



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO



**FACULTAD DE QUÍMICA**

PROGRAMA DE MAestrÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

*“Silenciamiento del factor eucarionte de inicio de la traducción 4E (eIF4E) en Arabidopsis thaliana mediante el uso de miRNAs artificiales”*

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS PRESENTA

Q.A. Escamilla Martínez Edson Emmanuel

Directora de Tesis Tzvetanka Dimitrova Dinkova



México D.F.



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 designado

|            |  |
|------------|--|
| Presidente | Dr. Lui Alfonso Vaca Domínguez             |
| Vocal      | Dr. José Luis Reyes Taboada                |
| Secretario | Dr. León Patricio Martínez Castilla        |
| Suplente   | Dra. Sobeida Sánchez Nieto                 |
| Suplente   | Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra |

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 103 del conjunto "E" de la Facultad de Química.

Director de tesis:

Dra. Dimitrova Dinkova Tzvetanka

---

Sustentante:

Q.A. Escamilla Martínez Edson Emmanuel

---

## Contenido

|  |           |
|--|-----------|
| <b>JURADO DESIGNADO</b> .....  | <b>I</b>  |
| <b>PRESIDENTE DR. LUI ALFONSO VACA DOMÍNGUEZ</b> .....                 | <b>I</b>  |
| <b>CONTENIDO</b> .....   | <b>II</b> |
| <b>AGRADECIMIENTOS</b> .....   | <b>VI</b> |
| <b>ABREVIATURAS</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>FIGURAS</b> .....   | <b>3</b>  |
| <b>INTRODUCCIÓN</b> .....  | <b>4</b>  |
| Regulación de la traducción .....                                      | 5         |
| <b>FACTORES DE INICIO EUCARIONTES (EIFS)</b> .....                     | <b>6</b>  |
| eIF1 y eIF1A .....   | 6         |
| eIF2 .....   | 7         |
| eIF3 .....   | 8         |
| Grupo de factores de inicio 4 (eIF4).....                              | 10        |
| eIF4A .....  | 10        |
| eIF4B .....  | 11        |
| eIF4E .....  | 12        |
| Estructura de eIF4E.....   | 12        |
| Miembros de la familia eIF4E de clase I.....                           | 15        |
| Miembros de la familia eIF4E de clase II .....                         | 16        |
| Miembros de la familia eIF4E de clase III.....                         | 17        |
| eIF4G .....  | 19        |
| <b>PABP</b> .....  | <b>22</b> |
| Estudio de la función de miembros de la familia eIF4E en plantas ..... | 23        |
| Importancia de eIF4E .....   | 26        |
| ¿Qué hacer? .....  | 27        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>SILENCIAMIENTO POR RNA INTERFERENTE.....</b>  | <b>28</b> |
| Biogénesis de RNAs pequeños en animales .....  | 31        |
| Vías de regulación mediadas por microRNAs en animales .....  | 32        |
| <b>BIOGÉNESIS DE RNAs PEQUEÑOS EN PLANTAS.....</b>   | <b>34</b> |
| microRNAs.....   | 35        |
| ta-si RNAs y nat-siRNAs.....   | 37        |
| hc-siRNAs.....   | 38        |
| Vías de regulación mediadas por microRNAs en plantas .....   | 40        |
| Localización subcelular de RNAs pequeños en plantas .....  | 40        |
| Auto regulación de componentes de la maquinaria de silenciamiento en plantas .....                               | 41        |
| <b>USO DE MIRNA ARTIFICIALES EN A. THALIANA .....</b>  | <b>41</b> |
| <b>HIPÓTESIS .....</b>   | <b>43</b> |
| <b>OBJETIVOS.....</b>  | <b>43</b> |
| • General .....  | 43        |
| • Particulares .....   | 43        |
| <b>PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL .....</b>  | <b>43</b> |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>   | <b>44</b> |
| Material biológico.....  | 44        |
| <b>MÉTODOS .....</b>   | <b>45</b> |
| Extracción de plásmido (miniprep).....   | 45        |
| Obtención de plásmido a gran escala.....   | 46        |
| Inserción de fragmentos de DNA en plásmidos mediante recombinación (tecnología Gateway).....                     | 47        |
| Obtención de células de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> competentes para transformación por choque térmico..... | 47        |
| Medio YM Sólido.....   | 48        |
| Transformación de células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> por choque térmico .....               | 48        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Infiltración en hojas de Arabidopsis thaliana con Agrobacterium tumefaciens .....</b> | <b>49</b> |
| <b>Extracción de RNA total .....</b>   | <b>49</b> |
| <b>Análisis de microRNAs por Northern Blot .....</b>                                     | <b>50</b> |
| <b>Marcaje en el extremo 5´ de oligonucleótidos .....</b>                                | <b>51</b> |
| <b>Purificación en columnas mini Quick Spin (ROCHE) .....</b>                            | <b>51</b> |
| <b>Solución de Acrilamida .....</b>  | <b>52</b> |
| <b>Southern blot .....</b>   | <b>52</b> |
| <b>RESULTADOS.....</b>   | <b>54</b> |
| <b>Diseño de oligonucleótidos .....</b>  | <b>54</b> |
| <b>ANÁLISIS DE RESULTADOS .....</b>  | <b>71</b> |
| <b>CONCLUSIONES .....</b>  | <b>74</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>  | <b>75</b> |
| <b>ANEXO I.....</b>  | <b>83</b> |
| <b>ANEXO II.....</b>   | <b>85</b> |

"Levántate y anda.

Deja la cama donde te duermes con la multitud y sale a caminar por ti mismo, es decir por lo único verdadero, es decir por la vida, entonces despierto, bendecirás a todos con tu alegría.

Deja la parasitaria tribuna y entra a la cancha a jugar tu partido, deja de complicarte y complicar.

Detente y comprobarás que el sentido de la vida, está en ella misma.

Puedes llamar a cada cosa como quieras, pero todas las cosas principalmente las que ni vemos y ni siquiera sospechamos conforman este iluminoso misterio que llamamos vida.

Muchas son las cosas y una la realidad.

Ábrete, anímate, aprende de todo, de ti mismo, concéntrate en esto y te iluminarás y esa serena alegría te llevará a estadio en estadio, siempre en ascenso, espiritual, intelectual y material, cantando, bailando y amando, la alegría te hace sabio no las preguntas.

Transforma en flores las espinas que te ponen en tu camino y esto sucede espontánea y naturalmente, contempla primero, pero para actuar después, esto es cerrar un círculo que es cada instante y hay que cerrarlo para pasar al próximo.

El sentido de la vida es ella misma y sólo se puede vivir cuando uno está en plenitud, es decir, cuando uno es dueño de uno mismo, es la única propiedad posible y saludable.

Vive el momento, entonces todo momento será una celebración, sin objetivos ni metas que te turban con ansiedades que te enferman porque te distraen del presente, que te hace perder el tiempo con el futuro.

Este Momento es la única verdad y vivirlo te aliviana, te purifica, te cura, te fortalece, es decir, te alegra y la alegría te devuelve la inocencia."

Facundo Cabral. E.P.D

## Agradecimientos

Es preciso agradecer a todas las personas que se involucraron directa o indirectamente en este proyecto, a mis compañeros de laboratorio, no los nombro pues sería injusto que por algún olvido no mencionara su nombre, a los nuevos, a los viejos, a los que no se han ido y a los que no han llegado.

A Cesy, por el apoyo como tutora y por poner su confianza en mí.

Al Dr. José Luis Reyes por mostrar interés en el proyecto.

A los compañeros de los demás laboratorios quienes también mostraron interés y brindaron apoyo cuando fue solicitado.

Agradezco a las personas con quienes un convivio de trabajo diario se convirtió en una amistad.

A los doctores Luis Vaca Domínguez y Jorge M. Vázquez Ramos por sus recomendaciones realizadas durante la realización de este proyecto.

A los revisores de tesis por las observaciones realizadas.

A mis amigos, a los incondicionales, a los que acompañan en las pedas y en los hospitales.

A todos ustedes gracias.

Por último, pero no menos importantes, por el contrario los más importantes, a mis padres, mis hermanos, mi cuñada y mi sobrino, gracias por el apoyo, los consejos sobre todo por soportarme tanto tiempo, gracias, muchas, muchas gracias.

Jamás dejes que las cosas se vallan de ti sin antes haber luchado por ellas, olvida los prejuicios y los temores, ante todo se consiente de cuáles son tus orígenes y no los olvides, nunca rendirse es algo que debes recordar siempre, aprecia a las personas que muestran un aprecio hacia ti.

## Abreviaturas

Å.- Amstrong

AGO.- Proteína Argonauta

cDNA.- DNA complementario.

CSN.- Señalosome COP9

CTD.- Dominio carboxilo terminal (siglas en inglés).

DEPC.- Dietil Pirocarbonato.

DCL.- DICER Like.

dsRNA.- RNA de doble cadena.

eIF.- Factor de inicio eucariótico (siglas en inglés)

GDP.- Guanosina difosfato

GTP.- Guanosina trifosfato.

HEN1.- Hua Enhancer 1

hc-RNA.- RNA pequeños heterocromaticos

IRES.- Sitio de ingreso interno al ribosoma (siglas en inglés)

kDa.- Kilo Dalton

K<sub>d</sub>.- Constante de disociación

µg.- microgramo.

µL.- microlitro.

mL.- mililitro.

mRNA, ácido ribonucleico mensajero

Met-tRNA<sup>met</sup>.- RNA de transferencia Iniciador.

miRNA.- microRNA

nat-siRNA.-siRNAs siRNAs derivados de transcritos anti sentido naturales.

nCBP.- novel Cap Binding Protein.

ORF.- Marco abierto de lectura (siglas en inglés)

PABP.- Poli(A) binding protein

PBs.- Cuerpos de procesamiento

PCR.- Reacción en cadena de la polimerasa.

P<sub>m</sub>.- Peso molecular.

RISC.- Complejo de silenciamiento inducido por RNA.

RNAi.- RNA de interferencia o interferente.

RRM.- Motivo de reconocimiento de RNA (siglas en inglés).

rRNA.- ácido ribonucleico ribosomal.

rpm.- Revoluciones por minuto.

S.- Coeficiente de sedimentación.

siRNA.- RNA pequeño de interferencia

SSC.- Cloruro y citrato de sodio.

sRNA.-RNA pequeño

T-DNA.- DNA de Transferencia.

ta-siRNA.- RNAs pequeños de interferencia que actúan en trans

tRNA ácido ribonucleico de transferencia.

