



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Expresión de una proteína de fusión del  
factor de inicio de traducción eIFiso4E-GFP  
en plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres  
y mutantes para eIFiso4E**

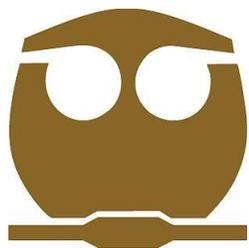
**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**Q U Í M I C O**

**P R E S E N T A**

**CÉSAR AGUIRRE MARTÍNEZ**



**MÉXICO, D.F.**

**2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor Rogelio Rodríguez Sotres  
**VOCAL:** Profesora Martha Patricia Coello Coutiño  
**SECRETARIO:** Profesora Tzvetanka Dimitrova Dinkova  
**1er. SUPLENTE:** Profesor Euclides Ávila Chávez  
**2° SUPLENTE:** Profesor León Patricio Martínez Castilla

### **SITIO EN DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA**

**LABORATORIO 103, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

**ASESORA**

**SUSTENTANTE**

-----  
**Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova**

-----  
**César Aguirre Martínez**

## AGRADECIMIENTOS

A la UNAM, que desde hace más de 9 años me abrió las puertas para transformar completamente mi forma de ver el mundo, de ver las ciencias, a mi mismo, mis ideas, mis expectativas... mi vida. La Máxima Casa de Estudios del país a la cual espero poder agradecer como se merece con mi trabajo y esfuerzo.

A mi mamá, que ha estado conmigo siempre, en todo momento, en las buenas y en las malas, con un consejo, un abrazo, una sonrisa, una palabra de aliento. Gracias por infundirme confianza en mí mismo, por enseñarme a no darme por vencido nunca y ser el mayor y mejor ejemplo de tenacidad, por enseñarme que los milagros existen y que todo proyecto debe realizarse con amor y entusiasmo, gracias por creer siempre en mí, y por todo el amor con el que me has educado desde que era niño, hasta convertirme en quien soy ahora. Muchas gracias mamá.

A mi prima Gaby, quien ha significado para mí un ejemplo a seguir en muchas situaciones. Gracias por ser quien me mostró y me acercó por vez primera a la magnificencia de la UNAM.

A mi familia, en particular mis tías Belén, Elvira y Consuelo; y mis primos Daniel, Karina y Gerardo. Gracias por apoyarme y estar a mi lado siempre.

A mis amigos de la Facultad: Paty, Iván Itzaé, Edgar Iván, Alberto Collado y Nérida Cuautle, con quienes he vivido todo tipo de situaciones, a veces muy buenas y otras no tanto. Ustedes se mostraron conmigo tal como son, con quienes me he conocido a mi mismo mucho más de lo que habría imaginado, con quienes me he transformado para sacar lo mejor de mí.

A mis amigos Ray y Yolanda, que seguimos siendo buenos amigos a pesar de la distancia y el tiempo.

A Jesús Enrique (Yisus) y César Carreón (A.), por su amistad, su compañía, su confianza, su sinceridad y por ser las grandes personas que son. Me alegra mucho haberlos conocido y tenerlos cerca en todo momento.

A mis queridas niñas Aliz y Andrea, cuya sinceridad e incondicional amistad y compañía han sido de vital importancia para mí. Es en estos últimos dos años cuando en verdad las he conocido y comprobado lo maravillosas que son. No saben cómo valoro la confianza, los momentos que hemos compartido, y que sean siempre tan honestas conmigo, no solo a nivel académico sino también a nivel personal.

Quiero agradecer a Vero Lemus, Sandra Aglae, Xochiquetzal, Frank, Laura Ivette, Paty Conelly, Yunuem, Lorena, Erandi, Abraham, Rodrigo, Irissol, Martha Andraca, Pilar, Tere, Eduardo Peralta, Marina, Paola, Christofer y Ruth por los momentos compartidos desde que nos hemos conocido.

A Alan, quien fue el primero en mostrarme los detalles de la investigación en Bioquímica y Biología Molecular de plantas, que además de ser mi profesor en mis primeros días en el laboratorio, se convirtió en un buen amigo. A Valeria, que me ayudó a encontrar un laboratorio donde realizar el proyecto que se convertiría en mi tesis de licenciatura, por compartirme sus conocimientos y consejos. A Susana, con quien compartí inquietudes y varias pláticas muy enriquecedoras para mi tesis y mi proyecto de vida; alguien que, tal vez sin saberlo, me motivó muchísimo. También quiero agradecer a mis amigos y compañeros de laboratorio y del conjunto E: Ingrid, Carlos, Pedro, Edson, Naholi, Normita, Sarita, Agustin, Augusto, César David, Eder, Vero, Ernesto, Natalia, Ulises, Samantha y Víctor, que me brindaron su ayuda, compañía, sus conocimientos y muchos momentos buenísimos e inolvidables.

A mi muy querida profesora Bertha Zayas, mi profesora de Química del CCH, quien ha sido mi mayor influencia de la Química. Con mucho, la mejor profesora que he tenido en la vida, a quien siempre agradeceré el acercarme desde muy temprano a la investigación científica a través de estancias cortas y proyectos breves; por creer siempre en mí, y por todo el interés y cariño demostrado desde hace ya varios años en mi realización personal y profesional. Gracias maestra Bertha.

A Euclides Ávila Chávez, que además de ser uno de los primeros en acercarme a la Bioquímica y mostrarme su belleza, y de ser un miembro de mi jurado, se ha convertido en un gran amigo.

A las profesoras Florentina Carreño, Guillermina Salazar, Silvia Pérez y Consuelo Sandoval, por todos los valiosos conocimientos que me han transmitido y de quienes he aprendido a ver la Química y la vida desde un enfoque más amigable.

A la Dra. Cesy, quien diestramente ha dirigido este proyecto de investigación con los buenos resultados obtenidos. Gracias por aceptarme en este laboratorio, donde he aprendido muchísimo y donde he ampliado mi panorama general de la investigación científica; aquí no sólo transformé la materia, sino aprendí a transformar la vida misma.

Al Dr. Rogelio por los valiosos consejos y críticas hechas a mi trabajo, y por la ayuda que me proporcionó para modelar la proteína de fusión estudiada en este proyecto.

A la Dra. Paty Coello por el tiempo, el interés, los consejos y críticas constructivas, los conocimientos transmitidos y por enseñarme la técnica de Floral Dip para la transformación de *Arabidopsis thaliana*.

Finalmente, al financiamiento otorgado por los proyectos PAPIIT IN208006 y PAPIIT IN204309.

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN .....</b>	<b>10</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo de investigación.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2 El proceso de traducción en procariontes.....</b>	<b>12</b>
2.2.1 Iniciación.....	12
2.2.2 Elongación.....	14
2.2.3 Terminación.....	14
<b>2.3 El inicio de la traducción en eucariontes.....</b>	<b>15</b>
<b>2.4 Mecanismos de regulación del inicio de la traducción.....</b>	<b>17</b>
2.4.1 Control traduccional bacteriano.....	17
2.4.2 Control traduccional en eucariontes: fosforilación de factores de inicio.....	18
2.4.3 Proteínas inhibitorias del factor eIF4E.....	20
2.4.4 Bloqueo del inicio de la traducción por miRNAs.....	22
<b>2.5 La familia eIF4E.....</b>	<b>22</b>
2.5.1 Aspectos generales de la familia eIF4E.....	22
2.5.2 Clasificación de los miembros de la familia eIF4E.....	27
<b>2.6 La familia eIF4E y la traducción en plantas.....</b>	<b>29</b>
<b>2.7 El factor de inicio eIF(iso)4E.....</b>	<b>34</b>
<b>2.8 Transformación de <i>A. thaliana</i> por inserción de T-DNA con     <i>Agrobacterium tumefaciens</i>.....</b>	<b>38</b>
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>42</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>42</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>42</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
<b>3.1 Material biológico vegetal.....</b>	<b>43</b>
3.1.1 <i>A. thaliana</i> .....	43

3.1.1.1 Siembra de semillas en tierra: condiciones de cultivo.....	43
3.1.1.2 Esterilización y siembra de semillas de <i>A. thaliana</i> en medio Gamborg's B-5 sólido .....	44
3.1.1.3 Siembra de semillas de <i>A. thaliana</i> en medio líquido.....	45
<b>3.2 Material biológico bacteriano.....</b>	<b>45</b>
3.2.1 <i>Escherichia coli</i> .....	45
3.2.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	46
3.2.3 Cultivos en medio líquido.....	46
3.2.4 Cultivos en medio sólido.....	47
<b>3.3 Manipulación y análisis de DNA .....</b>	<b>47</b>
3.3.1 Plásmidos utilizados .....	47
3.3.2 Extracción de plásmidos a partir de cultivos bacterianos.....	47
3.3.2.1 Lisis alcalina por el método de Birnboim y Doyle.....	47
3.3.2 Extracción de plásmidos con alta pureza.....	49
3.3.3 Extracción y purificación de DNA total de hoja, plántula y raíz de <i>A. thaliana</i> .....	50
3.3.4 Cuantificación de DNA.....	50
3.3.5 Electroforesis de DNA en geles de agarosa .....	51
3.3.6 Amplificación de fragmentos de DNA por PCR.....	51
3.3.7 Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa .....	53
3.3.8 Reacciones de restricción de DNA .....	53
3.3.9 Reacción de ligación con T4 DNA ligasa .....	54
3.3.10 Clonación en vector pGEM T-Easy.....	54
3.3.11 Tecnología Gateway.....	56
3.3.11.1 Clonación en vector pENTR TOPO .....	56
3.3.11.2 Reacción de recombinación LR con vector pEarleyGate 103.....	57
3.3.12 Secuenciación de DNA.....	58
<b>3.4 Manipulación y análisis de RNA .....</b>	<b>58</b>
3.4.1 Tratamiento de material para manejo de RNA.....	58
3.4.2 Extracción y purificación de RNA total.....	59
3.4.3 Cuantificación de RNA.....	59
3.4.4 Electroforesis de RNA en geles de agarosa .....	60
3.4.5 Síntesis de cDNA a través de la reacción de la reverso transcriptasa... 60	
3.4.6 RT-PCR en un solo paso .....	60
<b>3.5 Métodos de transformación genética.....</b>	<b>61</b>
3.5.1 <i>E. coli</i> .....	61
3.5.1.1 Preparación de células competentes para transformación por choque térmico .....	61
3.5.1.2 Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> por choque térmico .....	62
3.5.2 <i>A. tumefaciens</i> .....	63
3.5.2.1 Preparación de células competentes para transformación por choque térmico .....	63

3.5.2.2 Transformación de células de <i>A. tumefaciens</i> por choque térmico.	63
3.5.3 <i>A. thaliana</i> .....	64
3.5.3.1 Preparación previa de <i>A. thaliana</i> y <i>A. tumefaciens</i> para Floral Dip	64
3.5.3.2 Floral Dip .....	64
3.5.3.3 Selección de semillas transformantes en tierra .....	65
3.5.3.4 Selección rápida de semillas transformantes en medio sólido.....	66
<b>3.6 Extracción, purificación y análisis de proteínas .....</b>	<b>67</b>
3.6.1 Extracción de proteínas totales.....	67
3.6.2 Precipitación de proteínas con TCA .....	68
3.6.3 Purificación de proteínas con colas de histidinas .....	68
3.6.4 Cuantificación de proteínas .....	69
3.6.5 Electroforesis de proteínas SDS-PAGE.....	69
3.6.6 Tinción con plata de proteínas en geles de poliacrilamida.....	70
3.6.7 Western Blot .....	71
<b>3.7 Microscopía confocal.....</b>	<b>72</b>
3.7.1 Preparación de muestras.....	72
3.7.2 Visualización de GFP por microscopía confocal.....	73
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>74</b>
<b>4.1 Preparación de construcciones 35S::eIF(iso)4E::GFP .....</b>	<b>74</b>
<b>4.2 Caracterización de plantas transgénicas que expresen la fusión eIF(iso)4E en fondo WT .....</b>	<b>82</b>
4.2.1 Selección de semillas transformantes .....	82
4.2.2 Inserción del transgen en el genoma de <i>A. thaliana</i> (DNA) .....	87
4.2.3 Determinación de los niveles de expresión de mRNA.....	89
4.2.4 Detección de la proteína de fusión eIF(iso)4E-GFP .....	91
4.2.4.1 Inmunodetección por Western Blot.....	91
4.2.4.2 Microscopía confocal .....	94
4.2.5 Fenotipo de plantas transgénicas que expresan eIF(iso)4E-GFP (estudios preliminares).....	96
<b>4.3 Obtención de mutantes de complementación de eIF(iso)4E.....</b>	<b>101</b>
<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>103</b>
<b>6. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>110</b>
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>111</b>
<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>112</b>

## ABREVIATURAS

-/-	Mutación homóciga nula
++	Mutación de sobre expresión
4E-BP	4E Binding Protein (Proteína de unión a 4E)
4E-T	Transportador de 4E
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BASTA	Glufosinato de amonio
CaMV	Virus del mosaico de la calabaza
cDNA	DNA complementario
DEPC	Dietilpirocarbonato
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetraacético
EF	Factor de elongación
eIF	Factor de inicio eucarionte
F	Generación filial
fMet	N-formil-metionina
Fw	Oligonucleótido en sentido (forward)
G3PD	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GDP	Guanosina difosfato
GFP	Green Fluorescent Protein (Proteína verde fluorescente)
GTP	Guanosina monofosfato
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
IF	Factor de inicio (procarionte)
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
LMV	Virus del mosaico de la lechuga
mRNA	RNA mensajero
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
nCBP	novel Cap Binding Protein (nueva proteína de unión a cap)
PABP	Poly A Binding Protein (Proteína de unión a poli A)
PAGE	Poly Acrylamide Gel Electrophoresis (Electroforesis en gel de poliacrilamida)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
PMSF	Fluoruro de para-metil-sulfonilo
PSA	Persulfato de amonio
RF	Factor de liberación (Release Factor)
rRNA	RNA ribosomal
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a reverso transcripción

Rv	Oligonucleótido en anti sentido (reverse)
SD	Secuencia Shine-Dalgarno
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TCA	Ácido tricloroacético
T-DNA	DNA transferido
TEV	Virus del jaspeado del tabaco
Ti	Tumor inducing (Inductor de tumores)
tRNA	RNA de transferencia
TuMV	Virus del mosaico del nabo
U	Uracilo
UTR	Región no traducible del mRNA
VPg	Viral encoded genome-linked Protein (proteína viral unida al genoma)
WT	Wild Type (Silvestre)
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

### UNIDADES

°C	grado Celsius
kDa	kilodalton
g	gramo
kg	kilogramo
mg	miligramo
$\mu$ g	microgramo
ng	nanogramo
x g	unidad de fuerza centrífuga relativa (RFC)
in	pulgada
mL	mililitro
$\mu$ L	microlitro
cm	centímetro
nm	nanómetro
M	molar
mM	milimolar
$\mu$ M	micromolar
kpb	kilo pares de bases
pb	pares de bases
rpm	revoluciones por minuto
U	unidad
V	voltio

## 1. RESUMEN

Uno de los puntos críticos en la regulación del inicio de la traducción es el reconocimiento de la estructura 5' cap del mRNA por el factor eIF4E. En plantas existen tres diferentes proteínas de tipo eIF4E: eIF4E, eIF(iso)4E y nCBP. No se conoce cuál es la función específica de cada una de estas proteínas, ya que en teoría todas pueden participar en el inicio de la traducción. Estudios anteriores han demostrado que la ausencia del factor eIF(iso)4E no afecta el desarrollo normal de *Arabidopsis thaliana* en condiciones óptimas de crecimiento, y se le relaciona con resistencia a diferentes potyvirus (TuMV y LMV; Duprat *et al*, 2002). Sin embargo, no se sabe si bajo condiciones de estrés las plantas mutantes en eIF(iso)4E presentan algún defecto.

Tampoco se conoce una razón particular para la existencia de tres diferentes proteínas tipo eIF4E capaces de reconocer la estructura cap del mRNA. Aunque pudiera aceptarse que en la planta estas tres proteínas presentan funciones redundantes, es probable que mediante el proceso de selección cada una haya evolucionado para desempeñar una función particular. Se sabe que eIF(iso)4E se encuentra distribuido diferencialmente en las distintas partes de la planta y en las diferentes etapas del desarrollo de la misma, lo cual pudiera sugerir alguna función particular para este factor. Asimismo, estudios *in vitro* han demostrado que eIF4E y eIF(iso)4E muestran selección hacia el cap y la región 5' UTR (no traducible) de los mRNA. Para estudiar la función de eIF(iso)4E *in vivo*, se ha planteado el análisis molecular detallado de plantas que carecen (mutantes) y que sobre expresan a este factor.

En el presente trabajo, se prepararon construcciones que permiten expresar al factor eIF(iso)4E fusionado a la proteína reportera GFP. La transformación tanto de plantas silvestres como mutantes homocigas nulas se

realizó para estudiar en *Arabidopsis thaliana* los efectos de la sobre expresión y complementación del factor eIF(iso)4E, respectivamente. Se obtuvieron plantas transgénicas que sobre expresan la fusión eIF(iso)4E-GFP hasta conseguir la generación filial F<sub>4</sub>, donde el transgen fue verificado por RT-PCR, *western blot* y microscopía confocal. Se observó un aumento en los niveles de mRNA de eIF(iso)4E en las plantas transgénicas. La inmunodetección de la proteína de fusión se realizó con los anticuerpos anti-eIF(iso)4E y anti-GFP, donde se esperaba un peso molecular de 53 kDa. En estas mismas plantas se observó un crecimiento más lento de la raíz principal respecto a plantas silvestres, asociado a la expresión del transportador de fosfatos Pho-1. También se obtuvieron plantas transformantes de complementación, que serán estudiadas en otros proyectos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 *Arabidopsis thaliana* como modelo de investigación



*Arabidopsis thaliana* (figura 2.1) es una planta pequeña empleada como organismo modelo para el estudio de la biología molecular, la fisiología y la genética de plantas. *Arabidopsis* es un miembro de la familia de las *Brassicaceae*, a la cual pertenecen el repollo y el rábano. Aunque no posee valor agronómico, presenta ventajas muy importantes para la investigación básica. Esta planta tiene características que la vuelven idónea para utilizarla como modelo biológico: mapa genético completo, genoma pequeño, ciclo de vida rápido y transformación eficiente con *Agrobacterium tumefaciens*.

**Figura 2.1** *Arabidopsis thaliana* (fuente: TAIR, [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org))

### 2.2 El proceso de traducción en procariontes

El proceso de traducción es aquél mecanismo por el cual en una célula se lleva a cabo la síntesis de una proteína codificada en un mRNA. Dicho proceso, tanto en procariontes como en eucariontes, consta de tres etapas: iniciación, elongación y terminación. A continuación se describen sus características más relevantes.

#### 2.2.1 Iniciación

Dos eventos deben de llevarse a cabo antes del inicio de la traducción en procariontes. El primero es el cargado del tRNA por las aminoacil-tRNA

sintetasas, que une a los aminoácidos con sus correspondientes tRNAs. Este proceso ocurre en una reacción de dos pasos, en los que se activa el aminoácido usando ATP para generar aminoacil-AMP, luego, se une a través de un enlace éster en el grupo 2' ó 3'-OH al tRNA y, al final, queda unido al 3'-OH. El segundo evento es la disociación de los ribosomas en sus dos subunidades ribosomales, 30S y 50S. En *E. coli*, el factor de traducción IF1 promueve esta disociación, mientras que IF3 se une a la subunidad 30S para evitar que se reasocie con la subunidad 50S.

Una vez que IF1 e IF3 han disociado a los ribosomas, se forma el complejo de iniciación 30S, que está constituido por la subunidad ribosomal 30S, el mRNA, los factores de inicio, una molécula de GTP y el tRNA cargado con formil-metionina (fMet). A la subunidad 30S, asociada a IF3, se le unen los factores IF1, IF2 y una molécula de GTP. La unión entre la subunidad ribosomal 30S y el sitio de inicio de un mensajero depende del apareamiento entre una secuencia corta de RNA, denominada secuencia Shine-Dalgarno (GGAGG), río arriba del codón de inicio, y de una secuencia complementaria en el extremo 3' del 16S rRNA; ésta unión es mediada por IF3, con la ayuda de los factores IF1 e IF2. La unión del fMet-tRNA al complejo de inicio 30S es promovido principalmente por IF2. El codón de inicio en procariontes es comúnmente AUG (alrededor del 90 % de los genes), aunque puede ser también GUG (8 %) y en raros casos UUG (1 %). El aminoacil-tRNA de inicio es el N-formil-metionil-tRNA, lo que significa que el primer aminoácido incorporado al polipéptido es N-formil-metionina, aunque es frecuentemente removido durante la maduración de la proteína.

Después de la formación del complejo de inicio 30S, se une la subunidad ribosomal 50S, con lo que son liberados los factores IF1 e IF3, luego es hidrolizada una molécula de GTP y el factor IF2 se libera, quedando formado así el complejo de iniciación 70S para comenzar la elongación.

### 2.2.2 Elongación

La elongación de la cadena de polipéptido se realiza recorriendo el mensaje del extremo 5' al 3', en tres pasos: la unión de los aminoacil-tRNAs al ribosoma, la formación del enlace peptídico entre el aminoácido entrante y la cadena creciente, y la translocación, para que continúen uniéndose más aminoácidos.

Existen tres sitios para la unión del aminoacil-tRNA en el ribosoma: el sitio P (peptidilo), el sitio A (aminoacilo) y el sitio E (*exit*, salida). Para comenzar la elongación, una vez formado el complejo de inicio 70S y el fMet-tRNA en el sitio P del ribosoma, un segundo aminoácido unido a su tRNA, cuya naturaleza está ligada al segundo codón en el mensaje, se une al sitio A del ribosoma por la acción del factor de elongación EF-Tu y GTP; para esto, numerosos aminoacil-tRNAs son probados hasta que el correcto es encontrado. La peptidil transferasa (una parte integral de la subunidad ribosomal 50S) cataliza la formación del primer enlace peptídico, transfiriendo el fMet de su tRNA en el sitio P al aminoacil-tRNA en el sitio, en donde se forma un dipéptido enlazado al tRNA en el sitio A. En el siguiente paso, la translocación, el factor de elongación EF-G (y GTP) desplaza un codón el mRNA con su peptidil-tRNA y éste se transloca al sitio P, donde el tRNA deacilado sale del ribosoma por el sitio E. Este proceso se repite hasta que se encuentre un codón de paro, momento en el que se lleva a cabo la terminación.

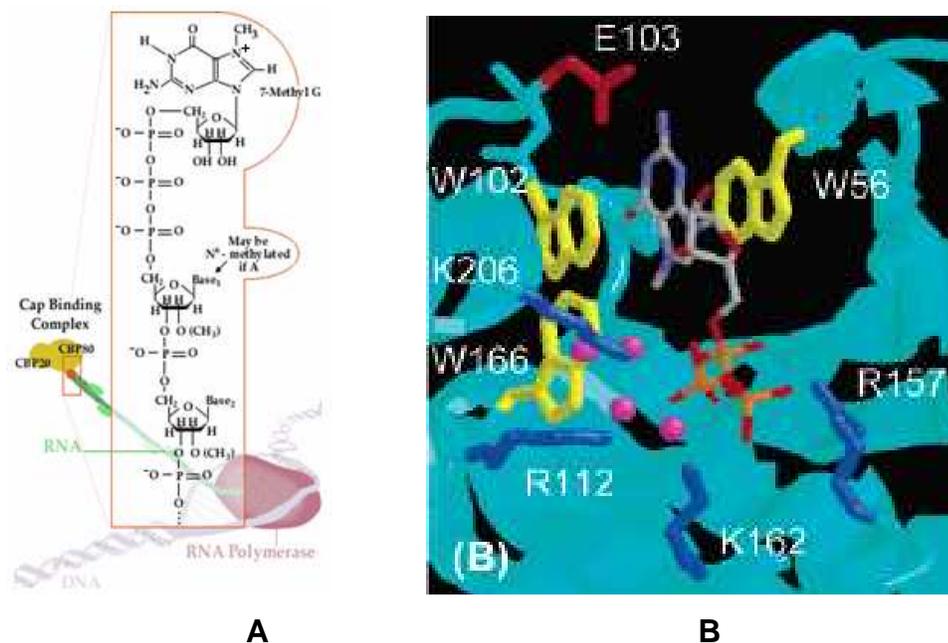
### 2.2.3 Terminación

La terminación de la traducción en procariontes es mediada por los factores de terminación RF1, RF2 y RF3 (*release factors*). RF1 reconoce los codones de paro UAA y UAG, RF2 reconoce a UAA y UGA. Éstos codones de paro carecen de sus correspondientes tRNAs, por ello son reconocidos por

estos factores de terminación. Cuando los RFs se unen, la peptidil transferasa forma un enlace entre el polipéptido y una molécula de agua, en lugar de otro aminoacil-tRNA, dejando descargado al tRNA en el sitio P y liberando a la cadena polipeptídica. Este tRNA deacilado es expulsado del ribosoma y los RFs se disocian con hidrólisis de GTP por RF3. El ribosoma se desmonta del mRNA, se prepara para ser disociado por los factores IF1 e IF3 y se reinicia un nuevo evento de traducción.

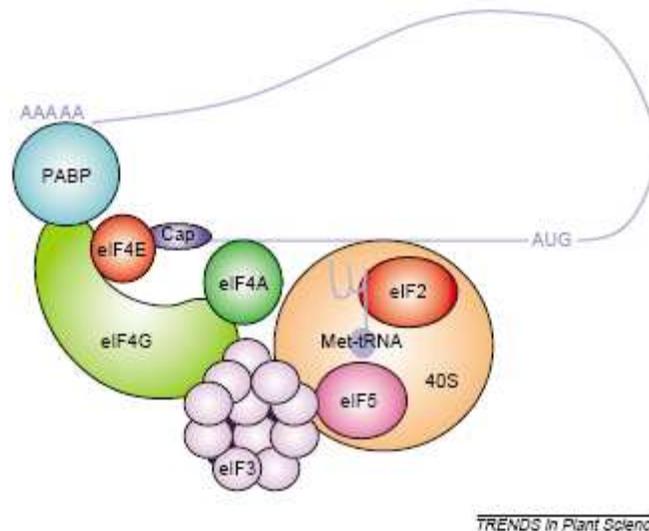
### 2.3 El inicio de la traducción en eucariontes

En el inicio de la traducción en eucariontes, la unión del mRNA es mediada por diferentes factores de iniciación eucariontes (eIF's).



**Figura 2.2** Reconocimiento de la estructura cap del mRNA por eIF4E. **A)** Estructura  $7^m\text{GpppN}$  colocada en el extremo 5' UTR donde se observan las uniones 5'  $\rightarrow$  5' entre el 7-metilguanilato y la primera base del RNA mensajero. **B)** Sitio de unión a cap en eIF4E; se muestran los principales contactos intermoleculares: interacciones  $\pi$  entre los residuos aromáticos indólicos de Trp102 y Trp56 (en amarillo) con cap, puentes de hidrógeno con Glu103 (en rojo), e interacciones de la cadena de fosfato con residuos básicos (en azul oscuro) a través de interacciones directas o mediadas por moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  (en magenta) y puentes salinos. (tomado de Niedzwiecka *et al*, 2004).

En primer lugar, una vez que el mRNA es sintetizado en el núcleo, madurado y exportado al citoplasma, el factor eIF4E reconoce específicamente a la estructura cap en el extremo 5' del mRNA (ver figura 2.2). eIF4E interacciona también con eIF4G, que funciona como plataforma para la unión de otros factores de inicio como son eIF4A, una RNA helicasa que desdobra estructuras secundarias en la región 5' del mRNA para facilitar la búsqueda del codón de inicio AUG; eIF4B, que requiere ATP y estimula la actividad de eIF4A, con lo que se ensambla el complejo eIF4F, que recluta a la subunidad ribosomal 40S y a otros factores de inicio (ver figura 2.3).



**Figura 2.3** Inicio de la traducción en eucariotes. La interacción de los factores de inicio, el mRNA y la subunidad ribosomal 40S. eIF4G actúa como proteína de anclaje para otros factores de inicio que reconoce el extremo 5'UTR del mRNA, la unidad ribosomal 40S y las proteínas que unen a la cola de poli A. (tomado de Robaglia y Caranta, 2006).

Por otro lado, el tRNA metionilado forma un complejo ternario con eIF2 y GTP (complejo de pre iniciación 43S), antes de unirse a la subunidad ribosomal 40S en el sitio P. El tRNA iniciador tiene una secuencia y características estructurales únicas que no se encuentran en los tRNAs elongadores, algunas de las cuales determinan su interacción con eIF2. El factor eIF3 forma un complejo multimérico (48S) con eIF1A, eIF2-tRNA<sup>met</sup>, la subunidad 40S y eIF4F para la búsqueda a través de la región 5'UTR del

mRNA, hasta encontrar el primer codón de inicio AUG en un contexto favorable. El mejor contexto es una purina en la posición -3 y una G en la posición +4, donde la A de AUG indica la posición +1 (reglas de Kozak), con lo que se asegura que se está traduciendo un marco de lectura correcto y que se están descartando codones de inicio prematuros (Weaver *et al*, 2008). La proteína eIF4G también tiene un dominio de unión a la proteína PABP que se une a la cola de poli A en el extremo 3' del mRNA, con lo que se circulariza el mensajero, se estabiliza y se incrementa la eficiencia traduccional. Una vez reconocido el codón de inicio, se activa la hidrólisis del GTP unido a eIF2 con ayuda de eIF5. La hidrólisis de GTP promueve la liberación de algunos factores de inicio y la unión de la subunidad 60S para formar el ribosoma 80S y dar paso a la etapa de elongación (Sánchez de Jiménez *et al*, 2005).

## **2.4 Mecanismos de regulación del inicio de la traducción**

El control de la expresión genética a nivel traduccional presenta grandes ventajas: es un control de respuesta rápida, reversible, específica, y de ajuste fino para la concentración de proteínas. Estos mecanismos permiten una regulación coordinada en la producción de familias de proteínas, tienen además potencial para llevar a cabo control espacial y son eficaces en sistemas que carecen de control transcripcional. Además, el control de la síntesis específica de proteínas en eucariontes tiene papeles críticos en el desarrollo, diferenciación, progresión del ciclo celular, la prevención de tumores y apoptosis (Sánchez de Jiménez *et al*, 2005). Es el inicio el que se encuentra más fuertemente regulado, debido al elevado costo energético que representa para la célula sintetizar polipéptidos. A continuación, se discuten algunos mecanismos de regulación que son representativos.

### **2.4.1 Control traduccional bacteriano**

El control de la expresión genética en procariontes se realiza principalmente a nivel transcripcional. El tiempo de vida relativamente corto de los mRNAs procariontes es consistente con lo muy eficiente que resulta este tipo de control; sin embargo, la naturaleza presenta algunos casos en los que ocurre un verdadero control a nivel traduccional en estos organismos.

Un ejemplo es el gen de la replicasa de la clase MS2 de fagos, que es regulado a nivel traduccional por la estructura secundaria que presenta su mRNA, que es policistrónico, en donde el codón de inicio se encuentra oculto dentro de esta estructura secundaria, por lo que no es traducido sino hasta que el ribosoma que traduce a la proteína de la cubierta desdobla la estructura y expone el codón de inicio de la replicasa al reconocimiento de la maquinaria de traducción (Weaver, 2008). Otro ejemplo es el codón de inicio del mRNA del factor sigma de choque térmico de *E. coli*,  $\sigma^{32}$ , que se encuentra también oculto en la estructura secundaria de su mensajero. En este caso, cuando la célula es expuesta a choque térmico, la estructura de este mRNA se relaja y permite la traducción activa de  $\sigma^{32}$  (Morita *et al*, 1999).

### **2.4.2 Control traduccional en eucariontes: fosforilación de factores de inicio**

Los mRNAs eucariontes son mucho más longevos que los correspondientes procariontes, por lo que el control a nivel traduccional es más importante (Weaver, 2008). Nuevos productos génicos pueden ser producidos rápidamente incrementando la traducción de mRNAs preexistentes. Esto es particularmente útil en eucariontes porque sus transcritos son generalmente más largos y toma más tiempo producirlos. Algunos mecanismos comunes involucran la fosforilación de diferentes factores de inicio, ya sea inhibiendo o estimulando la traducción. De manera general, las distintas formas de fosforilación ofrecen una forma efectiva de adaptarse a cambios fisiológicos y

ambientales, como puede ser la disponibilidad de nutrientes y estrés de tipo biótico y abiótico (Rhoads, 2009; Gebauer y Hentze, 2004).

**Fosforilación del factor eIF2.** Como ya se mencionó en la sección 2.3, eIF2 es parte del complejo ternario 43S y se asocia con la subunidad ribosomal 40S junto con GTP. Esta molécula de GTP es hidrolizada cuando el codón de inicio es localizado, produciendo eIF2 enlazado a GDP. Para volver a formar un complejo 43S funcional, es necesario intercambiar GDP por GTP, trabajo que es realizado por el factor eIF2B (Gebauer y Hentze, 2004). El factor eIF2 está constituido de tres subunidades:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . Bajo condiciones de estrés, la subunidad  $\alpha$  de mamíferos es fosforilada en el residuo Ser51 por varias proteínas cinasas como son HRI (*Haem-Regulated Inhibitor of translation*, inhibidor de la traducción regulado por el grupo hemo), la PKR (*double-stranded RNA dependent Protein Kinase*, también conocida como dsRNA-PK) y la PERK (*PRK-like Endoplasmic Reticulum Protein Kinase*). Cuando ésta subunidad  $\alpha$  se encuentra fosforilada, se incrementa su afinidad por el factor eIF2B impidiendo el intercambio GDP-GTP y, consecuentemente, inhibiendo globalmente la traducción de mRNAs (Pierrat *et al*, 2007).

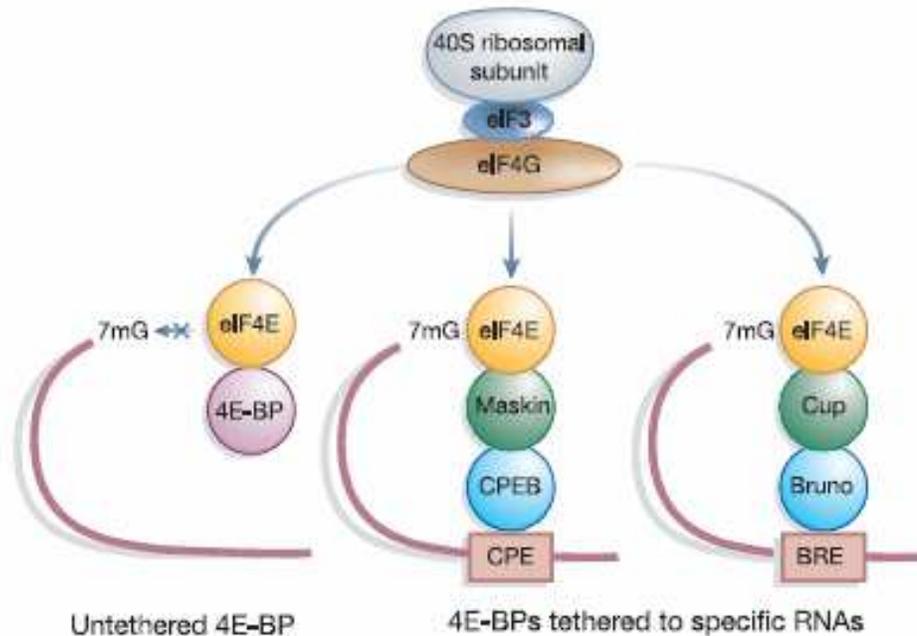
**Fosforilación de los factores eIF4E y eIF4G.** El factor eIF4E puede ser fosforilado bajo condiciones favorables de crecimiento celular, para incrementar su afinidad por 5' cap alrededor de cuatro veces en comparación con la forma no fosforilada, estimulando la traducción (Weaver, 2008). En mamíferos, el residuo Ser209 puede ser fosforilado por las proteínas Mnk 1 y 2 (*MAPK-mitogen-activated protein kinase- interacting kinases*), cPK (*Insulin-Stimulated Protamine Kinase*) y PKC (*Protein Kinase C*), en respuesta a varios estímulos como son factores de crecimiento y varios tipos de estrés ambiental (Scheper *et al*, 2001). La fosforilación también puede disminuir en algunos casos la afinidad por 5' cap. Experimentos *in vitro* han demostrado que el factor eIF(iso)4E de plantas puede ser fosforilado en el residuo Ser209 por la proteína cinasa CK2, reduciendo importantemente su afinidad por 5' cap,

sugiriendo la hipótesis de que existan algunos mecanismos capaces de fosforilar *in vivo* a este factor. Por su parte, el factor eIF4G de mamíferos también es fosforilado en el residuo Ser116 por una cantidad importante de proteínas cinasas, entre ellas se encuentran la fosfatidil-inositol-3-cinasa (PI3K) y FRAP (*FK506-binding protein 12/rapamycin associated protein*) vía la ruta mTOR (*target of rapamycin*, blanco de rapamicina), en respuesta a la estimulación por factores de crecimiento; la proteína cinasa S6, PKC, PAK2 (*p21-activated protein kinase 2*) y CaMKI (*Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase I*), (Pierrat *et al*, 2007).

