of Virology*. 147 : 1071 - 1076.

Merrick, W. C. 1992. Mechanism and Regulation of Eukaryotic Protein Synthesis. *Microbiological Reviews*. 52 (2): 291 - 315.

Miyoshi, H., Suehiro, N., Tomoo, K., Muto, S., Takahashi, T., Tsukamoto, T., Ohmri, T., Natsuaki, T., 2005. Binding analyses for the interaction between plant virus genome-linked protein (VPg) and plant translation initiation factors. *Biochimie*. 88: 329 - 340.

Morino, S., Imataka, H., Svitkin, Y. V., Pestova, T. V. y Sonenberg, N. 2000. Eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) binding site and the middle one-

third of eIF4GI constitute the core domain for Cap-dependent translation, and the C-terminal one-third functions as a modulatory region. *Molecular and Cellular Biology*. 20 (2): 468 - 477.

Nicaise, V., Gallois, J. L., Chafiai, F., Allen, L. M., Schurdi-Levraud, V., Browning, K. S., Candresse, T., Caranta, C., Gall, O. L. y German-Retana, S. 2007. Coordinated and selective recruitment of eIF4E and eIF4G factors for Potyvirus infection in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*. 581: 1041 - 1046.

Nicolai, M., Roncato, M. A., Canoy, A. S., Rouquié, D., Sarda, X., Freyssinet, G., y Robaglia, C. 2006. Large-scale analysis of mRNA translation states during sucrose starvation in *Arabidopsis* cells identifies cell proliferation and chromatin structure as target of translation control. *Plant Physiology*. 141: 663 - 673.

Noa-Carrizana, J. C., González-de-León, D., Ruiz-Castro, B. S., Piñero, D. and Silva-Rosales, L. 2005 Distribution of papaya mosaic virus and papaya ringspot virus in papaya plants (*Carica papaya* L.) in México. 2006. *Plant Disease*. 90 (8):1004 - 1011.

Noueiry, A. O., Chen, J., y Ahlquist, P. 2000. A mutant allele of essential, general translation initiation factor DED1 selectively inhibits traslation of a viral mRNA. *Proceedings of the National Academy of Science of United States of America*. 97: 12985 - 12990.

Pestova, T. V., Kolupaeva, V. G., Lomakin, I. B., Pilipenko, E. V., Shatsky, I. N., Agol, V. I. y Hellen, C. U. 2001. Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Science of United States of America*. 98: 7029 - 7036.

Pringle, C. R. 1999. *Virus Taxonomy - 1999*. *Archives of Virology*. 144 (2): 422 - 429.

Pyronnet, S., Imataka, H., Gingras, A., Fukunaga, R., Hunter, T. y Sonenberg, N. 1999. Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits Mnk1 to phosphorylate eIF4E. *The EMBO Journal*. 18 (1): 270 - 279.

Rajamäki, M. L. Y Valkonen, J. P. T. 2002. Viral genome-linked protein (VPg) controls accumulation and phloem-loading of a potyvirus in inoculated potato leaves. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 15 (2): 138 - 149.

Ray, S., Yumak, H., Domashevskiy, A. Khan, M. A. Gallie, D. R. y Goss, D. J. 2006. Tobacco Etch Virus mRNA preferentially binds wheat germ eukaryotic initiation factor (eIF) 4G rather than eIFiso4G. *The Journal of Biological Chemistry*. 281 (47): 35826 -35834.

Robaglia, C. y Caranta, C. 2005. Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *TRENDS in Plant Science*. 20: 1 - 6.

Rodriguez, 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. *The Plant Journal*. 13 (4): 465 - 473.

Roudet-Tavert, G., Michon, T., Walter J., Delaunay, T., Redondo, E. y Le Gall, O. 2007. Central domain of a Potyvirus VPg is involved in the interaction with the host translation initiation factor eIF4E and the viral protein HcPro. *Journal of General Virology*. 88: 1029 - 1033.

Ruffel, S., Dussault, M. H., Palloix, A., Moury B., Bendahmane, A., Robaglia, C. y Caranta, C. 2002. A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *The plant journal*. 32: 1067 - 1075.

Ruffel, S., Gallois, J. L., Moury, B., Robaglia, C., Palloix, A. y Caranta, C. 2006. Simultaneous mutations in translation initiation factors eIF4E and eIF(iso)4E are required to prevent pepper vein mottle virus infection of pepper. *Journal of General Virology*. 87: 2089 - 2098.

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*. *The Journal of Biological Chemistry*. 273 (17): 10325 - 10330.

Sato, M., Nakahara, K., Yoshii, M., Ishikawa, M. y Uyeda, I. 2005. Selective involvement of members of the eukaryotic initiation factor 4E family in the infection of *Arabidopsis thaliana* by potyviruses. *FEBS Letters*. 579: 1167 - 1171.

Schaad, M. C., Lellis, A. D. y Carrington, J. C. 1997. VPg of tobacco etch potyvirus is a host genotype-specific determinant for long-distance movement. *Journal of Virology*. 71 (11): 8624 - 8631.

Urcuqui-Inchima, S., Haenni, A. y Bernardi, F. 2001. Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Research*. 74: 157 - 175.

Vega, A. J. C. y Rivera, B. R. 2001. Los virus: cómplices para descifrar procesos celulares en las plantas. *Avance y perspectiva*. 20: 349 - 355.

Verchot-Lubicz, J., Ye, Ch. y Bamunusinghe, D. 2007. Molecular biology of potexviruses: recent advances. *Journal of General Virology*. 88: 1643 - 1655.

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 Structural & Molecular Biology*. 11 (6): 503 - 511.

Yeam, I., Cavatorta, J. R., Ripoll, D. R., Kang, B. C. y Jahn, M. M. 2007. Functional dissection of natural occurring amino acid substitutions in eIF4E that confers recessive Potyvirus resistance in plants. *The Plant Cell*. 19: 2913 - 2928.

Zeenko, V. y Gallie, D. R. 2005. Cap-independent translation of tobacco etch virus is conferred by an RNA pseudoknot in the 5'-leader. *Journal of Biological Chemistry*. 280 (29): 26813 - 6824.

### 13. ANEXO 1

Condiciones de amplificación por RT-PCR para el mRNA de elFiso4E con los oligonucleótidos elFiso4E5' y elFiso4E3'.

50°C	30min	
94°C	5min	
94°C	50min	30 ciclos
58°C	50min	
72°C	1min	
72°C	7min	
22°C		

Condiciones de amplificación por PCR para detectar la inserción del transposon dSpm en elFiso4E con los pares de oligonucleótidos dspm1-4E2KO1 y dspm11-4E2KO4.

50°C	30min	
94°C	5min	
94°C	50min	30 ciclos
58°C	50min	
72°C	1min	
72°C	7min	
22°C		

Condiciones para la amplificación del mRNA de G3FD por RT-PCR empleando los oligonucleótidos AtG3FD 5' y G3FD 3'.

50°C	30min	
94°C	5min	
94°C	50min	25 ciclos
58°C	50min	
72°C	1min	
72°C	7min	
22°C		

Condiciones para la amplificación por RT-PCR del fragmento de 720 pb de TEV.

50°C	30min	
94°C	5min	
94°C	50min	25 ciclos
56°C	50min	
72°C	1min	
72°C	7min	
22°C		

Condiciones para la amplificación por RT-PCR del fragmento de 1173 pb de PapMV.

50°C	30min	
94°C	5min	
94°C	50min	25 ciclos
57.6°C	50min	
72°C	2min 30 seg	
72°C	7min	
22°C		