ORF.- Región codificante del mRNA

uORF.- Región codificante del mRNA río arriba (siglas en inglés)

UTR.- Región no traducible del mRNA

4E-HP.- Proteína homóloga a 4E

## Figuras

|   |    |
|---|----|
| FIGURA 1. COMPLEJO DE INICIO DE LA TRADUCCIÓN.....                                      | 5  |
| FIGURA 2. ELEMENTOS ESTRUCTURALES DE UN MRNA. ....                                      | 6  |
| FIGURA 3. ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE EIF4E UNIDO A ANÁLOGO DE CAP.....                | 13 |
| FIGURA 4. CONTACTOS INTERATÓMICOS EIF4E CON ANALOGOS DE CAP.....                        | 14 |
| FIGURA 5; <i>ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS "CORE"</i> . ....                               | 19 |
| FIGURA 6; <i>GENOTIPIFICACIÓN DE LA MUTANTE POR INSERCIÓN DE T-DNA EN EIF4E</i> . ....  | 25 |
| FIGURA 7. <i>DENDROGRAMA DE SIMILITUD A NIVEL DE AMINOÁCIDOS</i> . ....                 | 26 |
| FIGURA 8; ESTRUCTURA CRISTALINA DE DICER Y ARGONAUTA.....                               | 30 |
| FIGURA 9; MECANISMO DEL RNAI.....   | 37 |
| FIGURA 10. DÚPLEX FORMADO POR AMIR4E Y MIR4E*.....                                      | 54 |
| FIGURA 11; DÚPLEX FORMADO POR MIR159 CON UNO DE SUS BLANCOS. ....                       | 55 |
| FIGURA 12; HIBRIDACIONES IN SÍLICO OBTENIDAS PARA AMIR4E CON SUS POSIBLES BLANCOS.....  | 56 |
| FIGURA 13; ALINEAMIENTO DE PRE-AMIR4E CON PRE-MIR159A.....                              | 58 |
| FIGURA 14; PLEGAMIENTOS DE LOS PRECURSORES DE MICRO RNAS. ....                          | 59 |
| FIGURA 15; PCR DE COLONIAS CANDIDATAS TRANSFORMADAS.....                                | 60 |
| FIGURA 16; RNA TOTAL OBTENIDO DE HOJAS INFILTRADAS DE <i>NICOTIANA TABACUM</i> . ....   | 62 |
| FIGURA 17; NORTHERN BLOT REALIZADO CONTRA MIR159A, U6 Y MARCADOR DE PESO MOLECULAR..... | 62 |
| FIGURA 18. NORTHERN BLOT DE A-MIR1.....   | 63 |
| FIGURA 19; RNA TOTAL OBTENIDO DE HOJAS DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> INFILTRADAS. .... | 64 |
| FIGURA 20; ESQUEMA DEL TRANSCRITO DEL PRECURSOR DE A4EMIR. ....                         | 65 |
| FIGURA 21; AMPLIFICACIÓN DEL PRECURSOR DE AMIR4E. ....                                  | 65 |
| FIGURA 22; AMPLIFICACIÓN DEL PRECURSOR DE MIR4E.....                                    | 66 |
| FIGURA 23; SOUTHERN BLOT PARA EL FRAGMENTO DE PRE-A4EMIR.....                           | 67 |
| FIGURA 24; NORTHERN BLOT PARA U6 Y MIR159. ....   | 67 |
| FIGURA 25; NORTHERN BLOT PARA DETECTAR A 4EMIR Y 4EMIR*.....                            | 68 |
| FIGURA 26; REACCIONES DE PCR DE LAS MUESTRAS DE RNA TOTAL DE PLANTAS INFILTRADAS. ....  | 69 |
| FIGURA 27; NORTHERN BLOT UTILIZANDO COMO SONDA EL PRECURSOR DE AMIR4E.....              | 70 |

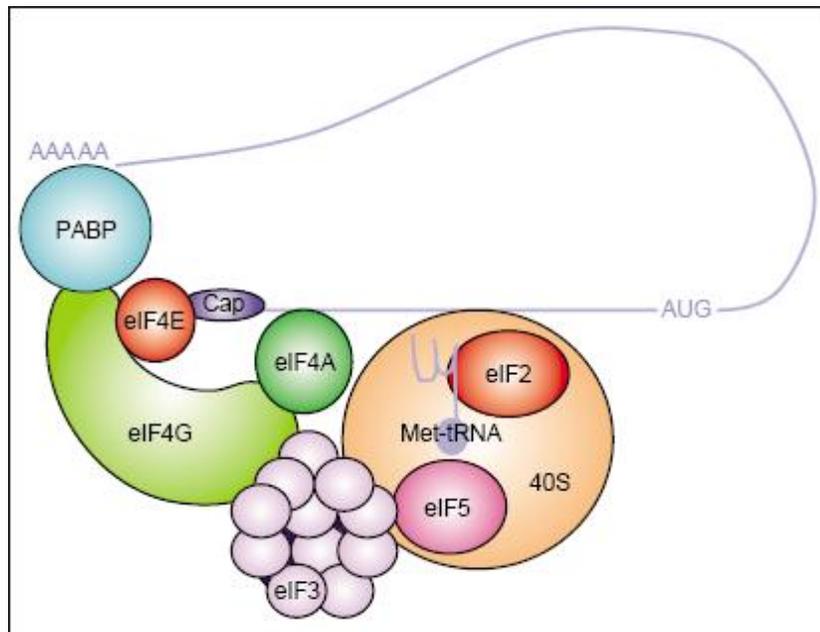
## Introducción

La traducción de un mRNA a proteína representa el paso final en la expresión genética. La regulación de la traducción es un mecanismo que es usado para modular la expresión genética en un amplio rango de situaciones biológicas [1].

El inicio de la traducción consiste de algunos pasos y es catalizado por proteínas referidas como factores de inicio eucarióticos (eIF). Primero ocurre la disociación de un ribosoma preexistente 80S promovida por eIF3 y eIF1A que se une a la subunidad 40S. Posteriormente se le une un complejo ternario, eIF2-GTP-Met-tRNA<sup>met</sup>, en el sitio P de la subunidad ribosomal formándose el complejo de pre-iniciación 43S. Por otro lado el mRNA es reclutado por el complejo eIF4F formado por eIF4E, eIF4A y eIF4G, donde eIF4E es una proteína que reconoce la estructura <sup>7</sup>m-GPPP (donde N puede ser cualquier nucleótido) 5' terminal de un mRNA. En muchos eucariontes (pero no en hongos o plantas) la penúltima base (N) es metilada en el hidroxilo 2' de la ribosa (Cap 1). Cuando el sitio no es metilado se llama Cap 0. La estructura Cap facilita la traducción de mRNAs, todos los mRNA eucariontes (excepto los de los organelos) poseen esta estructura, es importante para el splicing de pre-mRNAs, transporte y estabilidad de mRNAs y RNAs pequeños nucleares [2-4]. eIF4G es una proteína de anclaje para otros factores de inicio de la traducción y eIF4A es una helicasa de RNA que desdobra las estructuras secundarias en el extremo 5' UTR de los mRNAs. El mRNA unido al complejo eIF4F se asocia al complejo de pre iniciación 43S mediante la interacción entre eIF4G y eIF3, formándose el complejo de inicio de la traducción 48S. A continuación ocurre el escrutinio en dirección 5' a 3' ayudado por la actividad de la helicasa eIF4A y en mamíferos por eIF4B y eIF4H hasta encontrar el codón de inicio en un contexto favorable [2, 4]. La mayoría de los mRNAs poseen en su 3' UTR una cadena de poli Adeninas [poli (A)] la cual va de 50 a más de 200 bases. La cadena de poli (A) es un determinante de la estabilidad del mRNA así como de su eficiencia traduccional, muchos mensajeros de histonas y algunos RNAs virales son excepciones que no poseen esta estructura,[2]. En el complejo de inicio de la traducción, el mRNA es estabilizado y circularizado por la interacción de la cadena de poli (A) con una proteína de unión a cadenas de poli A (PABP), la cual se une a eIF4G dentro del complejo eIF4F que se encuentra interaccionando con el 5'Cap (Figura 1) [5].

Durante el proceso de escrutinio eIF2 hidroliza parcialmente GTP con la ayuda de eIF5. Antes del reconocimiento del codón de inicio el ion fosfato está en un equilibrio GTP-GDP•P<sub>i</sub>. Después de

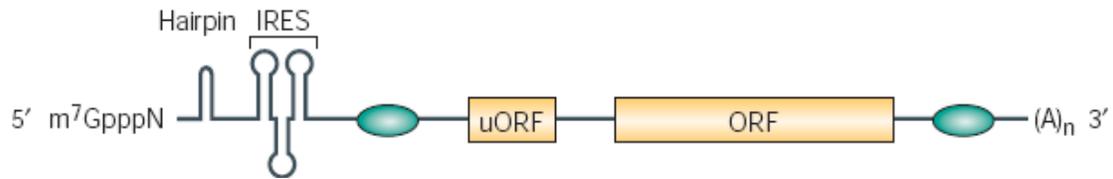
que el codón de inicio es identificado, el ion fosfato es liberado haciendo la hidrólisis de GTP irreversible y comprometiendo al complejo a proceder con el inicio de la traducción [5]. Después de que eIF2•GDP es liberado, la subunidad 60S puede unirse con ayuda de una segunda GTPasa, eIF5B, disociándolo como eIF5B•GDP. Después de la unión de las subunidades el complejo de iniciación está completo e inmediatamente comienza la elongación del péptido [5].



**Figura 1. Complejo de inicio de la traducción;** El mRNA es reclutado por el complejo eIF4F compuesto de las subunidades eIF4E, eIF4G y eIF4A, eIF4E es la proteína de unión a Cap y une la estructura <sup>7</sup>mGPPP del mRNA, eIF4G es una proteína de unión la cual recluta la proteína de unión a cadenas de poli(A)(PABP), la helicasa de RNA eIF4A, el complejo multiprotéico eIF3 quien recluta la subunidad ribosomal 40S unida al complejo ternario Met - tRNA<sup>met</sup>, eIF1 y eIF1A, tomado de [6].

## Regulación de la traducción

La regulación global de la traducción es mediada por modificaciones de los factores de inicio de la traducción, mientras que la regulación específica involucra complejos de proteínas regulatorias que reconocen elementos particulares localizados en las regiones 5' y 3' no traducibles (UTRs por sus siglas en inglés) de los mRNAs (Figura 2). Estos elementos incluyen a la estructura Cap y cola de poli (A) como activadores de la traducción; los sitios de ingreso internos al ribosoma (IRES por sus siglas en inglés) que permiten la traducción vía Cap independiente; los marcos de lectura abiertos río arriba del AUG (uORFs) que reducen la traducción de un ORF; y los sitios de unión a complejos regulatorios en las regiones 5' o 3' UTR [1].



**Figura 2. Elementos estructurales de un mRNA (tomado de [1]).** La estructura <sup>7</sup>m-GPPPn en el 5' terminal y la cadena de poli (A)<sub>n</sub> son motivos canónicos que promueven fuertemente el inicio de la traducción, las estructuras secundarias como los Hairpin (tallo - asa) bloquean la traducción, mientras que los IRES permiten el inicio de la traducción independiente de Cap. Los uORFs funcionan como reguladores negativos reduciendo la traducción del ORF principal, los óvalos en verde simbolizan sitios de unión de proteínas y/o RNAs reguladores que usualmente inhiben pero ocasionalmente promueven el inicio de la traducción.

Los elementos regulatorios de cada mRNA determinan que estos sean activamente traducidos, almacenados en ribonucleoproteínas inactivas, o degradados por cuerpos de procesamiento (PBs). En cambio, la regulación de la actividad de los factores de traducción implica cambios en la síntesis global de proteínas.

## Factores de Inicio Eucariontes (eIFs)

### eIF1 y eIF1A

eIF1 (12 kD) (forma parte del complejo multifactor) y eIF1A (17 kD) (se une a la subunidad 40S del ribosoma) interactúa con otras proteínas componentes durante el proceso de inicio de la traducción y participa en el reconocimiento codón – anti codón del tRNA iniciador cargado con Metionina (Met-tRNA<sup>met</sup>). Estos dos factores participan en el reclutamiento, escaneo de las regiones 5' no traducibles, restringen y promueven la hidrólisis y desecho de P<sub>i</sub>, controlan los cambios conformacionales clave del complejo y la unión de las diferentes subunidades [5]. Por otra parte eIF1 y eIF1A cooperan entre sí en la unión a la subunidad 40S y promueven el reclutamiento del complejo ternario, además de estas interacciones se ha mostrado que eIF3, eIF5 y eIF1 están físicamente asociados en un complejo multifactorial que existe libre de ribosomas [7]. eIF1 y eIF1A actúan de manera antagónica, siendo eIF1 el responsable de evitar el reconocimiento prematuro de un codón de inicio y eIF1A facilitando una pausa en el codón de inicio correcto el tiempo suficiente para proseguir con los eventos de iniciación río abajo [5]. Reconstrucciones por

microscopía Crio – electrónica de la subunidad 40S han mostrado que los dos factores juntos (eIF1 y eIF1A) causan un cambio conformacional en la subunidad pasando de una estructura cerrada (40S solo) a una abierta (40S-eIF1-eIF1A), que es receptiva a la unión del complejo ternario y es competente para el escaneo del mRNA. El complejo 40S•eIF1A parece estar más cerrado que la subunidad 40S por sí sola, lo que sugiere que al salir eIF1 del complejo de pre iniciación dejando a eIF1A, puede ser un mecanismo que dispare la conversión de un estado abierto competente para el escaneo a un estado cerrado que arresta el escaneo. [8].