#### 2.4.3 Proteínas inhibitorias del factor eIF4E (4E-BPs)

Las proteínas inhibitorias de 4E, 4EBPs (*4E-Binding Proteins*, también conocidas como PHAS-I por *Phosphorylated Heat and Acid Soluble Protein Stimulated by Insulin*), previenen la formación del complejo eIF4F, secuestrando a eIF4E e inhibiendo mensajeros que requieren altas cantidades de eIF4E disponible. El dominio de las 4E-BPs que permite este secuestro es la secuencia YXXXXL $\phi$ , en la cual  $\phi$  representa a algún residuo hidrofóbico y X a un aminoácido cualquiera (Richter y Sonenberg, 2005).

La insulina y muchos otros factores de crecimiento semejantes a insulina (IGFs) interactúan con receptores específicos situados en las membranas, que tienen dominios intracelulares de tirosina cinasas, produciendo una cascada de reacciones en varias vías de señalización, como las de la PI3K y las MAPK (Sánchez de Jiménez *et al*, 2005). Una proteína afectada por estas rutas es la cinasa mTOR y uno de los blancos de mTOR son las proteínas de unión a eIF4E, 4E-BPs, que en su forma hipofosforilada se encuentran unidas a 4E. Cuando mTOR las fosforila, se liberan de eIF4E permitiendo la formación de complejos activos entre eIF4G y eIF4E, estimulando así la traducción (ver figura 2.4).



**Figura 2. 4** Control traduccional por proteínas inhibitorias del factor eIF4E. Se muestran tres formas de inhibir la traducción secuestrando a eIF4E y evitando la formación del complejo eIF4F. 1) Las proteínas 4E-BPs, en su estado hipofosforilado, se encuentran unidas a eIF4E; cuando son fosforiladas por mTOR, se liberan y se permite la traducción. 2) La proteína Maskin de *Xenopus* se une a eIF4E y CPEB para impedir la traducción, actúa como una proteína tipo 4E-BP. 3) Proteínas en otros organismos pueden actuar de forma similar a Maskin, la proteína Cup une a eIF4E y a Bruno, una proteína de unión a una región específica del mRNA de Oskar, en *Drosophila melanogaster* (Richter y Sonenberg, 2005).

Las células eucariontes pueden utilizar otras proteínas que capturen a eIF4E para inhibir el inicio de la traducción. Descubierta en ovocitos de *Xenopus laevis*, Maskin es una de ellas (ver figura 2.4). Esta proteína actúa inhibiendo la traducción del mensajero de la ciclina B, un activador clave del ciclo celular, secuestrando a eIF4E, igual que otras proteínas 4E-BPs. Maskin impide que eIF4E forme el complejo eIF4F con eIF4G sobre este particular mRNA (Gebauer y Hentze, 2004). La proteína CPEB (*Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding Protein*) se une al elemento de poliadenilación citoplásmica (CPE), una secuencia del mRNA hacia el extremo 3' rica en Us, y a Maskin, que a su vez, mediante interacciones relativamente débiles debidas a una sustitución de T por Y en el dominio de unión a eIF4E, se encuentra unido a eIF4E. Cuando los ovocitos son inducidos a completar la meiosis, la CPEB estimula el crecimiento de la cola de poli A. La cola de poli A entonces

se une a eIF4G que, bajo estas condiciones, es capaz de desplazar a Maskin y estimular la traducción (Weaver, 2008). Otras proteínas similares a Maskin se han encontrado en *Drosophila melanogaster*. Bicoide se une a la región BBR (*Bicoid Binding Region*) y directamente a eIF4E, impidiendo la traducción del mRNA de caudal. Por otro lado, la proteína Cup se encuentra unida tanto a eIF4E y a Bruno, una proteína que a su vez tiene un sitio de unión BRE (*Bruno Response Element*) en el mRNA de Oskar, regulando la traducción de este mensajero como una proteína tipo 4E-BP (ver figura 2.4; Richter y Sonenberg, 2005).

#### **2.4.4 Bloqueo del inicio de la traducción por miRNA**

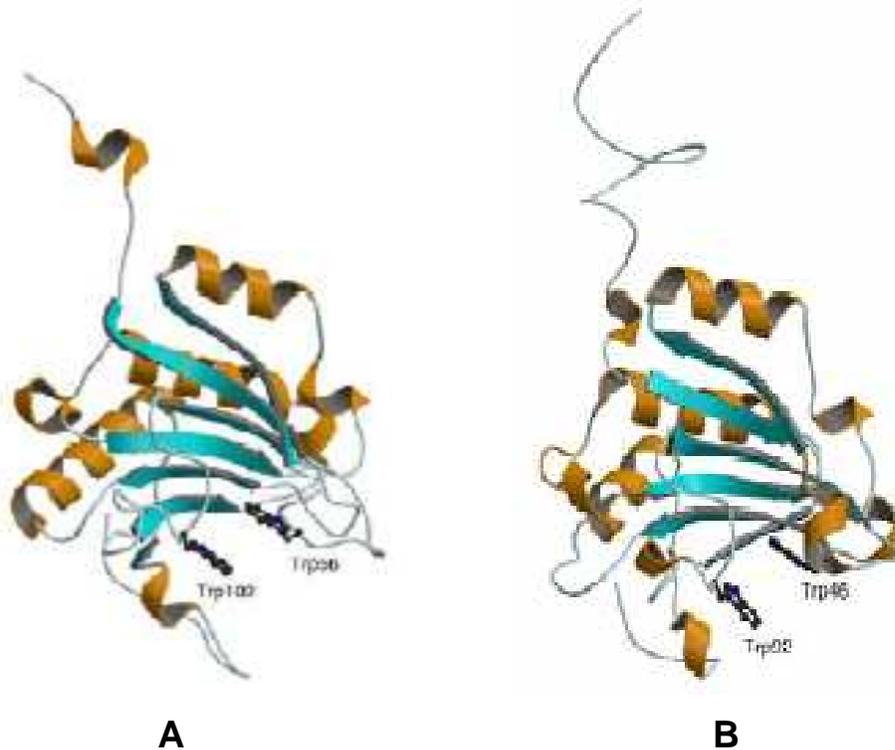
Los microRNAs (miRNA) son pequeños RNAs no codificantes (normalmente entre 21 y 25 nucleótidos) que regulan la expresión genética post transcripcionalmente, mediante secuencias específicas, inhibiendo la traducción o desestabilizando los mRNAs blancos (Carleton *et al*, 2007). En situaciones de estrés, algunos factores de transcripción (por ejemplo p53, HIF1a) promueven la expresión de miRNAs que reducen la traducción de mRNAs blanco. Directamente, no actúan sobre alguno de los componentes de la maquinaria de la traducción como pueden hacerlo las 4E-BPs, pero son un mecanismo de regulación de la traducción muy específico y, por el cual, alrededor del 25 % de los genes de mamíferos y un número importante de genes de plantas se encuentran regulados (Yamasaki y Anderson, 2008).

### **2.5 La familia eIF4E**

#### **2.5.1 Aspectos generales de la familia eIF4E**

El factor eIF4E fue descubierto inicialmente como un único polipéptido, pero se redefinió como subunidad del complejo eIF4F al encontrarse asociado a eIF4G. También se creía que los organismos tenían una sola versión de él,

pero posteriormente se hallaron dos isoformas en germen de trigo, eIF4E y eIF(iso4E); en *A. thaliana* a eIF4E y eIF(iso)4E (Rodríguez *et al*, 1998), y también nCBP (Ruud *et al* 1998). Dos miembros adicionales de la familia eIF4E en *H. sapiens*: 4EHP (*eIF4E Homologous Protein*, o bien eIF4E-2) y eIF4E-3. *C. elegans* expresa cinco miembros de la familia eIF4E, IFE 1-5. Lo anterior confirmó que diferentes organismos pueden expresar una variedad de isoformas de eIF4E (Rhoads, 2009).



**Figura 2.5** Estructura obtenida por difracción de rayos X de eIF4E de *H. sapiens* (A) y modelo tridimensional de eIF(iso)4E de *A. thaliana* (B). Para el modelo tridimensional se tomó como patrón la estructura obtenida de rayos X de eIF4E de humano. Los residuos que participan en la unión de cap son Trp66 y Trp102 para *H. sapiens* y Trp46 y Trp92 para *A. thaliana*, que se muestran en modelo de esferas y bastones. Ambas estructuras se presentan en la conformación que tendrían al encontrarse unidos a cap. (tomado de Okade *et al.* 2009).

Los distintos miembros capaces de unirse a la estructura 5' cap para dar inicio a la traducción conforman la familia eIF4E. Los miembros de esta familia poseen una secuencia consenso con residuos de Trp, Phe e His en un patrón distintivo resumido como  $H(X_5)W(X_2)W(X_{8-12})W(X_9)F(X_5)FW(X_{20})F(X_7)W(X_{10})W(X_{9-12})W(X_{34-35})W(X_{32-34})H$ . En todos los organismos las regiones N- y C- terminales no parecen ser indispensables para la

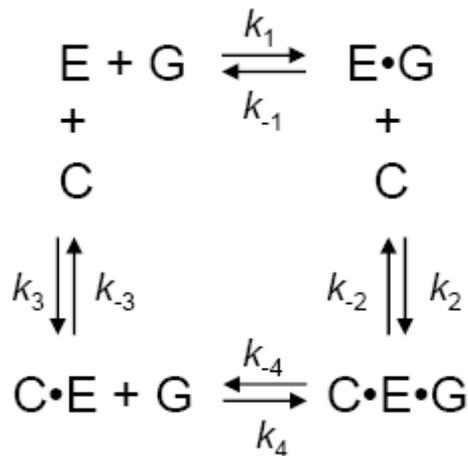
traducción, pero pudieran ser importantes para la regulación de su actividad o afectar la estabilidad de la proteína misma (Joshi *et al*, 2005).

La estructura cristalina de varios complejos eIF4E-5' cap han sido resueltos por cristalografía : eIF4E de murinos con  $^7\text{mGDP}$  (Marcotrigiano *et al*, 1997) y  $^7\text{mGpppG}$  (Niedzwiecka *et al*, 2002), eIF4E de humano con  $^7\text{mGTP}$  (ver figura 2.5) y  $^7\text{mGpppA}$  (Tomoo *et al*, 2002), dos complejos ternarios de eIF4E de murino con  $^7\text{mGDP}$ , uno con un péptido con la secuencia de unión de eIF4G y el otro con la secuencia de unión a eIF4E de 4E-BP1 (Marcotrigiano *et al*, 1999), y eIF4E de trigo (Monzingo *et al*, 2007). Por resonancia magnética multidimensional se determinó también la estructura de eIF4E de *S. cerevisiae* unido a  $^7\text{mGDP}$  (Matsuo *et al*, 1997).

En todas estas estructuras se ha encontrado que la especificidad de la interacción eIF4E-5' cap está dada principalmente por interacciones de tipo  $\pi$ -5' cap entre las nubes electrónicas aromáticas indólicas de los residuos Trp56 y Trp102 y el catión 5' cap, puentes de hidrógeno entre Glu103 y los protones del los N1 y N2 de  $^7\text{mG}$ , e interacciones de tipo Van der Waals con el Trp166 (figura 2.2 B; Rhoads, 2009; Stolarski *et al*, 2003). Existen otras proteínas que también unen a la estructura 5' cap mediante interacciones diferentes a las propias de la familia eIF4E. Un ejemplo son las proteínas CBP20 y CBP80, de carácter nuclear, que forman un complejo de unión a cap (CBC, ver figura 2.2 A) en el núcleo de células de mamíferos, donde están involucrados en el proceso de splicing del mRNA, la protección del extremo 5' UTR y la degradación de mRNAs dañados. El complejo CBC también tiene un rol en la exportación de mRNAs libres de errores hacia el citoplasma, donde se disocia de la estructura 5' cap, entonces los componentes CBP20 y CBP80 vuelven al núcleo y son reciclados (Bush *et al*, 2009).

Estudios termodinámicos *in vitro* han mostrado que 5' cap, al unirse a eIF4E en la forma *apo* (libre), provoca cambios conformacionales tanto en el

sitio de unión a cap, como en la región de unión a eIF4G y las 4E-BPs, que generan una compactación de eIF4E (Rutkowska-Wlodarczyk, 2008). Este proceso está caracterizado por los valores de los parámetros  $\Delta H = -74.3 \pm 3.6$  kJ/mol,  $\Delta S = -98.4 \pm 12.1$  J/mol·K y  $\Delta G = -45.109 \pm 0.090$  kJ/mol, que sugieren una compensación entalpía-entropía; donde la contribución **negativa** de la entropía, probablemente debida a la compactación de eIF4E, es contrarrestada por la elevada entalpía de la transición (Niedzwiecka *et al*, 2004). Aunque los parámetros termodinámicos sugieren que los cambios conformacionales provocados por 5' cap en eIF4E podrían favorecer la interacción entre eIF4E y eIF4G, la determinación de las constantes cinéticas de formación del complejo ternario eIF4E-eIF4G-<sup>7</sup>mGTP (ver figura 2.6) no confirman esto, sino que sugieren un mecanismo de formación aleatoria y que, en realidad, eIF4G estabiliza la interacción eIF4E-cap (Slepenkov *et al*, 2008; Volpon *et al*, 2006).



**Figura 2.6** Mecanismo cinético de formación del complejo ternario eIF4G-eIF4E-<sup>7</sup>mGpppG. E: eIF4E; G: eIF4G; C: <sup>7</sup>mGpppG. La determinación de las constantes cinéticas indicadas en el diagrama muestra que no hay preferencia por seguir alguna de las dos rutas. La presencia de eIF4G contribuye a estabilizar la interacción entre eIF4E y 5' cap. (Slepenkov *et al*, 2008).

La interacción entre eIF4E y eIF4G está mediada por el dominio YXXXXLφ en eIF4G (el mismo que en las 4E-BPs), mientras que en eIF4E los residuos responsables de la interacción son los Trp43 y Trp73. Éste último se encuentra dentro de la secuencia conservada (S/T)V(E/D)(E/D)FW. Cuando se sustituye el Trp73 de eIF4E de mamífero por un aminoácido no aromático, la habilidad de

eIF4E de interactuar con eIF4G o las 4E-BPs se ve interrumpida (Joshi *et al*, 2005; Rhoads *et al*, 2007).

Por otro lado, eIF4E, predominantemente citoplásmico, también se encuentra presente en el núcleo, en donde estimula el transporte de ciertos mRNAs al citoplasma. En mamíferos, entre el 12 y el 33 % está localizado en el núcleo (Dostie *et al*, 2000) y se colocaliza con los factores de splicing. eIF4E es importado al núcleo mediante el transportador 4E-T, que se une a través del mismo motivo que contienen eIF4G y las 4E-BPs, y que interactúa con los receptores nucleares, las importinas a y b. Una vez dentro, estimula el transporte de ciertos mRNAs al citoplasma; sin embargo, no se han comprendido completamente los mecanismos que permitan la permanencia de eIF4E en núcleo (Rong *et al*, 2008).

Los roles fisiológicos para cada uno de los miembros de la familia eIF4E están comenzando a emerger, pero ninguno es comprendido completamente. La expresión de eIF4Es específicos puede ocurrir en diferentes etapas de desarrollo del organismo y afectar el reclutamiento de distintos mRNAs, como se ha observado para IFE-4 de *C. elegans* (Dinkova *et al*, 2005) y pez cebra (Robalino *et al*, 2004). Las isoformas de eIF4E pueden ser expresadas de manera tejido-específica o célula-específica, probablemente para discriminar la expresión de ciertos genes, a través de interacciones de algún miembro de la familia eIF4E con mRNAs que contengan alguna característica estructural relevante, como puede serlo un 5' cap mono o multimetilado, la longitud de los extremos 3' y 5' UTR o la presencia de estructuras secundarias en los mismos. También existe el caso en el que algunas proteínas se unen específicamente a miembros de eIF4E para afectar ya sea su actividad, o la selección del mRNA a traducir (Rhoads *et al*, 2007).

Frecuentemente, se ha encontrado a eIF4E sobre expresado en cáncer humano y se encuentra íntimamente ligado al progreso metastático del mismo.

La función incrementada de eIF4E es debida a la activación de las rutas RAS y PI3K/AKT, con lo que se incrementa selectivamente la traducción de mRNAs clave en el desarrollo de tumores, angiogénesis y supervivencia celular. Por estas razones, varios trabajos tienen por objeto alcanzar una terapia con eIF4E como blanco, reduciendo selectivamente factores críticos para la malignidad de tumores (Graff *et al*, 2008).

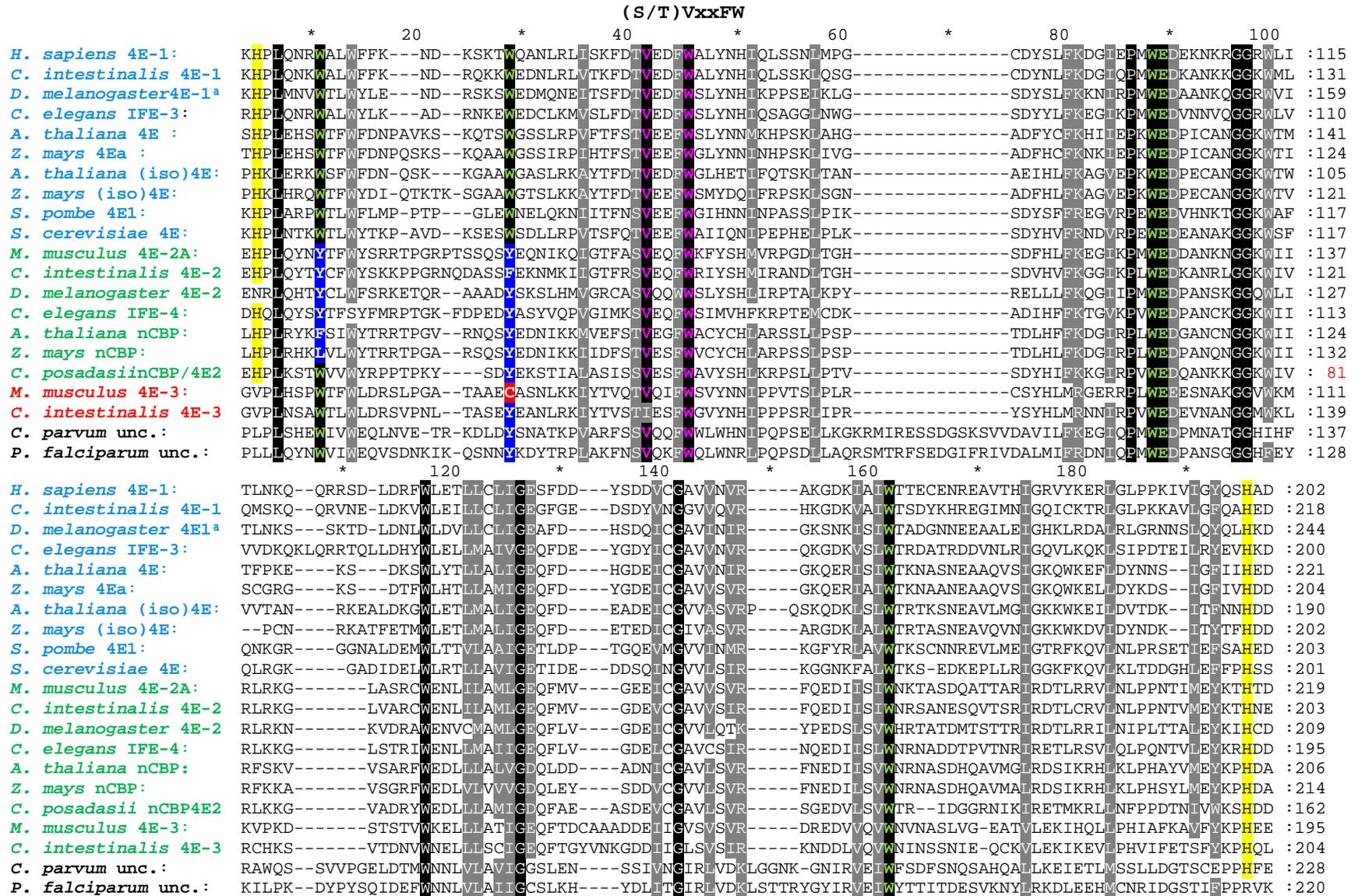
### 2.5.2 Clasificación de los miembros de la familia eIF4E

Actualmente los miembros de la familia eIF4E se encuentran clasificados en tres grupos. Realizando un alineamiento de secuencias de eIF4E de diversos organismos, Joshi *et al* (2005) encontró ocho triptófanos conservados en ellos, y propuso la secuencia consenso que caracteriza al núcleo de las proteínas eIF4E  $H(X_5)W(X_2)W(X_{8-12})W(X_9)F(X_5)FW(X_{20})F(X_7)W(X_{10})W(X_{9-12})W(X_{34-35})W(X_{32-34})H$ . A partir de ésta secuencia consenso, se clasificaron las proteínas eIF4E en tres grupos (ver figura 2.7) de acuerdo a los siguientes criterios:

**Clase I.** Incluye ortólogos de eIF4E de *H. sapiens* (eIF4E-1), *M. musculus* (eIF4E-1), *T. aestivum* (eIF4E y eIF(iso)4E) y *S. cerevisiae* (eIF4E). Poseen residuos de Trp en las posiciones equivalentes a Trp43 y Trp56 de humano e incluye a eIF4E y eIF(iso)4E de plantas.

**Clase II.** Incluye miembros de la familia eIF4E-2 de Metazoa y nCBP de plantas. Difiere de la clase I en que sus miembros poseen un residuo hidrofóbico como Tyr, Phe o Leu en lugar del equivalente Trp43, mientras que en la posición 56 pueden contener Tyr o Phe.

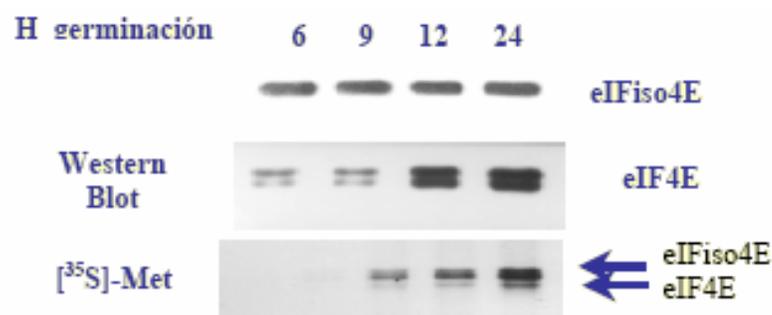
**Clase III.** Los miembros de la clase III han sido reconocidos solo en Metazoa. Poseen una Cys (en Vertebrata) o Tyr en la posición equivalente al Trp56 de humano y en la posición 43 un residuo de Trp.



## 2.6 La familia eIF4E y la traducción en plantas

La familia eIF4E de plantas está conformada por los factores eIF4E, eIF(iso)4E y nCBP. No se conoce la razón de la existencia de diferentes isoformas, pero los estudios en plantas sugieren la posibilidad de discriminación de mRNAs para ser traducidos preferencialmente por alguno de los miembros de la familia eIF4E de plantas, o para estimular o reprimir la traducción mediante interacciones directas con el cuerpo de los mRNAs.

eIF(iso)4E posee una similitud del 50 % respecto a eIF4E y un peso molecular de 24 kDa y forma el complejo eIF(iso)4F con la proteína eIF(iso)4G. Este complejo tiene una actividad similar al complejo eIF4F (eIF4E + eIF4G), en experimentos *in vitro*. La proteína eIF(iso)4G difiere de eIF4G en peso molecular, 86 kDa y 180 kDa, respectivamente, y en la ausencia de un fragmento hacia el extremo N-terminal, sugiriendo que los mecanismos de regulación entre estas dos proteínas pudieran ser muy diferentes. También, se ha demostrado la posibilidad de intercambio entre los componentes de los complejos eIF4F y eIF(iso)4F y la discriminación de mRNAs *in vitro*. (Browning, 2004). Los aminoácidos encargados de reconocer y formar interacciones  $\pi$  con 5' cap son los residuos Trp46 y Trp92 (numeración correspondiente a eIF4E de trigo; ver figuras 2.5 y 2.7).



**Figura 2.8** Niveles de las proteínas eIF4E y eIF(iso)4E en ejes embrionarios de maíz durante la germinación. Los niveles de eIF(iso)4E son altos desde las primeras horas post imbibición y mientras que eIF4E incrementa mucho sus niveles después de 24 horas. (Dinkova *et al*, 2000).

Estudios realizados en una cepa de *Sacharomyces cerevisiae* carente de eIF4E endógeno, la cual fue transformada tanto con eIF4E como con eIF(iso)4E proveniente de *A. thaliana*, demostraron un crecimiento mucho más lento de la levadura transformada con eIF(iso)4E en comparación con eIF4E (Rodríguez *et al*, 1998). Estos resultados demuestran la efectividad del factor eIF(iso)4E para soportar la traducción general *in vivo* de la levadura, pero también parecen sugerir una menor eficacia con respecto a eIF4E. Sin embargo, no debe olvidarse que probablemente los mRNAs de levadura no sean equiparables a los correspondientes en *A. thaliana* (Rhoads *et al*, 2007). En ejes de maíz (figura 2.8) se ha demostrado que el factor eIF(iso)4E se encuentra presente y sintetizándose activamente desde las primeras horas de germinación, mientras que eIF4E se encuentra en menor cantidad y con una síntesis *de novo* menos activa (Dinkova *et al*, 2000).

Ar nCBP	MEVLDRRDEIRDSEGNMDSIKSHYVTDSEERRSTELKDGLHPLRYKSIWYTRRTPGVRNQSIEDNIKKMVEFSTVEG	80
Wh	MTEDTEMRPASAGAEEREELADDGDGSSAAAAGRITA---HPLENATFNFDPNPQKSRQVAAGSTIKPIHTFSTVED	77
Whiso4E	MAEVEAALPVAATEPPEVAEAGDAGAAEAKGP-----HKLQRQTFNFDYDIQTKPKPGAAAGTSLKKGTFDFTVEE	70
Mouse4E	MATVEPETPTTNPPEAEKTESNQEVANPEHYIK-----HPLQNRWALWFFKND---KSKTQANLRLISKFDFTVED	71
Yeast	MSVEEVSKKFEENVSVDDTTATPKTVLSDSAHFVVK-----HPLNTKWTLWYTKPAVD-KSESMSDLLRPVTSFQTVEE	73
Ar nCBP	FWACYCMLARSSLLPSPTDLHFFKDGIRPLWEDGANCNGGKIIIRFSK---VVSARFWEDELLLALVGDQLDDADNI-CG	156
Wh 4E	FWGLYNNIHNPSKLNVDGFHCFKFKNIEPKWEDPICANGGKTIISCGR---GKSDTFWHLHTLLAMIGEQDFDGEI-CG	153
Whiso4E	FWCLYDQIFRPSKLVGSADFHFLFKAGVEPKWEDPECANGGKTVISSRK---TNLDTMWELETMALIGEQQFDRSQEI-CG	147
Mouse4E	FWALYNHIQLSSNLMPGCDYSLFKDGIIEPKWEDKKNRGGRIITLNKQQRSSDLDRFWLETLLCLIGESFDDYSDDVCG	151
Yeast	FWAIIQNIPEPKELPLKSDYHVFVRNDVVRPEWEDKANAKGGKISFQLRGKG--ADIDELWLRLLAVIGETIDEDDSQING	151
Ar nCBP	AVLSVRFNEDIISVNRNASDQHAVMGLRDSIKRHLKLPWAYVMEYKPHDASLRDNSSYRNTWLRQ	221
Wh 4E	AVVSVRQKQERVAIITKNAANEAQAISIGKQWKEFLDYKDS--IGFIVHEDAKRSDKGPKNRYTV	215
Whiso4E	VVASVVRQKQDKLSLITKTASNEAVQVDIGKQWKEVIDYNDK--MVYSFHDDSRSQKPSRGGRYTV	209
Mouse	AVVNVRAKGDKIAIITTECENRDAVTHIGRVYKERLGLPPKIVIGYQSHADATKSGSTTKNRFVV	217
Yeast	VVLSIRKGGNKFALITTKS-EDKEPLLRIIGGKFKQVLKLTDDGHLEFFPHSSANGRHPQPSITL---	213

**Figura 2.9** Comparación de la secuencia de nCBP de *A. thaliana* con otras secuencias. De acuerdo a la clasificación de Joshi *et al* (2005), nCBP pertenece a la clase II y posee en las posiciones equivalentes a Trp43 y Trp56 de humano a Phe y Tyr respectivamente. (modificado de Ruud *et al*, 1998).

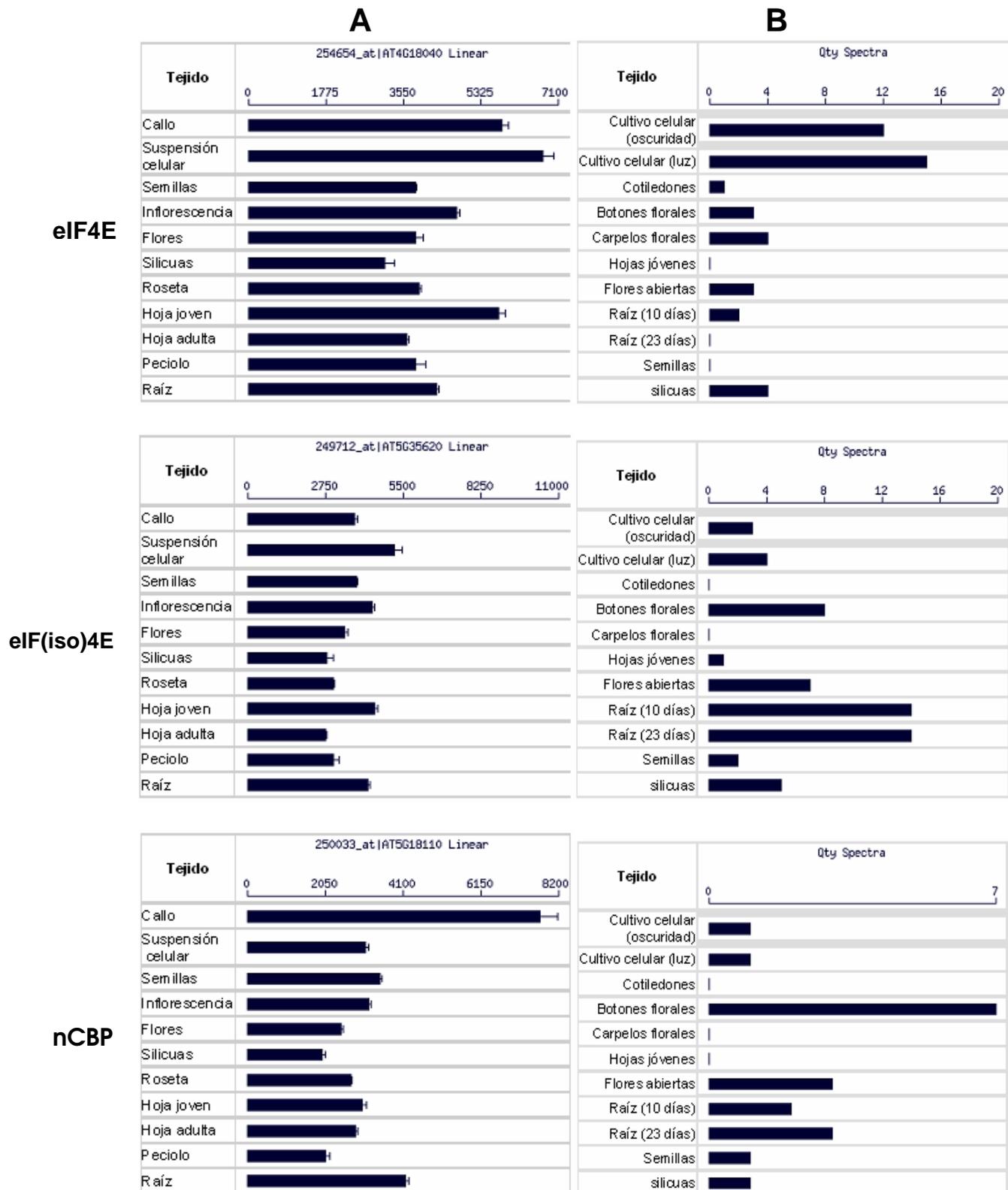
Hace poco más de diez años, se descubrió en *A. thaliana* una nueva proteína tipo eIF4E capaz de unir a 5' cap pero claramente diferente de eIF4E y eIF(iso)4E, la proteína nCBP (*novel Cap Binding Protein*), que también se encuentra en todas las plantas superiores. nCBP pertenece a la clase II, de acuerdo a la clasificación de Joshi (ver figura 2.9) y tiene sustituidos dos de los ocho triptófanos que conforman el núcleo de las proteínas eIF4E por Phe y Tyr.

Este último Trp participa directamente en las interacciones  $\pi$  con el catión 5' cap, y presenta un 58 % de similitud y un 32 % de identidad con eIF4E (Joshi *et al*, 2005). Se ha comprobado su capacidad de unir a 5' cap a través de la determinación de las constantes de disociación para la unión nCBP-5' cap, las que revelan una afinidad 20 veces mayor por 5' cap que lo observado con eIF(iso)4E. También se demostró, en un sistema de doble híbrido, que nCBP es capaz de formar un complejo funcional con el factor eIF(iso)4G y soportar la traducción *in vitro*, pero sólo al 30 % de actividad al compararla con eIF(iso)4E, lo que sugiere que probablemente participe regulando y secuestrando diversos mensajeros (Ruud *et al*, 1998).

En nuestro laboratorio, se ha obtenido y estudiado la mutante homociga nula de nCBP (Hidalgo, 2007; De la Torre, 2009). Se sabe que presenta un retraso en la floración de aproximadamente 10 días respecto a plantas silvestres en condiciones de día corto o día largo (ver figura 2.10). En experimentos dirigidos hacia la dilucidación de los mecanismos por los cuales este retraso se presenta, se encontró que nCBP probablemente está participando en la regulación de las vías de floración, particularmente en la vía autónoma. La mutante presenta a los mensajeros de los genes *FCA* disminuido (vía autónoma), *FLC* aumentado (vía autónoma, vía de vernalización) y *AGL28* disminuido (vía autónoma; De la Torre, 2009).



**Figura 2.10** Fenotipo de mutantes homocigas nulas de nCBP. Las plantas mutantes presentan un retraso de aproximadamente 10 días en la aparición de inflorescencia con respecto a plantas silvestres. (Hidalgo, 2007; De la Torre, 2009).



**Figura 2. 11** Expresión diferencial de los miembros de la familia eIF4E en *A. thaliana* a nivel mRNA (A) y proteína (B) en diferentes tejidos de la planta (Fuente: TAIR, [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)).