El sitio de unión a la subunidad 40S de eIF1 está localizado cercano al sitio P del ribosoma, y se ha propuesto que eIF1 promueve una conformación abierta del complejo de preiniciación (PIC) llevando al escaneo y la restricción del apareamiento de bases de Met-tRNA<sup>Met</sup> con tripletes que no son AUG, eIF1 así mismo regula negativamente la actividad de GTPasa de eIF5 en codones que no son AUG mediante una interacción directa entre estas proteínas [9].

## eIF2

eIF2 de plantas no difiere en composición o secuencia de aminoácidos de eIF2 de otros eucariontes [10]. Posee tres sub unidades ( $\alpha$   $\beta$   $\gamma$ ), la subunidad de unión a nucleótidos  $\gamma$  es un homólogo cercano en cuanto a secuencia y estructura a EF-Tu bacteriano y eEF1A eucarionte. Se piensa que eIF2 $\gamma$ •GTP tiene la mayor contribución a la unión de Met-tRNA<sup>Met</sup> a eIF2. El dominio carboxilo terminal (CTD) puede contactar a Met-tRNA<sup>Met</sup> directamente. La subunidad eIF2 $\beta$  contacta a eIF1A, eIF5 y eIF3 [11].

Cuando eIF2 se encuentra unido a GDP se promueve la interacción con el factor de intercambio de nucleótidos de guanosina (GEF, Guanosine Exchange Factor) eIF2B. eIF2 $\alpha$  es blanco para la inhibición global de la traducción, ya que si el GDP no es intercambiado por GTP, se impide la formación de un complejo ternario activo. Esta regulación es mediada por varias cinasas que fosforilan a eIF2, subunidad  $\alpha$ , en respuesta a situaciones de estrés. En este caso las subunidades eIF2 $\beta$  y eIF2 $\gamma$  implicadas en el intercambio de nucleótidos mantienen secuestrado a eIF2B de forma inactiva para realizar dicho intercambio [11].

eIF2B es un heteropentámero cuyas subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$  forman un subcomplejo regulatorio que une y reconoce eIF2 $\alpha$  fosforilado y reprime la actividad del subcomplejo catalítico formado por las subunidades “ $\gamma$ ” y “ $\epsilon$ ”. eIF2B $\epsilon$  es la subunidad que lleva acabo el intercambio de nucleótidos y su secuencia N-terminal media la interacción entre las demás subunidades del complejo. La

estructura cristalina del dominio  $\epsilon^{\text{CAT}}$  reveló que es un dominio helicoidal que posee una alta similitud al dominio carbonilo terminal de eIF5, sugiriendo que  $\epsilon^{\text{CAT}}$  y eIF5 interactúan con eIF2 de manera similar y pueden competir por la unión a este [11].

## eIF3

Este factor está constituido por 5 subunidades no idénticas en *Sacharomyces cerevisiae* y 13 subunidades no idénticas en mamíferos [10], designadas como eIF3a a eIF3m (Tabla 1). El complejo de levaduras es más simple, contiene como componentes estequiométricos a los ortólogos de eIF3a, eIF3b, eIF3c, eIF3g y eIF3i de mamífero, los cuales son esenciales para la traducción *in vivo*. La subunidad eIF3j es una unidad sub-estequiométrica no esencial que incrementa la interacción con otros eIFs, promoviendo la unión de eIF3 a la subunidad 40S y tiene una función independiente en la biogénesis del ribosoma 40S. Se sugiere que las subunidades esenciales en levadura (eIF3a, eIF3b, eIF3c, eIF3g y eIF3i) constituyen el núcleo del complejo que puede ejecutar las funciones cruciales de eIF3 y puede ser estimulado por eIF3j [12]

eIF3e es una proteína citoplasmática mayoritariamente, aunque también puede ser detectada en el núcleo en muchos organismos incluyendo las plantas. El papel de eIF3e no es claro, pero se ha asociado con: (i) el control de la actividad del proteosoma 26S (ii) el señalosoma COP9 y otras proteínas regulatorias de la proteólisis, (iii) el transactivador transcripcional del virus de la leucemia en células humanas T (HTLV Tax), (iv) los productos proto-oncogénicos Rfp y PML de “cuerpos nucleares”, y (v) organización del huso mitótico. Si bien eIF3e no es esencial para la iniciación de la traducción global, en *Schizosaccharomyces pombe* existe evidencia de que eIF3e tiene un papel importante en la traducción [13]. Ocho de las subunidades de eIF3 muestran secuencias homólogas con subunidades del señalosoma COP9 (CSN) y el proteosoma 26S y forman un subcomplejo. Cada una de las subunidades contiene uno o más motivos característicos estructurales. El motivo PCI tiene un papel estructural en el complejo, mientras que el motivo MPN puede presentar actividad de metalo-proteasa [13].

Tabla 1. Subunidades del complejo eIF3 en distintos organismos eucariontes.

| Nomenclatura Unificada | H. sapiens | A. thaliana | S. cerevisiae | S. pombe complejo Csn7B | S. pombe Complejo Int6 | Función   |
|------------------------|------------|-------------|---------------|-------------------------|------------------------|---|
| eIF3a                  | p170       | p114        | TIF32         | p107                    | p107                   | Unión a: 40S, eIF4B; Ensamble de MFC; Reclutamiento de TC y mRNA  |
| eIF3b                  | p116       | p82         | PRT1          | P84                     | p84                    | Unión de 40S; Ensamble de MFC; Reclutamiento de TC y mRNA; Escaneo  |
| eIF3c                  | P110       | p105        | NIP1          | P104                    | p104                   | Unión de 40S; Ensamble de MFC; Reclutamiento de mRNA y TC; Reconocimiento de AUG                                  |
| eIF3d                  | p66        | p66         | -             | -                       | Moe1                   |   |
| eIF3e                  | p48        | p551        | -             | -                       | Int6                   |   |
| eIF3f                  | p47        | p32         | -             | Csn6                    | Csn6                   | Posible sitio de unión para mTOR y S6K1   |
| eIF3g                  | p44        | p33         | Tif35         | Tif35                   | Tif35                  | Interactúa con la proteína trans activadora de caulimovirus y estimula el reinicio en mensajeros policistronicos. |
| eIF3h                  | p40        | p38         | -             | P40                     | -                      |   |
| eIF3i                  | p36        | p36         | TIF34         | Sum1                    | Sum1                   |   |
| eIF3j                  | p35        | -           | HCR1          | -                       | -                      | Unión de 40S; Ensamble de MFC   |
| eIF3k                  | p28        | p25         | -             | -                       | -                      |   |
| eIF3l                  | p67        | P60         | -             | -                       | -                      |   |
| eIF3m                  | GA17       | -           | -             | Csn7B                   | -                      |   |

eIF3 puede unirse a la subunidad 40S sin la presencia de otros eIFs y evita la unión prematura de la subunidad 60S, una actividad crucial para la formación de 43S PIC. Esta función es dependiente de otros factores incluyendo el TC, una combinación de eIF1, eIF1A y oligonucleótidos de RNA, estos factores pueden ya sea incrementar la unión de eIF3 a 40S o estimular la actividad de anti asociación de eIF3 parcialmente, estabilizando la interacción de eIF3-40S [12]. Una reconstrucción basada en microscopia crio-electrónica de eIF3 de mamífero y un modelo de su interacción con la subunidad 40S sugiere que una extensión en forma de “pie” de eIF3 se ubica muy cerca de la interfaz superficial de la subunidad 40S para interrumpir el contacto intersubunidad con 60S. La asociación de eIF3j con eIF3 también requiere la proteína cinasa mTOR (mammalian Target Of Rapamycin), la cual puede proveer otras características, como la unión de eIF4F. Debido a esto, las señales que conducen a la activación de mTOR estimulan la traducción [12].

## Grupo de factores de inicio 4 (eIF4)

Estos factores son específicos de eucariontes y son responsables del reclutamiento del mRNA al ribosoma. eIF4F es un complejo de tres proteínas: eIF4A, una RNA helicasa tipo DEAD dependiente de ATP de 45 kDa; eIF4E, una proteína de unión a Cap de 24 kDa; y eIF4G, una proteína de anclaje que contiene sitios de unión para eIF4E, eIF4A, eIF3 y PABP [2].

### eIF4A

eIF4A es una proteína de 46 kDa (en mamíferos) que posee una actividad de helicasa de RNA bidireccional dependiente de ATP. Pertenece a la familia de proteínas DEAD-box. Las familias de proteínas relacionadas muestran el motivo DEAH o DEXH [2]. Las proteínas DEAD muestran un motivo de 8 aminoácidos conservados y están involucradas en casi todos los aspectos del metabolismo de RNA [14]. Estas proteínas participan en diversos procesos aparte de la traducción, incluyendo el splicing de pre-mRNAs, biogénesis de ribosomas, y son muy importantes durante procesos del desarrollo como espermatogénesis y ovogénesis. Todos los miembros de esta familia tienen actividad de ATPasa, pero solo algunos miembros incluyendo aEIF4A poseen actividad de desdoblamiento de RNAs de doble cadena [2].

Tres proteínas han sido identificadas en humano, eIF4A - I, eIF4A - II y eIF4AIII [4], eIF4AI y eIF4AII son homólogas (89 % de identidad) y parecen ser funcionalmente equivalentes, pero muestran expresión tejido-específica y su regulación en el desarrollo es diferente. eIF4AIII (66 % de identidad a eIF4AI) no substituye a eIF4AI en un ensayo de unión a ribosomas [2], se han encontrado dos proteínas en ratón, eIF4A - I y eIF4A - II, una en conejo, tres en *Xenopus*, una en *S. cerevisiae* codificada por los genes *TIF - 1* y *TIF - 2*, dos en *Drosophila* Dm eIF4A y DM eIF4A - III y una en *E. coli*. Dos genes han sido clonados en *A. thaliana* y uno en trigo, más de 10 eIF4A han sido identificados en tabaco [4].

La unión de eIF4A a ATP y RNA es acoplada a una secuencia de cambios conformacionales incluyendo el paso de unión a los sustratos, hidrólisis de ATP, y desecho de los productos [14]. El grado de desdoblamiento de dúplex de RNA por eIF4A depende únicamente de la estabilidad del dúplex. La amplitud del desdoblamiento puede también ser correlacionada con la estabilidad del dúplex. eIF4A es capaz de desdoblar extremos romos (regiones sin cadena sencilla) dúplex de

RNA/DNA, DNA/RNA y RNA/DNA-PS (PS es fosforotioato), así como actividad ya sea en dirección 5' -> 3' o 3' -> 5'. eIF4A es capaz de interactuar con RNA de doble cadena. Se ha demostrado en ensayos *in vitro* y en sistemas fraccionados de lisados que eIF4A trabaja en conjunto con eIF4B, eIF4H (esta última de humano) y como subunidad de eIF4F durante el inicio de la traducción. eIF4A, eIF4B y eIF4F han sido implicados en la iniciación mediada por ingreso interno al ribosoma (traducción Cap independiente) [14].

eIF4A tiene dos dominios involucrados en la unión de RNA y ATP. En una conformación cerrada, los dos dominios forman una superficie de unión a RNA y el sitio de unión a ATP está en la interface entre los dos dominios. El RNA y el ATP se unen cooperativamente. La actividad de ATPasa de eIF4A libre es baja [15], sin embargo, es altamente estimulada cuando eIF4A es parte de un complejo multiprotéico que incluye a eIF4G, eIF4E, eIF4B y eIF4H [16].

## eIF4B

eIF4B es una proteína de 69 kDa en mamíferos que facilita la unión del mRNA al ribosoma en ensayos de unión a ribosoma reconstituido. Al contrario de eIF4A, el cual parece ser un factor esencial, eIF4B tiene una función facilitadora para el papel de eIF4A, debido a que el complejo de preiniciación 48S puede ser formado en su ausencia, y una cepa de levaduras interrumpida en el gen de eIF4B, TIF3, es viable [2]. eIF4B de mamíferos se homodimeriza mediante un motivo de 99 aminoácidos en la región media de la proteína rica en ácido aspártico, arginina, tirosina y glicina nombrada como dominio DRGY. Este dominio interactúa con la subunidad eIF3a [2].

eIF4B es esencial para estimular la actividad de helicasa de eIF4A en mamíferos. En trigo, eIF4B solo estimula moderadamente pero no es requerido para la actividad de helicasa y ATPasa de eIF4A [15] aunque potencia la actividad de helicasa de eIF4A y eIF4F y promueve la unión del mRNA a la subunidad 40S aparentemente a través de una interacción con eIF3. eIF4B de mamíferos posee dos dominios de unión a RNA y se ha propuesto que unen el mRNA y el RNA ribosomal simultáneamente, lo que contribuye al reclutamiento de la subunidad 40S a un mRNA [17]. eIF4B de mamíferos posee dos dominios separados de unión a RNA. Una región básica en el carboxilo terminal que une fuertemente al RNA de forma independiente a la secuencia y un motivo de reconocimiento a RNA (RRM por sus siglas en inglés) localizado en el amino terminal que une débilmente a RNA de forma independiente a la secuencia. eIF4B puede unir dos RNAs simultáneamente y a la subunidad ribosomal 40S *in vitro*. Se ha postulado que eIF4B actúa

directamente uniendo el extremo 5' UTR del mRNA a la subunidad ribosomal y/o indirectamente a través de su interacción con eIF3. Asimismo, eIF4B exhibe una actividad de alineamiento de RNA sugiriendo que puede promover una interacción mRNA-rRNAMet-tRNA<sub>i</sub> en un codón iniciador durante el proceso de escaneo [2].

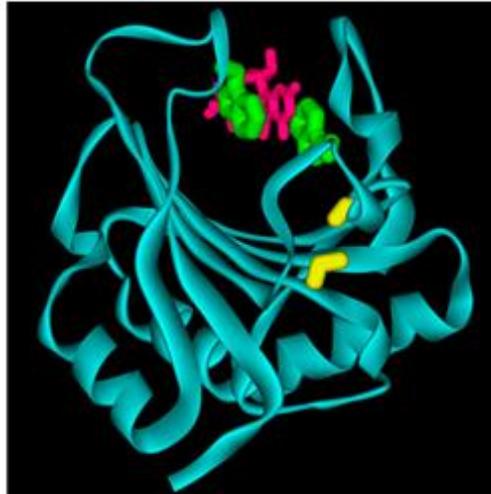
De manera semejante a los ortólogos de animales, eIF4B de plantas puede unir dos moléculas de RNA simultáneamente, pero difiere de eIF4B de mamíferos en que posee tres dominios de unión a RNA. Sumado a esto, su interacción con eIF4G y PABP puede incrementar la afinidad de PABP por la cadena de poli(A) del mRNA [17]. En resumen, desde hace varios años, se ha demostrado que eIF4B interactúa con eIF4G o eIFiso4G, eIF4A, eIF3 y directamente con el mRNA permitiendo organizar la unión de la maquinaria de inicio de la traducción [18].

## eIF4E

La proteína eIF4E fue identificada en los 1970s por su capacidad de unirse al Cap. Su purificación se ha visto facilitada por el uso de cromatografía de afinidad en una matriz que tiene unido covalentemente <sup>7</sup>mGTP como análogo de Cap. La depleción de eIF4E de extractos celulares disminuye drásticamente la traducción de mRNAs dependiente de Cap, actividad que es restaurada al adicionar eIF4E nativo de cualquier organismo expresado y purificado en bacterias. eIF4E es una proteína altamente conservada en el reino eukarya sobre todo en los aminoácidos clave para su función que constituyen la secuencia "core" de la proteína [19]. Las estructuras terciarias de eIF4E de ratón, levadura y humano han sido resueltas [20].

## Estructura de eIF4E

La estructura de eIF4E consta de un dominio simple  $\alpha/\beta$ , el cual contiene 8 cadenas  $\beta$  anti-paralelas formando una hoja  $\beta$  curvada, esta hoja se pliega en si misma por medio de tres grandes  $\alpha$  hélices (Figura 3). El 5' Cap del mRNA se une a eIF4E en una bolsa hidrofóbica en la superficie cóncava interior, de esta forma en la superficie dorsal eIF4E interactúa mutuamente con eIF4G o con proteínas inhibitorias de la traducción Cap dependiente [2].



**Figura 3. Estructura tridimensional de eIF4E unido a análogo de Cap**

Las formas de unión a Cap utilizadas por eIF4E de levadura y ratón son casi idénticas y todos los residuos de unión a Cap son conservados desde levaduras hasta mamíferos. El <sup>7</sup>mGDP (incluido en los cristales) ocupa una ranura estrecha en la superficie cóncava de eIF4E, donde la unión de <sup>7</sup>mG está dada por interacciones de tipo  $\pi$ - $\pi$  entre las bases y los grupos indol de dos triptófanos (Trp 56 y Trp 102 en ratón, Trp 58 y Trp 104 en eIF4E de levadura). Estas interacciones son coordinadas por puentes de hidrógeno que incluyen la Glutamina 103 y el grupo amido del Trp 102 (Figura 4). Esta forma de unión a Cap también se encuentra en una proteína VP39 metiltransferasa, una proteína bifuncional del virus vaccinia que metila el hidroxilo 2' de la ribosa en el Cap y así mismo actúa como un factor de procesividad para la poli (A) polimerasa viral. De esta forma el mecanismo de unión a Cap parece ser altamente conservado y puede ser utilizado, por ejemplo, para el reconocimiento del Cap por proteínas de unión a Cap nucleares y/o por las enzimas de Decapping que son diferentes de las proteínas tipo eIF4E [2].

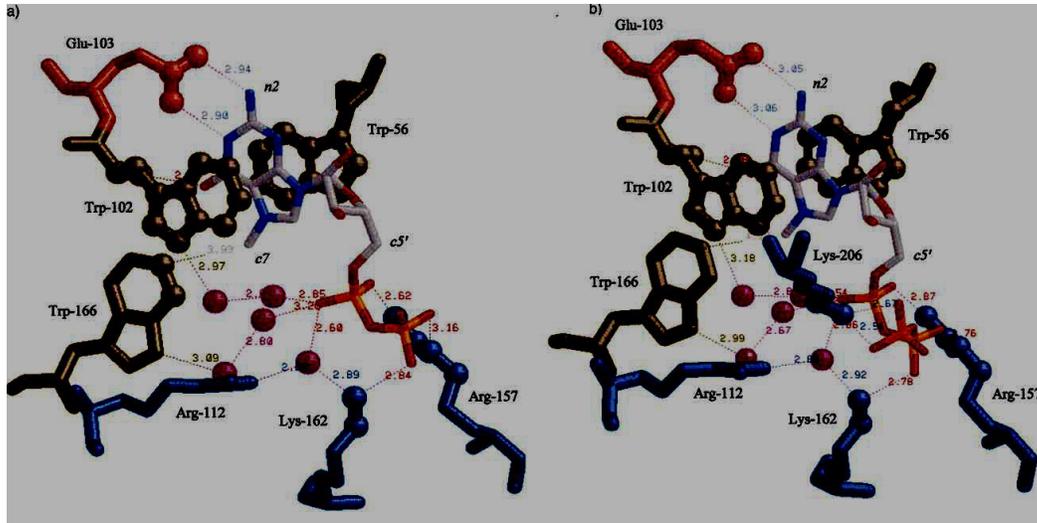


Figura 4. Contactos interatómicos en (a)  $^7mGDP-eIF4E$ , determinados con base en la estructura cristalográfica, y (b) complejo  $m^7GpppG$ , los puentes de hidrógeno, puentes salinos y las interacciones de Van der Walls son indicadas como líneas punteadas, con las distancias expresadas en Å. Las moléculas de agua que estabilizan los puentes de hidrógeno se muestran como esferas color magenta [21].

La actividad de eIF4E es altamente regulada y constituye el segundo punto de control para los niveles de traducción global, junto con la fosforilación de eIF2 $\alpha$  descrita arriba. En mamíferos y *Drosophila* existen proteínas de unión a eIF4E (4E-BPs) que muestran un motivo de aminoácidos igual al presente en eIF4G para interactuar con eIF4E. De esta manera actúan como competidores de la interacción eIF4E-eIF4G. Esta secuencia común es YxxxxL $\Phi$  (siendo  $\Phi$  un aminoácido hidrofóbico). La interacción entre 4E-BPs y eIF4E se regula por el nivel de fosforilación de las primeras. Las 4E-BPs hipofosforiladas muestran una mayor asociación a eIF4E, secuestrándolo en complejos inactivos para la traducción, mientras que una hiperfosforilación disminuye su afinidad por eIF4E, permitiendo el desplazamiento hacia la formación de eIF4E-eIF4G activo para la traducción. Esto puede deberse al hecho de que los sitios de fosforilación de 4E-BP se localizan en la región media flanqueando el sitio de unión a eIF4E, lo que podría dar como resultado una repulsión electrostática [19]. La señalización mediada por mTOR incide directamente sobre la fosforilación de 4E-BPs para promover un incremento en los niveles de síntesis de proteínas [2]. Las proteínas 4E-BPs, no parecen estar presentes en todos los organismos eucariotes, por lo que el mecanismo de regulación arriba descrito no necesariamente aplica para todos.

eIF4E también es susceptible de fosforilación, en el caso de mamíferos por la MAP cinasa Mnk capaz de unirse a eIF4G. Generalmente, pero no siempre, la fosforilación en la Serina 209 se correlaciona positivamente con un incremento en la actividad de traducción. La estructura

cristalina de eIF4E-m<sup>7</sup>GDP (humano) sugiere que la forma fosforilada de la Ser-209 forma un puente salino con la Lisina 159, el cual se ha propuesto que funciona como una abrazadera para estabilizar la interacción mRNA-eIF4E. Esto es consistente con los datos que muestran que eIF4E fosforilado une con mayor afinidad a Cap que eIF4E no fosforilado [22].

Con el incremento de secuencias de genomas conocidas, se encontró que casi todos los eucariontes poseen más de una proteína eIF4E. Sin embargo, para muchas no se conoce si funcionan como un factor de traducción general, o si tienen un papel especializado. La secuencia consenso de la región “core” representada por ~170 aminoácidos (de la His37 a la His 200 de eIF4E de humano): H(X5)W(X2)W(X8-12)W(X9)F(X5)FW(X20)F(X7)W(X10)W(X9-12)W(X34-35)W(X32-34)H fue definida en el 2005 por el grupo de Rosemary Jagus como necesaria para que una proteína sea definida como miembro de la familia eIF4E [19]. En particular, esta región contiene los residuos aromáticos de Trp y Phe así como otros aminoácidos importantes para formar la estructura capaz de acomodar el Cap. En el mismo trabajo, se realizó un análisis con las secuencias disponibles originando la agrupación de los miembros de la familia eIF4E en tres clases [19], los miembros de la clase I incluyen a las proteínas semejantes al eIF4E canónico descrito para mamíferos (eIF4E-1 de humano). Esta clase se encuentra en Viridiplantae, metazoarios y fungi, así como algunos protistas. Los miembros de las clases II y III presentan sustituciones en uno o dos de los Trp de la región “core” y su distribución es más restringida en los organismos eucariontes.

### Miembros de la familia eIF4E de clase I

Comparaciones de las secuencias de aminoácidos representantes de la región “core” de los miembros seleccionados de los subgrupos I, II y III revelan una identidad de 35% a 40% y una similitud de 60% a 65% entre ellos y poseen los residuos de Trp 43 y 56 correspondientes a eIF4E-1 de humano (Figura 5). En plantas existen dos subgrupos dentro de la clase I representados por eIF4E y eIF(iso)4E, los cuales hasta el momento han sido encontradas en todas las especies cuyos genomas se conocen. Esto sugiere que en plantas eIF4E sufrió un evento de duplicación temprano. Las dos proteínas están estrechamente relacionadas en secuencia y cada una posee los atributos de actividad de eIF4E-1 de mamíferos. Sin embargo, la expresión de eIF(iso)4E relativo a eIF4E de *A. thaliana* en *S. cerevisiae* carente de un gen eIF4E endógeno funcional resulta en un crecimiento más lento [23]. Además, eIF(iso)4E y eIF4E difieren en su patrón de expresión en varias especies de plantas y muestran actividad diferencial en un sistema de traducción in vitro [23].