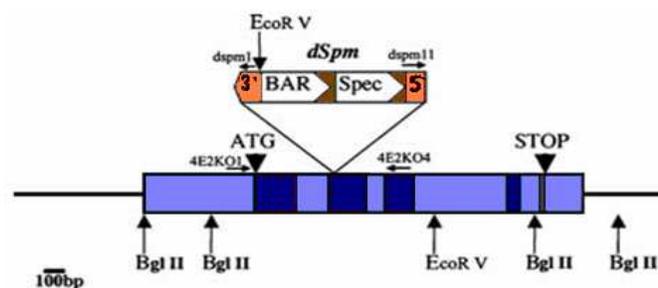
Los niveles de expresión de mRNA y proteína para los diferentes miembros de la familia eIF4E en *A. thaliana* pueden observarse en la figura 2.11. Como ya se había hecho ver anteriormente, las cantidades de mensajero no correlacionan con las cantidades de proteína en los distintos tejidos de la planta. De manera general, puede notarse que el mRNA de eIF4E se encuentra expresado prácticamente en todos los tejidos y en una cantidad importante, no así la proteína que, principalmente, se sintetiza en cultivos celulares y en flores y silicuas. eIF(iso)4E se expresa, a nivel mRNA, en todos los tejidos, aunque en menor cantidad que eIF4E, la proteína lo hace mayoritariamente en raíz y botones florales, en menor proporción en silicuas y muy poco en cultivos celulares. El mRNA de nCBP se encuentra expresado muy fuertemente en callo y raíz, y se distribuye homogéneamente en el resto de los tejidos. nCBP como proteína se localiza particularmente en botones florales, flores abiertas y raíces de 23 días. La diferente distribución de mRNA y proteína de estos factores nos sugiere modelos y mecanismos de regulación a través de la estabilidad, las actividades específicas de cada factor y de los distintos patrones de traducción de cada uno de ellos (TAIR, [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)).

Aunque los ribosomas de las plantas tienen una arquitectura similar a la de los mamíferos, así como las proteínas ribosomales mantienen un alto grado de identidad con las de otros organismos eucariotes, la regulación de la traducción a través de los factores de iniciación en eucariotes puede presentar diferentes estrategias en los distintos organismos. Prueba de esto son los intentos fallidos de detectar proteínas similares a las 4E-BPs de mamíferos en plantas. Mediante ensayos de traducción *in vitro* de los mensajes almacenados en ejes embrionarios de maíz, se demostró que en este grupo de mensajes se sintetizan diferentes patrones de proteínas dependiendo de la presencia de uno u otro de los factores eIF4E o eIFiso4E. Esto sugiere que la regulación de la traducción puede llevarse a cabo mediante la discriminación de mensajeros por estos factores y, a su vez, por las cantidades y distribución de los miembros de la familia eIF4E en distintos tejidos de las plantas. También se ha demostrado la traducción de otros

mensajeros en ausencia de cualquiera de las proteínas eIF4E, sugiriendo que en plantas también se desarrolla la traducción cap independiente vía IRES (*Internal Ribosomal Entry Site*, sitio de entrada interna al ribosoma), que son estructuras secundarias hacia el extremo 5' UTR que permiten el reclutamiento de forma directa de la subunidad ribosomal 40S y que pueden traducirse sin interacciones con la estructura 5' cap. La traducción por esta vía se activa bajo condiciones de estrés ambiental, temperaturas elevadas, disponibilidad de nutrientes baja y en algunas etapas del desarrollo celular, cuando se inhibe la traducción cap dependiente (Dinkova *et al*, 2005; Sánchez de Jiménez *et al*, 2005).

Finalmente, de manera similar a la regulación por la ruta mTOR en mamíferos, que modifica los niveles de fosforilación de las proteínas 4E-BPs, se ha encontrado una proteína en maíz que tiene actividad similar a la insulina (denomida ZmIGF), que induce la fosforilación de ZmS6K (una cinasa) a través de la ruta de mTOR y que, a su vez, favorece la traducción de ciertos mRNAs llamados TOP (*track of pyrimidines*), por tener una secuencia rica en pirimidinas hacia el extremo 5' UTR (García-Flores *et al*, 2001; Rhoads *et al*, 2007).

## 2.7 El factor de inicio de traducción eIF(iso)4E de *A. thaliana*

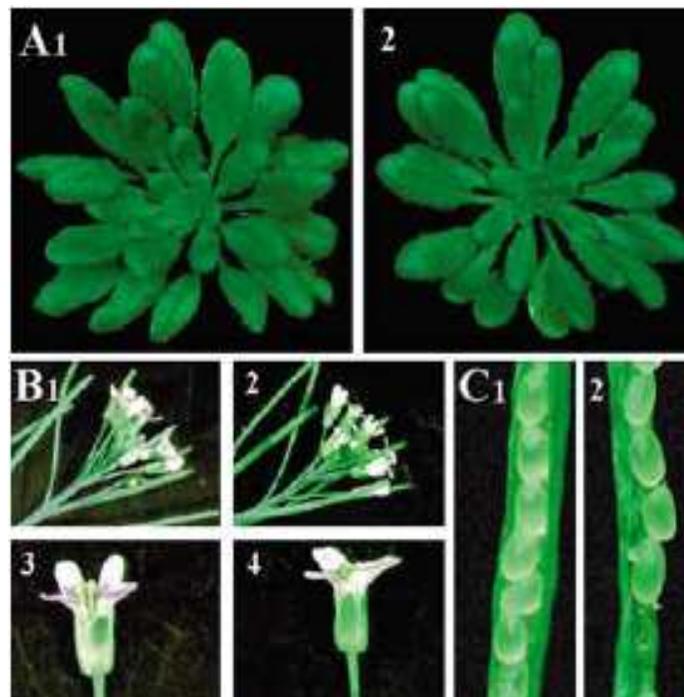


**Figura 2.12** Diagrama de la región codificadora de *AteIF(iso)4E* interrumpida en el segundo exón (cuadros oscuros) por la inserción del transposón *Spm*. (Duprat 2002).

Duprat *et al* (2002) obtuvieron una mutante homóciga nula del factor eIF(iso)4E a través de la inserción del elemento defectuoso *dSpm* (un transposón) en el segundo exón de la secuencia que codifica a eIF(iso)4E (figura 2.12). Este

transposón impide la síntesis de eIF(iso)4E y posee, como marcadores de selección, genes para la resistencia al herbicida BASTA y espectinomycin.

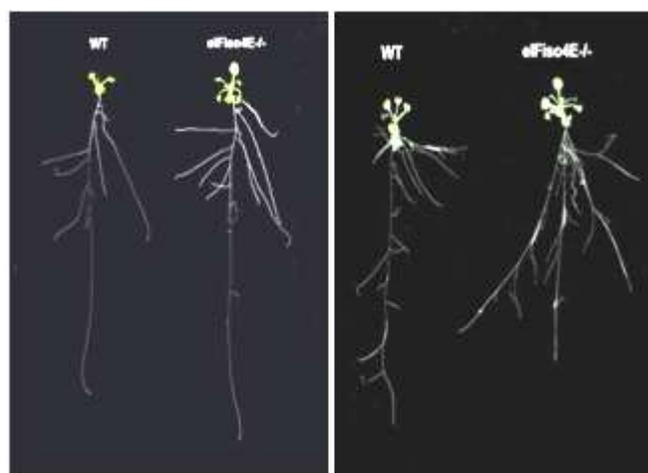
Esta mutante no presenta un fenotipo diferente evidente respecto a plantas silvestres (WT), bajo condiciones normales de crecimiento (figura 2.13). El desarrollo de la roseta, de inflorescencias, de flores, silicuas y la generación de semillas viables no se ve alterado por esta mutación. La ausencia de un fenotipo evidente y los reportes previos que indican un crecimiento más lento en la complementación con eIF(iso)4E de *S. cerevisiae* carente de eIF4E (Rodríguez *et al*, 1998) podrían sugerir funciones redundantes para este factor; sin embargo, la distribución diferencial tanto de mRNA como de proteínas observada en la figura 2.11 y los distintos patrones estudiados de traducción de mensajeros *in vitro* (Sánchez de Jiménez *et al*, 2005) sugieren una función particular para eIF(iso)4E.



**Figura 2.13** Fenotipo de la mutante eIF(iso)4E  $-/-$ . Los números impares representan plantas WT y los pares a la línea mutante nula. No se observan diferencias significativas en roseta, número de hojas, inflorescencias y ambas líneas generan semillas viables (Duprat *et al*, 2002).

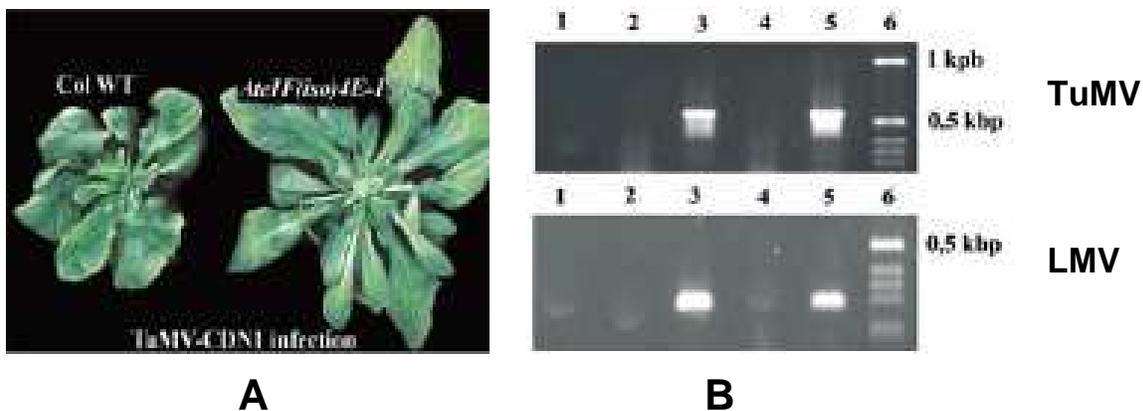
Con el objetivo de encontrar saber si eIF(iso)4E tiene una función específica, en el laboratorio se han realizado estudios en la mutante nula de eIF(iso)4E. Se compararon los fenotipos de plantas eIF(iso)4E  $-/-$  y WT bajo diferentes condiciones. Los resultados mostraron que la mutante nula presenta una raíz principal de mayor longitud, con 1 cm respecto a WT (ver figura 2.14), bajo condiciones normales, condición que se revierte en deficiencia de fósforo. Adicionalmente, se probaron condiciones de deficiencia de otros nutrientes con lo que se confirmó que el efecto es debido a la ausencia de fósforo (Martínez, 2008, no publicado).

Análisis hechos por microarreglos en RNA total y RNA polisomal han demostrado que un conjunto de 80 mRNAs disminuyen su traducción en la mutante de eIF(iso)4E (Martínez, 2008, no publicado). En contraste, también se encontró un grupo de 48 mensajeros que vieron incrementada su traducción, probablemente, por la sobre expresión del factor eIF4E que se presenta en la línea mutante nula (Duprat *et al*, 2002). Los mRNAs afectados no pertenecen específicamente a alguna vía metabólica o tejido de la planta, aunque un elevado porcentaje de los que disminuyeron su traducción se expresan diferencialmente en raíz (Martínez, 2008, no publicado).



**Figura 2.14** Longitud de la raíz principal de plántulas eIF(iso)4E  $-/-$  y WT de 20 días de edad bajo condiciones normales y en deficiencia de fósforo. Las plantas mutantes eIF(iso)4E  $-/-$  presentan un crecimiento en promedio de 1cm extra comparado con plantas WT (Martínez, 2008).

El equipo de Duprat (2002) encontró que la mutante eIF(iso)4E  $-/-$  es resistente a la infección de los potyvirus (virus de RNA de cadena sencilla, sentido positivo, con la proteína VPg enlazada al extremo 5' UTR en la lugar de poseer la estructura 5' cap) TuMV y LMV (figura 2.15). Existen varios reportes que describen interacciones entre la proteína VPg de varios potyvirus y el factor de inicio eIF4E, o su isoforma eIF(iso)4E, tanto en sistemas de doble híbrido, como en determinaciones de las constantes cinéticas (Miyoshi *et al*, 2008; Robaglia y Caranta, 2006).



**Figura 2.15** Ensayos de infección con potyvirus (TuMV y LMV) en plantas WT y eIF(iso)4E $-/-$ . **A)** Las plantas silvestres presentan síntomas evidentes de infección por potyvirus, las plantas homocigas nulas no. **B)** Detección de RNA viral a 15 dpi de los potyvirus TuMV y LMV en hojas locales y sistémicas de plantas infectadas. Carril 1: control sin RNA; carril 2: hojas locales WT inoculadas con agua; carril 3: RNA de hojas sistémicas WT infectadas; carril 4 RNA de hojas locales eIF(iso)4E  $-/-$  inoculadas; carril 5: RNA de hoja local de plantas WT inoculadas; carril 6: marcador de pesos moleculares. (tomado de Duprat *et al*, 2002).

El rol bioquímico preciso de eIF(iso)4E y de otros factores de inicio, en la infección de potyvirus, no ha sido definido. Hasta el momento, se han planteado las siguientes hipótesis:

1) La VPg podría funcionar mimetizando las funciones de 5' cap, reclutando en el RNA viral la maquinaria del inicio de la traducción; sin embargo, se sabe que la región 5' UTR de TuMV soporta el inicio de la traducción a través de IRES (Carrington y Freed, 1990).

2) La interacción VPg-eIF(iso)4E podría jugar también un papel importante en la replicación del genoma. En el modelo de la replicación de los picornavirus, la VPg uridilada funciona como oligonucleótido para la síntesis de la cadena complementaria. eIF4E, a través de la interacción con eIF4G, se encuentra cercano a PABP, así la VPg, que actuaría como oligonucleótido, podría estar posicionada cerca del tracto de la poli A viral y, a través de su interacción con eIF4E, facilitar el inicio de la replicación de RNA. En apoyo a este modelo, la uridilación por la polimerasa viral N1b ha sido demostrada y también la existencia de complejos conteniendo a VPg, N1b, eIF4E y PABP (Herold y Andino, 2001).

3) Una tercera hipótesis ha sido propuesta, en la cual se plantea que eIF(iso)4E podría favorecer el movimiento célula a célula del virus (Robaglia y Caranta, 2006). En apoyo a esta última hipótesis, en nuestro laboratorio se ha encontrado que las mutantes eIF(iso)4E -/- permiten la traducción activa del RNA viral del potyvirus TEV, pero no su movimiento célula a distancia, razón por la cual siguen investigándose los posibles funciones que pueda ejercer el factor eIF(iso)4E en el movimiento viral (Contreras, 2008).

### **2.9 Transformación de *A. thaliana* por inserción de T-DNA con *Agrobacterium tumefaciens***

El proceso de transformación genética es un evento que se presenta en forma natural en algunos seres vivos y origina cambios importantes en sus características. Los procesos de infección viral y la resistencia adquirida de las bacterias son ejemplos muy claros. Sin embargo, un proceso también común es la transferencia y transformación genética llevada a cabo por las bacterias del género *Agrobacterium* (*A. rhizogenes*, *A. tumefaciens* y *A. vitis*) sobre organismos eucariontes, específicamente plantas y algunos hongos. Este grupo de bacterias pertenece a la familia Rhizobiaceae, donde también se incluyen *A. rhizobium* y *Phyllobacterium*. *Agrobacterium* sp. abarca bacterias patógenas, gram-negativas, no esporulantes, móviles, que crecen en el suelo. Inicialmente, estas bacterias

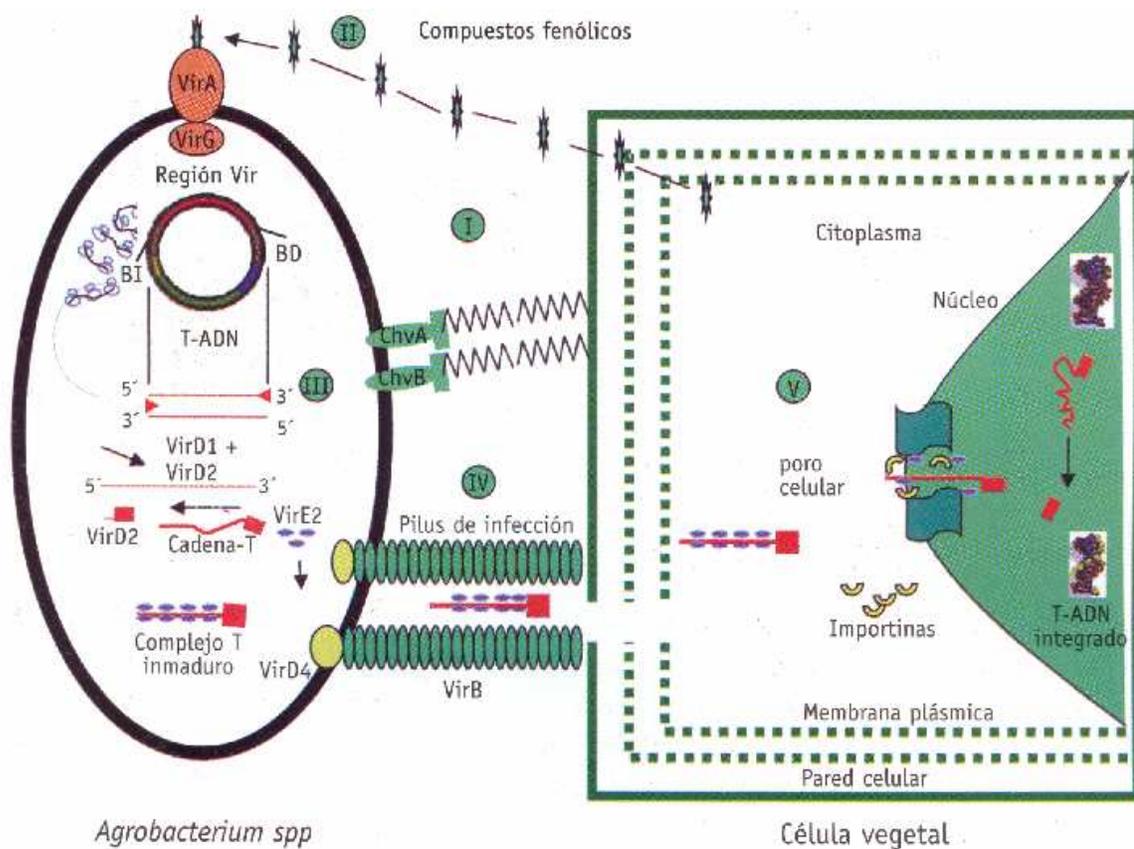
fueron conocidas por su capacidad de provocar tumores en plantas, pero estudios moleculares, por su parte, demostraron que estas bacterias son únicas por su habilidad de transferir material genético entre especies de diferentes reinos, en este caso, entre procariontes y plantas. Esta característica es utilizada comúnmente como herramienta biotecnológica para la introducción de material genético en *Arabidopsis thaliana*, como se realizó en este trabajo también.

Las *Agrobacterium sp*, además de su cromosoma circular, poseen un plásmido extracromosomal con un tamaño aproximado de 200 kb, el cual, por ser responsable de los efectos oncogénicos, se ha denominado plásmido Ti (*Tumor inducing*, inductor de tumores). Este plásmido contiene una secuencia de DNA llamada T-DNA (*Transferred DNA*, DNA transferido), que está delimitada hacia ambos extremos por una franja repetida de 25 pares de bases, de un tamaño aproximado de 35 kb. La información genética transferida incluye genes para la síntesis de metabolitos útiles para la bacteria (opinas: octopina, nopalina, cucumopina, agropina, succinamopina, entre otros) y síntesis de fitorreguladores. En otra parte del plásmido, se encuentran los genes *virA* y *virG*, cuyos productos intervienen en la transducción de señales de la bacteria.

El proceso de transferencia de T-DNA se describe a continuación (Chi Manzanero *et al*, 2004): en el momento en que la planta sufre daño mecánico, las células del área dañada liberan una serie de compuestos fenólicos (acetosiringona principalmente), los cuales son detectados por *A. tumefaciens*, que le indican el sitio de posible invasión y posterior infección, como se ilustra en la figura 2.16. Posteriormente, los compuestos fenólicos interactúan con VirA, la cual se autofosforila y actúa sobre la proteína citoplásmica VirG, fosforilándola. A su vez, ésta modula la expresión de los genes de virulencia de la bacteria, el operón *Vir*, ubicado en el plásmido Ti (figura 2.16, etapa II). Luego se genera una cadena sencilla de T-DNA por la acción de las nucleasas VirD2 y VirD1, las cuales cortan y relajan la doble cadena, generando una hebra complementaria. La proteína VirD2 se une a la hebra T en su extremo 5', mientras que un conjunto de proteínas

VirE2 se unen al resto de la hebra. Estos tres elementos conforman el complejo de transferencia (figura 2.16, etapa III).

En el caso específico de *A. tumefaciens*, el *pilus* de infección, estructura en forma de filamento que se proyecta de la superficie de la bacteria hacia el exterior y que la comunica con la célula vegetal, está formado por las proteínas VirB2 y VirB5, así como por otras proteínas, principalmente VirB4 y VirB11, con actividad de ATPasa. Otras proteínas involucradas son VirB6, VirB7 y VirB9, que forman un canal de transporte en la membrana celular bacteriana (figura 2.16, etapa IV).



**Figura 2.16** Modelo del proceso de infección de células vegetales por *Agrobacterium tumefaciens*. Etapa I, percepción de compuestos fenólicos y adhesión de la bacteria a la pared celular. Etapa II, modulación de la expresión de los genes de virulencia de la bacteria. Etapa III, formación del complejo de transferencia de T-DNA. Etapa IV, formación de un canal de transporte en la membrana celular bacteriana. Etapa V, integración del T-DNA al genoma de la célula vegetal (tomado de Chi Manzanero, 2004).

La entrada del complejo de transferencia del T-DNA es facilitada por las proteínas VirD2 y VirE2, que poseen señales de localización nuclear que permiten dirigirlos y transportarlos al núcleo (figura 2.16, etapa V). Una vez dentro, el complejo es liberado de estas proteínas, probablemente a través del complejo SCF<sub>virF</sub> ubiquitina. El T-DNA después es procesado por la maquinaria de reparación de DNA de la célula vegetal, para convertirlo en un intermediario de doble cadena y ser reconocido por proteínas como la histona H2A (Mysore *et al.*, 1998), la histona H3 (Anand *et al.*, 2007) y KU80 (Li *et al.*, 2005) quienes lo integran al cromosoma de la planta (Anand *et al.* 2007).

La transformación de *Arabidopsis thaliana* por la inserción de T-DNA ha sido ampliamente utilizada para generar colecciones de líneas transgénicas. La metodología más sencilla es la reportada por Clough y Bent (1998), en la cual se sumergen los botones florales de la planta en suspensiones de *A. tumefaciens* modificados con algún vector de interés. Es fundamental aclarar que la inserción de este T-DNA en el genoma de la planta se realiza de manera aleatoria, debido a que no es posible controlar la integración del mismo al cromosoma. Por estas razones, es muy importante conocer la región de inserción, para lo cual se han desarrollado técnicas como la descrita por Malley *et al.*(2007), en la que se realiza una digestión exhaustiva del DNA genómico con enzimas de restricción, una ligación con adaptadores, una amplificación por PCR utilizando oligonucleótidos específicos del T-DNA y de algún adaptador, y una posterior secuenciación del fragmento amplificado.

## HIPÓTESIS

Si la regulación de mRNAs mediada por eIF(iso)4E desempeña alguna función particular dentro del ciclo de vida de *Arabidopsis*, entonces, al sobre expresar esta proteína en las plantas silvestres, se observará reversión de los efectos detectados en ausencia de la misma (fenotipo de raíz principal, selectividad de la traducción de algunos mensajeros y resistencia a la infección por potyvirus) y los efectos directos e indirectos de este factor se verán aumentados.

## OBJETIVO GENERAL

Expresar elFiso4E bajo el promotor 35S y fusionado a la proteína verde fluorescente (GFP) en plantas de *A. thaliana* silvestres y mutantes para eIF(iso)4E.

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Amplificar por RT-PCR el fragmento de cDNA que codifica para el factor eIFiso4E, y purificarlo.
2. Preparar vectores adecuados que contengan el gen que codifica para elFiso4E-GFP bajo el promotor 35S, y realizar la transformación de *A. tumefaciens*.
3. Transformar plantas de *A. thaliana* mediante cultivos de *A. tumefaciens* modificados.
4. Corroborar a nivel DNA, RNA y proteína la transformación genética de las plantas.
5. Estudiar el fenotipo de las plantas transgénicas obtenidas.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL BIOLÓGICO VEGETAL

##### 3.1.1 Semillas de *Arabidopsis thaliana*

Para la elaboración de este proyecto, se utilizó la planta *Arabidopsis thaliana*, ecotipo Columbia (Col-0), tanto para plantas silvestres (WT) como mutantes. La mutante homociga nula de *AtELF(iso)4E* que se adquirió, presenta inserción de un transposón en el segundo exón de la región codificadora de *AtELF(iso)4E* (ver figura 2.12), impidiendo la síntesis del factor *ELF(iso)4E* (Duprat 2002).

Durante el desarrollo de este trabajo también se han generado líneas transgénicas, cuyas características se detallarán a fondo en la sección de resultados.

##### 3.1.1.1 Siembra de semillas en tierra. Condiciones de cultivo

Para sembrar semillas en tierra, se preparó una mezcla de sustratos Metromix 200, humedecida con agua destilada, y se repartió en macetas pequeñas de plástico. Las semillas se esparcieron sobre la mezcla de sustratos y se colocaron en oscuridad a 4 °C por 48 horas (vernalización). Posteriormente, se llevaron al invernadero a 22 °C bajo cualquiera de los dos fotoperiodos disponibles: día corto (16 horas oscuridad y 8 horas de luz) para favorecer la formación de la roseta, o día largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) para la rápida formación de inflorescencias. Las macetas se cubrieron por 2 semanas con un domo de plástico para favorecer las condiciones de humedad. Después se retiró el domo y se agregaron 5 unidades del fertilizante Osmocote® 13:13:13 por maceta. Las plantas fueron regadas cada dos días con agua potable.

Durante la floración se colocó una cubierta de celofán en cada planta, impidiendo la entrada de polen extraño y la contaminación vía la modificación del fondo genético, asegurando así la autofecundación. Cuando las silicuas (frutos) se formaron, se dejaron secar las plantas por una semana para poder colectar las semillas, que fueron conservadas en tubos Eppendorf estériles, a 4° C, hasta su nuevo uso.

### **3.1.1.2 Esterilización y siembra de semillas en medio Gamborg's B-5 sólido**

La esterilización de semillas para siembra en medio sólido debe realizarse en una campana de flujo laminar. Primero, las semillas se colocaron en un tubo Eppendorf y se les agregó 1 mL de una disolución al 20 % v/v de NaClO comercial y 1 µL del tensoactivo tween 20 (c<sub>f</sub> 0.1%), se agitaron vigorosamente con ayuda de un vortex por 20 minutos. Los tubos con semillas se centrifugaron por 10 segundos en una picofuga y se eliminó el sobrenadante. Luego se les agregó 1 mL de la disolución de NaClO al 20%, se agitó vigorosamente por 10 minutos y se eliminó el sobrenadante. Las semillas se enjuagaron 5 veces con 1 mL de H<sub>2</sub>O estéril para eliminar completamente el NaClO y el Tween 20. Después, las semillas se resuspendieron en 1 mL de H<sub>2</sub>O.

Las semillas esterilizadas fueron sembradas en cajas Petri con medio Gamborg's B-5 (3.2 g/L de polvo Gamborg's B-5 de Sigma-Aldrich®; 1 % p/v sacarosa, pH 5.3 ajustado con disolución 10 mM KOH, 1.5 % p/v agar bacteriológico) y los marcadores de selección apropiados (kanamicina o BASTA, concentraciones finales 50 µg/mL ó 50 µM, respectivamente, esterilizados previamente por filtración), cuando fue necesario. Las cajas con las semillas se cubrieron con papel aluminio y se mantuvieron a 4 °C por 48 horas (vernalización). Después las placas se colocaron en cámaras de

crecimiento bajo fotoperiodo de día corto por tres semanas, luego de lo cual se transplantaron las plántulas a macetas con la mezcla de sustratos Metromix 200 y se colocó el domo por una semana, para tener altas condiciones de humedad.

### 3.1.1.3 Siembra de semillas en medio líquido. Condiciones de cultivo

La siembra de semillas en medio líquido tiene como finalidad facilitar la recolección de la raíz en comparación a como puede hacerse en medio sólido

Primeramente, se esterilizaron las semillas como se indicó en la sección 3.1.1.2, y se colocaron aproximadamente 30 semillas en frascos de vidrio con 25mL de medio Gamborg's B-5 líquido y se incubaron por dos semanas en fotoperiodo de día largo con agitación de 100 rpm.

## 3.2 MATERIAL BIOLÓGICO BACTERIANO

### 3.2.1 *Escherichia coli*

Tabla 3.1 Cepas de *E. coli* utilizadas.

Cepa	Genotipo	Uso	Referencia
DH5 $\alpha$	F- $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK-, mK+) <i>phoA supE44</i> $\lambda$ - <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	Producción de plásmidos pGEM-AtelF(iso)4E, pHBT- AtelF(iso)4E y pBIN- AtelF(iso)4E	Hanahan (1983)
DB3.1	F- <i>gyrA462 endA1</i> $\Delta$ ( <i>sr1-recA</i> ) <i>mcrB</i> <i>mrr hsdS20</i> (rB-, mB-) <i>supE44 ara-14</i> <i>galK2 lacY1 proA2 rpsL20</i> (SmR) <i>xyI-5</i> $\lambda$ - <i>leu mtl1</i>	Producción de vector pEarleyGate 103	Hanahan (1983)
TOP10	F- <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74 recA1</i> <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>araleu</i> ) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Producción de plásmidos AtelF(iso)4E-TOPO y pEarley-AtelF(iso)4E	Invitrogen®

Las cepas utilizadas para la producción de plásmidos han sido DH5 $\alpha$ , DB3.1 y TOP10, cuyas características más importantes se resumen en la tabla 3.1.

### 3.2.2 *Agrobacterium tumefaciens*

La cepa utilizada para la eficiente transformación de *A. thaliana* es *A. tumefaciens* Pvg2260/c58, resistente a rifampicina (Woods *et al*, 2001).

### 3.2.3 Cultivos en medio líquido

*E. coli* se cultivó a 37 °C, con agitación de 200 rpm, en medio LB líquido (1 % p/v bactotripton, 0.5 % p/v extracto de levadura, 0.25 M NaCl, pH 7.0) con los marcadores de selección de acuerdo al plásmido con el que las bacterias hayan sido transformadas. El tiempo de incubación depende de la densidad óptica que se desea alcanzar; normalmente este tiempo fue de 12 horas para aislamiento de plásmidos.

**Tabla 3.2** Concentraciones de uso de antibióticos y otros compuestos añadidos a cultivos bacterianos.

Compuesto	Concentración de uso
X-gal	0.1 mM
IPTG	40 $\mu$ g/mL
Ampicilina	100 $\mu$ g/mL
Kanamicina	50 $\mu$ g/mL
Rifampicina	100 $\mu$ g/mL

*A. tumefaciens* se cultivó en medio YM líquido (54.88 mM D-manitol, 0.04 % p/v extracto de levadura, 2.5 mM NaCl, 1.15 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>) con los marcadores de selección apropiados. Las condiciones de crecimiento fueron 28 °C por 72 horas con agitación de 200 rpm. También, es posible cultivarse en medio LB con los marcadores de selección. La cepa utilizada es resistente a rifampicina, por lo que se añadió este antibiótico en todo cultivo de esta bacteria.

### 3.2.4 Cultivos en medio sólido

Los cultivos en medio sólido se prepararon utilizando medio LB o YM con 1 % p/v de agar bacteriológico, junto con los marcadores de selección apropiados. Las condiciones de crecimiento fueron 37 °C por 24 horas y 28 °C por 72 horas para *E. coli* y *A. tumefaciens*, respectivamente.

## 3.3 MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA

### 3.3.1 Plásmidos utilizados

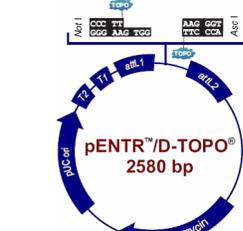
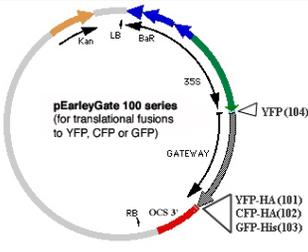
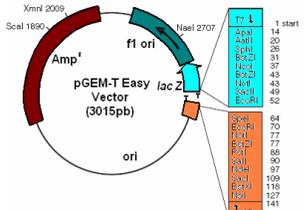
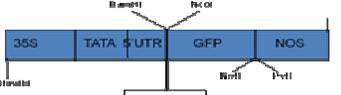
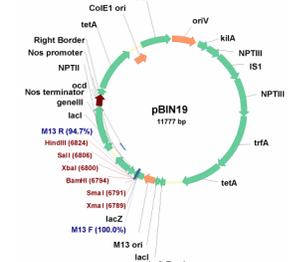
Los plásmidos que han sido utilizados en el desarrollo de este proyecto, no construidos durante la realización del mismo, y sus características más relevantes se resumen en la tabla 3.3.

### 3.3.2 Extracción de plásmidos a partir de cultivos bacterianos.

#### 3.3.2.1 Lisis alcalina por el método de Birnboim y Doyle

Esta metodología ha sido empleada para la extracción de plásmidos de *E. coli* y *A. tumefaciens* crecidos en medio líquido. Primero se centrifugaron cultivos bacterianos crecidos por toda la noche a 3000 rpm por 5 minutos. El botón bacteriano se resuspendió en 100 µL de la disolución 1 (50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0), y se agregaron 200 µL de la disolución 2 fresca (0.2 M NaOH, 34.67 mM SDS) para lisar las células, se mezcló por inversión, y se incubó 5 minutos en hielo. Se agregaron 150 µL de la disolución 3 fría (3 M acetato de potasio, 0.2 M ácido acético, pH 4.8) para

Tabla 3.3 Plásmidos utilizados.

Plásmido	Características	Mapa
pENTR /D-TOPO® (Invitrogen)	Vector para clonación de fragmentos originados por PCR y generar clona entrante Gateway®. Resistencia a kanamicina.	
pEarleyGate103	Vector destino Gateway® para transformar plantas. Fusión a promotor 35S. Fusión a proteína reportera GFP. Resistencia a kanamicina en bacterias, resistencia a glufosinato de amonio en plantas.	
pGEM T-Easy® (Promega)	Vector para clonación, por apareamiento con timinas libres, de fragmentos originados por PCR. Resistencia a ampicilina.	
pHBT	Vector para fusión a proteína reportera GFP. Promotor 35S. Resistencia a ampicilina	
pBIN19	Vector binario para transformación de plantas (sitios LB y RB). Fusión a promotor 3X35S. Resistencia a kanamicina en plantas y bacterias	

precipitar proteínas y DNA genómico o cromosomal, y se mezcló, tras lo cual se colocó 10 minutos en hielo. Los tubos se centrifugaron a 14000 rpm por 10 minutos a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se agregaron 40 µL de disolución de Tris-HCl 1 M pH 8.0. El plásmido se extrajo agregando 400 µL de una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (24:24:1), y agitando en vortex por 15 segundos. Las fases se separaron centrifugando por

dos minutos a 14000 rpm y se transfirió la fase acuosa (superior), que contenía al plásmido, a un tubo nuevo.

El DNA se precipitó añadiendo 1 mL de EtOH absoluto frío, se incubó a temperatura ambiente por diez minutos y luego se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se decantó y se lavó el pellet con EtOH al 80 % v/v. Finalmente, se eliminó el EtOH al 80 % y el pellet se resuspendió en 40 µL de H<sub>2</sub>O-DEPC. Se añadieron después 3 µL de RNAsa A, incubando a 37 °C por 30 minutos, con el propósito de eliminar RNA. El DNA plasmídico se conservó a -20 °C hasta el momento de usarse.

### 3.3.2.2 Extracción de plásmidos con alta pureza

La extracción empleando el kit **Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System** de Promega® se realizó para obtener altos niveles de concentración y pureza del plásmido a aislarse. Primero, se centrifugaron cultivos crecidos por toda la noche por 5 minutos a 3000 rpm. Luego, se resuspendió el pellet formado en 250 µL de la solución de resuspensión celular, con ayuda del vórtex. Se agregaron 250 µL de la disolución de lisis celular a cada muestra y se mezclaron perfectamente los tubos por inversión. Luego se agregaron 10 µL de la disolución de proteasa alcalina y se centrifugó por 10 minutos a 13200 rpm a temperatura ambiente.

Por otro lado, se insertó una columna en un tubo de recolección y se decantó el lisado claro, producto de la centrifugación, dentro de la columna. Se centrifugó nuevamente a 13200 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente y se eliminó el líquido residual. La columna se lavó dos veces con 500 µL de la disolución de lavado y se centrifugó a 13200 rpm por 2 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se colocó la columna en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se eluyó el plásmido con 40 µL de agua libre de nucleasas, centrifugando a

13200 rpm por 1 minuto. El DNA extraído se almacenó a -20 °C hasta utilizarse.

### **3.3.3 Extracción y purificación de DNA total de hoja, plántula y raíz de *A. thaliana***

Este procedimiento se realizó utilizando el kit PUREGENE® DNA Purification Kit de Gentra Systems®. Primero, se pulverizó el tejido (100 mg) con nitrógeno líquido, en un tubo Eppendorf y con ayuda de un pistilo estéril. Luego, se agregaron 600 µL de la disolución de lisis celular y se mezcló en vortex por 5 segundos. El lisado celular se incubó a 65 °C por 60 minutos, invirtiendo el tubo cada 30 minutos para homogenizar la muestra.

A cada tubo se le añadieron 3 µL de la disolución de RNasa A, y se incubó a 37 °C por 15 minutos. Los tubos luego se enfriaron a temperatura ambiente, y se agregaron 200 µL de la disolución de precipitación de proteínas, tras lo cual se mezcló en vortex por 20 segundos. Los tubos se incubaron en hielo por 15 minutos y fueron centrifugados a 14000 x *g* por 3 minutos. Las proteínas precipitadas formaron un pellet verde. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf con 600 µL de isopropanol absoluto, se mezcló por inversión 50 veces y luego se centrifugó a 14000 x *g* por 1 minuto. En este punto, el DNA fue visible como un pellet blanco o ligeramente verde. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el pellet por inversión sobre una toalla por 2 minutos, luego se lavó con 600 µL de EtOH al 80 % v/v, tras lo cual se centrifugó nuevamente a 14000 x *g* por 1 minuto. El pellet se dejó secar sobre una toalla de papel. Finalmente, se agregaron 40 µL de la solución de hidratación y se incubó por 10 minutos a 65 °C. El DNA extraído se conservó a -20 °C hasta el momento de ser utilizado.

### **3.3.4 Cuantificación de DNA**

La cuantificación de DNA se llevó a cabo utilizando un espectrofotómetro UV-Visible, midiendo el valor de absorbancia a 260 nm. Se utilizó una celda especial de cuarzo, en donde se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de una dilución 1:100 de la disolución concentrada de DNA y, tomando como blanco agua estéril, se aplicó la siguiente ecuación:

$$[\text{DNA}] = A_{260\text{nm}} \times 50 \mu\text{g/mL}$$

También es importante considerar la lectura a 280 nm (proteínas) y el cociente  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ , cuyo valor está relacionado con la pureza del DNA, que es óptima si este coeficiente es mayor a 2.

### **3.3.5 Electroforesis de DNA en geles de agarosa**

Para analizar DNA genómico total o plásmidos por electroforesis, se prepararon geles con diferentes concentraciones de agarosa en buffer 0.5 X TBE (44.5 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 44.5 mM ácido bórico, pH 8.0), de acuerdo al tamaño de las bandas que esperan observarse, y se añadió bromuro de etidio para obtener una concentración final de 0.5  $\mu\text{g/mL}$ . Las muestras analizadas contenían un volumen de buffer de carga (glicerol 50 % v/v, 1 mM EDTA, 0.25 % p/v azul de bromofenol, 0.25 % p/v xilencianol) equivalente a la décima parte del volumen total de la muestra. También, se incluyó el marcador adecuado de pesos moleculares (TrackIt 1kb DNA Ladder® ó TrackIt 100bp DNA Ladder®, ambos de Invitrogen®). El buffer de corrida fue la disolución 0.5 X de TBE. La electroforesis se llevó a cabo en cámaras de electroforesis horizontal, Mini-Sub® Cell GT de BIO-RAD, con un voltaje que puede variar entre los 50 y 90 V, de acuerdo con la velocidad deseada de corrida.

### **3.3.6 Amplificación de fragmentos de DNA por PCR**

La técnica de PCR sirve para sintetizar millones de copias de un fragmento de DNA determinado sin necesidad de clonarlo, flanqueando los extremos con iniciadores específicos. Las reacciones realizadas constaron de volúmenes de 15  $\mu\text{L}$  que contienen las siguientes cantidades de reactivos: 1.5  $\mu\text{L}$  Buffer de PCR 10X, 0.3  $\mu\text{L}$  dNTPs 10 mM, 0.45  $\mu\text{L}$   $\text{MgSO}_4$  50 mM, 0.3  $\mu\text{L}$  oligonucleótido Fw 10  $\mu\text{M}$ , 0.3  $\mu\text{L}$  oligonucleótido Rv 10  $\mu\text{M}$ , 0.2  $\mu\text{L}$  Platinum® *Taq* DNA Polimerasa (Invitrogen®) 5 U/ $\mu\text{L}$  y 1  $\mu\text{L}$  de una dilución 1:10 de DNA genómico o plasmídico.

De manera general, primero se sometió el DNA a una desnaturalización de 5 minutos a 94 °C, para luego dar inicio a los 30 ciclos que fueron de 30 segundos a 94 °C para desnaturalización del DNA, 1 minuto a 61 °C para el apareamiento de oligonucleótidos con el DNA, 1 minuto a 72 °C para la extensión por la *Taq* polimerasa. Después de estos 30 ciclos, 1 minuto adicional a 72 °C y finalmente la reacción se detuvo a 4 °C. Los ciclos se llevaron a cabo en un termociclador (Mastercycler gradient de Eppendorf®). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa. Los oligonucleótidos empleados para PCR se resumen en la tabla 3.4.

### **Amplificación de fragmentos romos de DNA por PCR**

La *Taq* DNA polimerasa de Invitrogen® añade a las copias del fragmento de DNA amplificado una unidad de adenina en cada extremo. Esto puede perjudicar reacciones posteriores como es el caso de las clonaciones en vectores como pENTR D/TOPO®. Por esta razón, se utilizó el kit Expand High Fidelity<sup>PLUS</sup> PCR System de Roche® para generar copias con extremos romos. La composición de las reacciones estuvo dada por los siguientes reactivos para 50  $\mu\text{L}$ : 10  $\mu\text{L}$  Expand HiFi<sup>PLUS</sup> Reaction Buffer 5X, 1  $\mu\text{L}$  PCR Nucleotide Mix 10 mM, 1  $\mu\text{L}$  oligonucleótido Fw 10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{L}$  oligonucleótido Rv 10  $\mu\text{M}$ , 0.5  $\mu\text{L}$  (2.5 U) Expand HiFi<sup>PLUS</sup> Enzyme Blend y 2  $\mu\text{L}$  de una dilución 1:10 de DNA. El programa en el termociclador fue el mismo que el indicado arriba y los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa.

**Tabla 3.4** Secuencias de oligonucleótidos utilizados en las reacciones de amplificación PCR.

<b>Oligonucleótido</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Banda esperada</b>
pENTR-Atiso4E 1 Fw pENTR-Atiso4E 2 Rv	5'-CACCATGGCGACCGATGATGTG-3' 5'- GACAGTGAACCGGCTTCTTCTGG-3'	598 pares de bases
pENTR-AtelF4E 1 Fw pENTR-AtelF4E 2 Rv	5'-CACCATGGCGGTAGAAGACACTCCC-3' 5'-AGCGGTGTAAGCGTTCTTTGCATTCC-3'	709 pares de bases
pENTR-nCBP 1 Fw pENTR-nCBP 2 Rv	5'-CACCATGGCGGAGGTTTTGGATAGG-3' 5'-TCCTCTCAGCCATGTGTTTCTGTAGG-3'	669 pares de bases
BAR A Fw BAR B Rv	5'-ACAGCGACCACGCTCTTGAA-3' 5'-TGCACCATCGTCAACCACTA-3'	310 pares de bases
AtelF(iso)4E T1 Fw AtelF(iso)4E T2 Rv	5'-GGATCCGCGAAGAATATGGCGACCGATG-3' 5'-CATGCCATGGCAGTGAACCGGCTTCTTCTG-3'	576 pares de bases
GFP1 Fw GFP2 Rv	5'-CTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTT-3' 5'-GTAAAAGGACAGGGCCATCGCC-3'	557 pares de bases

### 3.3.7 Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa

La purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa se realizó utilizando el QIAquick Gel Extraction Kit ® de QIAGEN®. Primero, se cortó cuidadosamente la banda deseada con una navaja y se colocó dentro de un tubo Eppendorf, al cual se le agregaron 300 µL de buffer QG por cada 100 mg de muestra. Los tubos se incubaron a 50 °C por 10 minutos para disolver el gel, mezclando cada 3 minutos en vortex. Luego, se decantó la mezcla dentro de una columna QIAquick con tubo colector y se centrifugó a 13000 rpm por 1 minuto, se desechó el líquido residual y se agregaron 500 µL de buffer QG para disolver completamente la agarosa; se centrifugó nuevamente por 1 minuto a 13000 rpm. Después, se lavó la columna con 750 µL de buffer PE (EtOH añadido) y, finalmente, se eluyó el plásmido con 30 µL del buffer de elución, incubando por 1 minuto a temperatura ambiente y centrifugando por 1 minuto a 13000 rpm, cambiando el tubo colector por un tubo Eppendorf de 1.5 mL. El DNA purificado se analizó por electroforesis en gel de agarosa y se conservó a -20 °C hasta su uso.

### 3.3.8 Reacciones de restricción de DNA

La digestión de plásmidos con enzimas de restricción se llevó a cabo incubando de 500 ng a 1 µg de DNA (de 1 a 15 µL de disolución de plásmido) con 5 U de la(s) enzima(s) (1 µL por cada enzima) correspondiente(s), en un tubo con 2 µL del buffer de digestión 10 X adecuado, según las enzimas utilizadas y la cantidad de agua estéril requerida para un total de 20 µL de reacción. La digestión se incubó a 37 °C por 12 horas para asegurar un alto rendimiento de digestión. Los fragmentos producidos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa.

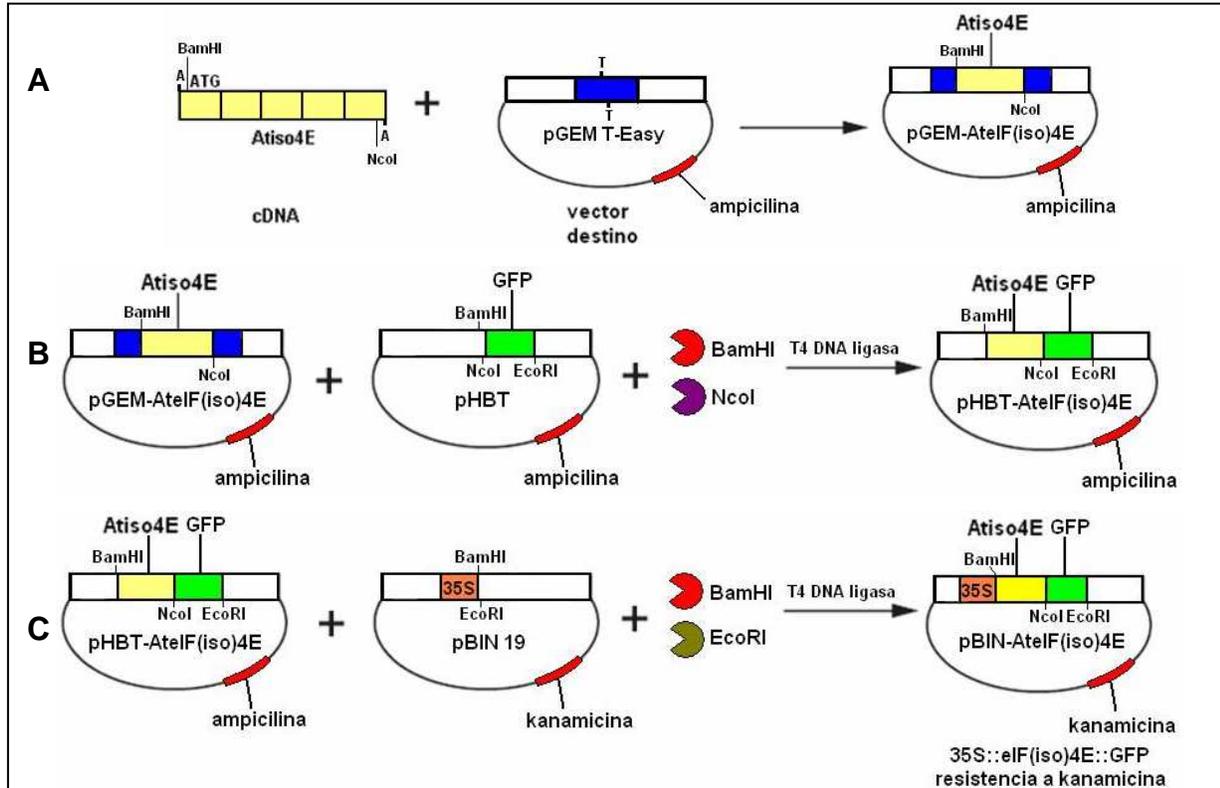
### **3.3.9 Reacción de ligación con T4 DNA ligasa**

La clonación del factor eIF(iso)4E en los vectores pHBT y pBIN19 se llevó a cabo por recombinación clásica, utilizando el Rapid DNA Ligation Kit® de Roche®. Para esta reacción se buscó una relación molar 4:1 entre inserto y vector, digeridos, previamente, con las mismas enzimas de restricción. Por cada reacción, de 21 µL, se emplearon las siguientes cantidades de reactivos: 4 µL inserto, 1 µL vector destino, 3 µL de agua estéril y 2 µL de buffer de dilución 5X, y se mezcló perfectamente por pipeteo. Luego se agregaron 10 µL de buffer de ligación T4 DNA 2X, 1 µL de T4 DNA Ligasa y se incubó a temperatura ambiente, por 12 horas. Posteriormente, se transformaron células competentes DH5α utilizando los marcadores de selección apropiados.

### **3.3.10 Clonación en vector pGEM T-Easy®. Preparación de la construcción 35S::eIF(iso)4E::GFP con resistencia a kanamicina**

La clonación del fragmento obtenido por PCR que codifica para eIF(iso)4E (ver sección 3.3.6) se realizó de manera directa en el vector pGEM-T (ver tabla 3.2), aprovechando el hecho de que la *Taq* DNA polimerasa de Invitrogen® coloca adeninas en los extremos de los fragmentos que amplifica. Utilizando los oligos T1 y T2 (ver tabla 3.4), se amplificó eIF(iso)4E y se purificó de gel de agarosa según se indicó en la sección 3.3.7.

La ligación se efectuó colocando 5  $\mu$ L de buffer de ligación 2 X, 1  $\mu$ L del vector pGEM T-Easy (50 ng), 2  $\mu$ L del inserto eIF(iso)4E, 1  $\mu$ L de T4 DNA ligasa (3 U/ $\mu$ L) y 1  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O estéril. La mezcla de reacción se incubó por 2 horas a temperatura ambiente, y con 2  $\mu$ L se transformaron células DH5 $\alpha$  según se indica en la sección 3.5.1.2, utilizando placas con medio LB y como marcador de selección ampilicina, IPTG como inductor y X-Gal como sustrato colorido de selección. Las colonias transformantes positivas eran incoloras, puesto que el inserto se introduce en el vector pGEM T-Easy interrumpiendo a *lac Z*, de tal suerte que aquellas colonias transformadas con el vector vacío serían de color azul y las que contengan a eIF(iso)4E serían blancas.



**Figura 3.1** Preparación de la construcción *35S::eIF(iso)4E::GFP* con resistencia a kanamicina en plantas. A) Inserción de *eIF(iso)4E* en pGEM T-Easy. B) Recombinación de pGEM-AtelF(iso)4E con vector pHBT para fusionar a eIF(iso)4E con GFP a través de recombinação clásica con la T4 DNA ligasa. C) Recombinación de pHBT-AtelF(iso)4E con el vector pBIN19 para fusionar a eIF(iso)4E-GFP con el promotor 35S, y transformar plantas confiriéndoles resistencia a kanamicina.

La construcción 35S::eIF(iso)4E::GFP que confiere resistencia a kanamicina se concretó mediante reacciones de restricción y ligación como se mostró en las secciones 3.3.8 y 3.3.9, clonando primero en el vector pHBT para fusionar a eIF(iso)4E con GFP, y luego en pBIN19 para transformar plantas mutantes homocigas nulas para eIF(iso)4E (ver tabla 3.3, y figura 3.1), complementando a este factor.

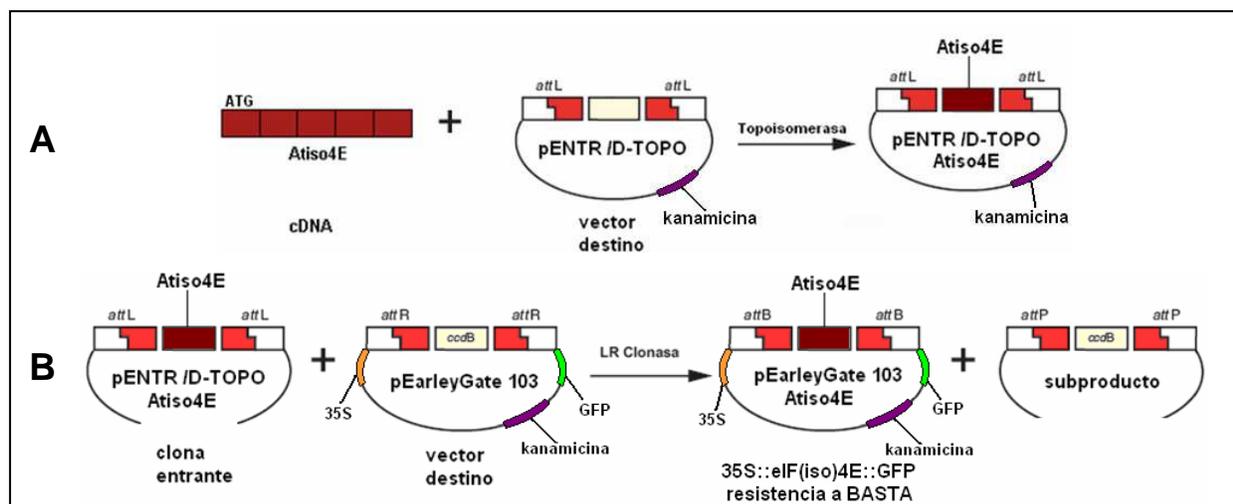
### **3.3.11 Tecnología Gateway. Preparación de la construcción 35S::eIF(iso)4E::GFP con resistencia a BASTA**

La tecnología Gateway® es un método de clonación que aprovecha las propiedades de la recombinación sitio-específica del bacteriófago  $\lambda$  para clonar un gen en un vector Gateway rápida y eficientemente. Consta de tres pasos principales: 1) generar una clona entrante con el vector TOPO®; 2) realizar una recombinación LR entre el vector entrante y el vector destino (pEarleyGate 103); y 3) la introducción de la construcción en el hospedero apropiado (*A. tumefaciens* para los intereses de este proyecto). Utilizando esta tecnología, se preparó la construcción 35S::eIF(iso)4E::GFP que confiere resistencia a BASTA (ver figura 3.2), con la cual se transformaron plantas *A. thaliana* WT, para sobre expresar así a eIF(iso)4E. El procedimiento se muestra a continuación.

#### **3.3.11.1 Clonación en vector pENTR TOPO®**

La preparación del vector entrante se realizó clonando el gen que codifica para eIF(iso)4E en el vector pENTR TOPO® de Invitrogen® (ver tabla 3.3). Primero, se amplificó *AteIF(iso)4E* de cDNA por PCR utilizando la polimerasa de alta afinidad (ver sección 3.6.1) y los oligos pENTR-Atiso4E Fw y Rv. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa y la banda deseada (550 pares de bases) se purificó del gel según se mostró en la sección 3.3.7. Fue necesario ajustar la concentración de la disolución del inserto de tal

forma que tuviera una concentración final de 1-5 ng/μL, para obtener los mejores resultados de recombinación.



**Figura 3.2** Preparación de la construcción  $35S::eIF(iso)4E::GFP$  resistente a BASTA en plantas. A) Inserción de  $eIF(iso)4E$  en pENTR D/TOPO. B) Recombinación de vector entrante pENTR-AtelF(iso)4E con vector destino pEarleyGate103. La secuencia denominada *ccdB* es letal para células no transformantes, de tal suerte que aquellas que contengan al vector pEarleyGate103 vacío no sobrevivirán.

Por cada reacción, se colocó 1 μL de producto de PCR purificado fresco, 1 μL de la disolución de sal, 1 μL de vector TOPO® y 3 μL de agua destilada estéril. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos, luego se colocó en hielo y se transformaron células competentes TOP10, de acuerdo con el método descrito en la sección 3.5.1.2, utilizando como marcador de selección kanamicina. Las colonias sobrevivientes fueron analizadas por PCR y digestiones con enzimas de restricción.

### 3.3.11.2 Reacción de recombinación LR con pEarleyGate 103

Una vez conseguido el vector entrante, se realizó la recombinación LR con el vector destino pEarleyGate 103 (ver tabla 3.1) para terminar la construcción  $35S::AtelF(iso)4E::GFP$ . Por cada mezcla de reacción, en un tubo Eppendorf de 1.5 mL se colocaron 3 μL del vector entrante AtelF(iso)4E-TOPO (50 ng/μL, previamente digerido con la enzima MluI), 1 μL vector destino pEarleyGate 103

(150 ng/ $\mu$ L) y 4  $\mu$ L de buffer TE pH 8.0. Por otro lado, la LR Clonase II enzyme Mix (Invitrogen®) se descongeló en hielo, se mezcló en vortex por 2 segundos y se agregaron 2  $\mu$ L a la mezcla de reacción, se mezcló perfectamente y se centrifugó por 10 segundos en una picofuga. Se incubó la reacción a 25 °C por una hora y luego se agregó 1  $\mu$ L de la Proteinasa K (Invitrogen®) y se incubó por 10 minutos a 37 °C, para inactivar la reacción. Finalmente, se colocó la reacción en hielo y se transformaron, con la construcción, células competentes TOP10 según se muestra en la sección 3.5.1.2. El marcador de selección fue nuevamente kanamicina.

### 3.3.12 Secuenciación de DNA

La secuenciación automática de las construcciones preparadas se realizó utilizando un secuenciador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyzer® de Perkin-Elmer Applied Biosystems, a través de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Los electroferogramas generados fueron visualizados a través del programa **Chromas LITE 2.01**, software gratuito disponible en [www.techne.lysium.com.au](http://www.techne.lysium.com.au). Las secuencias obtenidas se analizaron utilizando los programas **BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.5.3** y **BLASTP 2.2.19+**, este último disponible en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

## 3.4 MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE RNA

### 3.4.1 Tratamiento de material para manejo de RNA

Para evitar la degradación del RNA por acción de RNasas, se tomaron las siguientes medidas: los materiales de vidrio, metálicos y cerámicos empleados en el manejo de tejidos se trataron con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, lavados con agua destilada, esterilizados en autoclave (1.5 kg/in<sup>2</sup>) por 20 minutos y horneados a 200 °C por 24 horas. Las disoluciones requeridas se prepararon utilizando agua estéril conteniendo 0.1 % v/v de dietilpirocarbonato (H<sub>2</sub>O-DEPC), las puntas de

micropipetas contenían filtro y, de manera opcional, los procedimientos que involucran RNA se llevaron a cabo con un mechero encendido cerca.

### 3.4.2 Extracción y purificación de RNA

La extracción y purificación de RNA total se realizó utilizando el reactivo TRIzol®. Para ello, el protocolo es como sigue: primero, se pulverizaron perfectamente 100 mg de tejido en un mortero con nitrógeno líquido y se transfirió a tubos Eppendorf estériles. Después, se agregó 1 mL de TRIzol® a cada tubo y se mezcló perfectamente por inversión. Las muestras se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la completa disociación de complejos ribonucleoproteicos. Se agregaron 200 µL de cloroformo y se agitaron manual y vigorosamente los tubos por 15 segundos y se incubaron a temperatura ambiente por 3 minutos. Se centrifugó posteriormente a 12000 x g por 15 minutos a 4° C, con lo cual se formaron dos fases, la fase superior acuosa que contenía al RNA y una fase inferior de fenol y cloroformo, además de una interfase. La fase acuosa se transfirió a tubos nuevos y se precipitó el RNA total con 500 µL de isopropanol por cada tubo. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos y se centrifugaron a 12000 x g por 15 minutos a 4 °C, después de lo cual se observó un pellet de apariencia gelatinosa. El pellet se lavó con 1 mL de EtOH al 80 % v/v. Luego se centrifugó a 7500 x g por 5 minutos a 4 °C. Cada pellet se dejó secar por unos 2 ó 3 minutos y se resuspendió en 40µL de H<sub>2</sub>O-DEPC. Finalmente, se incubaron los tubos por 10 minutos a 55-60 °C para rehidratar el RNA y se almacenaron a -70° C hasta su uso.

### 3.4.3 Cuantificación de RNA

La cuantificación de RNA total se llevó a cabo de la misma manera que la descrita en la sección 3.3.4, salvo que el blanco es H<sub>2</sub>O-DEPC y la ecuación a utilizar es:

$$[\text{RNA}] = A_{260\text{nm}} \times 40\mu\text{g/mL}$$

Un valor superior a 2 de la relación  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  también indica óptimas condiciones de pureza.

### 3.4.4 Electroforesis de RNA en geles de agarosa

La integridad y pureza del RNA total extraído se verificó por electroforesis en geles de agarosa. Las características del gel y del buffer fueron las mismas que las indicadas en la sección 3.3.5, excepto que el agua utilizada contenía DEPC. El voltaje de corrida no excedió los 60V dada la fragilidad del RNA. En general, un RNA íntegro presenta tres bandas: 28S, 18S y t-RNA.

### 3.4.5 Síntesis de cDNA a través de la reverso transcriptasa

Utilizando como molde RNA total extraído de diversos tejidos, puede sintetizarse el DNA complementario (cDNA, sin intrones) mediante una transcripción inversa. Para 20  $\mu\text{L}$  de reacción, se colocaron en un tubo 1  $\mu\text{L}$  de oligo (dT)<sub>12-18</sub> (500  $\mu\text{g/mL}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de RNA total (1 ng-5 $\mu\text{g}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de 10 mM dNTPs y 9  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O-DEPC y se calentaron a 65 °C por 5 minutos. Luego, se centrifugó por 10 segundos en un picofuga, y se agregaron 4  $\mu\text{L}$  de buffer 5X First-Strand (Invitrogen®), 2  $\mu\text{L}$  de 0.1 M DTT y 1  $\mu\text{L}$  de RNasa OUT (inhibidor de ribonucleasa recombinante) y se incubó a 37 °C por 2 minutos, para inactivar nucleasas. Después, se agregó 1  $\mu\text{L}$  (200 U) de la enzima M-MLVRT (Invitrogen®) y se incubó por 10 minutos a 25° C, luego a 37 °C por 50 minutos y, finalmente, se inactivó la reacción a 70 °C por 15 minutos. El cDNA sintetizado puede utilizarse para realizar PCR según se describió en la sección 3.3.6 o conservarse a -20 °C, hasta su uso.

### 3.4.6 RT-PCR en un solo paso

La RT-PC en un solo paso es una reacción donde la reacción de transcripción inversa y la PCR se llevan a cabo en la misma mezcla de reacción. Se utilizó el kit Superscript One Step RT-PCR con Platinum *Taq* de Invitrogen®. Para un volumen de reacción de 12.5 µL, se colocaron las siguientes cantidades de reactivos: 6.25 µL de Buffer 2X Reaction Mix, 0.45 µL MgSO<sub>4</sub> 50 mM, 0.45 µL oligonucleótido Fw 10 µM, 0.45 µL oligonucleótido Rv 10 µM, 0.25 µL de RT/Platinum *Taq* Mix, 4.05 µL de H<sub>2</sub>O-DEPC y 1 µL de RNA (0.2 µg/µL).

Primero se sintetizó el cDNA por la reverso transcriptasa, a 50 °C, por 30 minutos, para luego dar inicio a los ciclos (de 28 a 30 según los oligonucleótidos empleados) que constaron de 30 segundos a 94 °C para desnaturalización del cDNA, 1 minuto a 61 °C para el alineamiento de oligonucleótidos con el cDNA, 1 minuto a 72 °C para la extensión por la *Taq* polimerasa. Después de estos 30 ciclos, 1 minuto adicional a 72 °C y, finalmente, la reacción se detuvo a 4° C. Los productos fueron analizados inmediatamente por electroforesis en gel de agarosa.

**Tabla 3.5** Secuencias de oligonucleótidos utilizados en las reacciones de amplificación RT-PCR.

Oligonucleótido	Secuencia	Banda esperada
18S Fw 18S Rv	5'-GGAAACTTACCAGGTCCAGACATAG-3' 5'-GTGGCCTAAACGGCCATAGTCCCTC-3'	210 pares de bases
Tub Fw Tub Rv	5'-CTCAAGAGGTTCTCAGCAGTA-3' 5'-TCACCTTCTTCATCCGCAGTT-3'	480 pares de bases
eIF4E Fw eIF4E Rv	5'-CCTGTCGAGCTTCTTCGCATCCTCATGG-3' 5'-GGCGGTAGAAGACTCCCAAATCTGTTG-3'	678 pares de bases
nCBP Fw nCBP Rv	5'-CAGGGACTCGGGAAACATGGACAGC-3' 5'-GCCGCTTGATTGAGTCTCTCAAACCCATCAC-3'	534 pares de bases

### 3.5 MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

#### 3.5.1 *E. Coli*

##### 3.5.1.1 Preparación de células competentes para transformación por choque térmico

Por este procedimiento se hicieron crecer células de *E. coli* hasta alcanzar la fase log ( $DO_{590nm} = 0.375$ ), que fueron después centrifugadas y resuspendidas en una disolución de  $CaCl_2$ , los iones  $Ca^{2+}$  facilitan la eficiente entrada de DNA extranjero a la célula.

Primero, se inocularon 50 mL de medio LB líquido sin antibióticos con una colonia de *E. coli* y se incubó a 37° C por 12 horas y agitación de 200 rpm, luego se tomaron 4 mL del cultivo y se inocularon 400 mL de medio LB líquido en un matraz de 2 L y se incubó a 37 °C a 200 rpm hasta que se alcanzó un valor de  $DO_{590nm}$  de 0.375, aproximadamente 3 horas. Posteriormente, se dividió el cultivo en 8 porciones de 50 mL y se incubó por 10 minutos en hielo, luego se centrifugaron a 1700 x g por 7 minutos, a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y el botón bacteriano se resuspendió en 10 mL de la disolución de calcio fría (60 mM  $CaCl_2$ , 15 % v/v glicerol, 10 mM PIPES, pH 7.0); luego se centrifugó a 1100 x g a 4 °C por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se agregaron 10 mL de la solución de calcio fría incubando por 30 minutos en hielo. Nuevamente, se centrifugó por 5 minutos a 1100 x g a 4 °C por 5 minutos, y se resuspendió el botón en 2 mL de la disolución de calcio fría, para luego dividir el contenido de cada tubo en alícuotas de 250  $\mu$ L y colocarlas en tubos Eppendorf de 1.5m L. Las células competentes se conservaron a -70° C hasta su uso.

### **3.5.1.2 Transformación de células competentes de *E. coli* por choque térmico**

Se descongelaron las células competentes en hielo y se les agregó de 1 a 5  $\mu$ L (10 ng) del plásmido con el cual se van a transformar y se mezcló perfectamente por inversión varias veces. Los tubos se colocaron en hielo por 30 minutos y se sumergieron en un baño de agua a 42 °C por 30 segundos, una vez hecho esto, los tubos fueron regresados al hielo. A cada tubo tratado se le agregaron 250  $\mu$ L de medio SOC (0.5 % p/v extracto de levadura, 2 % p/v bactotripton, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM  $MgCl_2$ , 10 mM  $MgSO_4$ , 20 mM

glucosa) y se incubaron a 37 °C por 1 hora a 200 rpm. Se centrifugó por 1 minuto a 3000 rpm, y se resuspendió el botón bacteriano en 100 µL del sobrenadante. Las células se plaquearon en medio LB sólido con los marcadores de selección elegidos. Las placas se incubaron a 37 °C por 24 horas.

### **3.5.2 *A. tumefaciens***

#### **3.5.2.1 Preparación de células competentes de *A. tumefaciens* para transformación por choque térmico**

Primero, se creció una colonia de *A. tumefaciens* en 10 mL de medio YM líquido a 28 °C toda la noche con agitación constante. Con 2 mL del cultivo anterior, se inocularon 50 mL de medio YM fresco y se incubó con agitación constante (200 rpm) a 28 °C hasta alcanzar una  $DO_{600nm}$  de 0.5, aproximadamente 16 horas. Se enfrió el cultivo en hielo por 10 minutos y se centrifugó a 6000 rpm por 5 minutos a 4 °C, luego se resuspendió el botón bacteriano en 1 mL de disolución de  $CaCl_2$  20 mM con glicerol al 10 % v/v y se dividió en alícuotas de 100 µL. Estas células pueden usarse inmediatamente para transformar o congelarse con nitrógeno líquido y guardarlas a -70° C. Estas células son resistentes a rifampicina.

#### **3.5.2.2 Transformación de células de *A. tumefaciens* por choque térmico**

Se descongelaron las células competentes en hielo y se les agregó 1 µL del plásmido con el que se transformó. Se congelaron las células con el plásmido en nitrógeno líquido por 5 minutos y se incubaron a 37 °C por 25 minutos. Se agregó 1 mL de medio YM sin marcador de selección y se incubó por 3 horas, a 28 °C, con agitación constante (200 rpm). Se centrifugaron las células a 13000 rpm por 30 segundos y se resuspendió el botón bacteriano en

100  $\mu$ L de medio YM y se plaquearon las células en medio YM sólido con los marcadores de selección adecuados. Las placas se incubaron a 28 °C, por 2 ó 3 días, para obtener colonias transformantes.

### **3.5.3 *A. thaliana***

#### **3.5.3.1 Preparación previa de *A. tumefaciens* y *A. thaliana* para floral dip**

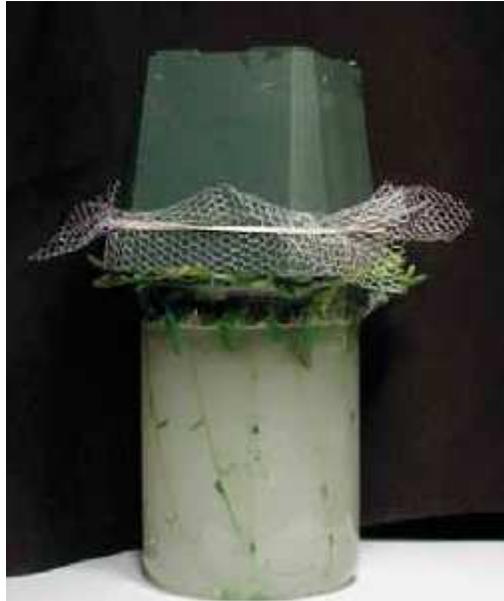
Las plantas fueron cultivadas en tierra y mantenidas en fotoperiodo de día largo hasta que la inflorescencia alcanzó 5 cm de longitud, momento en el cual se cortó para favorecer la formación de un mayor número de inflorescencias. La transformación se realizó una semana después de este corte, cuando se tenían más inflorescencias y éstas contenían botones florales aún verdes.

Por otro lado, tres días antes de la transformación, se inocularon 10 mL de medio LB líquido con una colonia de *A. tumefaciens*, conteniendo la construcción deseada, se incubó a 28 °C por 24 horas a 200 rpm, se tomaron 2 mL de este cultivo y se inocularon 200 mL de medio LB líquido con los marcadores de selección apropiados. El cultivo se incubó por 48 horas bajo las mismas condiciones de crecimiento.

#### **3.5.3.2 Transformación de *A. thaliana* por Floral Dip.**

El día de la transformación se centrifugaron los cultivos bacterianos por 20 minutos a 5000  $\times g$  y se resuspendió el botón bacteriano en 50 mL de una disolución de sacarosa al 5 % p/v , y se agregó el volumen necesario de ésta para alcanzar un valor de  $DO_{600\text{ nm}}$  de 0.8. Se añadieron 10  $\mu$ L del surfactante Silwet 77 por cada 100 mL de la suspensión bacteriana.