En trigo se ha visto que eIF(iso)4F (eIF(iso)4E-eIF(iso)4G) prefiere estructuras Cap hipermetiladas y mRNAs con menos estructuras secundarias comparado con eIF4F (eIF4E-eIF4G), se ha visto también en maíz que eIF(iso)4F se localiza en microtúbulos [24].

## Miembros de la familia eIF4E de clase II

La clase II incluye a miembros de la familia eIF4E que poseen un residuo hidrofóbico como Tyr o Phe pero no Trp en la posición equivalente a los Trp 43 y 56 de eIF4E-1 de humano (Figura 5). Este grupo se denomina eIF4E-2 y tiene representantes en metazoarios (4E-HP en humano y *Drosophila*) y Viridiplantae (nCBP, novel Cap Binding Protein). Miembros de esta familia, también pueden ser reconocidos en hongos patogénicos del sub-filum Pezizomycotina.

Comparaciones en la secuencia de aminoácidos de la región “core” muestra que la clase II posee un 50% de identidad y 70 a 80 % de similitud entre sus miembros, y un 30 a 35% de identidad y 60 a 65% de similitud con los miembros de la clase I. Los miembros de la clase II difieren a su vez en que estos poseen un residuo hidrofóbico como Tyr, Phe o Leu en la posición equivalente al Trp 56 de eIF4E - 1 de *H. sapiens*. Los miembros de la clase II también poseen una substitución en el Trp 43 relativo a eIF4E – 1 de *H. sapiens* [19].

Se sabe que 4E-HP de humano y *Drosophila* tienen funciones especializadas, ya que no son capaces de interactuar con eIF4G, pero si con 4E-BPs [25-27]. Además para *Drosophila*, 4E-HP es parte de un mecanismo de regulación particular en la traducción de algunos mRNAs durante la adquisición de polaridad en el eje anterior-posterior del embrión [28, 29]. Respecto a nCBP de plantas, se demostró en *A. thaliana* que la proteína interactúa fuertemente con 7mGTP, puede estimular pobremente la traducción en germen de trigo e interactúa tanto con eIF4G como con eIF(iso)4G [30].

### Miembros de la familia eIF4E de clase III

Los miembros de la clase III muestran entre un 30 a 35% de identidad y un 45 a 55% de similitud con los miembros de la clase I o clase II (Figura 5). Poseen una substitución de Tyr en la posición correspondiente al Trp 56 de eIF4E-1 de humano, todos los miembros de la clase III poseen, al igual que los miembros de la familia eIF4E de clase I y a diferencia de los de clase II, un residuo de Trp en la posición Trp-43 con respecto a eIF4E-1 de humano. Estos miembros de la clase III solo han sido identificados en Metazoarios. No existe evidencia de que los miembros de la clase III se expresen en nematodos. El origen de los miembros de la clase III puede deberse a una duplicación temprana de los miembros de la clase II, aunque una imagen más clara será posible solo con la obtención de mayor número de secuencias de metazoarios no cordados [19].

```

*          *          *          *          *
20        40        60        80        100
◆ H. sapiens 4E-1      : KHFLQNRWAL PFK---ND--KSKTQANLRLSKFDTVEDEPFLYLNHQLSSNMPG-----CDYSLFKDGEPEPMWDEKKNKGGRLI : 11
◆ C. intestinalis 4E-1 : KHFLQNRWAL PFK---ND--RQKKEDNLRLLTKFDTVEDEPFLYLNHQLSSKQSG-----CDYNLFKDGEQPMWDEKANKKGGKML : 13
◆ D. melanogaster 4E-1a : KHFLDMNVWTL YLE---ND--RKKSEDMQNEITSFDTVEDEPFLYLNHQLKPFSEKLG-----SDYSLFKKHLRPEMWDAANKQGGRLVI : 15
◆ C. elegans IFE-3     : RHFLQNRWAL YLK---AD--RNKEEDCLKMWSLFDTVEDEPFLYLNHQLSAGGNWG-----SDYYLFRKGEKPEMWLVNNVQGGRLV : 11
▲ A. thaliana 4E      : SHELEHSWTF PDPNPAVKS--KQTSVGGSLRPPTFSVEEFPFLYLNHQLKPSKLAHG-----ADFYCFKHLIPEPMWDEIPICANGGKTM : 14
▲ Z. mays 4Ea        : THELEHSWTF PDPNPQSKS--KQAAVGGSSIRPHTFSTVEEFPFLYLNHQLHPSKIVG-----ADPHCFKRNKPEPMWDEIPICANGGKTI : 12
▲ A. thaliana (iso)4E : PHNLERNSP PDPN-QSK---KGAAVGGSLRKYTFDTVEEFPGLHETIPQTSKLTAN-----AEIHLFKAGPEPMWDEIPICANGGKTIW : 10
▲ Z. mays (iso)4E    : PHNLRHQWTF YDI-QTKTK-SGAAVGTSLKKYTFDTVEEFPMSYDQIPRPSKISGN-----ADPHLFKAGPEPMWDEIPICANGGKTIW : 12
■ S. pombe 4E1       : KHFLARWTL PLMP-PTP---GLEWELQKNITTFNSVEEFPGLIHNNIPASSPIK-----SDYSEFREGVPEPMWDEIVHNKTKGGKAF : 11
■ S. cerevisiae 4E   : KHFLNTKWTLYTKP-AVD--KSESVDLLRPTSFQTVEEFPALIQNPEPHEFLK-----SDYHVFRNDVPEPMWDEANANGGKMSF : 11
◆ M. musculus 4E-2A : EHELQYNWTF YSRRTPGRPTSGQSYEQNIKQIGTFASVEQEPKPYSHVVRPGDTGH-----SDPHLFEKGEKPEMWDEANANGGKTIW : 13
◆ C. intestinalis 4E-2 : EHELQYTWTF YSKKPPGRNQDASSPEKNMKIGTFRSTVEQEPRIYSHVIRANDTGH-----SDVHVFKGGEKPEMWDEKANRLGGKTIW : 12
◆ D. melanogaster 4E-2 : ENFLQHTYCLPSRKETQR--AAADYSKSLHMVGRCAVQQWVSLYSHVIRPTAKPY-----RELLLFKQGLIPEMWDEIPANSGGKLI : 12
◆ C. elegans IFE-4   : DHCLQYSWTF SYFMRPTGK-PPEFDYASVYVQPIGIMKSYEQEPKIMVHPKRPTECDK-----ADIHFPKTGKPEMWDEIPANCKGGKTI : 11
▲ A. thaliana nCBP   : LHELRYKFSIYTRRTPGV--RNQSYEDNIKKVVEFSTVEGEPACVYCHVARSSELPSP-----TDLHFVKDGEKPEMWDEIPANCGGKTI : 12
▲ Z. mays nCBP      : LHELRRHIVLYTRRTPGA--RQSQSYEDNIKKVIDFSTVEEFPWCYCHVARPSSLPSP-----TDLHLFKDGEKPEMWDEIPANCGGKTI : 13
■ C. posadasii nCBP/4E-2 : EHELKSTWVWYRPPTPKY---SDYEKSTIAVASISSVESEFVAVYSHVKRPSLPTV-----SDYHIFKKGKPEPMWDEQANKKGGKTIW : 8
◆ M. musculus 4E-3   : GVFLHGSWTF LDRSLPGA--TAAECANLKKYTVQTVQIEFVYNNIPVVTSEFLR-----CSYHLMGGERPEMWDEIPANSGGKTIW : 11
◆ C. intestinalis 4E-3 : GVFLNSWTL LDRSVENL--TASEVENLRKQYTVSTVESEFVYNNIPPPSRIPR-----YSYHLMRNNRPEMWDEIPANSGGKTIW : 13
○ C. parvum unc.     : PLHLSHEWIVBQLNVE-TR-KDLLYSNATKPARFSSVQEPVLLWHNIPQPSLTKGKRMIRESDGSKSVVDVAVILFKEGICQPMWDEIPANSGGHIHF : 13
○ P. falciparum unc. : PLLLQYNWVIEQVSDNKIK-QSNWYDYTRPAKFNVSQKPEQLWNRIPQPSDLAQRSMTRFSEDGIPRIVDALMIPRDNICQPMWDEIPANSGGGHPEY : 12

```

```

*          *          *          *          *
120       140       160       180
◆ H. sapiens 4E-1      : TLNKQ--QRRSD-LDRFLETLLCLIGGSPDD---YSDDVCGAVVNR-----ARGDKIAVWTTCECENREAVTHIGRVYKERVGLPPKIVIGVQSHAD : 202
◆ C. intestinalis 4E-1 : QMSKQ--QRVNE-LDKVLEILLCLIGGSPGE---DSDYVGGVQVVR-----HKGDKVAWVTSDYKHREGIMNIGQICKTRVGLPKKAVIGVQAHED : 218
◆ D. melanogaster 4E-1a : TLNKS---SKTD-LDNLWLDVLLCLIGGAPD---HSDQVCGAVVNR-----GKSNKISVWTTADGNNEEAALIGHKLRDARLGRNNSLQVQLHXD : 244
◆ C. elegans IFE-3     : VVDKQKLQRRTQLLDHYWLELLNAIVGGQFDE---YGDYVCGAVVNR-----QKGDKVAWVTRDATRDDVNLRIQVQLKQKQISIPDTEILREVEVHKD : 200
▲ A. thaliana 4E      : TFPKE---KS---DKSWLYTLALIGGQFD---HGDEVCGAVVNR-----GKQERTVWTKNASNEAAQVSIQKQWKEFDYNNNS--IGVLIHED : 221
▲ Z. mays 4Ea        : SCGRG---KS---DTFWLHTLLAMIGGQFD---YGDEVCGAVVSVR-----GKQERTVWTKNAANEAAQVSIQKQWKEFDYKDS--IGVIVHDD : 204
▲ A. thaliana (iso)4E : VVTAN---RKEALDKGLETLLAMIGGQFD---EADENVCGAVVSVR---QSKQDKLWVTRTKSNEAVLMGIGKWKKEIDVTDK--ITVNNHDD : 190
▲ Z. mays (iso)4E    : --PCN---RKATFETWLETLLAMIGGQFD---ETEDVCGVVSVR-----ARGDKIAWVTRTASNEAVQVNIQKWKQVVDYNDK--ITVTFHDD : 202
■ S. pombe 4E1       : QNKGR---GGNALDENWLTVDAAIGSTLDP---TGQVWGVVNMNR-----KGFYRIAVWTKSCNNREVLMEIGTRFKQVWNLPRSETIDSAHED : 203
■ S. cerevisiae 4E   : QLRGK---GADIDELRTRLLAVIGETIDE---DSDQVGVVSVR-----KGGKFAVWTKS-EDKEPLLRIQKFKQVWKLTDGHEVPPHSS : 201
◆ M. musculus 4E-2A : RLRKG-----LASRQENLLDAMIGGQPMV---GDEVCGAVVSVR---PQEDIISVWTKNTASDQATTARIRDTLRRVWNLPPNTIMEVKTHTD : 219
◆ C. intestinalis 4E-2 : RLRKG-----LVARQENLLDAMIGGQPMV---GDEVCGAVVSVR---PQEDIISVWNRNANESQVTSRIRDTLCRVWNLPPNTIMEVKTHTNE : 203
◆ D. melanogaster 4E-2 : RLRKN-----KVDRPENVQDAMIGGQPLV---GDEVCGVVLQTK---YPEDSISVWHRRTATDMSTTRIRDTLRRVWNIPLTALVAKIHXD : 209
◆ C. elegans IFE-4   : RLKKG-----LSTRVWENLLAMIGGQPLV---GDEVCGAVCSIR---NQEDIISVWNRNADDTFVTVNRIRDTLRSVWQLPQNTVLEVKRHDD : 195
▲ A. thaliana nCBP   : RPSKV-----VSARFWEDLLALVGGQLDD---ADNVCGAVVSVR---FNEDIISVWNRNASDHQAVMGDRDSIKRHWKLPHPAYVMEKPHDA : 206
▲ Z. mays nCBP      : RPKKA-----VSGRFWEDLVVVGQQLLEY---SDVCGVVSVR---FNEDIISVWNRNASDHQAVMARDGSIKRHWKLPHPAYVMEKPHDA : 214
■ C. posadasii nCBP/4E-2 : RLKKG-----VADRWEDLLAMIGGQPAE---ASDEVCGAVVSVR---SGEDVLSVWTR--IDGGRNIKIRRTMKRLVFPFPDPTNIVKSHDD : 162
◆ M. musculus 4E-3   : KVPKD-----STSTVWKELEATIGGQPTDCAADDEIGVVSVR---DREDVQVWVNVNASLVG-EATVLEKIHQVWPHIAPKAVVFKPHPE : 195
◆ C. intestinalis 4E-3 : RCHKSE-----VTDNFWEDLLSCIGGQPTGVVWKGDDVIGLEVSVR---KNEDLVQVWNRNINSGNIE-QCKVLEKIKVWPHVIVPETSFKPHQL : 204
○ C. parvum unc.     : RAWQS---SVVPGELDTVWNNLVDAVIGGSLEN---SSIVNGIRVVDLGGNK-GNIRVWVPSDPSNQSAAHQALLKEIETLVSSLLDGTSCPEHPPE : 228
○ P. falciparum unc. : KILPK---DYPYSQIDEPNNLVDAIIGCSLKH---YDLITGIRVVDKLTSTRYGYIRVWVYTTITDESVKNYLRKDLRHHVWVNRIDGSTIVPPRVK : 220