Posteriormente, se introdujo la planta, de forma invertida y sujetando la maceta firmemente, en la suspensión de *A. tumefaciens* por 1 minuto (ver figura 3.3). Luego, la maceta se colocó de manera lateral sobre papel absorbente, en una charola. Una vez tratadas todas las plantas, se cubrieron con un domo de plástico y se dejaron en oscuridad por toda la noche, terminado este tiempo, se llevaron al invernadero bajo fotoperiodo de día largo.



**Figura 3.3** Inmersión de los botones florales de *A. thaliana* en una suspensión de *A. tumefaciens* para la transformación por Floral Dip (tomado de Zhang *et al*, 2006).

### 3.5.3.3 Selección de semillas transformantes en tierra

La selección de semillas transformantes positivas, producto de Floral dip, en tierra es un proceso que tiene una duración aproximada de 3 semanas. Primero, en un salero se colocaron aproximadamente 200 semillas candidatas y se mezclaron con 2 g de arena fina, con la finalidad de que dichas semillas queden uniformemente esparcidas. Las semillas se colocaron sobre una superficie de aproximadamente 10x10 cm con mezcla de sustratos Metromix 200, humedecida con agua destilada. Terminado el proceso de vernalización, se llevaron las semillas al invernadero bajo un fotoperiodo de día largo y se permitió el desarrollo de las plántulas por 5 días. Concluido éste tiempo, se asperjaron las plántulas con una disolución de BASTA 30 mg/L, utilizando un

atomizador de velo fino. Se asperjaron 5 veces a intervalos de 2 días, momento en el cual las plántulas verdes y saludables eran perfectamente distinguibles de plántulas moribundas.

Fue necesario contar con controles tanto positivo (resistentes a BASTA) como negativo (WT), puesto que pueden aparecer falsos positivos como consecuencia de una aplicación inadecuada del herbicida o cuando haya una densidad muy alta de plantas en crecimiento; por otro lado, un exceso de herbicida puede afectar a las plantas transformantes y resistentes, llevándolas a la muerte.

Las plántulas resistentes al herbicida fueron trasplantadas a macetas con una mezcla de sustratos fresca y se añadieron 10 unidades del fertilizante Osmocote® 13:13:13. La progenie de las transformantes primarias también fue sujeta a selección para asegurarse de que las transformantes realmente lo fueran.

### **3.5.3.4 Selección rápida de semillas transformantes en medio sólido**

La selección rápida de semillas transformantes se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Harrison *et al* (2006; ver figura 3.4). La selección rápida en medio Gamborg's B-5 sólido se empleó para identificar transformantes en el transcurso de una semana en lugar de los 21 días que toma la identificación en tierra, debido a que algunos marcadores de selección pueden ser dañinos, incluso a plántulas transformantes positivas, bajo prolongados periodos de exposición, como es el caso del herbicida BASTA.

Primero las semillas se esterilizaron y sembraron en medio sólido con los marcadores de selección adecuados, según se indicó en la sección 1.1.2. Una vez terminado el periodo de vernalización, las semillas se colocaron por 6 horas en iluminación, luego se cubrieron por 48 horas con papel aluminio a temperatura

ambiente, y después de 24 horas bajo luz, fue posible identificar fácilmente las plántulas verdes y saludables de aquellas amarillentas y débiles (es necesario incluir controles positivo y negativo). En este punto, las plántulas transformantes positivas fueron trasplantadas a placas nuevas con medio Gamborg's B-5 sólido, o bien a frascos con medio Gamborg's B-5 líquido, en cualquier caso sin marcadores de selección.



**Figura 3.4** Línea de tiempo de comparación de métodos de selección de transformantes positivos. Selección en tierra y selección rápida (Modificado de Harrison *et al*, 2006).

### 3.6 EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

#### 3.6.1 Extracción de proteínas totales

La extracción de proteínas se hizo de plántulas de *A. thaliana* crecidas en medio Gamborg's B-5 líquido por dos semanas, con el objetivo de que se tuviera una mayor proporción de raíces, en donde la cantidad de factores de traducción es elevada en comparación con otros tejidos de la planta. Las plántulas se sacaron del medio y se secaron cuidadosamente con una toalla de papel. Luego, se pulverizaron 5 g de plántulas en nitrógeno líquido y se resuspendió el polvo en 25 mL del buffer de extracción <sup>7</sup>m-GTP A (100 mM KCl, 20 mM HEPES, 0.21 mM EDTA, 2 mM PMSF, 0.5 mM DTT, 50 % v/v glicerol) con inhibidor de proteasas (se agregó una tableta de cOmplete TM EDTA-free® de Roche® por cada 50 mL) y se mezcló en vortex, por un minuto. Luego, se centrifugó a 15000 rpm por 30 minutos a 4 °C, se extrajo cuidadosamente el sobrenadante y se colocó en otro tubo limpio, filtrando a través de 7 capas de gasa. Las proteínas totales aisladas

pueden conservarse a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , purificarse por cromatografía de afinidad o analizarse por electroforesis SDS-PAGE.

### 3.6.2 Precipitación con TCA de proteínas

La precipitación con ácido tricloroacético (TCA) tiene la finalidad de concentrar proteínas que se encuentran diluidas, como puede ser el caso de las purificadas por cromatografía de afinidad. Para esto, se descongelaron las proteínas totales y se añadieron a cada tubo  $38.4\text{ }\mu\text{L}$  de acrilamida lineal al  $0.25\text{ }\%$  p/v,  $440\text{ }\mu\text{L}$  de TCA  $20\text{ }\%$  p/v en acetona y se incubó a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  por toda la noche.

Los tubos se centrifugaron por 25 minutos a  $14000\text{ rpm}$  a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se eliminó el sobrenadante. El pellet de proteínas se lavó con  $500\text{ }\mu\text{L}$  de acetona fría y se centrifugó por 10 minutos a  $14000\text{ rpm}$ . Este lavado con acetona fría se repitió dos veces más. Luego de esto, los tubos se dejaron secar por 5 minutos en el Speed Vacuum, el pellet seco se resuspendió en  $40\text{ }\mu\text{L}$  de buffer de carga  $1\times$  ( $15.63\text{ mM}$  Tris-HCl,  $0.5\text{ }\%$  p/v SDS,  $2.5\text{ }\%$  v/v glicerol,  $1.25\text{ }\%$  v/v  $\beta$ -mercaptoetanol,  $0.0125\text{ }\%$  p/v azul de bromofenol) y se calentó por 5 minutos a  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Las proteínas se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta realizar la electroforesis SDS-PAGE.

### 3.6.3 Purificación de proteínas por unión a colas de histidina

La proteína de fusión eIF(iso)4E-GFP que confiere resistencia a BASTA en plantas fue purificada utilizando el kit MagneHis<sup>TM</sup> Protein Purification System® de Promega®. También se utilizaron plántulas de dos semanas edad crecidas en medio Gamborg's B-5 líquido.

Primero, se extrajeron las proteínas totales de  $1\text{ g}$  de plántulas, según se indicó en la sección 3.6.1 y se dividió en porciones de  $1\text{ mL}$ ; luego se agregó  $1\text{ }\mu\text{L}$  de DNasa I a cada tubo y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente con

agitación de 150 rpm; terminado el tiempo de incubación, se agregaron 30  $\mu\text{L}$  de la suspensión de partículas de Ni y 22  $\mu\text{L}$  de imidazol 1 M, se mezcló por inversión y se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente. Se capturaron las partículas de Ni en la parte inferior del tubo con una placa magnética y se eliminó el sobrenadante; luego se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de la solución de lavado (conteniendo NaCl 0.5 M), se mezcló por pipeteo, se retiró el sobrenadante y se conservó éste en un tubo Eppendorf a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  (primer lavado). Se repitió el lavado otras dos veces conservando el sobrenadante en cada caso (lavados 2 y 3). Finalmente, se agregaron 100  $\mu\text{L}$  del buffer de elución, los tubos se incubaron por 2 minutos a temperatura ambiente y se recuperó la proteína purificada presente en el sobrenadante, que se transfirió a un tubo nuevo y se conservó a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , hasta el momento de la electroforesis SDS-PAGE.

### 3.6.4 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo a través del ensayo de Lowry, con el kit Bio-Rad *DC Protein Assay*®. Primero, se prepararon tubos con 100  $\mu\text{L}$  de muestras, cinco de las cuales fueron de BSA, con concentraciones que iban desde 0.2 hasta 1.5 mg/mL para obtener una curva de calibración, y los tubos de las muestras a analizar. A cada tubo se le agregaron 500  $\mu\text{L}$  del reactivo A y se mezcló en vortex, luego se agregaron 4 mL del reactivo B a cada muestra, se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente y se leyeron los valores de absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro UV-Visible. La concentración de cada muestra se calculó utilizando la siguiente expresión:

$$[\text{Proteínas}](\text{mg} / \text{mL}) = mA_{750\text{nm}} + b$$

en donde los parámetros  $m$  y  $b$  (pendiente de la recta y ordenada al origen, respectivamente) se obtienen de la curva de calibración.

### 3.6.5 Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)

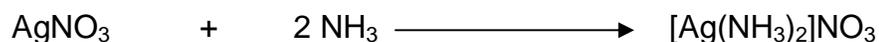
La electroforesis de proteínas se realizó en geles de acrilamida en condiciones desnaturalizantes. Primero, se prepararon geles separadores al 15 % de acrilamida (15 % p/v acrilamida, 0.32 % p/v bis-acrilamida, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 0.1 % p/v SDS) de tamaño 8x6 cm y 1 mm de espesor. La reacción de polimerización se catalizó añadiendo 37.5  $\mu$ L de PSA al 20 % p/v y 3.75  $\mu$ L de TEMED por gel como iniciadores. Una vez listo el gel separador, encima se preparó el gel concentrador (9 % p/v acrilamida, 0.24 % p/v bis-acrilamida, 0.222 M Tris-HCl pH 6.8, 0.178 % p/v SDS), reacción en la cual se agregaron 20  $\mu$ L de PSA al 20 % y 5  $\mu$ L de TEMED como iniciadores por gel de 2 mL.

Las muestras analizadas contenían buffer de carga 1X (15.63 mM Tris-HCl, 0.5 % p/v SDS, 2.5 % v/v glicerol, 1.25 % v/v  $\beta$ -mercaptoetanol, 0.0125 % p/v azul de bromofenol). También se incluyó el marcador de pesos moleculares (Kaleidoscope Prestained Standards® de Bio Rad®). La electroforesis se llevó a cabo en cámaras Mini-PROTEAN® Tetra Cell de BIO-RAD con buffer de corrida 1X (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicina, 3.47 mM SDS, pH 8.3) por 3 horas a voltaje constante de 100 V, para una satisfactoria separación de bandas.

### **3.6.6 Tinción con plata de proteínas en geles de poliacrilamida**

Los geles de proteínas fueron teñidos con plata dada la alta sensibilidad que tiene este tipo de tinción. Una vez que la electroforesis finalizó, el gel se extrajo de la cámara y se incubó en una mezcla MeOH-H<sub>2</sub>O 1:1 por una hora y media para fijar las proteínas en el gel, con agitación suave. Luego se hicieron tres lavados con agua de 10 minutos cada uno. Se decantó el agua y se colocó el gel en una mezcla MeOH-H<sub>2</sub>O 1:1 con 100  $\mu$ L de formaldehído al 37 %, por una hora y media. Se eliminó la mezcla metanólica y se repitieron los lavados con agua destilada de 10 minutos cada uno (tres en total).

Por otro lado, se preparó el compuesto de coordinación  $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]\text{NO}_3$  (reactivo de Tollens) a través de la siguiente reacción:



El reactivo de Tollens (disolución 1) se preparó añadiendo 2 mL de una disolución 2.35 M de  $\text{AgNO}_3$  a 25 mL de una disolución 0.45 M de  $\text{NH}_3$ , y aforando a 100 mL. Este compuesto se agregó al gel y se incubó con agitación suave por 15 minutos, con la finalidad de que la plata formara un compuesto de coordinación con las proteínas del gel. Luego, se lavó tres veces el gel con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada y se agregó la disolución 2 fresca (citrate de sodio 0.005%, añadir 250  $\mu\text{L}$  de formaldehído al 37 % por cada 500 mL de disolución) para comenzar el revelado (formación de  $\text{AgOH}$ , color marrón). Se requirió eliminar y agregar más de la disolución 2 cada cierto intervalo de tiempo. Cuando el revelado alcanzó la intensidad deseada, se eliminó la disolución 2 y se añadieron 100 mL de la disolución 3 ( $\text{CH}_3\text{COOH}$  10 %,  $\text{MeOH}$  50 %), con lo cual dicho revelado se detuvo. Se incubó el gel en agua por toda la noche con agitación suave para eliminar residuos de la tinción. Finalmente, el gel se colocó en el secador de geles al vacío por una hora y media a 65 °C.

### 3.6.7 Western Blot

La técnica de western blot se utilizó para detectar la proteína de fusión eIF(iso)4E-GFP en las plantas que sobreexpresan a eIF(iso)4E, mediante los anticuerpos que reconocen a eIF(iso)4E y a GFP, en proteínas totales y en las fracciones de proteínas purificadas con Ni. La transferencia se realizó resolviendo primero las proteínas analizadas en un gel de poliacrilamida, según se indicó en la sección 3.6.6. La membrana PVDF Inmobilon-P-Transfer de Millipore® fue activada previamente introduciéndola por 20 segundos en  $\text{MeOH}$  al 100 %. Luego, el gel y la membrana fueron equilibrados por 10 minutos en el buffer de

transferencia (buffer de corrida 1 X, 20 % v/v MeOH). Una vez formado el paquete de transferencia, fueron transferidas las proteínas por una hora a 100 V a 4 °C.

Para la inmunodetección, la membrana fue bloqueada por una hora en solución de bloqueo (buffer salino de fosfatos PBS 1 X, 5 % p/v leche en polvo, 0.1 % v/v Tween 20). Luego, se agregó el primer anticuerpo (anti-eIF(iso)4F, anti-eIF4F o anti-GFP) en una dilución 1:5000 en solución de bloqueo y se incubó por 12 horas con agitación a 4 °C. Después, se hicieron tres lavados a la membrana con la disolución de lavado (PBS 1 X, 0.1 % v/v Tween 20) de 10 minutos cada uno a temperatura ambiente. Se colocó el segundo anticuerpo, anti-IgG acoplado a HRP (peroxidasa de rábano), en una dilución 1:5000 en solución de bloqueo y se incubó, por una hora, a temperatura ambiente, con agitación suave. La membrana fue después lavada tres veces más con la disolución de lavado (10 minutos cada uno).

La detección luminiscente se realizó agregando a la membrana la mezcla Imobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate® de Millipore®, que contenía luminol y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, con lo cual la HRP catalizaba la oxidación del luminol por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, cuyo producto emite luz visible. Con este sustrato la membrana se incubó por 5 minutos y se expuso la membrana a placas fotográficas Kodak® por 3 minutos, para capturar las señales luminosas.

### 3.7 MICROSCOPIA CONFOCAL

#### 3.7.1 Preparación de muestras para microscopía confocal

La detección de la proteína reportera GFP por microscopía confocal se realizó utilizando embriones de *A. thaliana*. En un tubo Eppendorf con 1 mL de agua destilada se colocaron alrededor de 50 semillas de *A. thaliana* y se incubaron a 4 °C por 12 horas para dar comienzo a la activación del metabolismo del embrión. Con ayuda de una aguja de disección, unas pinzas y un estereoscopio,

se extrajeron cuidadosamente los embriones de las semillas puestas en agua, sujetando con unas pinzas de puntas finas uno de los extremos y raspando en el otro extremo la cubierta con la punta de la aguja de disección; el embrión salió presionando suavemente con las pinzas. Una vez fuera cada embrión, se colocó en un tubo Eppendorf con 1 mL de la solución fijadora fresca (4 % p/v paraformaldehído, 1.37 mM NaCl, 0.27 mM KCl, 0.43 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.14 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 15 % v/v DMSO, 0.1 % v/v Tween 20) y se incubó por 12 horas, a 4 °C. Se eliminó la solución fijadora y se hicieron tres lavados de 15 minutos cada uno con 1 mL de glicerol al 70 % v/v.

Se eliminaron del tubo 900 µL del glicerol y se resuspendieron los embriones en los 100 µL restantes. Se tomaron 20 µL de la suspensión, procurando llevar consigo aproximadamente 20 embriones y se colocaron en el centro de un portaobjetos distribuyéndolos lo más uniformemente posible. Luego, se rompió un cubreobjetos en pequeños fragmentos y se tomaron cuatro de ellos que se colocaron alrededor de los embriones, sirviendo de soporte para el cubreobjetos que se puso para protegerlos. Los huecos que quedaron vacíos entre el portaobjetos y el cubreobjetos fueron rellenados con glicerol al 70 %. Para finalizar, se aplicaron 3 ó 4 capas de barniz incoloro de uñas comercial en los bordes del cubreobjetos para sellar.

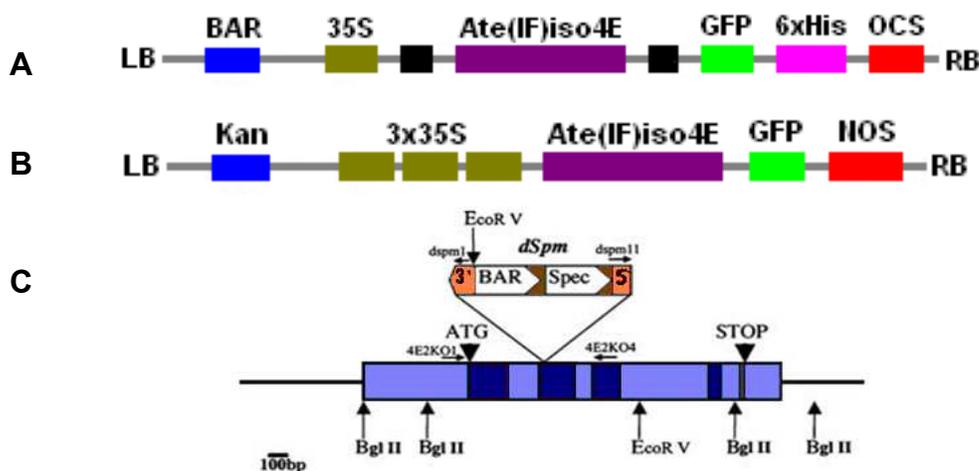
### **3.7.2 Visualización de GFP por microscopía confocal.**

La proteína GFP fue visualizada utilizando el microscopio confocal Olympus FV1000 de la Unidad de Microscopía del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. La radiación electromagnética de excitación de GFP tiene una longitud de onda de 488 nm, y se ha adquirido la emisión en un intervalo de 515 a 565 nm. La clorofila se ha adquirido en el intervalo de 600 a 650 nm. Las imágenes obtenidas se analizaron a través del programa **FluoView® 1000 de Olympus®**.

## 4. RESULTADOS

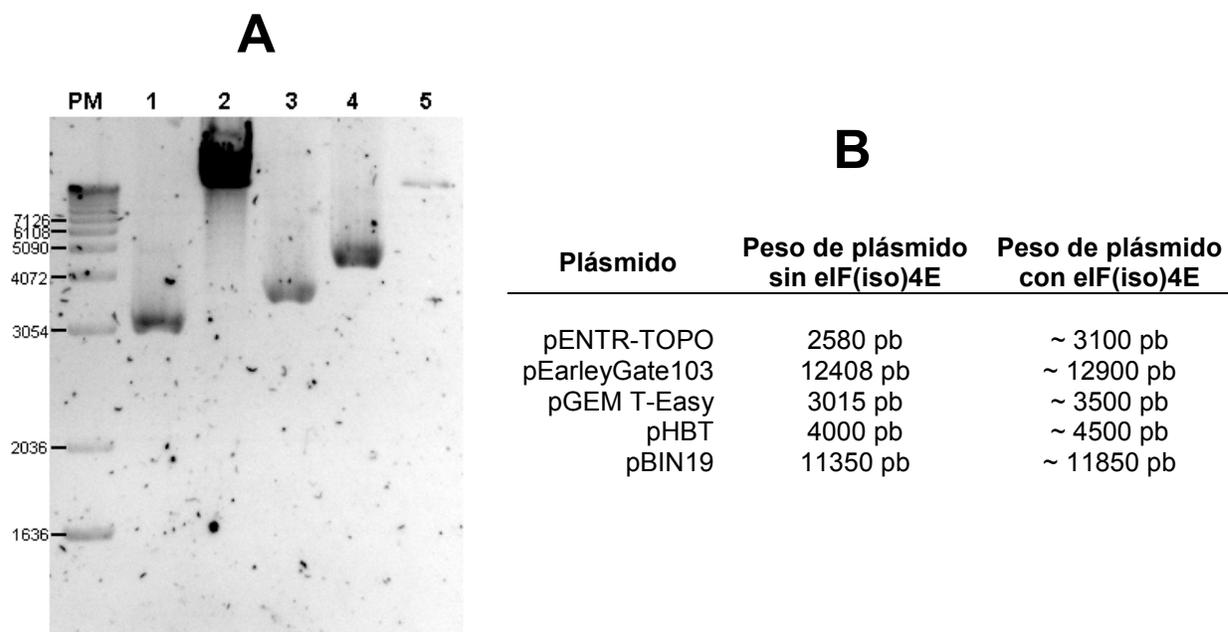
### 4.1 PREPARACIÓN DE CONSTRUCCIONES 35S::eIF(iso)4E::GFP

Las características más relevantes de las construcciones preparadas en el desarrollo de este proyecto se resumen en la figura 4.1. La primera construcción (de aquí en adelante **construcción A**), se preparó utilizando la tecnología Gateway®. Esta construcción contiene un gen de resistencia al herbicida BASTA y, hacia el extremo carboxilo terminal de GFP, una serie de seis residuos de histidina para facilitar la purificación por cromatografía de afinidad con Ni de la proteína de fusión. La segunda construcción (**construcción B**), se preparó insertando la región codificante de eIF(iso)4E en el vector binario pBIN19 bajo el promotor 35S, que se encuentra por triplicado, y que contiene un gen que confiere resistencia a kanamicina en plantas transgénicas. En este caso, la proteína de fusión no contiene el grupo de histidinas, por lo que no podrá purificarse con Ni. Fue necesario generar ambas construcciones debido a que la mutante eIF(iso)4E *-/-* ya contiene el marcador de resistencia a BASTA en el elemento *dSpm*, que interrumpe el segundo exón de *eIF(iso)4E* (figura 4.1 C; Duprat *et al*, 2002), de tal suerte que la construcción A no permitirá una selección para plantas transgénicas de complementación.



**Figura 4.1** Diagramas de las construcciones 35S::eIF(iso)4E::GFP. A) Construcción que confiere resistencia a BASTA. Contiene hacia el extremo carboxilo terminal un set de 6 histidinas que facilitarán su posterior purificación por cromatografía de afinidad. B) Construcción que confiere resistencia a kanamicina. C) Inserción de *dSpm* en la región codificadora de eIF(iso)4E (Duprat *et al*, 2002).

Para la primera construcción, se extrajo RNA total de hoja madura de planta WT y se sintetizó el correspondiente cDNA mediante una transcripción inversa con la enzima M-MLVRT (reverso transcriptasa). Posteriormente, se amplificó el fragmento que codifica para eIF(iso)4E utilizando los oligos pENTR-Atiso4E 1 y pENTR-Atiso4E 2, con la polimerasa de alta fidelidad, obteniéndose una banda de 590 pares de bases (panel A, figura 4.3). Este fragmento se purificó y clonó en el vector pENTR D/TOPO para obtener la clona entrante, pENTR-AtelF(iso)4E. Luego, se recombinó con el vector destino pEarleyGate103, que nos permite fusionar al factor eIF(iso)4E con la proteína reportera GFP, bajo el promotor fuerte 35S del CaMV; el plásmido generado es la construcción A. Finalmente, se transformaron células competentes de *A. tumefaciens*.



**Figura 4.2** Plásmidos preparados para generar las construcciones 35S::eIF(iso)4E::GFP. **A:** electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos linealizados, PM: marcador de pesos moleculares, 1: pENTR-eIF(iso)4E digerido con HindIII, 2: pEarley-eIF(iso)4E digerido con EcoRV, 3: pGEM-eIF(iso)4E digerido con BamHI, 4: pHBT-eIF(iso)4E digerido con BamHI, 5: pBIN-eIF(iso)4E digerido con BamHI; **B:** pesos moleculares de los plásmidos. Notar que en todos los casos se observa en el gel que los plásmidos exceden por aproximadamente 500 pb los pesos moleculares de los vectores sin transformar, que indica la inserción del fragmento que codifica para eIF(iso)4E.

Para la preparación de la construcción B, se amplificó el fragmento *eIF(iso)4E* de cDNA sintetizado a partir de RNA de hoja madura de planta WT (ver figura 4.3,

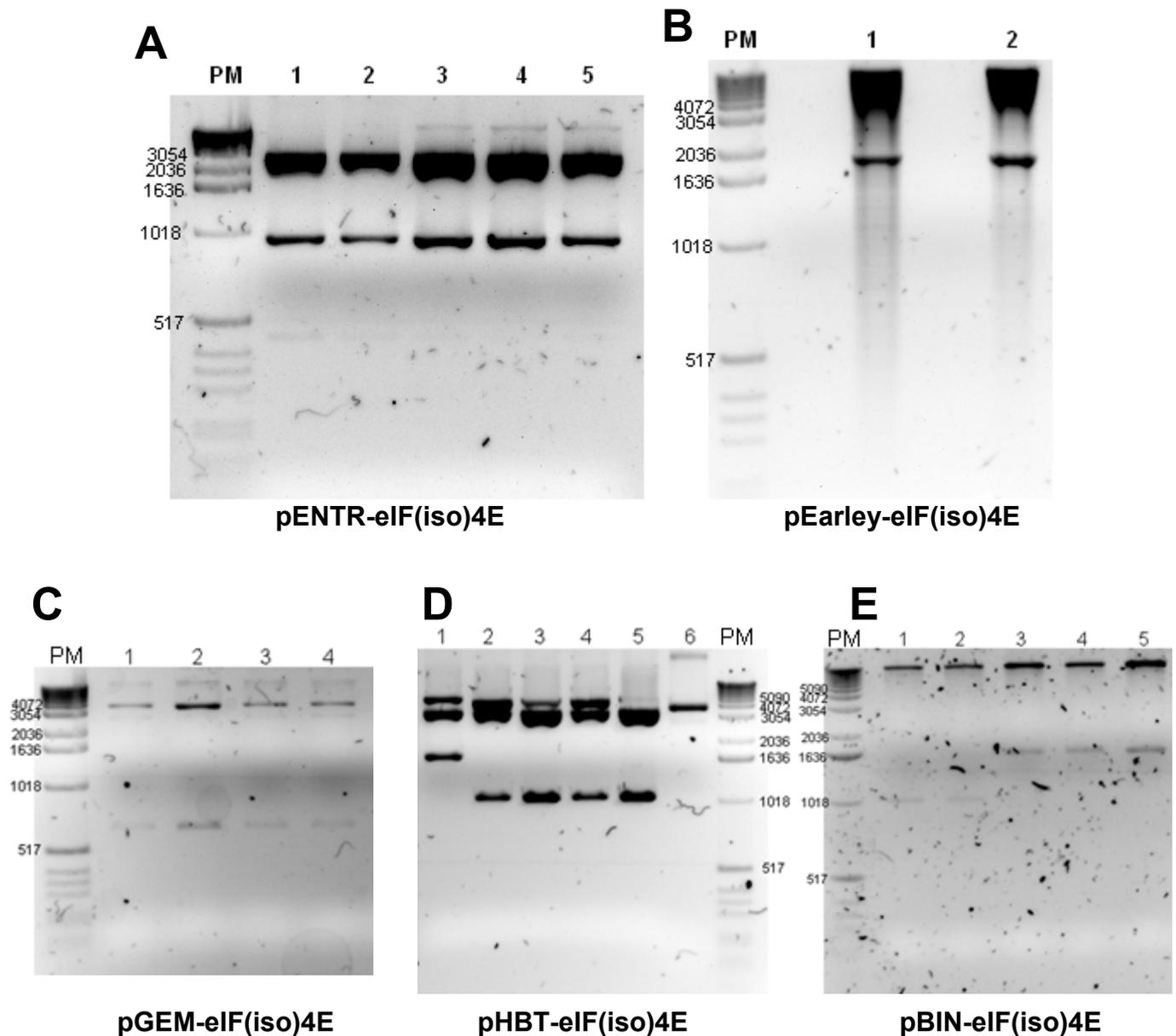
panel II), utilizando los oligos *AteIF(iso)4ET1* y 2, que contenían secuencias blanco para las enzimas de restricción *BamHI* y *NcoI*. Este fragmento se insertó en el vector *pGEM-T Easy*®, para generar el plásmido *pGEM-eIF(iso)4E*. Digiriendo tanto a *pGEM-eIF(iso)4E* como a *pHBT* con *BamHI* y *NcoI*, se clonó *eIF(iso)4E* en el vector *pHBT* a través de una ligación clásica con la *T4 DNA* ligasa, con lo cual se consiguió fusionar a nuestro factor con la proteína reportera *GFP*, obteniendo el plásmido *pHBT-eIF(iso)4E*. La clonación en el vector binario *pBIN19* se consiguió también por ligación clásica, utilizando las enzimas *BamHI* y *EcoRI* para clonar a *eIF(iso)4E* fusionado a *GFP*, obteniendo la construcción *35S::eIF(iso)4E::GFP*, que confiere resistencia a kanamicina en plantas y contiene por triplicado al promotor *35S* de *CaMV*. Luego se transformaron células competentes de *A. tumefaciens* con esta construcción también.



**Figura 4.3.** PCR para corroborar la presencia del fragmento *AteIF(iso)4E* en los plásmidos preparados. **Panel I:** amplificación del gen *eIF(iso)4E* con los oligos *pENTR-Atiso4E 1* y *2* (598 pares de bases) a partir de los plásmidos de la construcción A. A) Amplificación del cDNA *eIF(iso)4E* de plantas silvestres (WT); B) plásmido *pENTR-eIF(iso)4E*; C) *pEarley-eIF(iso)4E* extraído de células *DH5 $\alpha$* ; D) *pEarley-eIF(iso)4E* extraído de *A. tumefaciens*. **Panel II:** amplificación del gen *eIF(iso)4E* con los oligos *AteIF(iso)4ET1* y *2* (576 pares de bases) a partir de los plásmidos de la construcción B, A) Amplificación de *eIF(iso)4E* de plantas silvestres (WT); B) plásmido *pGEM-eIF(iso)4E*; C) plásmido *pHBT-eIF(iso)4E*; D) *pBIN-eIF(iso)4E* extraído de células *DH5 $\alpha$* ; E) *pBIN-eIF(iso)4E* extraído de *A. tumefaciens*.

Los plásmidos generados en la preparación de las construcciones mostraron un peso molecular alrededor de 500 pares de bases mayor a lo del vector vacío (ver figura 4.2 A y B; aunque esto sólo es válido para los vectores con peso molecular menor a 5 kb, en pesos altos esta diferencia es difícil de observar), lo cual nos proporcionó una evidencia adicional de que los plásmidos se encuentran correctamente transformados. La presencia del gen *eIF(iso)4E* fue corroborada en todos los plásmidos generados por PCR (figura 4.3), observándose en cada caso la presencia de fragmentos de 598 pares de bases para la construcción A y de 576

para la construcción B. También se realizaron diversas digestiones mediante la combinación de distintas enzimas de restricción (figura 4.4), donde la liberación del fragmento indicado en cada plásmido corroboró la correcta inserción de *eIF(iso)4E* en los diferentes vectores utilizados y preparados.



**Figura 4.4** Reacciones de digestión de los plásmidos obtenidos para corroborar la inserción de *eIF(iso)4E*. A) pENTR-eIF(iso)4E digerido con MluI, fragmento esperado: 930 pb; B) pEarley-eIF(iso)4E digerido con HindIII, fragmento esperado: 1750 pb; C) pGEM-eIF(iso)4E digerido con EcoRI, fragmento esperado: 700 pares de bases; D) pHBT-eIF(iso)4E digerido con BamHI + EcoRI (selección de positivas, sólo lo es el carril 1), fragmento esperado: 1600 pares de bases; E) pBIN-eIF(iso)4E digerido con BamHI + EcoRI (selección de positivas, sólo lo fueron 3, 4 y 5), fragmento esperado: 1600 pares de bases.

**Construcción A**  
(resistencia a BASTA)

3	CAT	TGT	CCT	CTC	CCG	GCG	GCG	GCG	GAA	TTA	CCG	GCG	ACA	GAG	GCG	GAG	AAA	CAA
	H	C	P	L	P	A	A	A	E	L	P	A	T	E	A	E	K	Q
57	CCA	CAC	AAG	CTC	GAA	AGA	AAG	TGG	AGT	TTC	TGG	TTC	GAT	AAC	CAA	TCA	AAG	AAA
	P	H	K	L	E	R	K	W	S	F	W	F	D	N	Q	S	K	K
							*				*							
111	GGC	GCC	GCC	TGG	GGA	GCT	TCT	CTT	CGT	AAA	GCC	TAT	ACT	TTC	GAC	ACC	GTC	GAA
	G	A	A	W	G	A	S	L	R	K	A	Y	T	F	D	T	V	E
				*														
165	GAT	TTT	TGG	GGA	TTG	CAC	GAG	ACT	ATA	TTT	CAG	ACT	AGC	AAA	TTG	ACA	GCG	AAT
	D	F	W	G	L	H	E	T	I	F	Q	T	S	K	L	T	A	N
			*															
219	GCT	GAA	ATT	CAC	TTG	TTC	AAA	GCT	GGT	GTT	GAG	CCA	AAG	TGG	GAA	GAT	CCA	GAG
	A	E	I	H	L	F	K	A	G	V	E	P	K	W	E	D	P	E
														*				
273	TGT	GCT	AAT	GGA	GGA	AAG	TGG	ACT	TGG	GTT	GTT	ACT	GCT	AAT	AGG	AAG	GAA	GCT
	C	A	N	G	G	K	W	T	W	V	V	T	A	N	R	K	E	A
							*											
327	TTA	GAC	AAA	GGC	TGG	CTT	GAA	ACT	TTG	ATG	GCT	TTG	ATT	GGA	GAG	CAA	TTT	GAT
	L	D	K	G	W	L	E	T	L	M	A	L	I	G	E	Q	F	D
					*													
381	GAA	GCA	GAT	GAG	ATT	TGT	GGT	GTG	GTT	GCT	AGT	GTC	CGT	CCA	CAG	TCG	AAG	CAA
	E	A	D	E	I	C	G	V	V	A	S	V	R	P	Q	S	K	Q
435	GAC	AAG	CTC	TCC	TTG	TGG	ACT	AGG	ACG	AAG	TCT	AAT	GAA	GCT	GTT	CTG	ATG	GGT
	D	K	L	S	L	W	T	R	T	K	S	N	E	A	V	L	M	G
						*												
489	ATT	GGG	AAG	AAG	TGG	AAG	GAG	ATA	CTT	GAT	GTC	ACC	GAC	AAG	ATA	ACT	TTC	AAT
	I	G	K	K	W	K	E	I	L	D	V	T	D	K	I	T	F	N
543	AAC	CAT	GAT	GAT	TCC	AGA	AGA	AGC	CGG	TTC	ACT	GTC	ATG	GGT	GGG	CGC	GCC	GAC
	N	H	D	D	S	R	R	S	R	F	T	V	M	G	G	R	A	D
597	CCA	GCT	TTC	TTG	TAC	AAA	GTG	GTG	CTC	GAG	ATG	GTA	GAT	CTG	ACT	AGT	AAA	GGA
	P	A	F	L	Y	K	V	V	L	E	M	V	D	L	T	S	K	G
651	GAA	GAA	CTT	TTC	ACT	GGA	GTT	GTC	CCA	ATT	CTT	GTT	GAA	TTA	GAT	GGT	GAT	GTT
	E	E	L	F	T	G	V	V	P	I	L	V	E	L	D	G	D	V
705	AAT	GGG	CAC	AAA	TTT	TCT	GTC	AGT	GGA	GAG	GGT	GAA	GGT	GAT	GCA	ACA	TAC	GGA
	N	G	H	K	F	S	V	S	G	E	G	E	G	D	A	T	Y	G
759	AAA	CTT	ACC	CTT	AAA	TTT	ATT	TGC	ACT	ACT	GGA	AAA	CTA	CCT	GTT	CCG	TGG	CCA
	K	L	T	L	K	F	I	C	T	T	G	K	L	P	V	P	W	P
813	ACA	CTT	GTC	ACT	ACT	TTC	TCT	TAT	GGT	GTT	CAA	TGC	TTT	TCA	AGA	TAC	CCA	GAT
	T	L	V	T	T	F	S	Y	G	V	Q	C	F	S	R	Y	P	D
867	CAT	ATG	AAG	CGG	CAC	GAC	TTC	TTC	AAG	AGC	GCC	ATG	CCT	GAG	GGA	TAC	GTG	CAG
	H	M	K	R	H	D	F	F	K	S	A	M	P	E	G	Y	V	Q

Termina eIF(iso)4E ↓  
Comienza GFP ↓

**Figura 4.5** Secuenciación de las construcción A, pEarley-eIF(iso)4E. La secuencia de aminoácidos correspondiente a eIF(iso)4E se muestra en azul y en rojo la de GFP. Los ocho triptofanos característicos de eIF(iso)4E se resaltan con un asterisco. Entre el último residuo de eIF(iso)4E y el primero de GFP se encuentran 16 aminoácidos.

**Construcción B**  
(resistencia a kanamicina)

2	CTC	CCG	GCG	GCG	GCC	GAA	TTA	CCG	GCG	ACA	GAG	GCG	GAG	AAA	CAA	CCA	CAC	AAG
	L	P	A	A	A	E	L	P	A	T	E	A	E	K	Q	P	H	K
56	CTC	GAA	AGA	AAG	TGG	AGT	TTC	TGG	TTC	GAT	AAC	CAA	TCA	AAG	AAA	GGC	GCC	GCC
	L	E	R	K	W	S	F	W	F	D	N	Q	S	K	K	G	A	A

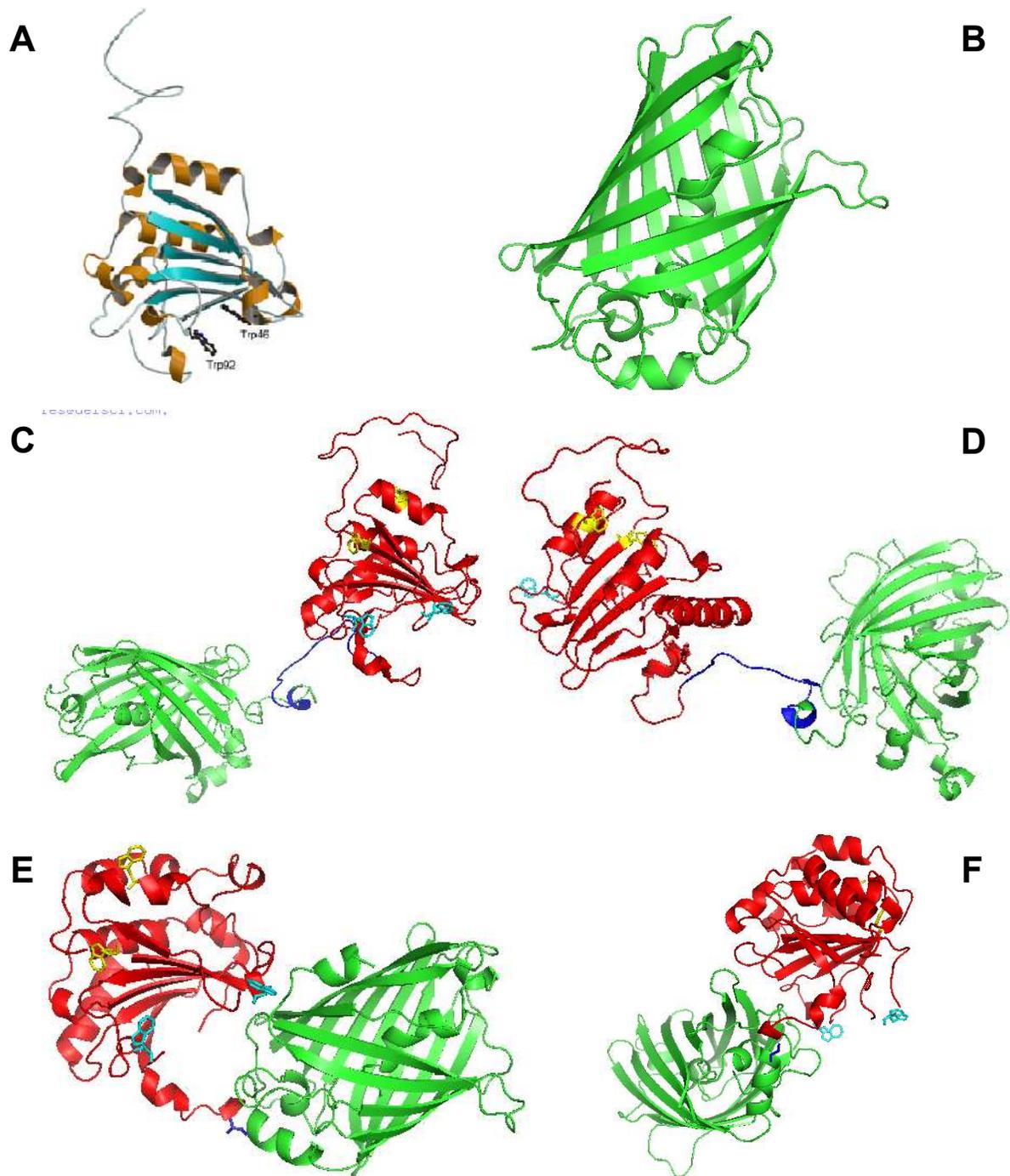
```

100 TGG GGA GCT TCT CTT CGT AAA GCC TAT ACT TTC GAC ACC GTC GAA GAT TTT TGG
    W  G  A  S  L  R  K  A  Y  T  F  D  T  V  E  D  F  W
    *
154 GGA TTG CAC GAG ACT ATA TTT CAG ACT AGC AAA TTG ACA GCG AAT GCT GAA ATT
    G  L  H  E  T  I  F  Q  T  S  K  L  T  A  N  A  E  I
198 CAC TTG TTC AAA GCT GGT GTT GAG CCA AAG TGG GAA GAT CCA GAG TGT GCT AAT
    H  L  F  K  A  G  V  E  P  K  W  E  D  P  E  C  A  N
    *
252 GGA GGA AAG TGG ACT TGG GTT GTT ACT GCT AAT AGG AAG GAA GCT TTA GAC AAA
    G  G  K  W  T  W  V  V  T  A  N  R  K  E  A  L  D  K
    *
296 GGC TGG CTT GAA ACT TTG ATG GCT TTG ATT GGA GAG CAA TTT GAT GAA GCA GAT
    G  W  L  E  T  L  M  A  L  I  G  E  Q  F  D  E  A  D
    *
350 GAG ATT TGT GGT GTG GTT GCT AGT GTC CGT CCA CAG TCG AAG CAA GAC AAG CTC
    E  I  C  G  V  V  A  S  V  R  P  Q  S  K  Q  D  K  L
404 TCC TTG TGG ACT AGG ACG AAG TCT AAT GAA GCT GTT CTG ATG GGT ATT GGG AAG
    S  L  W  T  R  T  K  S  N  E  A  V  L  M  G  I  G  K
    *
458 AAG TGG AAG GAG ATA CTT GAT GTC ACC GAC AAG ATA ACT TTC AAT AAC CAT GAT
    K  W  K  E  I  L  D  V  T  D  K  I  T  F  N  N  H  D
    Termina eIF(iso)4E ↓ Inicia GFP
502 GAT TCC AGA AGA AGC CGG TTC ACT GCC ATG GTG AGC CAG GGC GAG GAG CTG TTC
    D  S  R  R  S  R  F  T  A  M  V  S  Q  G  E  E  L  F
556 ACC GGG GTG GTG CCC ATC CTG GTC GAG CTG GAC GGC GAC GTA AAC GGC CAC AAG
    T  G  V  V  P  I  L  V  E  L  D  G  D  V  N  G  H  K
610 TTC
    F

```

**Figura 4.6** Secuenciación de la construcción B, pBIN-eIF(iso)4E. La secuencia de aminoácidos correspondiente a eIF(iso)4E se muestran en azul y en rojo los de GFP. Los ocho triptofanos característicos de eIF(iso)4E se indican con un asterisco. Entre el último residuo de eIF(iso)4E y el primero de GFP se encuentra un aminoácido.

Las construcciones finales fueron sometidas a secuenciación automática (ver figuras 4.5 y 4.6). En ambos casos, pEarley-eIF(iso)4E y pBIN-eIF(iso)4E, se puede observar que las secuencias se encuentran en el marco de lectura correcto, que carecen de codones de paro prematuros y que se encuentran presentes y en posición correcta los aminoácidos encargados de reconocer a cap (Trp46 y Trp 92), y a eIF(iso)4G (Trp33 y Trp63).



**Figura 4.7** Modelos computacionales de las estructuras terciarias de las proteínas de fusión eIF(iso)4E-GFP. A) Estructura de eIF(iso)4E en la forma unida a cap (cap no mostrado), modelada a partir de eIF4E de humano (tomado de Okade *et al*, 2009). Estructuras modeladas con el servidor SAM-T08 de GFP (B), eIF(iso)4E-GFP en la construcción que confiere resistencia a BASTA (C y D) y eIF(iso)4E-GFP en la construcción que confiere resistencia a kanamicina (E y F). Las proteínas de fusión son mostradas en las vistas frontal, C y E, exhibiendo en color cian los residuos Trp46 y Trp92 que son responsables de la unión directa a cap; y dorsal, D y F, exhibiendo en color azul la secuencia que une a eIF(iso)4E (en rojo) con GFP (verde). Adicionalmente, se muestran en color amarillo los aminoácidos responsables de la unión de eIF(iso)4E con eIF(iso)4G, Trp33 y Trp63.

Una diferencia importante entre la construcción A y B es que en la primera existen 16 residuos de aminoácidos entre el último aminoácido de eIF(iso)4E y el primero de la GFP. En el caso de la construcción B, sólo es un aminoácido. Con la intención de establecer cómo estas diferencias pudieran afectar a las proteínas de fusión generadas, se realizaron predicciones estructurales a través del servidor SAMT-08 (HMM-based Protein Structure Prediction, SAM-T08, disponible en [http://compbio.soe.ucsc.edu/SAM\\_T08/T08-query.html](http://compbio.soe.ucsc.edu/SAM_T08/T08-query.html); Karplus *et al*, 1998; Karplus *et al*, 2003; Katzman *et al*, 2008; ver figura 4.7). En la figura 4.7, se presentan primero las estructuras de las proteínas eIF(iso)4E y GFP separadas (A y B, respectivamente), para tener un punto de comparación en los modelos de las proteínas de fusión. La calificación de la confiabilidad de estos modelos mostró que la GFP es confiable en todos los casos, pero no la proteína eIF(iso)4E. Para solucionar esto, en 4.7 C y D la proteína eIF(iso)4E se modeló tomando como patrón la estructura reportada de eIF4E de *T. aestivum* (Monzingo *et al*, 2007). En el modelo de eIF(iso)4E (Figura 4.7 A, tomado de Okade *et al*, 2009) se observa claramente la disposición espacial de los residuos Trp46 y Trp92, que se encargan de establecer interacciones de tipo  $\pi$  con la estructura cap y, de manera general, nos indica la arquitectura estructural de esta proteína. La proteína GFP (Figura 4.7 B) presenta una hélice alfa rodeada de varias láminas beta, donde estas últimas muestran una conformación similar a la exhibida en la estructura de “barril”.

En el modelado de C, D, E y F no se considera la unión a cap, lo cual puede influir en la distancia y posición de los Trp que reconocen esta estructura. La proteína de fusión, representada en la figura 4.7 por C y D, corresponde a la construcción A, donde la parte de eIF(iso)4E fue modelada utilizando como patrón la estructura reportada de eIF4E de trigo. En esta proteína, se observa que la secuencia de 16 aminoácidos que une a ambas proteínas no parece afectar el correcto plegamiento de las mismas, permitiendo a eIF(iso)4E adoptar una disposición adecuada de los aminoácidos encargados de la unión con eIF(iso)4G, y con cap, donde es importante señalar que la posición espacial en estos últimos varía un poco respecto a la presentada en A porque no se encuentran unidos a cap. La GFP también presenta

una estructura muy similar a la mostrada en B. El análisis de las interacciones no covalentes que pudieran darse entre aminoácidos de eIF(iso)4E y GFP debe profundizarse a través de simulaciones de dinámica molecular. La proteína de fusión representada por E y F (correspondiente a la construcción B) no se modeló con el patrón de eIF4E de trigo, así que el modelo debe aún ser perfeccionado con este patrón y ser sometido a relajación mediante dinámica molecular. Esta estructura muestra distorsiones importantes para considerar en eIF(iso)4E, que deben verificarse más adelante con modelos más detallados y que consideren información adicional. La disposición espacial de los elementos de estructura secundaria y de los residuos Trp46 y Trp92 difiere de la que se observa para eIF(iso)4E solo (figura 4.7 A). Los triptófanos que interactúan con cap se encuentran muy alejados entre sí, y el residuo Trp46 parece tener interacciones débiles con algunas regiones de la GFP. Estas observaciones sugieren que puede verse afectada la interacción con cap de la proteína de fusión B, aunque los residuos que permiten la interacción con eIF(iso)4G, Trp33 y Trp63, no parecen haberse alterado mucho. Por otro lado, la GFP no muestra modificaciones importantes respecto a la de la figura 4.7 B. De cualquier manera, no se puede asegurar un cambio en la afinidad por cap hasta realizar estudios más profundos en este punto.

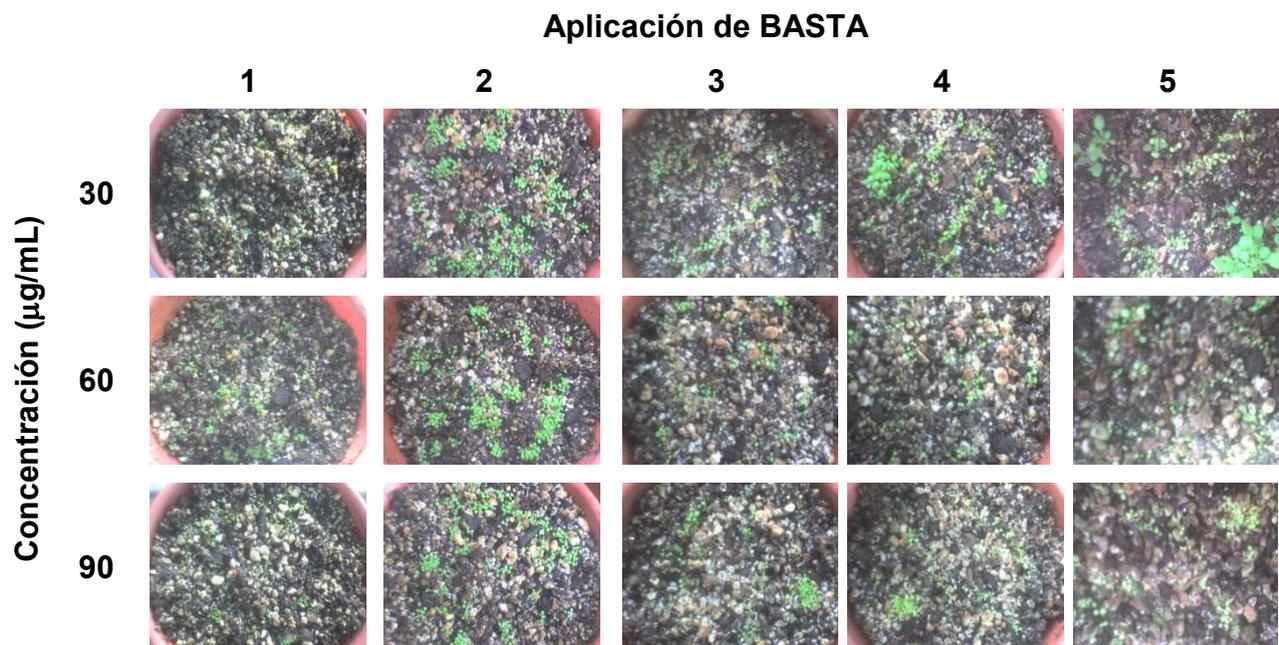
Las diferencias observadas entre ambas proteínas de fusión son debidas al número de aminoácidos que se encuentran entre ellas, de tal forma que 16 residuos (construcción A) permiten un buen plegamiento, pero un solo aminoácido (construcción B) entre ellas genera distorsiones importantes en eIF(iso)4E.

## **4.2 CARACTERIZACIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS QUE EXPRESAN LA FUSIÓN eIF(iso)4E::GFP EN FONDO WT**

### **4.2.1 Selección de semillas transformantes**

Para generar plantas transgénicas estables que sobre expresen a eIF(iso)4E, con la construcción A se transformaron por inmersión floral 25 plantas de *A. thaliana*

silvestres (WT), y se obtuvieron alrededor de 2000 semillas. De la generación F<sub>1</sub>, cada semilla que resulte transformante representa una línea independiente, debido a la azarosa inserción del T-DNA en el genoma de la planta transformada.

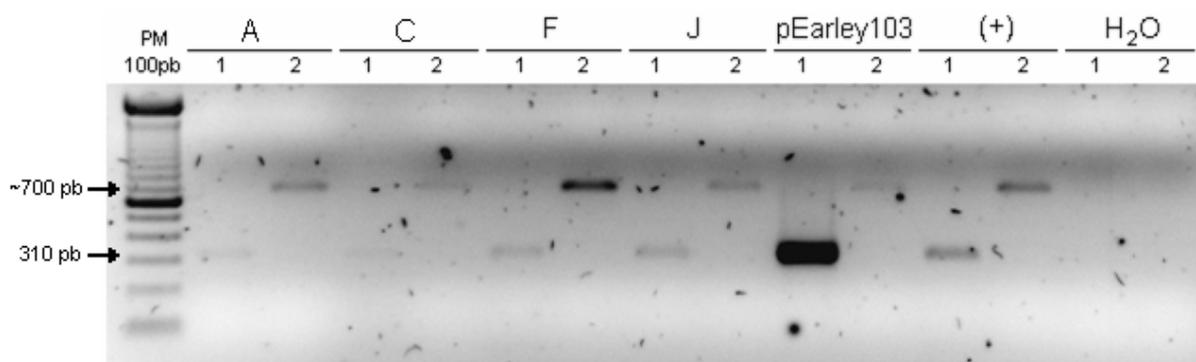


**Figura 4.8** Condiciones de selección de semillas transformantes. Se realizaron cinco aplicaciones de disoluciones de BASTA con concentraciones de 30, 60 y 90  $\mu\text{g/mL}$ . La concentración más apropiada fue la de 30  $\mu\text{g/mL}$ , las otras concentraciones resultaron muy agresivas. El 2 % de las semillas candidatas fueron positivas.

Dadas las características de la construcción A, resumidas en la figura 4.1, la selección de semillas transformantes se realizó con el herbicida BASTA. Primero se estandarizó la metodología adecuada de selección, para lo cual se asperjaron lotes de 100 semillas candidatas con diferentes concentraciones del herbicida (30, 60 y 90  $\mu\text{g/mL}$ ) y se analizó el comportamiento de las poblaciones sometidas a selección a lo largo de cinco aplicaciones (ver figura 4.8), con la finalidad de optimizar las condiciones de selección. Este breve estudio indicó que la concentración adecuada de BASTA fue de 30  $\mu\text{g/mL}$  tras cuatro o cinco aplicaciones de la misma, momento en el cual las plántulas transformantes fueron distinguibles fácilmente de las cloróticas y moribundas. La selección con una concentración de BASTA de 60  $\mu\text{g/mL}$  no fue adecuada porque se generaban plántulas sobrevivientes frágiles y las

diferencias respecto a plántulas no transformantes eran ambiguas. Con una concentración de 90  $\mu\text{g/mL}$  perecieron todas las plántulas, debido a que el herbicida es muy agresivo incluso para las plántulas transformantes positivas.

Bajo las condiciones halladas (30  $\mu\text{g/mL}$  BASTA), se seleccionaron 20 plántulas transformantes del lote inicial de 2000 semillas, que se denominaron con las letras del alfabeto (de la A a la Y). Como control positivo se utilizaron semillas homocigas nulas *eIF(iso)4E*  $-/-$ , dado que son resistentes a BASTA, y semillas WT como control negativo. Cada una de las plántulas transformantes se transplantó a una maceta independiente y se aisló mediante una envoltura de celofán para asegurar la autofecundación. Se tomó una muestra de hoja de cada planta y se extrajo RNA total para realizar una segunda selección y corroborar la primera selección, en la cual se pudieron distinguir las transformantes reales de los falsos positivos. Para esto, se hizo RT-PCR utilizando los oligonucleótidos BAR para amplificar el gen *BAR*, que confiere resistencia a BASTA. Se observó que únicamente las líneas D, E, K y V fueron falsos positivos y en el resto se encontró al gen *BAR* (ver tabla 4.1). En la figura 4.9, se observa un ejemplo de esta segunda selección, donde se ve que las líneas A, C, F, y J son verdaderas transgénicas.

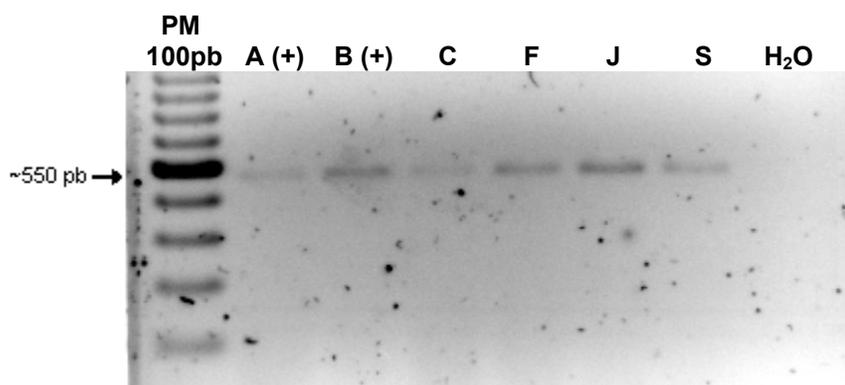


**Figura 4.9** Selección secundaria de algunas candidatas de sobre expresión mediante RT-PCR de RNA total de hoja. Detección del mensajero de *BAR* en candidatas de la generación  $F_1$ . Se utilizaron los oligos BAR (310 pb, carriles con el número 1) y pENTR-Atiso4E (598 pb, carriles con el número 2) como control. El plásmido pEarley-*eIF(iso)4E* fue colocado como control positivo de ambos genes. Las bandas con peso molecular aproximado de 700 pb probablemente sean correspondientes al gen *eIF(iso)4E*, y se vean así por las condiciones de la electroforesis.

La presencia de falsos positivos pudo ser debida a una aplicación no homogénea del herbicida, por esta razón, es importante realizar la selección secundaria y descartar así plantas con el genotipo WT. La progenie de cada una de las plantas transformantes positivas se colectó, generación F<sub>2</sub>, y aquellas líneas que produjeron una mayor cantidad de semillas (C, F, J y S) se seleccionaron nuevamente con BASTA; esto es necesario porque las plantas de la generación F<sub>1</sub> son heterocígas y en su descendencia se encontrará, según el modelo mendeliano, que un 25 % de las semillas tiene genotipo silvestre, el 50 % será heterocígo y sólo el 25 % será homocígo para elF(iso)4E-GFP. Siguiendo este mismo modelo, fenotípicamente, se tendrá un 75 % de semillas resistentes al herbicida y un 25 % de semillas no resistentes. La selección de la generación F<sub>2</sub> mostró que la cantidad de sobrevivientes fue cercana al 75 % en todos los casos, en concordancia con lo esperado según el modelo mendeliano. De esta generación, también se extrajo RNA total de hoja adulta y en esta ocasión se hizo RT-PCR para detectar al mensajero de GFP (ver figura 4.10) y, aunque aparentemente se encuentra en bajos niveles de expresión, su presencia es una prueba adicional de que las plantas correspondientes son transgénicas.

**Tabla 4.1** Selección por RT-PCR de plantas positivas para la construcción A de la generación F<sub>1</sub>, mediante la amplificación del mensajero de *BAR* (resistencia a BASTA).

Línea	Gen <i>BAR</i>	Línea	Gen <i>BAR</i>	Línea	Gen <i>Bar</i>
A (+)	✓	J	✓	S	✓
B (+)	✓	K	✗	T	✓
C	✓	L	✓	U	✓
D	✗	M	✓	V	✗
E	✗	N	✓	W	✓
F	✓	O	✓	X	✓
G	✓	P	✓	Y	✓
H	✓	Q	✓		
I	✓	R	✓		

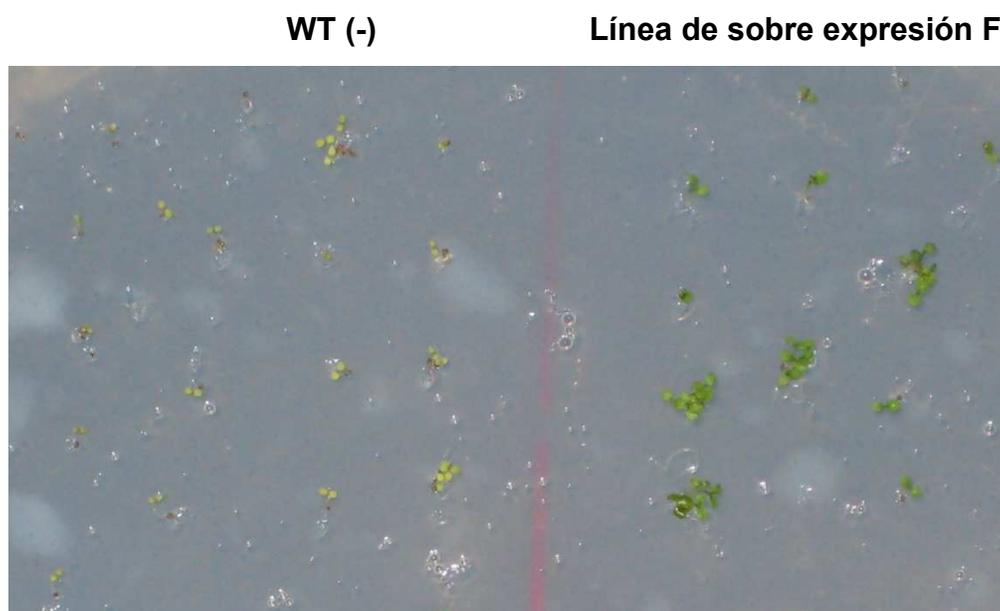


**Figura 4.10** RT-PCR de RNA total de hoja adulta de algunas candidatas de sobre expresión de *eIF(iso)4E*. Se detectó el mRNA de *GFP* (557 pb) con lo que se comprobó la expresión del mensajero de *eIF(iso)4E-GFP*.

Debe mencionarse que anteriormente se tuvo la oportunidad de probar los oligonucleótidos *GFP* y se comprobó su efectividad para DNA y plásmidos, pero para RNA la amplificación es difícil y no siempre exitosa, fallando inclusive en controles positivos de plantas transgénicas que expresan a *GFP*.

A partir de los resultados observados por RT-PCR y la cantidad de semillas generadas por cada planta, se continuó el estudio con las líneas F y J para reducir el número de líneas transgénicas a sembrar. El resto de las líneas, en su mayoría pertenecientes a la generación  $F_1$ , fueron conservadas en refrigeración para su posterior estudio en la elaboración de otros proyectos. De esta manera, se obtuvieron las progenies pertenecientes a la generación  $F_3$  de las líneas F y J, y la línea F fue llevada hasta conseguir las generaciones  $F_4$  y  $F_5$ . En este punto, no es posible asegurar la homocigocidad de la línea F, puesto que no desarrollamos una estrategia experimental que permitiera discriminar entre plantas homocigas y heterocigas en particular para *eIF(iso)4E-GFP*. A pesar de esto, el proceso de selección con BASTA de la generación  $F_3$  mostró un porcentaje de supervivencia del 80 %, mientras que las semillas de la generación  $F_4$  fueron resistentes prácticamente todas al herbicida BASTA (figura 4.11), con lo que se demuestra que la composición de individuos homocigos y heterocigos son los que predominan en estas generaciones. Esta elevada composición de individuos que llevan el transgén *eIF(iso)4E-GFP* en las generaciones  $F_4$  y  $F_5$  se aprovechó para prescindir de la

selección con BASTA, en el desarrollo de otros experimentos que se describirán más adelante. Es importante estudiar los efectos directos de la sobre expresión de eIF(iso)4E, y no confundirlos con los efectos generados por el estrés que resulta para las plantas la aplicación de BASTA, que se traduce en un crecimiento más lento de la planta. De esta manera, los posteriores experimentos que involucren plántulas de la generación F<sub>4</sub> ya no estarán influenciados por los efectos de BASTA, con la reserva de que un muy pequeño porcentaje pudiera contener aún el genotipo WT. Sin embargo, para continuar generando semillas más adelante, sí se seleccionará con el herbicida para asegurar que nuestras semillas son transgénicas y que no se pierde el transgén en la descendencia de estas plantas.

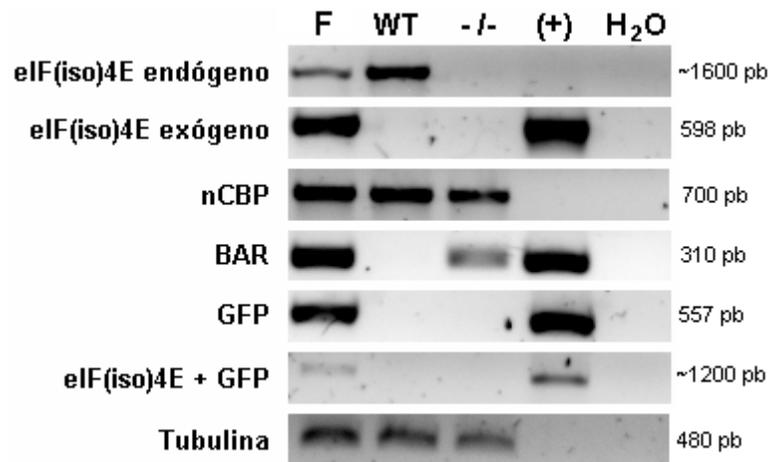


**Figura 4.11** Efecto del herbicida BASTA en línea transgénica de sobre expresión F, generación filial F<sub>4</sub>. La mayor parte de las plántulas de esta generación fueron resistentes al herbicida, prácticamente ninguna presenta el fenotipo WT (semillas colocadas en el lado izquierdo como control negativo).

#### 4.2.2 Inserción del transgen en el genoma de *A. thaliana* (DNA)

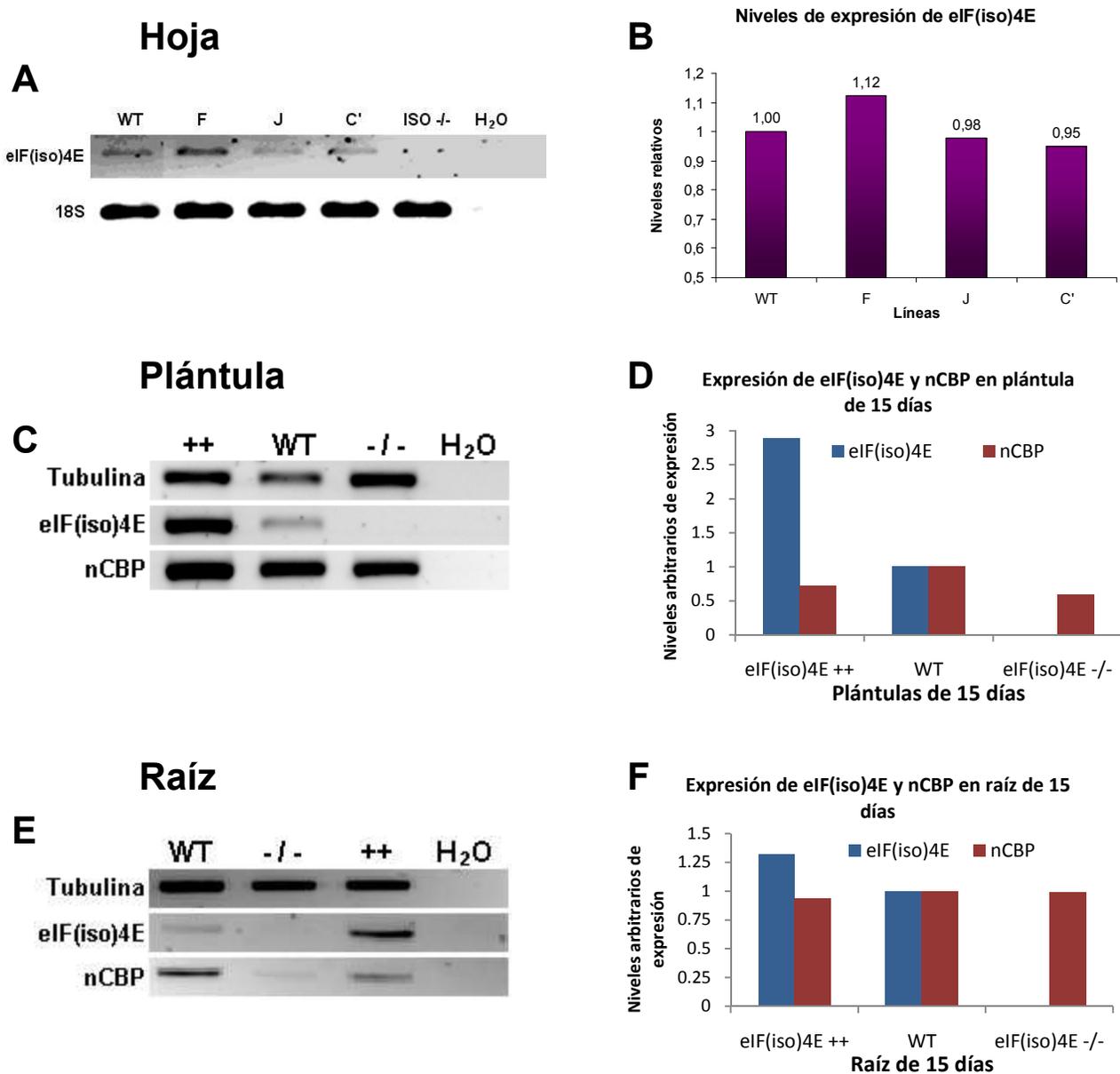
Se comprobó la inserción de la construcción A en el genoma de la línea eIF(iso)4E ++ (línea F) por PCR de DNA genómico (figura 4.12). Tomando como punto de comparación DNA de plántulas WT, eIF(iso)4E -/- de 15 días de edad y el

plásmido pEarley-eIF(iso)4E, como control positivo, se amplificaron los fragmentos correspondientes a los genes *eIF(iso)4E*, *nCBP*, *BAR*, *GFP* y la fusión *eIF(iso)4E-GFP*. Los oligonucleótidos pENTR-eIF(iso)4E amplificaron dos tipos de bandas, la primera correspondiente a eIF(iso)4E endógeno (1600 pares de bases), presente en plantas WT y ++, y el eIF(iso)4E exógeno (598 pares de bases), presente en la línea ++ y en el control positivo. *nCBP* y *tubulina* fueron amplificados como controles positivos, que se encuentran en todos los casos, a excepción del plásmido pEarley-eIF(iso)4E, como se esperaba. El gen *BAR* se encuentra presente tanto en el control (+), como en la línea ++ y la mutante nula eIF(iso)4E *-/-*. Los fragmentos correspondientes a *GFP* presentan una banda de 550 pares de bases en el DNA genómico de eIF(iso)4E ++ y en el control positivo, de igual forma ocurre con la mezcla de oligonucleótidos pENTR-eIF(iso)4E Fw y GFP Rv, amplificando una señal de 1200 pares de bases, que corresponde propiamente a la fusión *eIF(iso)4E-GFP*. El conjunto de bandas observadas son prueba de que la inserción se realizó, la línea F presenta los fragmentos correspondientes a *eIF(iso)4E* exógeno, el gen *BAR*, *GFP*, y *eIF(iso)4E::GFP*. Con esto puede asegurarse la inserción, aunque no puede decirse que esté activa traduccionalmente.