```

Figura 5; Alineamiento de secuencias “core” de las distintas clases de las familias eIF4E en diferentes especies, los miembros de la clase I se muestran en azul, los de clase II en verde y los de clase III en rojo, los símbolos a la izquierda representan el grupo taxonómico, metazoarios (diamantes), fungi (cuadros), Viridiplantae (triángulos) y Protista (círculos). Los residuos subrayados dentro del alineamiento representan la identidad con respecto a los residuos Trp-43, 56, 102 y 166 así como a Glu-103 en eIF4E-I de *H. sapiens* (verde); la identidad dentro de la región consenso conservada (S/T)VxxW que contiene amino ácidos equivalentes a Val-69 y Trp-73 a eIF4E-I de *H. sapiens* (púrpura); la identidad con los residuos de *H. sapiens* equivalentes a los que limitan la región “core” de eIF4E-I de *H. sapiens* (subrayados en amarillo); variaciones en los residuos equivalentes a Trp-43 y 56 de eIF4E de *H. sapiens* son indicadas de la siguiente manera Tyr/Phe subrayadas en azul con texto blanco; Cys subrayada en rojo con texto blanco; Los residuos subrayados en negro o gris indican amino ácidos que son idénticos en todas las secuencias o similares en más del 85 % de las secuencias. Los números a la derecha indican la distancia de aminoácidos con respecto al residuo de Met N- terminal. Tomado de [19].

## eIF4G

eIF4G ha sido aislado y clonado de diversas especies incluyendo las levaduras *S. cerevisiae* y *S. pombe*[31], *Drosophila*[32], trigo [33] y humano [34, 35].

Las proteínas que muestran homología con eIF4G de humano o levadura son más de una en la mayoría de los organismos, incluyendo la propia levadura. De acuerdo con el sistema de nomenclatura propuesto para los factores de traducción, el producto del gen principal en humanos es referido como eIF4G-1, mientras que sus dos homólogos se denominan eIF4G-2 (también conocido como p97, eIF4G2, DAP5 y NAT1) y eIF4G-3 (también conocido como eIF4G3 y eIF4GII). La mayoría de los estudios reportados hasta la fecha se han referido a eIF4G-1 [36]. Otras isoformas de eIF4G difieren en su región amino terminal, se originan por inicios de la traducción en diferentes codones AUG. Se ha mostrado que las dos isoformas mayores, nombradas eIF4GI y eIF4GII [37], son más abundantes en células humanas. La isoforma de menor tamaño (nombrada eIF4Ga) carece de la secuencia cercana al amino terminal de eIF4GI que interactúa con PABP. eIF4G interactúa con eIF3 mediante un dominio central que es denominado MIF4G y que está presente en diversas proteínas. Este dominio también es responsable de unir a eIF4A, eIF4B y recluta a la subunidad ribosomal 40S formando una unión estable entre el mRNA y el Ribosoma durante el inicio de traducción [37].

Las dos isoformas de eIF4G en mamíferos, eIF4GI y eIF4GII, poseen 46% de identidad y una masa molecular predicha de 171 y 176 kDa respectivamente. En *S. cerevisiae* también existen dos isoformas (Tif4631 y Tif4632, también conocidas como p150 y p130) que poseen 53% de identidad. Dos isoformas existen también en plantas, eIF4G y eIF(iso)4G [10].

Las dos isoformas de eIF4G en mamíferos, eIF4GI y eIF4GII, poseen 46% de identidad y una masa molecular predicha de 171 y 176 kDa respectivamente. En *S. cerevisiae* también existen dos isoformas (Tif4631 y Tif4632, también conocidas como p150 y p130) que poseen 53% de identidad. Dos isoformas existen también en plantas, eIF4G y eIF(iso)4G [10], presentes como las subunidades mayores de los complejos eIF4F y eIFiso4F respectivamente. eIF4G y eIF(iso)4G de plantas difieren en peso (165 y 86 kDa respectivamente) y son solo 39% idénticas, mientras que las dos formas presentes en levaduras y mamíferos son considerablemente más conservadas [18]. Las isoformas de eIF4G de mamíferos y plantas poseen actividades bioquímicas similares, aunque funciones especializadas durante el desarrollo o en ciertas condiciones celulares.

eIF4G funciona como el sitio de co-localización para varias proteínas relacionadas con el metabolismo de mRNA. Los datos sobre eIF4G de levaduras, plantas y mamíferos arrojan sitios de unión (desde el amino hacia el carboxilo terminal de eIF4G) para la proteína de la influenza NS1, la proteína citoplásmica de unión a cadenas de Poli(A) PABP, la proteína de rotavirus NSP3, la proteína de decapping Dcp1, la proteína de unión a Cap eIF4E, el complejo nuclear de unión a Cap CBP 80, el factor de iniciación eIF3, la helicasa de RNA eIF4A en dos sitios distintos, el mismo RNA, las proteínas de choque térmico Hsp 27 y Hsp 70, y la cinasa de eIF4E Mnk1. En algunos casos no solo se ha visto que eIF4G une diversas proteínas, sino que también afecta las actividades de éstas y la unión con otras proteínas [36].

La proteína eIF4G1 posee tres dominios que son aproximadamente equivalentes en tamaño: la parte amino terminal que se define por su sitio de corte para proteasas de picornavirus, el dominio medio MIF o "core" (para este trabajo nos referimos a él como MIF, ya que "core" fue utilizado para eIF4E), que es crítico para la formación del complejo de inicio de la traducción, y la región carboxilo terminal, la cual parece ser un modulador en la traducción. La estructura del dominio MIF de eIF4G recientemente ha sido resuelta y revela la presencia de cinco repeticiones HEAT (nombradas por Huntingtin, Elongation 3, una subunidad de la proteína fosfatasa 2a blanco de Rapamicina). Las repeticiones HEAT se encuentran en proteínas que están en complejos multiproteicos y son formados por un arreglo de cinco pares de repeticiones de alfa hélices anti paralelas. Esto confirma el papel esencial de eIF4G1 en la coordinación de todos los componentes requeridos para la formación del complejo de pre iniciación en el mRNA.

La presencia de tres sitios de Serina estimulables para fosforilación localizados en el dominio medio de la proteína sugieren que la actividad de eIF4G puede ser regulada por eventos de fosforilación [35]. En el complejo eIF4F, eIF4E interactúa con eIF4G y media la traducción Cap

dependiente por la formación del complejo 48S en el extremo 5' terminal de mRNA. Lamphear y colegas (1995) mapearon el sitio de interacción mediante el uso de la proteasa de picornavirus observando que el fragmento amino terminal de eIF4GI generado por corte puede retenerse en cromatografías con m<sup>7</sup>GTP – Sefarosa. Una región de 49 aminoácidos en eIF4GI la cual está presente en las proteínas de levaduras, mamíferos y plantas, la cual incluye el motivo YXXXXLΦ es la responsable de unión de eIF4G y eIF4E. Como ya se mencionó antes, este motivo es compartido con las proteínas 4E-BPs y constituye un mecanismo de regulación para el inicio de la traducción eucarionte [35].

Lamphear y colegas han asignado el sitio de unión de eIF4A en la región carboxilo terminal de eIF4G. Este dominio de interacción no se encuentra en homólogos de levadura, a pesar de que eIF4A es esencial para la traducción en este organismo. Un segundo sitio de unión para eIF4A fue mapeado en el dominio MIF de eIF4G. Dado que eIF4A puede interactuar con cada uno de los sitios de unión en una relación de 1:1 esto proporciona una relación neta de 1:2; eIF4G:eIF4A. Además eIF4A se asocia y disocia más rápidamente del MIF que del dominio carboxi terminal, lo que sugiere que las dos moléculas de eIF4A podrían unirse de una forma cooperativa con eIF4GI [35].

eIF4GI puede asociarse con eIF4AI o eIF4AII pero nunca con ambas. Estos datos junto con experimentos de “pull-down” usando proteínas fusionadas a marcadores mostraron que el complejo eIF4F exhibe una relación de una molécula de eIF4A por una molécula de eIF4G, lo cual está de acuerdo con el modelo propuesto por Sonenberg y colegas que sugiere que una molécula de eIF4A es colocada en una especie de sándwich entre los dos sitios de unión de eIF4G [35].

Experimentos de titulación, competencia y de resonancia de plasmón superficial mostraron que eIF3 se une en el sitio entre los aminoácidos 975 – 1065 en el dominio central de eIF4GI. La unión de eIF4A y eIF3 en la región central es mutuamente cooperativa con un incremento de la unión de eIF3 a eIF4GI de cuatro veces en la presencia de eIF4A. De forma recíproca la unión de eIF4A al dominio MIF de eIF4GI se incrementó en más de dos veces en presencia de eIF3 [35].

El dominio de interacción con PABP fue mapeado en una región de 114 aminoácidos en la región N amino terminal de la proteína eIF4G de levadura. Mutaciones en el primer y segundo motivo de reconocimiento de RNA (RRM 1-2) de PABP impiden su asociación a eIF4G inhibiendo la traducción dependiente de la cola de poli(A) en extractos de levadura [35]. La interacción PABP-eIF4GI no es esencial para la traducción Cap dependiente, ya que variantes de eIF4G o fragmentos carentes del sitio de unión a PABP son capaces de llevar a cabo este proceso aunque con menor eficiencia que

sus contrapartes [37]. Además de estas uniones a proteínas, eIF4G posee un motivo de reconocimiento a RNA (RRM) el cual es conservado en todos los eIF4G [2].

eIF4F consiste de eIF4E y una proteína eIF4G con un peso de 220 kDa, mientras que, en plantas el segundo complejo de unión a Cap llamado eIFiso4F contiene una subunidad de eIF4G llamada eIFiso4G, eIFiso4F consiste de una subunidad eIFiso4E y una subunidad eIFiso4G con un peso de 86 kDa, esta subunidad posee todas las propiedades de interacción de eIF4G, incluida la interacción con PABP, a pesar de que le falta una porción importante de la región amino terminal de eIF4G. La interacción de eIF(iso)4G con eIF4B y PABP incrementa la actividad de ATPasa y RNA helicasa del complejo eIF4A/eIF4B/eIF(iso)4F, lo que sugiere que PABP puede estimular el escaneo del mRNA por el complejo eIF4F y de esta manera incrementar la eficiencia de inicio de la traducción. La afinidad en la unión a Cap por eIF4E y a la cola de poli(A) por PABP también son potenciadas por esta interacción [38].