**Figura 4.12** PCR de DNA genómico para demostrar la inserción de *35S::eIF(iso)4E::GFP* en el genoma de *A. thaliana*. **F**: línea F; **WT**: línea silvestre; **-/-**: mutante eIF(iso)4E *-/-*; **(+)**: plásmido pEarley-eIF(iso)4E. La línea eIF(iso)4E ++ presenta dos fragmentos correspondientes a eIF(iso)4E, el endógeno (1600 pares de bases), que también se observa en plantas WT, y el insertado (598 pares de bases). La línea eIF(iso)4E ++ también presenta bandas correspondientes a los genes *BAR*, *GFP* y *eIF(iso)4E::GFP*, que estaban presentes en la construcción con que se transformó.

4.2.3 Determinación de los niveles de expresión de mRNA



**Figura 4.13** Comparación de los niveles de expresión en hoja adulta y plántulas de 15 días post germinación del mensajero de eIF(iso)4E en líneas de sobre expresión, respecto a plantas silvestres y homocigas nulas. **A y B**, Niveles de expresión en hoja adulta de diferentes líneas de sobre expresión en donde se ve que sólo la línea F (denominada a partir de ahora **eIF(iso)4E ++**) muestra una cantidad mayor de mensajero que la silvestre (12 %). También se muestran los niveles de expresión de eIF(iso)4E en plántulas de 15 días post germinación (**C y D**) y en raíz de 15 días (**E y F**) de las líneas eIF(iso)4E ++, WT y eIF(iso)4E -/-. Los niveles de mensajero en plántula de eIF(iso)4E son marcadamente superiores, en un 180 %, a los mostrados por la WT. En raíz, sólo es el 30 %.

En el análisis de la generación F<sub>2</sub>, se extrajo RNA total de hojas adultas de las líneas F, J y C y, por RT-PCR semicuantitativo, se amplificó a *eIF(iso)4E* y se compararon los niveles de RNA con los de la mutante *eIF(iso)4E -/-* y con los de plantas silvestres (ver figura 4.13, A y B). Los resultados indicaron que únicamente la línea F presentaba una ligera sobre expresión (12 %) con respecto a plantas silvestres (nombrada a partir de ahora ***eIF(iso)4E ++***, por ser la única que parecía sobre expresar su mRNA). El resto de las líneas mostraba niveles de mensajero muy parecidos a WT y sugerían que, aunque la construcción se encontraba bajo un promotor fuerte como lo es 35S, tal vez una sobre expresión de este factor podría alterar de forma negativa el desarrollo de la planta y probablemente se estuviera activando algún mecanismo de control que impidiera una síntesis mayor de este mRNA.

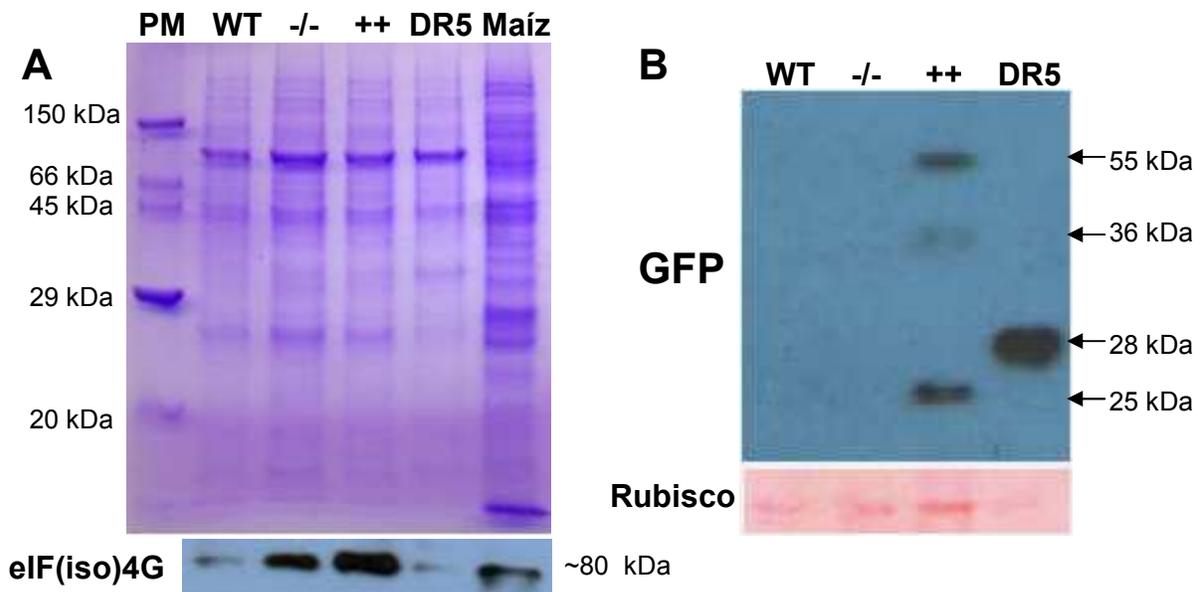
Por otro lado, debe considerarse también que, de acuerdo a los resultados generados por microarreglos (ver sección de antecedentes, figura 2.11), no es en hoja adulta en donde el mensajero del factor *eIF(iso)4E* se encuentra más abundantemente, sino en raíz y plántula. Por esta razón, se repitió este experimento utilizando RNA total de raíz y plántulas crecidas en medio líquido por 15 días. En plántula, fue evidente que el mensajero de *eIF(iso)4E* se encuentra en mayor cantidad que en plántulas WT (ver figura 4.13, C y D), en un 180 %. En raíz, el exceso de mRNA de *eIF(iso)4E* sólo es del 30 %, respecto a raíces WT (ver figura 4.13, E y F). Es muy interesante notar también que los niveles de *nCBP*, en plántula, disminuyen en una proporción importante, llegando casi a la mitad respecto a WT, sugiriendo que probablemente algunas de las funciones ejercidas por *nCBP* pudieran ser suplidas por *eIF(iso)4E*. Como ya se mencionó antes, los oligonucleótidos para GFP no funcionan satisfactoriamente con RNA, y por esto es que no se consideraron aquí.

El análisis a nivel de mRNA no es suficiente para decir que una proteína se sobre expresa ya que no indica qué tan activo está traduccionalmente el mensajero. Por otra parte, a nivel post traduccional podría darse una degradación o

estabilización de la proteína de fusión, lo cual tendría repercusión en los niveles observados de la misma. Esto implica que debe evaluarse la proteína eIF(iso)4E-GFP en las plantas transgénicas.

#### 4.2.4 Determinación de la presencia de la proteína de fusión eIF(iso)4E-GFP

##### 4.2.4.1 Inmunodetección por Western Blot



**Figura 4.15** Inmunodetección de la proteína de fusión eIF(iso)4E-GFP en extractos totales de las líneas WT, eIF(iso)4E  $-/-$ , eIF(iso)4E  $++$ , DR5 y proteínas totales de ejes de maíz (control positivo de eIF(iso)4F). A) Electroforesis SDS-PAGE. Es posible observar sutiles cambios en los patrones de proteínas entre las líneas de *A. thaliana*, así como las marcadas diferencias de las mismas con respecto a los ejes embrionarios de maíz. En la parte inferior se muestra un western blot contra eIF(iso)4F, que reconoció a las proteínas eIF(iso)4G en cada caso. B) Western blot utilizando anticuerpos contra GFP. El anticuerpo reconoció señales en las muestras de la línea eIF(iso)4E  $++$  y DR5. En eIF(iso)4E  $++$  se observa una señal de 55 kDa correspondiente a la proteína de fusión eIF(iso)4E-GFP, tenues señales de 36 kDa y una ligera de 25 kDa. En la parte inferior se muestra teñida con rojo de Ponceau la proteína rubisco, que se empleó como control de carga.

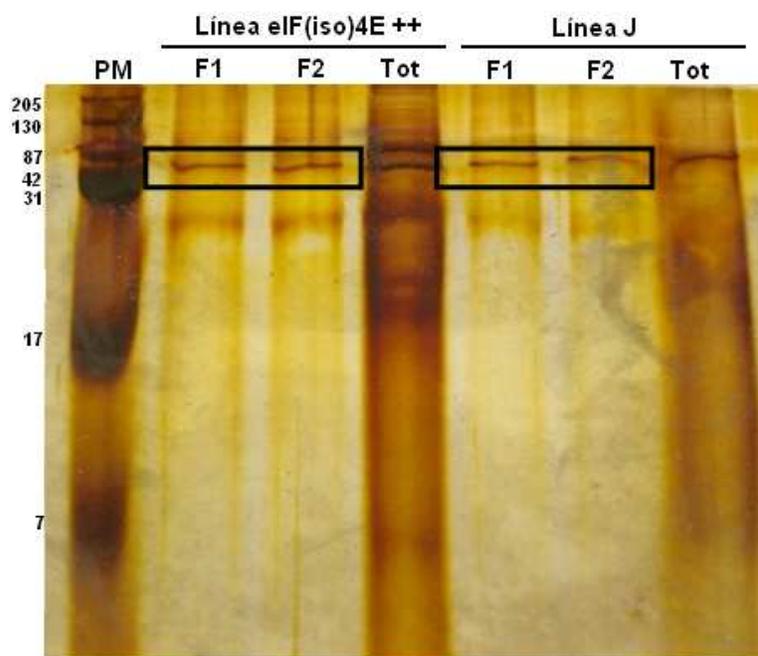
La detección de la proteína de fusión se realizó utilizando plántulas de 15 días post germinación crecidas en medio líquido. Se utilizaron plántulas de las líneas WT, eIF(iso)4E  $-/-$ , eIF(iso)4E $++$  (de la generación  $F_4$ ) y DR5. La línea DR5 es una línea transgénica que expresa GFP donde se sintetizan auxinas, por ello es nuestro

control positivo de GFP. Se extrajeron proteínas totales y se purificó la proteína de fusión eIF(iso)4E-GFP producto de la construcción A por cromatografía de afinidad con partículas de Ni.

Se realizó western blot con proteínas totales resueltas y transferidas el mismo día de su extracción, reduciendo, en lo posible, la degradación de proteínas debidas a una manipulación prolongada a temperatura ambiente, inherente a los procesos de purificación. En la figura 4.15 A, se observa un gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomase, en el cual se colocaron 15 µg de proteína total de las líneas WT (control de eIF(iso)4F), eIF(iso)4E -/- (control negativo de eIF(iso)4E), la línea eIF(iso)4E ++, DR5 (control positivo de GFP) y proteínas totales extraídas de ejes embrionarios de maíz (control positivo de western blot). Los patrones de bandas mostraron diferencias entre las proteínas de maíz y de *A. thaliana*, ya que se trató de extractos a partir de organismos y tejidos diferentes. En las muestras de *A. thaliana*, se ve una señal distintiva correspondiente a la línea DR5 cercana a los 30 kDa.

Por otra parte, en el western blot, utilizando el anticuerpo policlonal anti-eIF(iso)4F, que reconoce tanto a eIF(iso)4E como a eIF(iso)4G, se esperaba detectar a eIF(iso)4G en todas las muestras, mientras que a eIF(iso)4E sólo en los extractos de WT, ++, DR5 y Maíz. Se observó, en todos los casos, la proteína eIF(iso)4G, aunque no fue posible detectar a eIF(iso)4E en ninguna muestra, probablemente debido a la abundancia de eIF(iso)4G en los extractos totales, o a la facilidad de degradación de eIF(iso)4E. En la figura 4.15 B, se muestra un western blot con el anticuerpo monoclonal anti-GFP, que ha reconocido una serie de señales en las muestras eIF(iso)4E ++ y DR5. En este caso, se esperaba detectar a GFP en la línea DR5 con un peso molecular aproximado de 25 kDa y en la línea eIF(iso)4E++ a la proteína de fusión, con un peso molecular aproximado de 53 kDa. En DR5, se observó una señal muy fuerte con un peso molecular de 28 kDa, correspondiendo a GFP y que, probablemente, sea la proteína distintiva de esta muestra en el gel teñido con azul de Coomasie en el panel A. En la línea eIF(iso)4E ++, se ve una señal con un peso molecular de 55 kDa que corresponde al esperado para la proteína de fusión

eIF(iso)4E-GFP que se sobre expresó. Esta misma muestra también contiene señales reconocidas por anti-GFP de menor peso molecular, que evidencian la ya reportada facilidad de degradación del factor eIF(iso)4E, donde la señal más ligera, de 25 kDa, corresponde, probablemente, a la proteína GFP sin el factor eIF(iso)4E.

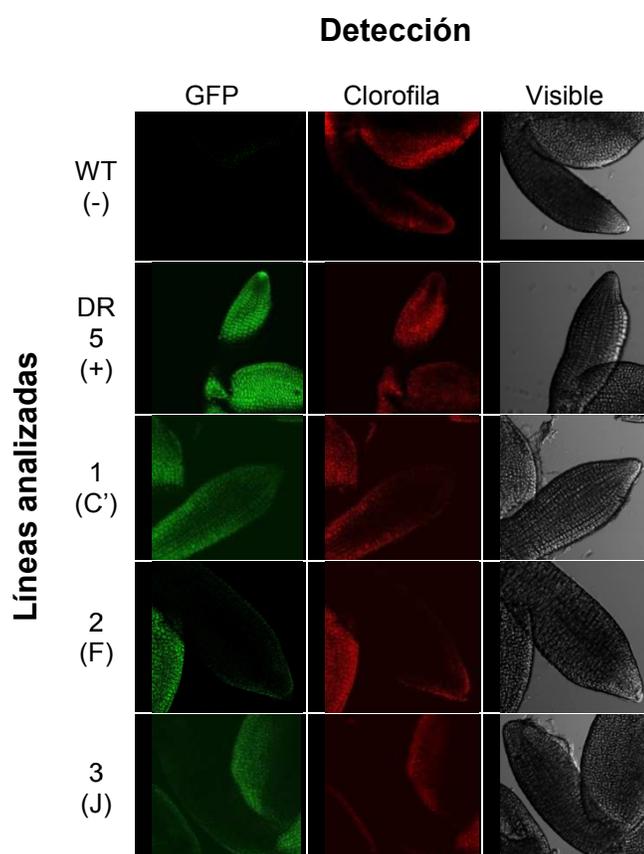


**Figura 4.16** Purificación de la proteína de fusión eIF(iso)4E-GFP por cromatografía de afinidad con partículas de Ni. Se observan dos bandas mayoritarias de ~50 kDa y de ~28 kDa. El recuadro negro señala a la probable banda correspondiente a la proteína de fusión. La banda de 28 kDa puede ser un producto de degradación que aún contiene la cola de histidinas de la construcción.

De las proteínas purificadas con partículas de Ni, se recuperaron dos fracciones de 100  $\mu$ L. Se resolvieron proteínas de las líneas eIF(iso)4E ++ y la línea J por electroforesis desnaturizante SDS-PAGE y se tiñó con plata (figura 4.16). En ambas líneas, se observó una banda con un peso molecular cercano a los 50 kDa (figura 4.16), probablemente la proteína de fusión, y algunas otras bandas que puedan ser debidas a uniones inespecíficas o productos de degradación. Para comprobar lo observado en las purificaciones por cromatografía de afinidad, se realizó western blot con el anticuerpo policlonal anti-eIF(iso)4F y con anti-GFP en las fracciones purificadas; sin embargo, estos anticuerpos no reconocieron ninguna señal. Lo anterior puede tener alguna de las siguientes causas: 1) que las bandas no

corresponden a la proteína de fusión ni a productos de degradación, sino a inespecificidades en el método de purificación; ó 2) como el western blot se hizo después de una manipulación prolongada a temperatura ambiente, las fracciones pudieron contener proteínas degradadas, no detectadas por alguno de los dos anticuerpos.

#### 4.2.4.2 Detección de la proteína de fusión por microscopía confocal



**Figura 4.17** Visualización de GFP por microscopía confocal en embriones de líneas de sobre expresión, generación F<sub>3</sub>. Se emplearon los canales de la GFP, clorofila y luz visible. Las líneas F, J y C' resultaron positivas para GFP.

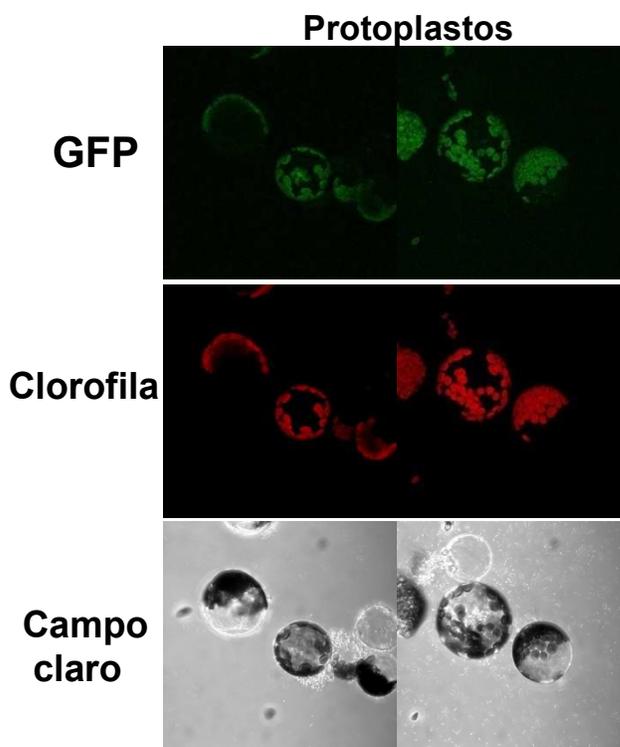
Dados los resultados en la detección de la proteína de fusión por western blot, se decidió analizar la presencia de la GFP por microscopía confocal. Algunos embriones de las líneas C, F y J fueron analizados por microscopía confocal para detectar la señal fluorescente de la GFP (ver figura 4.17). Se utilizaron embriones

para evitar complicaciones que pudiera presentar el exceso de clorofila presente en plantas adultas y la dificultad de tratar con las frágiles raíces, aunque tal vez este último tejido habría sido el más apropiado, puesto que es donde la proteína eIF(iso)4E se encuentra más abundantemente en plantas WT y no hay interferencia de la clorofila.

Empleando canales que permitieran detectar a GFP (emisión 515 a 565 nm) y la clorofila (600-650 nm), se observó que las líneas C, F y J mostraban una señal clara aunque débil de GFP y que ésta parecía estar localizada en el citoplasma. La fluorescencia es mucho menos marcada que en el control positivo DR5, donde la señal es muy fuerte y localizada, probablemente, debido a que aunque este factor de traducción se encuentra sobre expresado, no es muy abundante a nivel de proteína en la planta. Es probable también que el espectro de emisión normal de la GFP esté siendo afectado por la presencia de eIF(iso)4E, tal vez desplazándolo hacia valores más arriba o más debajo de longitud de onda y por ello presentar señales tan tenues en la emisión.

La localización subcelular se estudió transformando protoplastos con el plásmido pEarley-eIF(iso)4E (construcción A, ver figura 4.18). En este caso, la señal de GFP fue muy baja y es difícil asegurar su presencia, dado el solapamiento de la clorofila con los cloroplastos. Reportes previos han demostrado que una proteína de fusión similar, expresada transitoriamente en hojas de *N. benthamiana*, se localiza en retículo endoplásmico y que su ubicación es debida a la funcionalidad de eIF(iso)4E y no a efectos de la GFP que lleva consigo (Beauchemin *et al*, 2007). La ausencia de señal fluorescente en los protoplastos de hojas de *A. thaliana* transformados pudiera tener diversas causas, entre ellos se encuentra el estrés al que es sometida la célula en los diferentes tratamientos para conseguir los protoplastos, que carecen de pared celular; aunque también se ha reportado que en estos sistemas se puede llevar a cabo un re arreglo de la cromatina acompañado de un proceso de de-diferenciación, que pudiera impedir que nuestra proteína de fusión se exprese (Tessadori *et al*, 2007). Existen también algunos elementos a considerar para dudar de la autenticidad

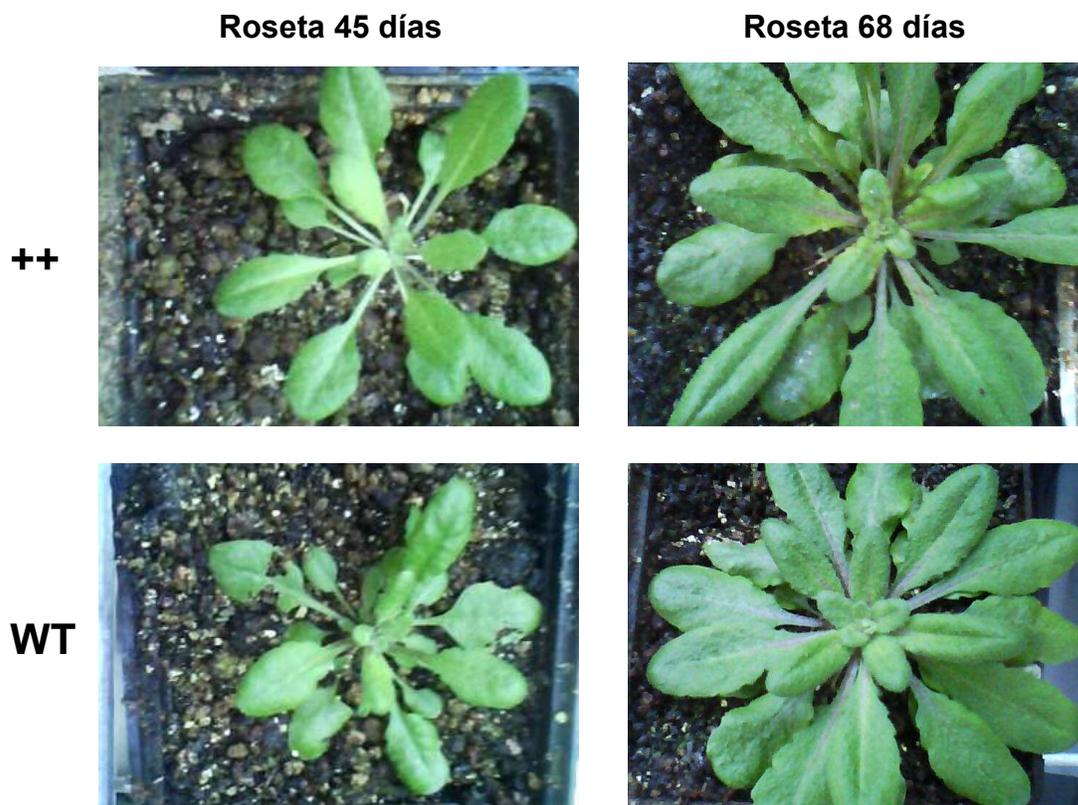
señal de GFP en la transformación de protoplastos, como el que la señal en GFP es muy débil y coincide con la localización de la clorofila; además de que en los embriones vistos en la figura 4.17 todas las células presentan la señal fluorescente, cuando en la transformación de protoplasto sólo algunas fueron positivas. Para estudiar la localización subcelular, sería útil probar con metodologías nuevas, como la planteada por Marion *et al* (2008), donde se transforman plántulas de *A. thaliana* y el estrés mecánico se minimiza, además de que se trataría de un sistema más parecido a lo que se tiene en una transformación genética estable. De esta forma, la localización subcelular quedaría pendiente para desarrollarse más adelante con alguna otra metodología. También podrían probarse algunas otras proteínas reporteras fluorescentes: RFP, YFP o CFP.



**Figura 4.18** Localización subcelular de la proteína de fusión eIF(iso)4E-GFP. 1) Localización subcelular en protoplastos. Las señales fluorescentes se observan localizadas en cloroplasto, lo que sugiere que la proteína no se está traduciendo, y que estas señales bien pudieran tratarse en realidad de clorofila.

#### **4.2.5 Fenotipo de plantas transgénicas que expresan eIF(iso)4E-GFP (estudios preliminares)**

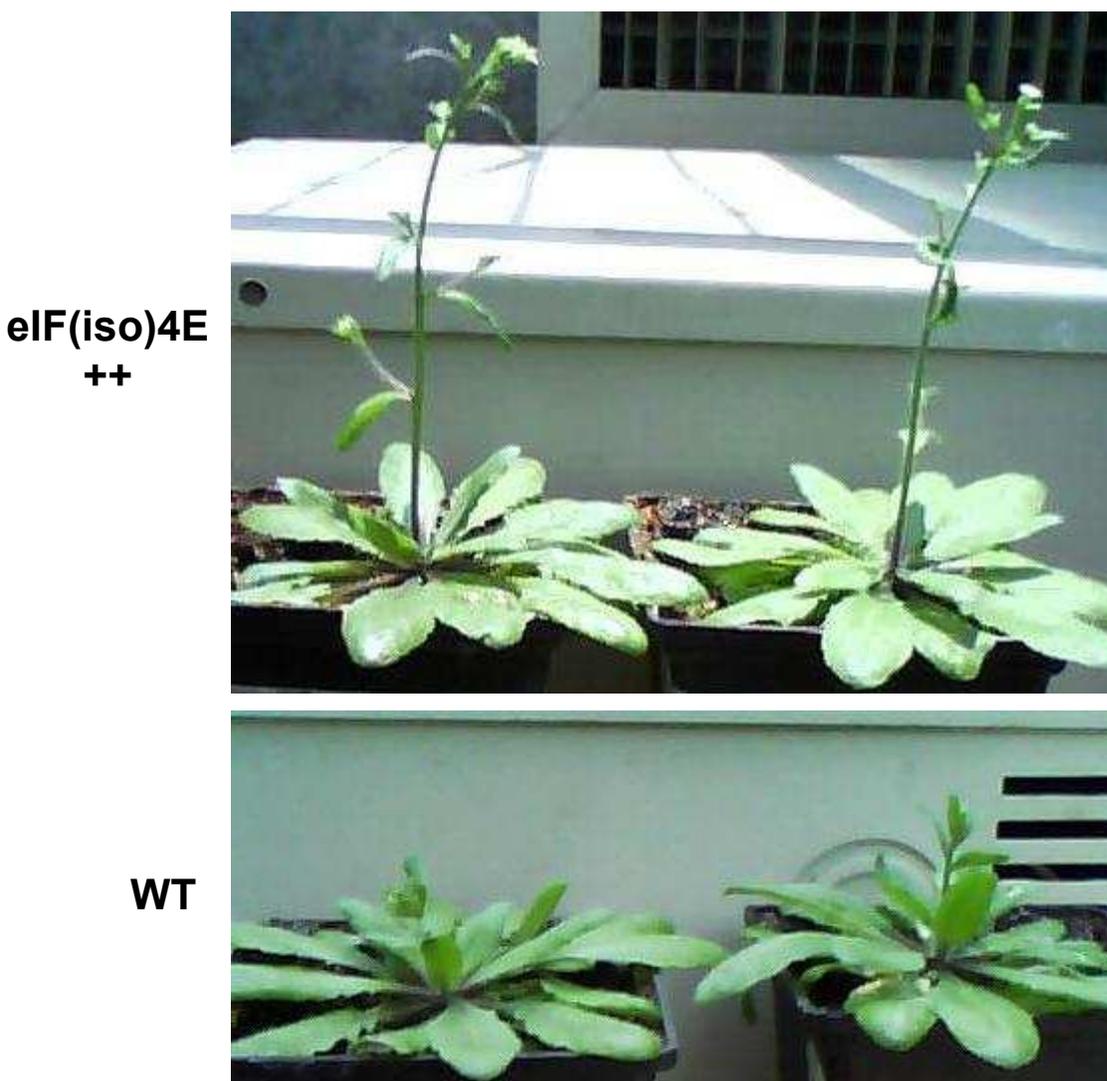
Los resultados observados a nivel DNA, RNA y proteína confirman la expresión del factor eIF(iso)4E-GFP en la línea eIF(iso)4E ++. Aún con estas evidencias experimentales, es importante recordar que los fenotipos pudieran deberse a la interrupción de algún gen ocasionada por la inserción de la construcción A y no propiamente a la sobre expresión del factor eIF(iso)4E, por lo que se deben verificar en al menos dos de las otras líneas transgénicas generadas.



**Figura 4.19** Desarrollo de la roseta en plantas transgénicas en dos diferentes etapas de desarrollo: jóvenes (45 días post germinación) y adultas (68 días post germinación). Cualitativamente, no se observan diferencias significativas entre las plantas que sobre expresan a eIF(iso)4E y las plantas silvestres. El número de hojas y el tamaño de la roseta son similares en ambas líneas. Se compararon 8 plantas de la línea F y 8 plantas silvestres.

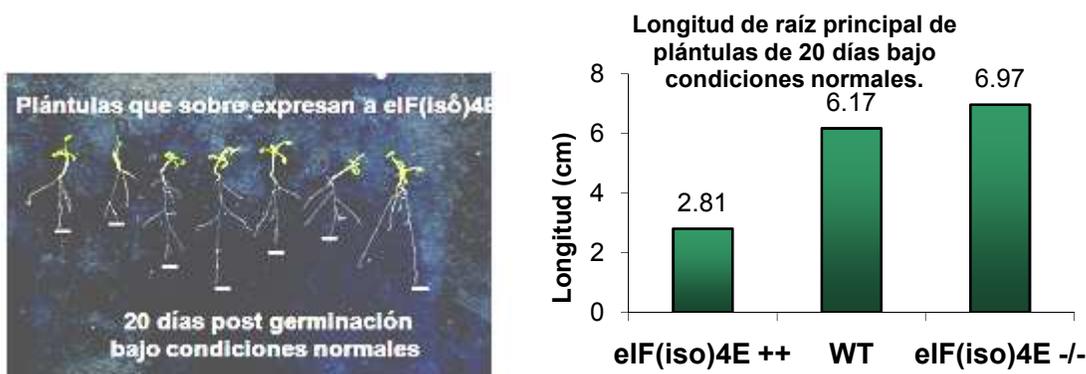
Primero, se comparó el desarrollo de la roseta entre plantas de las líneas eIF(iso)4E ++, línea F, y WT crecidas en medio Gamborg's B-5 por tres semanas bajo fotoperiodo de día corto, sin observar diferencias importantes en la germinación y establecimiento de la plántula. Ocho plantas de cada línea fueron transplantadas a macetas con la mezcla de sustratos Metromix 200 y se permitió su desarrollo por 1 mes bajo fotoperiodo de día corto. Posterior a este tiempo, las plantas se colocaron

bajo fotoperiodo de día largo hasta la generación de semillas. El número de hojas y la longitud de las mismas fueron dos parámetros que se midieron pero que no mostraron diferencias significativas entre las dos líneas. La figura 4.19 ilustra la forma y tamaño de las rosetas de plantas jóvenes (45 días de edad) y adultas (68 días de edad), que no difieren de forma importante.



**Figura 4.20** Desarrollo de inflorescencia en plantas transgénicas de sobre expresión y silvestres. Las imágenes fueron obtenidas a 75 días post germinación. La aparición de inflorescencias (75 días) en plantas que sobre expresan a eIF(iso)4E se llevó a cabo tres días antes que en las plantas silvestres (78 días).

Una vez transferidas a fotoperiodo de día largo, en las plantas de *A. thaliana* se promueve la floración. En esta etapa, se observaron algunas diferencias importantes. En la figura 4.20, se muestran plantas crecidas bajo las condiciones indicadas en el párrafo anterior a 75 días de edad, donde las plantas de la línea eIF(iso)4E ++ ya desarrollaron inflorescencia y sobrepasaron el *bolting* (una inflorescencia de 6 cm de longitud), mientras que en plantas silvestres el desarrollo de la inflorescencia apenas comienza y no sobrepasa los 3 cm de longitud en el lote estudiado. Las plantas silvestres alcanzaron el *bolting* 3 días después que las eIF(iso)4E ++, es decir, a los 78 días de edad. Sin embargo, a los 75 días de edad no se encontraron diferencias importantes en el número y tamaño de las hojas de la roseta, las cuales en promedio contienen alrededor de 25 hojas en ambas líneas. A excepción del tiempo de la aparición de la inflorescencia, no se observaron otros cambios en las características de la parte aérea de las plantas, tales como el número de flores generadas, la cantidad de silicuas y semillas producidas, al menos de forma significativa.

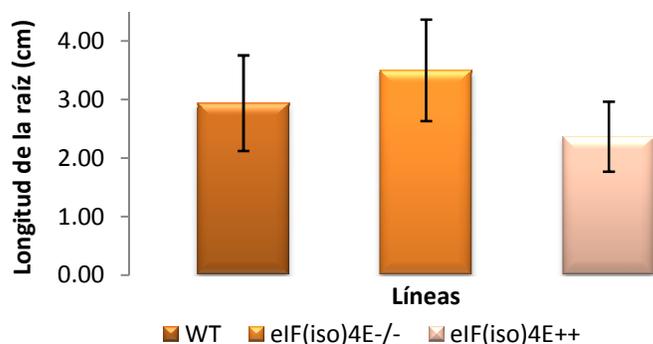


**Figura 4.21** Longitud de la raíz principal de plántulas transgénicas de sobre expresión. Bajo condiciones normales de crecimiento, la longitud de la raíz principal a 20 días post germinación en plántulas ++ es menor (2.8 cm) que en plántulas WT (6.17 cm) y eIF(iso)4E -/- (6.97 cm). Las plantas eIF(iso)4E ++ fueron seleccionadas por cuatro días con BASTA.

Uno de los fenotipos observados en la mutante nula para eIF(iso)4E -/-, fue el mayor crecimiento de la raíz principal de 1 cm con respecto a plantas silvestres. Por ello, en un experimento en conjunto con el proyecto de doctorado de Valeria Martínez en este laboratorio, se estudió también el desarrollo de la raíz principal en

una línea transgénica de sobre expresión de eIF(iso)4E. El estudio se realizó germinando las semillas en medio Hoagland y midiendo la longitud de la raíz a la edad de 20 días (figura 4.21). En este estudio, las semillas fueron seleccionadas mediante incubación de 4 días con BASTA y luego se transfirieron a nuevo medio Hoagland sin marcadores de selección. Se realizó esta selección con BASTA para asegurar una elevada cantidad de plántulas transgénicas positivas en el experimento. La figura 4.21 indica una longitud de la raíz principal cercana a la mitad de lo que se observa comúnmente en plantas WT y mutantes nulas eIF(iso)4E  $-/-$ . Para descartar que este efecto sea debido al herbicida y no a la sobre expresión de eIF(iso)4E, se repitió este experimento sin aplicar el herbicida y colocando en la misma caja semillas eIF(iso)4E  $++$ , eIF(iso)4E  $-/-$  y WT, cuyas longitudes de la raíz principal a 20 días post germinación se presentan en la figura 4.22. Como puede observarse, las diferencias en este nuevo experimento fueron menores, aunque la tendencia general mostrada en la figura 2.14 (ver sección de antecedentes, raíz principal más larga para la mutante eIF(iso)4E  $-/-$ ) continua observándose. Es importante validar estadísticamente estos experimentos, incrementando el número de plantas y experimentos independientes para determinar si existe o no un fenotipo distinto de raíz en las plantas eIF(iso)4E  $++$  con respecto a plantas silvestres.

#### Segunda determinación de longitud de la raíz principal. 20 dpj.



**Figura 4.22** Determinación de la longitud de la raíz principal de plántulas de 20 días post germinación en medio Hoagland bajo fotoperiodo de día corto, en ausencia de BASTA.

Es importante tomar en cuenta también que, dado que en la generación F4 prácticamente todos los individuos resultaron positivos para la resistencia a BASTA (ver figura 4.12), las observaciones sobre el fenotipo realizadas deben considerarse como preliminares y ser confirmadas a futuro en condiciones de homocigidad de la línea estudiada.

#### **4.3 OBTENCIÓN DE SEMILLAS TRANSFORMANTES DE COMPLEMENTACIÓN DE eIF(iso)4E**

Se transformaron inicialmente 5 plantas mutantes homocigas nulas con la construcción 35S::eIF(iso)4E::GFP B, que confiere resistencia a kanamicina y se obtuvo un lote de semillas candidatas de alrededor de 200 semillas, que fueron sometidas a selección en medio Gamborg's B-5 con kanamicina (50  $\mu$ M) y sacarosa al 1% p/v, por el método de selección rápida de 4 días (ver figura 4.23). Este método de selección produjo tres plántulas resistentes a kanamicina, que fueron cambiadas a una placa con medio Gamborg's B-5 sin kanamicina; sin embargo, de estas tres plántulas sólo sobrevivió una (figura 4.22 B), probablemente, debido a una inadecuada manipulación de estas plántulas siendo todavía muy jóvenes y vulnerables. La plántula sobreviviente permaneció por 18 días más en este nuevo medio y fue después transferida a la mezcla de sustratos Metromix 200.

A pesar de contar con una planta resistente a kanamicina, es necesario obtener más plantas transgénicas de este tipo, para evaluar los efectos observados en distintas líneas de complementación del factor eIF(iso)4E. Una nueva transformación de plantas homocigas nulas fue llevada a cabo, sin embargo, ya no se presentan en este proyecto por falta de tiempo, pero, en las plantas que resulten transformantes positivas, se evaluará a nivel DNA, RNA, y proteína la expresión de la proteína de fusión eIF(iso)4E-GFP, cuyos resultados se generarán en posteriores proyectos de investigación en este laboratorio.



**Figura 4.23** Selección de semillas transformantes de complementación del factor  $eIF(iso)4E$ . La selección se realizó en medio Gamborg's B-5 con kanamicina ( $50 \mu\text{M}$ ). De un lote de 150 semillas se obtuvieron tres plántulas resistentes a kanamicina, de las cuales solo 1 plántula sobrevivió a los cambios de medio (primero el cambio a medio Gamborg's B-5 sin kanamicina y 18 días después el cambio a tierra).

## 5. DISCUSIÓN

En este proyecto, se han generado dos construcciones para expresar eIF(iso)4E de *A. thaliana* fusionado a la proteína verde fluorescente GFP. Estas construcciones se emplearon para obtener plantas transgénicas estables en los fondos genéticos WT y eIF(iso)4E -/- del ecotipo Columbia (Col-0). La expresión de esta quimera ha sido verificada en distintos niveles en plantas transgénicas con fondo silvestre WT: a nivel DNA mediante la detección por PCR de la construcción insertada en el genoma de la planta, a nivel RNA por RT-PCR para comprobar la presencia del mRNA correspondiente a *eIF(iso)4E* y a *GFP* y, por último, a nivel proteína, donde se detectó por *western blot* con anticuerpos monoclonales anti-GFP a la proteína de fusión, con un peso molecular muy parecido al esperado (55 kDa).

La transformación de plantas silvestres (WT) generó una cantidad relativamente grande de líneas que sobre expresan a eIF(iso)4E, al menos a nivel mRNA. Hay que señalar que en este trabajo se concentró el análisis en la línea F, aunque se obtuvieron varias líneas de semillas transgénicas. Las plantas transgénicas de esta línea se llevaron hasta obtener las generaciones F<sub>4</sub> y F<sub>5</sub>; sin embargo, nunca se demostró la composición de individuos homocigos y heterocigos, simplemente se observó que prácticamente todas las plántulas eran resistentes al herbicida. Es altamente recomendable generar líneas de sobre expresión homocigas para evitar someter las plantas a selección con BASTA, que constituye un estrés para la misma y puede alterar el análisis fenotípico. El análisis de varias líneas transgénicas permitirá determinar si los efectos que se observan son debidos a la expresión de la proteína de fusión o son producto de la interrupción de algún gen. El mapeo de la inserción del transgén también puede dar indicios acerca de su ubicación en el genoma y dilucidar si se afecta la expresión de algún gen particular.

Los niveles de mRNA de eIF(iso)4E en las plantas transgénicas de la línea eIF(iso)4E ++ revelan una mayor cantidad de este mensajero, alrededor de 2.8 veces en plántula y 1.3 veces en raíz, respecto a plantas silvestres, y una disminución del

mensajero de nCBP. Estos valores reflejan una transcripción activa del transgen que se insertó, lo que sugiere que la construcción se introdujo, según se mostró por PCR, en una parte del genoma que permite su expresión activa. Sin embargo, sería muy útil saber qué tan activamente se está traduciendo este mensajero, a través del análisis de su distribución en perfiles polirribosomales, porque ya se ha demostrado que los patrones de distribución de mRNA y sus respectivas proteínas suelen variar (TAIR, [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org), ver figura 2.11).

Los resultados generados por western blot confirman el procesamiento del mRNA de *eIF(iso)4E::GFP*. Aquí se observan varias bandas de diferente peso molecular inferiores a la esperada de 55 kDa, señales claras que indican degradación de la proteína de fusión, que es consistente con reportes previos en maíz: el factor eIF(iso)4E de maíz se degrada muy rápidamente y su regulación es a nivel traduccional, con una elevada tasa de recambio (Dinkova *et al*, 2000). Al estar presente la proteína de fusión se demuestra que su mRNA está siendo traducido activamente, pero aún queda abierta la interrogante de la regulación post-traduccional, puesto que no se están considerando los posibles mecanismos presentes en la regulación de la síntesis de proteínas (Gebauer y Hentze, 2004; Sánchez de Jiménez *et al*, 2005; Dinkova *et al* 2000). Para demostrar una real sobre expresión de la proteína eIF(iso)4E, sería necesario plantear una estrategia experimental que permita la comparación de los niveles de la proteína endógena y la de fusión, por western blot. La estabilidad y funcionalidad de la proteína de fusión eIF(iso)4E-GFP A debe estudiarse con algo más de profundidad y compararla con la que presenta el factor eIF(iso)4E por sí mismo. Esto puede lograrse mediante DSC (calorimetría diferencial de barrido) y otras técnicas cuya finalidad es caracterizar, mediante métodos fisicoquímicos y cinéticos, la desnaturalización y estabilidad de proteínas, y la interacción con otras proteínas de la maquinaria de inicio de la traducción y cap (Rodríguez-Larrea *et al*, 2006; Slepnev *et al*, 2008; Niedzwiecka *et al*, 2004; Volpon *et al*, 2006). La funcionalidad de la proteína de fusión también debe evaluarse; *in vitro*, a través de traducción en lisado de reticulocito de conejo o germen de trigo; o *in vivo*, mediante la recuperación de cepas de *S. cerevisiae*

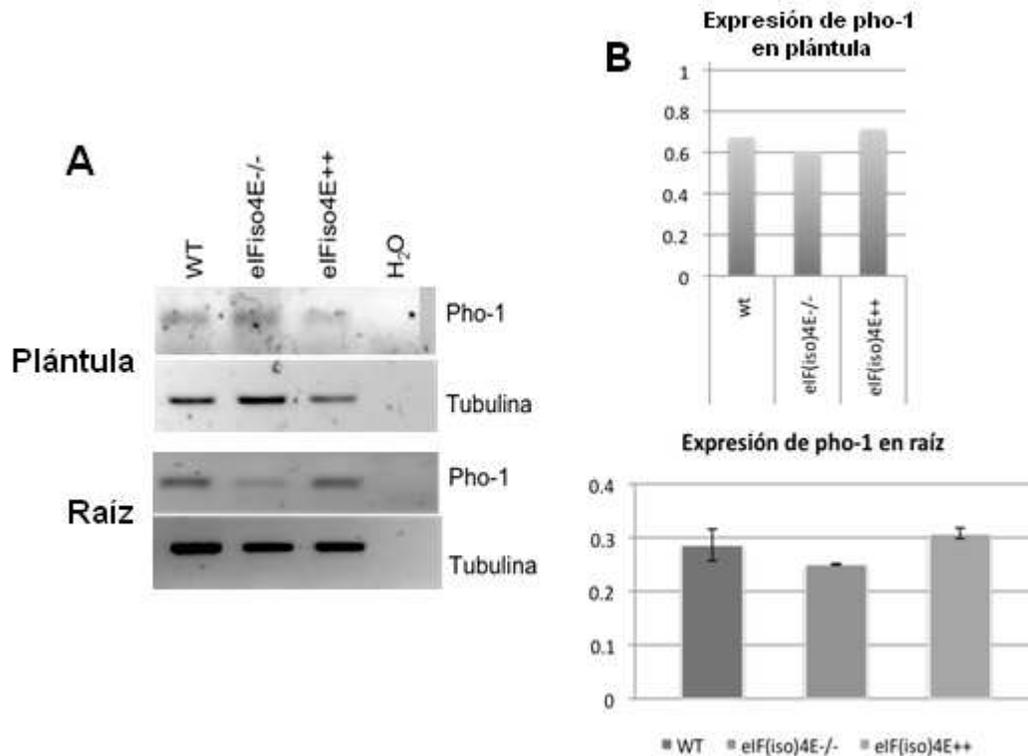
carentes de eIF4E (Rhoads *et al*, 2007). Tampoco debe olvidarse que el transgen contiene el promotor 35S, que regula una transcripción ubicua, en lugar de la región 5'UTR que contiene el gen *eIF(iso)4E* en plantas silvestres, por lo que pudiera faltar una regulación traduccional.

Otro punto relevante es la visualización hecha por microscopía confocal para detectar a la GFP. Se utilizaron embriones para disminuir en buena medida las interferencias de la clorofila, puesto que es bien sabido que los espectros de emisión de la GFP y de la clorofila no son demasiado diferentes, y por ello es posible y común que en algún punto crucen sus emisiones. A pesar de encontrarse el transgen bajo el promotor fuerte 35S, las señales producidas por la GFP fueron siempre tenues, aunque no debe olvidarse que estas señales corresponden al exceso de eIF(iso)4E en los embriones estudiados. La localización subcelular no se realizó con plántulas o embriones debido a que no se disponía de instrumentos que generaran cortes adecuados para lograr ver el contenido de una sola célula, por lo que, se decidió estudiar la localización subcelular de la fusión eIF(iso)4E-GFP en protoplastos. En estas células, no pudo observarse de manera confiable la expresión de eIF(iso)4E-GFP, por lo que no se pudo definir su localización subcelular. Las causas de esta ausencia de proteína de fusión pueden ser varias: en primer lugar debe considerarse el estrés al que son sometidas estas células que pueden alterar la expresión de ciertos genes (Marion *et al*, 2008), en segundo lugar se han reportado ya importantes rearrreglos de la estructura de la cromatina (Tessadori *et al*, 2007) en este tipo de células que carecen de pared celular, es decir, no es accesible el transgen que produciría la proteína de fusión, y finalmente los protoplastos son células que se encuentran en un proceso de de-diferenciación (Tessadori *et al*, 2007), y la expresión de genes se verá afectada por estas condiciones. Se ha reportado que este tipo de proteínas de fusión se localizan en el retículo endoplásmico y que son catalíticamente activas, al menos esto se ha demostrado ya mediante la expresión transitoria de eIF(iso)4E de *A. thaliana* fusionado a GFP en hojas de *Nicotiana benthamiana*, donde las interacciones entre eIF(iso)4E y los potyvirus ya han sido demostradas (Beauchemin *et al*, 2007).

Se prepararon dos modelos estructurales correspondientes a cada una de las proteínas de fusión, producto de las dos construcciones hechas, en colaboración con el Dr. Rogelio Rodríguez Sotres. El primer modelo, eIF(iso)4E-GFP A, muestra a la proteína de fusión que contiene entre las dos proteínas fusionadas una secuencia de 16 aminoácidos, que no parece alterar la estructura terciaria y actividad catalítica del factor de inicio de la traducción, donde la disposición espacial del sitio catalítico y de los aminoácidos responsables de la unión a las diferentes proteínas de tipo 4E-BPs, se conserva. Se tomó como base la estructura reportada de trigo de eIF4E (Browning *et al*, 2007) para modelar a eIF(iso)4E y se obtuvieron diferentes estructuras, donde únicamente la mostrada en la figura 4.7 C y D mostró una calificación suficientemente buena. Por otro lado tenemos a la proteína eIF(iso)4E-GFP A, cuyos 16 aminoácidos que sirven de puente permiten que se adopte una conformación estructural donde el sitio catalítico mantiene sus características estructurales. Las interacciones no covalentes que pudieran presentarse entre aminoácidos de la GFP y eIF(iso)4E deben ser estudiadas a mayor detalle probando dinámicas moleculares.

La segunda proteína de fusión, eIF(iso)4E-GFP B, que sólo contiene un aminoácido entre las proteínas fusionadas, presenta distorsiones importantes tanto en la disposición espacial del sitio catalítico como en los aminoácidos encargados de la unión a otras proteínas. Hasta el momento de la escritura de este texto, no se han calificado aún los modelos obtenidos para esta proteína de fusión, por lo que es importante tomar los resultados obtenidos como preliminares. Probablemente, una separación de un aminoácido (un residuo de alanina) esté provocando conformaciones estructurales no estables termodinámicamente, de tal manera que la proteína busque un estado energético más favorable. La conformación final puede ser consecuencia de efectos estéricos provocados por la cercanía de ambas proteínas, separando algunas regiones de las proteínas entre sí, o bien se estén produciendo interacciones débiles no covalentes. El resultado es una proteína de fusión que tiene distorsionados sus sitios de unión y el sitio catalítico. No se descarta la posibilidad de que la estructura 5' cap o eIF(iso)4E generen las modificaciones

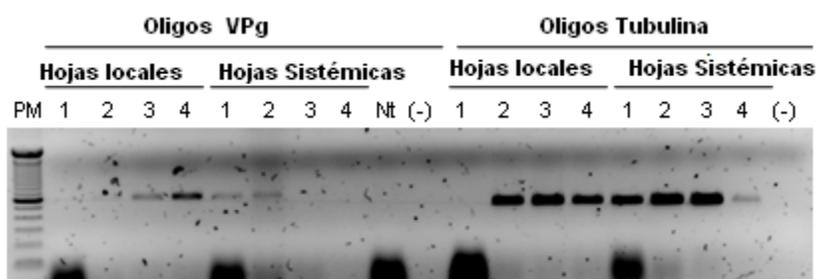
estructurales necesarias para que la proteína de fusión sea funcional *in vivo* (Rutkowska-Wlodarczyk, 2008).



**Figura 5.1** Expresión del mRNA del transportador de fosfatos PHO-1. A) RT-PCR a partir de RNA total de plántula y raíz, ambos de 15 días post germinación, de las líneas WT, eIF(iso)4E<sup>-/-</sup> y eIF(iso)4E<sup>++</sup>. B) Análisis densitométrico de la expresión mostrada en el panel A (en colaboración con Martínez Silva, 2009, no publicado).

En este trabajo, se inició la caracterización fenotípica de plantas de la línea F, ya que se contaba con datos en el laboratorio sobre un fenotipo particular de plantas carentes de eIF(iso)4E (raíz principal más larga, Martínez-Silva, 2009, no publicado). Se ha mostrado, a través de microarreglos de RNA total y polisomal, que algunos mensajeros que afectan su expresión en ausencia de eIF(iso)4E son de raíz, como el transportador de fosfatos Pho-1 (Martínez, 2008, no publicado). El mRNA de PHO-1, en plantas carentes de eIF(iso)4E, se encuentra disminuido (ver figura 5.1); y en plantas que sobre expresan a eIF(iso)4E tenemos al mRNA de este transportador ligeramente aumentado.

Queda pendiente el estudio de infección y movilidad de potyvirus, donde se ha relacionado a este factor con el ciclo viral de potyvirus, como el potyvirus TEV (Contreras, 2007), y en cuyo proyecto también se incluirán estas plantas transgénicas generadas para tener bases más sólidas en lo que respecta al movimiento viral afectado por eIF(iso)4E. A manera de resultado preliminar, se ensayó el movimiento viral en transgénicas que sobre expresan a eIF(iso)4E. Se encontró que en estas hojas el movimiento del mRNA viral a hojas sistémicas se da más tempranamente que en plantas silvestres, lo que sería consistente con las interacciones reportadas entre eIF(iso)4E y la VPg de potyvirus (Robaglia y Caranta, 2006), y con la hipótesis planteada acerca del papel que pudiera jugar eIF(iso)4E en el movimiento viral a distancia. En plantas de la línea F de sobre expresión, el mRNA viral, en la primera hoja sistémica, se detectó desde 2 días post inoculación (ver figura 5.2), mientras que en plantas silvestres este proceso toma 4 días (Contreras, 2008). Es necesario repetir más adelante este experimento, puesto que en la figura 5.2 sólo se puede considerar como válido lo obtenido en hojas locales de 2, 3 y 4 dpi, mientras que en sistémicas sólo 2 y 3 días post inoculación.



**Figura 5.2** Ensayo de infección con potyvirus TEV en hojas locales y sistémicas de plantas transgénicas eIF(iso)4E ++. Los números indican el número de días post inoculación de la muestra. Nt: control positivo de *N. tabacum*. (-): control negativo de agua.

Los resultados obtenidos en este trabajo, y en colaboración con Martínez Silva y Contreras Paredes, demuestran cierta reversión en los efectos detectados en las plantas carentes de eIF(iso)4E. Para empezar, tenemos los resultados preliminares en raíz: en las mutantes nulas se observó una raíz principal de mayor longitud, comparada con plantas silvestres, mientras que, en transgénicas de sobre expresión, se observa una **raíz principal de menor tamaño**. Si verdaderamente el factor eIF(iso)4E participa activamente en la regulación de algunos mensajeros, como el

transportador PHO-1, la sobre expresión de este factor repercutiría directamente sobre la síntesis de estos mensajeros. Los resultados obtenidos parecen mostrar que el transgen se está expresando activamente y se observan cambios importantes en la floración y en el desarrollo de la raíz, tejidos en los cuales se da la mayor síntesis de eIF(iso)4E en plantas silvestres (ver figura 2.12 nuevamente, [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org); Donan *et al*, 2009). De esta forma, se esperaba observar cambios importantes también en los mensajeros relacionados con estos tejidos. Los microarreglos confirmaron la variación de los niveles de PHO-1 en mutantes nulas, y en transgénicas de sobre expresión vemos también al mRNA de este transportador ligeramente aumentado y, probablemente los otros mRNAs modificados, vistos por microarreglos, se vean alterados en estas transgénicas. El tamaño de la raíz principal parece reflejar directa o indirectamente estos cambios; sin embargo, deben estudiarse más profundamente para descartar los efectos de la interrupción de genes por la inserción realizada. Por otro lado, tenemos los estudios de infección por potyvirus: en la mutante carente de eIF(iso)4E no se observa movimiento a distancia del mRNA del potyvirus TEV, aunque sí su traducción; en plantas silvestres, el mRNA potyviral tarda 4 días para ser transportado a hojas sistémicas (Contreras, 2008), y en transgénicas de sobre expresión, sólo 1 día. La reversión de efectos podría resumirse como sigue, a reserva de ser repetidos los experimentos y validados estadísticamente: 1) se revierte el fenotipo de raíz, de ser una raíz más larga en mutantes, a ser una raíz más corta en transgénicas de sobre expresión y 2) se revierte el efecto en movimiento viral, de ser nulo en mutantes carentes de eIF(iso)4E, a ser más rápido en transgénicas de sobre expresión, respecto a WT.

## **6. PERSPECTIVAS**

La expresión de estas proteínas de fusión seguirá estudiándose en el laboratorio. Se analizarán las demás líneas transgénicas de sobre expresión obtenidas, y se comenzará el estudio más detallado en las plantas de complementación, donde se podrá comprobar si la ausencia de actividad catalítica predicha por informática se da o no, además de que podrá analizarse mejor la recuperación del fenotipo de raíz hallado y el movimiento viral. También se ha contemplado el estudio de la proteómica de las líneas transgénicas tomando como material biológico suspensiones celulares, donde los factores de inicio de la traducción son muy abundantes. En estos extractos podría detallarse más a fondo la estabilidad y funcionalidad de la proteína de fusión, así como ensayar su habilidad de unirse a cap en estudios *in vitro*.

### 7. CONCLUSIONES

1. Hay reversión del fenotipo de raíz detectado: en mutantes carentes de eIF(iso)4E, la raíz principal es de mayor longitud respecto a plantas silvestres; en el caso de la línea de sobre expresión F, la longitud de la raíz principal es menor que en plantas silvestres.

2. El mRNA de la proteína de fusión eIF(iso)4E-GFP se sobre expresa en plantas transgénicas que inicialmente presentaban el genotipo silvestre, produciendo una generación (F<sub>4</sub>) altamente poblada de individuos con genotipo homocigo o heterocigo, y una muy baja cantidad de individuos con genotipo silvestre.

3. Las plantas transgénicas de la línea F expresan la proteína de fusión eIF(iso)4E-GFP en bajos niveles. La proteína de fusión es lábil, se degrada muy rápidamente

4. Se obtuvieron semillas transgénicas resistentes a kanamicina, correspondientes a la expresión de la proteína de fusión eIF(iso)4E-GFP con fondo eIF(iso)4E -/-.

## 8. LITERATURA CONSULTADA

Anand A., Krichevsky A., Schornack S., Lahaye T., Tzfira T., Tang Y., Citovsky V., Mysore K. S. (2007), **Arabidopsis VIRE2 INTERACTING PROTEIN2 is required for Agrobacterium T-DNA integration in plants**. *The Plant Cell* 19, 1695–1708.

Beauchemin C., Boutet N., Laliberté J. F. (2007), **Visualization of the interaction between the precursors of VPg, the viral protein linked to the genome of Turnip Mosaic Virus, and translation eukaryotic initiation factor iso4E in planta**. *Journal of Virology* 81 (2), 775-782.

Browning K. S. (2004), **Plant translation initiation factors: it is not easy to be green**. *Biochemical Society Transactions* 32, 589-591.

Bush M. S., Hutchins A. P., Jones A. M. E., Naldrett M. J., Jarmolowski A., Lloyd C. W., Doonan J. H. (2009), **Selective recruitment of proteins to 5' cap complexes during the growth cycle in Arabidopsis**. *The Plant Journal*, 1-7.

Carleton M., Cleary M. A., Linsley P. S. (2007), **MicroRNAs and cell cycle regulation**, *Cell Cycle* 6:17, 2127-2132.

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

Chi-Manzanero B. H., Echeverría S., Kay A. J., Acerito P. O., Rodríguez L. C. (2004), **La bacteria Agrobacterium tumefaciens como herramienta biotecnológica**. *Ciencia* 55 (3), 61-68.

Chiu W., Niwa Y., Zeng W., Hirano T., Kobayashi H., Sheen J. (1996), **Engineered GFP as a vital reporter in plants**. *Current Biology* 6, 325–330.

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

Contreras Paredes C. A. (2008), **Papel del factor eIF(iso)4E en el mecanismo de infección por potyvirus en Arabidopsis thaliana**. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM.

De la Torre Díaz S. (2009), **Papel de la proteína de unión a Cap, nCBP, en la floración de Arabidopsis thaliana**. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM.

Dinkova T. D., Aguilar R., Sánchez de Jiménez E. (2000), **Expression of maize eukaryotic initiation factor (eIF)iso4E is regulated at the translation level**. *Biochem. J.* 351, 825-831.

Dinkova T. D., Keiper B. D., Korneeva N. L., Aamodt E. J., 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.

Ditt R. F., Kerr K. F., Figueiredo P., Delrow J., Comai L., Nester E. W. (2006), **The *Arabidopsis thaliana* transcriptome in response to *Agrobacterium tumefaciens*.** *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19, 665–681.

Dostie J., Ferraiuolo M., Pause A., Adam S. A., Sonenberg N. (2000), **A novel shuttling protein, 4E-T, mediates the nuclear import of the mRNA 5' cap-binding protein, eIF4E.** *EMBO Journal* 19 (12), 3142-3256.

Duprat A., Caranta C., Revers F., Menand B., Browning K., 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.

Earley K., Haag J. R., Pontes O., Opper K., Juehne T., Song K., Pikaard C. S. (2006), **Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics.** *The Plant Journal* 45, 616-629.

Freire M. A., Tourneur C., Granier F., Camonis J., Amrani A. E., Browning K. S., Robaglia C. (2000), **Plant lipoxygenase 2 is a translation initiation factor-4E-binding protein.** *Plant Molecular Biology* 44, 129–140.

García-Flores C., Aguilar R., Reyes de la Cruz H., Albores M., Sánchez de Jiménez E. (2001), **A maize insulin-like growth factor signals to a transduction pathway that regulates protein synthesis in maize.** *Biochemical Journal* 358 (1), 95-100.

Gebauer F., Hentze M. W. (2004), **Molecular mechanisms of translation control.** *Nature Reviews* 5, 827-835.

Goodfellows I. G., Roberts L. O. (2007), **Eukaryotic initiation factor 4E.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 30, 1-6.

Graff J. R., Konicek B. W., Carter J. H., Marcusson E. G. (2008), **Targeting the eukaryotic translation initiation factor 4E for cancer therapy.** *Cancer Research* 38 (3), 631-634.

Hanahan D. (1983), **Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.** *Journal of Molecular Biology* 166 (4), 557-580.

Harrison S. J., Mott E. K., Parsley K., Aspinall S., Gray J. C., Cottage A. (2006), **A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation.** *Plant Methods* 2:19.

Herold J., Andino R. (2001), **Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge**. *Molecular Cell* 7 (3), 581-591.

Hidalgo-Mejía A. A. (2007), **Obtención y caracterización de mutantes homocigas de un miembro de la familia eIF4E: nCBP (novel Cap Binding Protein) en *Arabidopsis thaliana***. Tesis de Licenciatura en Química, Facultad de Química, UNAM.

Hwang H., Gelvin S. B. (2004), **Plant proteins that interact with VirB2, the *Agrobacterium tumefaciens* pilin protein, mediate plant transformation**. *The Plant Cell* 16, 3148–3167.

Jaluria P., Konstantopoulos K., Betenbaugh M., Shiloach J. (2007), **A perspective on microarrays: current applications, pitfalls, and potential uses**. *Microbial Cell Factories* 6:4.

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

Karplus K., Barrett C., Hughey R. (1998), **Hidden (Markov) Models for detecting remote protein homologies**. *Bioinformatics* 14 (10), 846-856.

Karplus K., Karchin R., Draper J., Casper J., Mandel-Gutfreund Y., Diekhans M., Hughey R. (2003), **Combining local-structure, fold-recognition, and new-fold methods for protein structure prediction**. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 53, 491-496.

Katzman S., Barrett C., Thiltgen G., Karchin R., Karplus K. (2008), **Predict-2nd: a tool for generalized protein local structure prediction**. *Bioinformatics* 24 (21), 2453-2459.

LeClere S., Bartel B. (2001), **A library of *Arabidopsis* 35S-cDNA lines for identifying novel mutants**. *Plant Molecular Biology* 46, 695–703.

Li J., Vaidya M., White C., Vainstein A., Citovsky V., Tzfira T. (2005), **Involvement of KU80 in T-DNA integration in plant cell**. *Proceedings National Academy of Sciences USA* 102 (52), 19231-19236.

Majid N. A., Parveez G. K. A. (2007), **Evaluation of Green Fluorescence Protein (GFP) as a selectable marker for oil palm transformation via transient expression**. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 15, 1-8.

Malley R. C. O., Alonso J. M., Kim C. J., Lisse T. J., Ecker J. R. (2007), **An adapter ligation-mediated PCR method for high-throughput mapping of T-DNA inserts in the *Arabidopsis* genome**. *Nature Protocols* 2 (11), 2910-2917.

Marcotrigiano J., Gingras A. C., Sonenberg N., Burley S. K. (1999), **Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G**. *Molecular Cell* 3 (6), 707-716.

Marcotrigiano J., Gingras A. C., Sonenberg N., Burley S. K. (1997), **Cocrystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP**. *Cell* 89 (6), 951-961.

Marion J., Bach L., Bellec Y., Meyer C., Gissot L., Faure J. D. (2008), **Systematic analysis of protein subcellular localization and interaction using high-throughput transient transformation of *Arabidopsis* seedlings**. *The Plant Journal* 56 (1), 169-179.

Matsuo H., Li H., McGuire A. M., Fletcher C. M., Gringras A. C., Sonenberg N., Wagner G. (1997), **Structure of translation factor eIF4E bound to m7GDP and interaction with 4E-binding protein**. *Nature Structural Biology*. 4 (9), 717-724.

Miyoshi H., Suehiro N., Tomoo K., Muto S., Takhashi T., Tsukamoto T., Ohmori T., Natsuaki T. (2006), **Binding analyses for the interaction between plant virus genome-linked protein (VPg) and plant translational initiation factors**. *Biochimie*, 329-340.

Monzingo A. F., Dhaliwal S., Dutt-Chaudhuri A., Lyon A., Sadow J. H., Hoffman D. W., Robertus J. D., Browning K. S. (2007), **The structure of eukaryotic translation initiation factor-4E from wheat reveals a novel disulfide bond**. *Plant Physiology* 143, 1504-1518.

Morita M., Kanemori M., Yanagi H., Yura T. (1999), **Heat-induced synthesis of sigma32 in *Escherichia coli*: structural and functional dissection of rpoH mRNA secondary structure**. *Journal of Bacteriology* 181 (2), 401-410.

Mysore K. S., Bassuner B., Deng X., Darbinian N. S., Motchoulski A., Ream W., Gelvin S. B. (1998), **Role of the *Agrobacterium tumefaciens* VirD2 protein in T-DNA transfer and integration**. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11, 668-683.

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

Niedzwiecka A., Darzynkiewicz E., Stolarski R. (2004), **Thermodynamics of mRNA 5' cap binding by eukaryotic translation initiation factor eIF4E**. *Biochemistry* 43, 13305-13317.

Niedzwiecka A., Marcotrigiano J., Stepinski J., Jankowska-Anyszka M., Wyslouch-Cieszyńska A., Dadlez M., Gingras A. C., Mak P., Drazynkiewicz E., Sonenberg N., Burley S. K., Stolarski R. (2002), **Biophysical studies of eIF4E**

**cap-binding protein: recognition of mRNA 5' cap structure and synthetic fragments of eIF4G and 4E-BP1 proteins.** Journal of Molecular Biology 319 (3), 615-635.

Okade H., Fujita Y., Miyamoto S., Tomoo K., Muto S., Miyoshi H., Natsuaki T., Rhoads R. E., Ishida T. (2009), **Turnip mosaic virus genome-linked protein VPg binds C-terminal region of cap-bound initiation factor 4E orthologue without exhibiting host cellular specificity.** Journal of Biochemistry 145 (3), 299-307.

Pierrat O. A., Mikitova V., Bush M. S., Browning K. S., J. H. Doonan J. H. (2007), **Control of protein translation by phosphorylation of the mRNA 5'-cap-binding complex.** Biochemical Society Transactions 35 (6), 1634-1637.

Rhoads R. E., Dinkova T. D., Jagus R. (2007), **Approaches for Analyzing the Differential Activities and Functions of eIF4E Family Members.** Methods in Enzymology 429, 261-297.

Rhoads R. E. (2009), **eIF4E: new family members, new binding partners, new roles.** Journal of Biological Chemistry 284 (25), 16711-16715.

Richter J. D., Sonenberg N. (2005), **Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins.** Nature 433, 477-480.

Robaglia C., Caranta C. (2006), **Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection.** TREND in Plant Science 11 (1), 39-45.

Robalino J., Joshi B., Fahrenkrug S. C., Jaqus R. (2004), **Two zebrafish eIF4E family members are differentially expressed and functionally divergent.** Journal of Biological Chemistry 279 (11), 10532-10541.

Rodríguez C., Freire M. A., Camilleri C., 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.

Rodríguez I. P., Barrera H. A. (2004), **La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención.** Ciencia UANL VII, 323-335.

Rodríguez-Larrea D., Minning S., Borchert T. V., Sánchez-Ruiz J. M. (2006), **Role of solvation barriers in protein kinetic stability.** Journal of Molecular Biology 360, 715-724.

Rong L., Livingstone M., Sukarieh R., Petroulakis E., Gingras A. C., Crosby K., Smith B., Polakiewicz R. D., Pelletier J., Ferraiuolo M. A., Sonenberg N. (2008), **Control of eIF4E cellular localization by eIF4E-binding proteins, 4E-BP.** RNA 14 (7), 1318-1327.

Rutkowska-Włodarczyk I., Stepinski J., Dadlez M., Darzynkiewicz E., Stolarski R., Niedzwiecka A. (2008), **Structural changes of eIF4E upon binding**

**to the mRNA 5' monomethylguanosine and trimethylguanosine Cap.** Biochemistry 47, 2710–2720.

Ruud K. A., Kuhlow C., Goss D. J., Browning K. S. (1998), **Identification and characterization of a Novel Cap-binding Protein from *Arabidopsis thaliana*.** The Journal of Biological Chemistry 273, 10325-10330.

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

Schütz P., Bumann M., Oberholzer A. E., Bieniossek C., Trachsel H., Altmann M., Baumann U. (2008), **Crystal structure of the yeast eIF4A-eIF4G complex: An RNA-helicase controlled by protein-protein interactions.** Proceedings National Academy of Sciences USA 105, 9564-9569.

Sheen J., Hwang S., Niwa Y., Kobayashi H., Galbraith D. W. (1995), **Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells.** The Plant Journal 9, 777-784.

Slepenkov S. V., Korneeva N. L., Rhoads R. E. (2008), **Kinetic mechanism for assembly of the m7GpppG•eIF4E•eIF4G complex.** Journal of Biological Chemistry 283 (37), 25227-25237.

Sonenberg N. (2008), **eIF4E, the mRNA cap-binding protein: from basic discovery to translational research.** Biochemistry and Cellular Biology 86, 178-183.

Stolarski R. (2003), **Thermodynamics of specific protein-RNA interactions.** Acta Biochimica Polonica 50, 297-318.

Tessadori F., Schulkes R. K., van Driel R., Fransz P. (2007), **Light-regulated large-scale reorganization of chromatin during the floral transition in *Arabidopsis*.** The Plant Journal 50 (5), 848-857.

Tomoo K., Matsushita Y., Fujisaki H., Abiko F., Shen X., Taniguchi T., Miyagawa H., Kitamura K., Ishida T. (2005), **Structural basis for mRNA cap-binding regulation of eukaryotic initiation factor 4E by 4E-Binding protein, studied by spectroscopic, X-ray crystal structural, and molecular dynamics simulation methods.** Biochimica et Biophysica Acta 1753, 191-208.

Tomoo K., Shen X., Okabe K., Nozoe Y., Fukuhara S., Morino S., Ishida T., Taniguchi T., Hasegawa H., Terashima A., Sasaki M., Katsuya Y., Kitamura K., Miyoshi H., Ishikawa M., Miura K. (2002), **Crystal structures of 7-methylguanosine 5'-triphosphate (m(7)GTP)- and P(1)-7-methylguanosine-P(3)-adenosine5', 5'-triphosphate (m(7)GpppA)-bound human full-length eukaryotic initiation factor 4E: biological importance of the C-terminal flexible region.** Journal of Biochemistry 362 (3), 539-544.

Volpon L., Osborne M. J., Topisirovic I., Siddiqui N., Borden K. L. B. (2006), **Cap-free structure of eIF4E suggests a basis for conformational regulation by its ligands.** *The EMBO Journal* 25, 5138–5149.

Weaver R. F. (2008), **Molecular Biology.** Cuarta Edición, Editorial McGraw Hill, USA, pp. 522-600.

Wei S., Bravdo B., Shoseyov O. (2004), **Fluorescent screening of transgenic *Arabidopsis* seeds without germination.** *Plant Physiology* 135, 709–714.

Wells S. E., Hillner P. E., Vale R. D., Sachs A. B. (1998), **Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors.** *Molecular Cell* 2, 135–140.

Wood D. W., Setubal J. C., Kaul R., Monks D. E., Kitajima J. P., Okura V. K., Zhou Y., Chen L., Wood G. E., Almeida N. F. Jr, Woo L., Chen Y., Paulsen I. T., Eisen J. A., Karp P. D., Bovee D. Sr, Chapman P., Clendenning J., Deatherage G., Gillet W., Grant C., Kutayavin T., Levy R., Li M. J., McClelland E., Palmieri A., Raymond C., Rouse G., Saenphimmachak C., Wu Z., Romero P., Gordon D., Zhang S., Yoo H., Tao Y., Biddle P., Jung M., Krespan W., Perry M., Gordon-Kamm B., Liao L., Kim S., Hendrick C., Zhao Z. Y., Dolan M., Chumley F., Tingey S. V., Tomb J. F., Gordon M. P., Olson M. V., Nester E. W. (2001), **The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58.** *Science* 294 (5550), 2266.

Yamasaki S., Anderson P. (2008), **Reprogramming mRNA translation during stress.** *Current Opinion in Cell Biology* 20, 222-228.

Zhang X., Henriques R., Lin S., Niu Q., Chua N. (2006), ***Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method.** *Nature Methods* 1, 1-6.