## PABP

La proteína de unión a poli A (PABP) tiene un papel crucial en la vía de la expresión génica. Une el extremo 3' del mRNA y estimula el inicio de la traducción mediante la circularización 5' - 3' debido a su interacción con eIF4G [39]. Pertenece a una familia de proteínas caracterizadas por su capacidad de unir RNAs poli(A) con una Kda aproximada de 2-7 nM, requieren de 12 residuos de adenosina para unirse, pero pueden proteger entre 25 y 27 residuos, siendo capaces de multimerización sobre muchos residuos de poli(A) [40]. PABP es una proteína ubicua de las células eucariotas, se encuentra tanto en núcleo como en citoplasma. Une cadenas de poli(A) de mRNA citoplásmicos y *heterogéneos nucleares*. *En levadura, PABP es esencial para la viabilidad y estimula la traducción in vitro con altas velocidades de reiniciación. Mutantes en PABP sensibles a temperatura de levadura tienen bajos niveles de polisomas y altos niveles de monoribosomas después de llegar a una temperatura restrictiva [41]. PABP interacciona con una región de eIF4G que es amino terminal al sitio de unión de eIF4E en S. cerevisiae.* En este sistema, la interacción eIF4G/PABP es dependiente de RNA, sugiriendo que la unión de PABP a la cadena de poli(A) de alguna manera deja a PABP competente para interactuar con eIF4G.

*Arabidopsis thaliana* posee 8 genes de PABP que están agrupados en cuatro clases. Los miembros de la clase I (PABP3 y PABP5) tienen expresión limitada al tejido reproductivo; los miembros de la clase II (PABP2, PABP4 y PABP8) son alta y ampliamente expresados; los miembros de la clase III

(PABP6 y PABP7) tienen un patrón restringido y una débil expresión y el único miembro de la clase IV (PABP1) tiene expresión baja, tejido específica [39]. Las proteínas PABP de trigo, humano y levadura poseen cuatro motivos de reconocimiento de RNA conservados (RRM1-4) y un dominio C- terminal. PABP es expresado en todos lo eucariontes y promueve la traducción a través de interacciones físicas y funcionales con los factores de inicio eucarióticos eIF4G, eIFiso4G y eIF4B [18].

## Estudio de la función de miembros de la familia eIF4E en plantas

Los estudios *in vivo* sobre las proteínas eIF4E en plantas son pocos. Aportes importantes se han hecho mediante la identificación de mutantes resistentes a infecciones por virus que han sido mapeadas al locus eIF4E o eIF(iso)4E. Duprat y Col. [42] mostraron el efecto de la carencia de eIF(iso)4E en *Arabidopsis thaliana*. Las plantas mutantes por inserción de T-DNA en eIF(iso)4E no mostraron fenotipo evidente bajo condiciones normales de desarrollo. En estas plantas los niveles de proteína de eIF4E están incrementados y se observó resistencia a algunos virus.

Los estudios sobre eIF(iso)4E han demostrado que interactúa con la proteína viral VPg unida al extremo 5' del RNA viral de algunos potyvirus. Al parecer eIF(iso)4E tiene un papel en la traducción o replicación del genoma viral. La línea mutante *ateIF(iso)4E-1* es resistente a la infección de algunos potyvirus, aunque es susceptible a otros [42]. Se han identificado mutantes naturales en el locus de eIF4E en lechuga, jitomate y chile que presentan resistencia a ciertos virus. Estas mutantes naturales presentan cambios puntuales de aminoácidos que no interfieren con la unión a Cap pero al parecer afectan la interacción con el mRNA viral. Dado que el fenotipo de mutante en eIF(iso)4E o los cambio puntuales en eIF4E es indistinguible de las plantas silvestres (a excepción de la resistencia viral) se ha llegado a considerar que estas isoformas podrían ser redundantes funcionalmente.

También se ha caracterizado una mutante por inserción en el gen de nCBP donde la proteína se encuentra ausente. Esta mutante se ha relacionado con retraso en la floración. En la tabla 2 se resumen los fenotipos observados en las mutantes nulas para eIF(iso)4E y nCBP en *Arabidopsis thaliana*.

Tabla 2: Fenotipos presentes en plantas mutantes de los factores eIF4E y nCBP.

| Tejido        | Silvestre   | Mutante <i>eif(iso)4e</i><br>* | Mutante <i>ncbp</i><br>** |
|---------------|-------------|--------------------------------|---------------------------|
| Silicuas      | Normal      | Normal                         | Normal                    |
| Hojas         | Normal      | Normal                         | Normal                    |
| Flor          | Normal      | Normal                         | Normal                    |
| Virus         | Susceptible | Resistente                     | -----                     |
| Floración     | Normal      | Normal                         | Retraso                   |
| Raíz          | Normal      | Aumento de tamaño              | Normal                    |
| Hoja caulinar | Normal      | Normal                         | Normal                    |
| Roseta        | Normal      | Normal                         | Normal                    |

\*Duprat y colaboradores 2002

\*\*Hidalgo A. Tesis licenciatura 2007.

Recientemente en nuestro laboratorio se ha trabajado con una planta mutante la cual presenta una inserción de T-DNA para eIF4E. Sin embargo, los resultados hasta ahora obtenidos han demostrado que, al menos, por esta estrategia bioquímica no existe un silenciamiento de eIF4E total, ya que la inserción solo se manifiesta en forma heteróciga (Figura 6).

Adicionalmente, en *Arabidopsis thaliana* se han reportado tres secuencias homólogas que codifican para eIF4E-1 localizadas en distintos cromosomas, estas están disponibles en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> y corresponden a At4g18040 (eIF4E-1 número de accesoión BX827076), At1g29550 (eIF4E-2 número de accesoión 102695) y At1g29590 (eIF4E-3 número de accesoión 102699). Estas secuencias muestran entre sí una identidad de 94% (At1g29550 con At1g29590), At4g18040 posee una identidad de 67% con At1g29590 y una identidad de 68% con At1g29550, así mismo eIF4E-1 posee una identidad con nCBP y eIF(iso)4E de 30% y 45% respectivamente. Los datos que se muestran en la tabla 3 indican una alta similitud entre At1g29550 y At1g29590, así mismo se observa que estas dos son muy similares a eIF(iso)4E y eIF4E-1, mientras que nCBP muestra una mayor separación.

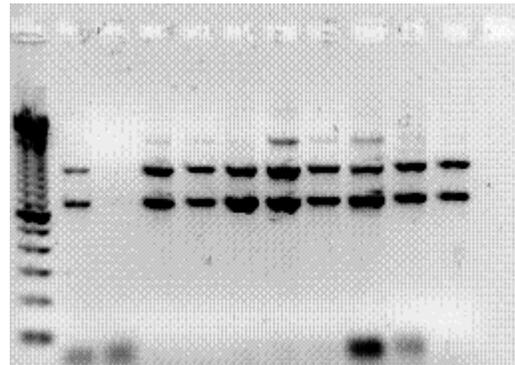


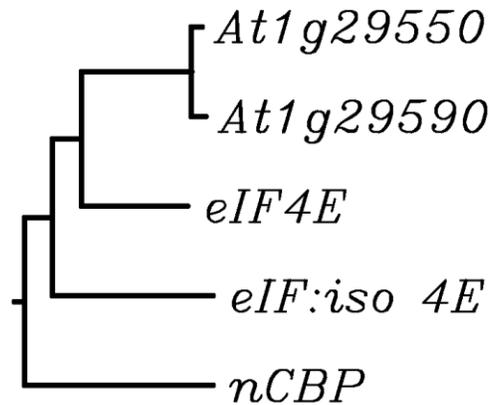
Figura 6; Genotipificación de la mutante por inserción de T-DNA en eIF4E. El esquema a la izquierda indica las bandas y tamaño en pb esperadas para plantas silvestres (WT), heterocigotas (HZ) y homocigotas (HM) para la inserción de T-DNA. A la derecha se muestra un gel de PCR para las plantas mutantes de eIF4. Las amplificaciones muestran que todos estos individuos son heterocigotas. Tomado de [43].

Tabla3: Similitud entre isoformas de eIF4E de *Arabidopsis thaliana* expresadas en porcentaje.

| Secuencia          | At4g18040<br>eIF4E | At1g29550 | At1g29590 | eIF(iso)4E |
|--------------------|--------------------|-----------|-----------|------------|
| At4g18040<br>eIF4E | -                  |           |           |            |
| At1g29550          | 68                 | -         |           |            |
| At1g29590          | 67                 | 94        | -         |            |
| eIF(iso)4E         | 50                 | 45        | 45        | -          |
| nCBP               | 32                 | 31        | 30        | 31         |

Las similitudes anteriores sugieren que eIF4E, At1g29550 y At1g29590 podrían codificar para proteínas más similares entre sí que respecto a eIF(iso)4E y nCBP, por lo cual si se requiere silenciar su función, podría ser necesario apagar a los tres genes al mismo tiempo. Alineamientos entre las secuencias eIF4E, At1g29550 y At1g29590 traducidas *in silico* en el sitio <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> indicaron que At1g29590 posee un extremo amino terminal de 45 aminoácidos extra con respecto a eIF4E. Los alineamientos realizados, eliminando la región amino terminal de At1g29590, con eIF4E, eIF(iso)4E y nCBP fueron utilizados para

obtener un dendrograma (Figura 7), el cual sugiere que At1g29590 y At1g29550 es una duplicación reciente originada a partir de eIF4E.



**Figura 7. Dendrograma de similitud a nivel de aminoácidos; este muestra que las secuencias At1g29550 y At1g29590 tienen una mayor identidad a eIF4E que a eIF(iso)4E y nCBP.**

## Importancia de eIF4E

La regulación de la traducción de mRNAs es un importante paso en la expresión genética. Durante el desarrollo de los embriones, la traducción de los mensajeros es estrictamente regulada para producir proteínas en el lugar correcto. eIF4E es el mayor blanco de regulación de la traducción dependiente de Cap, posee un papel clave durante la embriogénesis, incluyendo la gametogénesis, fertilización y establecimiento de los ejes embrionarios [44].

Debido a su rol central en la traducción Cap dependiente la regulación de la actividad de eIF4E es crítica para el desarrollo normal de las células. La sobreexpresión de eIF4E en el ciclo celular sensible o en células protooncogénicas resulta en un sobre crecimiento y transformación maligna. La expresión de eIF4E es así mismo significativamente mayor en muchos tipos de cáncer [29, 45]. La inhibición de eIF4E por siRNAs resulta en el arresto del ciclo celular y la inhibición de formación de colonias de células de cáncer de pecho, inhibe la movilidad de células cancerosas, reprime el crecimiento celular y la migración, además, potencia la quimio-sensibilidad, sugiriendo un potencial blanco terapéutico en carcinoma de pecho [45]. Por otro lado IFE-3 en *Caenorhabditis elegans*, el ortólogo más relacionado a eIF4E-1 de mamífero, es esencial para la viabilidad. En contraste tres isoformas relacionadas (IFE-1, IFE-2 e IFE-5) unen Caps trimetilados y son parcialmente redundantes, pero al menos una isoforma funcional es requerida para la viabilidad.

IFE-4, la cual une solo Caps monometilado, se encuentra más relacionado a nCBP y 4E-HP de mamíferos y no es esencial para la viabilidad [46].

eIF4E y eIFiso4E de *Arabidopsis thaliana* mostraron ser diferencialmente expresados mediante ensayos de Northern blot, el mRNA de eIF4E es expresado en todos los tejidos excepto en las células de las zonas de especialización de la raíz; el mRNA de eIFiso4E es particularmente abundante en órganos florales y en tejidos jóvenes en desarrollo. En ensayos de complementación en una cepa mutante condicional de *Saccharomyces cerevisiae* se observó que, la cepa complementada con eIFiso4E crece pobremente comparada con la cepa complementada con eIF4E [23]. En tabaco se encontró una proteína eIF4E y dos isoformas de eIFiso4E, mediante represión anti sentido, plantas transgénicas de tabaco mostraron represión significativa ya sea de NteIF4E o ambas isoformas de NteIFiso4E, con desarrollo normal vegetativo y fertilidad en las plantas transgénicas, de la misma forma que en *Arabidopsis thaliana* (Duprat et al.), la represión de NteIFiso4E resulto en un incremento compensatorio en los niveles de NteIF4E, mientras que, la represión de NteIFiso4E no activo un incremento reciproco en los niveles de NteIFiso4E. La represión anti sentido de ambos NteIF4e y NteIFiso4E resulto en plantas con un fenotipo de semienanismo y una disminución en la carga de los polirribosomas, demostrando que tanto eIF4E como eIFiso4E soportan la traducción in planta, lo cual sugiere su potencial rol en la regulación del crecimiento de las plantas [47].

## ¿Qué hacer?

Dada la identidad entre las secuencias codificantes de eIF4E, eIF(iso)4E y nCBP una posibilidad atractiva para apagar selectivamente la expresión de eIF4E, At1g29550 y At1g29590, sin afectar a eIF(iso)4E y nCBP sería utilizar el mecanismo de RNA interferente. El RNA interferente (RNAi) ha emergido como una nueva forma de controlar la expresión génica a nivel transcripcional, postranscripcional y traduccional. Debido a su aparente cobertura, control y fácil manipulación el RNAi ha sido explotado como una herramienta para investigar la función de los genes a partir del silenciamiento.

## Silenciamiento por RNA interferente

El silenciamiento por RNA interferente (RNAi) regula la expresión genética en algunos organismos eucariontes mediante la actividad de distintas clases de RNAs pequeños endógenos (sRNAs) [48]. Los RNAs pequeños constituyen una familia de RNAs no codificantes de 19 a 28 nucleótidos de longitud, los cuales son derivados de RNAs de doble cadena (dsRNA) [49]. Estos pueden inducir el silenciamiento a través del apareamiento específico de bases con moléculas de mRNA blanco [49]. Debido a que estos fenómenos no fueron relacionados al momento del descubrimiento, fueron referidos con diferentes nombres tales como RNA de interferencia (RNAi), co – supresión, silenciamiento genético (pos-transcripcional o transcripcional, dependiendo del proceso afectado) o “Quelling” en hongos [49].

Dos clases principales de RNAs de doble cadena han sido descritas, las de los RNAs pequeños de interferencia (siRNAs) y los microRNAs (miRNAs). Los siRNAs son cadenas totalmente complementarias mientras que los miRNAs se originan de cadenas dúplex que poseen desapareamientos a lo largo de la cadena en forma de estructuras de tallo- asa. Ambas clases de RNAs de doble cadena se unen a un complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC; RNA induced silencing complex), el cual contiene proteínas clave para el procesamiento y funcionamiento de RNAs de doble cadena en el RNAi [48-50]. El RNAi fue descubierto originalmente en *Caenorhabditis elegans* como respuesta a dsRNA que llevan al corte de secuencias específicas de RNA mensajeros [49]. Pronto resultó que el RNAi no es limitado a nematodos y puede ser inducido en *Drosophila melanogaster* [51], *Trypanosoma* [52] y vertebrados [53]. El fenómeno del RNAi también fue observado en plantas hace algunas décadas, como mecanismo de defensa contra RNAs exógenos [50].

Los dos miembros fundadores de la familia de los microRNAs, *lin-4* y *let-7*, fueron originalmente caracterizados en *Caenorhabditis elegans*, como genes requeridos para la regulación de los eventos de desarrollo [54]. Estos miRNAs controlan el tiempo de desarrollo y las características de células adultas hipodérmicas uniéndose a sitios parcialmente complementarios en los mRNAs a los que regulan reprimiendo su traducción a proteína [55]. A partir de 1999, cientos de microRNAs fueron identificados en los genomas metazoarios, incluyendo gusanos, moscas, plantas y mamíferos. Los microRNAs tienen diversos patrones de expresión y pueden regular varios procesos de desarrollo y fisiológicos [54]. La presencia de miRNAs en *Chlamydomonas reinhardtii*

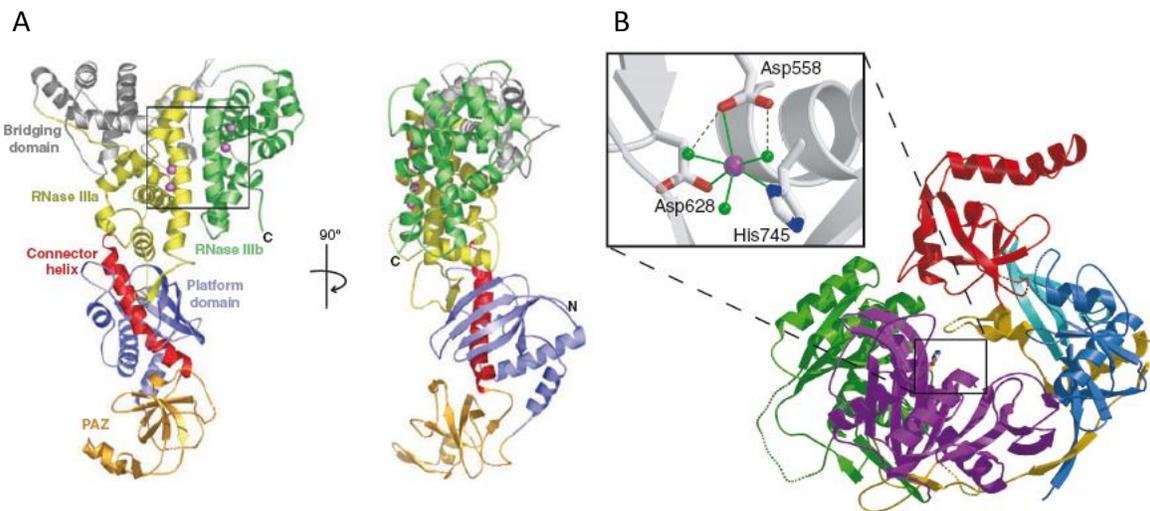
sugiere que la regulación basada en miRNAs es un mecanismo ancestral y evolutivamente conservado [56].

Si bien los siRNAs y los miRNAs fueron inicialmente descubiertos en estudios no relacionados, ambos tipos de RNAs pequeños se encuentran estrechamente relacionados en su biogénesis, unión a los complejos RNA-proteína y capacidad para regular negativamente la expresión de genes en diversos eucariontes [49]. Ambos tipos de RNAs pequeños son generados por Dicer (DCR) una enzima multidominio miembro de la familia de RNAsas tipo III [48, 49]. DCR corta RNAs de doble cadena (dsRNA) cada 22 nucleótidos (nt) aproximadamente, generando los siRNAs o miRNAs [49]. Una de las cadenas del dúplex de 22 nt (la cadena guía) es entonces reclutada por una enzima Argonauta (AGO) para formar un complejo de silenciamiento dependiente de RNA (RISC) dirigido por miRNAs o siRNAs. Este complejo marca y silencia post-transcripcionalmente mRNAs blanco que contienen secuencias parcial o totalmente complementarias al sRNA [48].

La formación de RISC no es un proceso aislado, el RISC menor o mínimo algunas veces llamado “core” RISC puede ser constituido por solo dos componentes, miRNA y una proteína AGO. En contraste, el RISC mayor nombrado “holo” RISC se encuentra frecuentemente compuesto por la mayoría de las proteínas de las vías de RNAi o miRNA incluyendo a Dicer, proteínas de unión a RNAs de doble cadena, RNA helicasas, AGO, proteínas de otras vías tales como proteínas ribosomales y proteínas identificadas de vías específicas de enfermedades en el caso de animales. Se ha sugerido que “holo” y “core” RISC pueden tener diferentes funciones en la regulación traduccional dirigida por miRNAs y las interacciones entre miRNAs y otras vías [57].

Estudios anteriores han generalizado dos formas básicas de acción de los miRNAs hacia sus blancos: corte de los blancos y represión traduccional [57]. Existen factores que determinan si un mRNA blanco será cortado o reprimido en la traducción. El corte de un mRNA blanco de un miRNA es realizado por una proteína AGO. Esta posee una actividad de “slicer” conferida por un dominio PIWI. Las proteínas AGO pertenecen a una familia evolutivamente conservada, están compuestas de cuatro dominios: el N-terminal, PAZ, el dominio medio MID y PIWI [58, 59]. El dominio PAZ tiene un papel en la unión a ácidos nucleicos independiente de la secuencia, ya que reconoce el extremo 3' terminal de la cadena sencilla de siRNA, el dominio MID une el 5' fosfato y el dominio PIWI posee un plegamiento tipo RNAasa H en el cual dos residuos Aspartato conservados que son críticos para el sitio activo, al igual que otras RNAsas H. El dominio MID tiene una estructura homóloga al dominio de unión del azúcar del represor Lac [60]. Los dominios N-terminal, medio MID y PIWI forman una base en forma de media luna, con el dominio PIWI en el centro de la

media luna, la región que sigue el dominio N-terminal forma un tallo que mantiene el dominio PAZ por encima de la media luna y un interdominio conector que soporta los cuatro dominios de la proteína (Figura 8). Esta arquitectura forma un surco en el centro de la media luna y el dominio PAZ cierra la parte superior de este surco. Esta organización crea surcos con cargas positivas que probablemente permiten unir ácidos nucleicos. El surco mayor se forma entre el dominio PAZ y la base de la media luna y el surco menor se encuentra entre los dominio N-terminal y PIWI. Modelado de siRNA y mRNA blanco han mostrado que el surco mayor puede acomodar el dúplex posicionando el enlace fosfodiéster escindible en el sitio activo [60].



**Figura 8; A)** estructura cristalina de DICER de *Giardia*, se muestran los dominios PAZ (PIWI, Argonauta, Zwiller) en color naranja, la hélice conectora (rojo), el dominio de RNasa IIIa en amarillo y el de RNasa IIIb en verde (tomado de [61]); **B)** Estructura cristalina de ArgonAUTA de *Pirococcus fuirusus*. El dominio N-Terminal se muestra en coloración azul, el dominio PAZ en rojo, el dominio MID en verde y el dominio PIWI en púrpura, el dominio PAZ se mantiene por encima de la base en forma de media luna creados por los dominios N-Terminal y Medio y PIWI. Se muestra un acercamiento al sitio activo (Asp-Asp-His) coordinando un ion  $Mn^{2+}$  también se muestra. Se utilizó  $Mn^{2+}$  debido a que es más fácil de distinguir cristalográficamente y puede sustituir funcionalmente a  $Mg^{2+}$ . Tomado de [60].

En plantas muchos microRNAs conocidos interactúan con complementariedad parcial o perfecta en la secuencia codificante o no-codificante del mRNA blanco [56, 62], mientras que en animales, la complementariedad establecida entre miRNA y mRNA blanco es imperfecta y dirige una represión traduccional. De forma diferente a otros RNAs pequeños de plantas, específicamente a los siRNAs, los miRNAs actúan generalmente *en trans* para reprimir genes no relacionados al locus que codifica al miRNA [62]. En plantas el complejo RISC puede tener tres actividades; (1) Corte endonucleolítico en el centro del híbrido miRNA-mRNA blanco, (2) represión traduccional del

mRNA blanco a través de un mecanismo desconocido y (3) metilación de citocinas de DNA y/o de las histonas en el caso de siRNA-DNA blanco [63, 64].

## Biogénesis de RNAs pequeños en animales

Los miRNAs en el genoma de los animales son ubicuos y frecuentemente se transcriben como unidades codificantes separadas, siendo algunos de ellos localizados en unidades policistrónicas que contienen múltiples miRNAs. Algunos también se encuentran en Intrones (mirtrones y sirtrones [65] y presumiblemente emergen del procesamiento de los Intrones escindidos de los genes que codifican para proteínas [66]. Los miRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II dependiente de DNA generando un microRNA primario (pri-miRNA) que contiene una estructura imperfecta de dsRNA conocida como tallo-asa, donde se encuentra el futuro miRNA [67, 68].

Los pri-miRNAs son similares a los transcritos que codifican para proteínas, ya que poseen una estructura 5' Cap y una cadena de poli(A) en el extremo 3' terminal e inclusive pueden tener Intrones dentro de su secuencia [66]. El procesamiento del pri-miRNA en animales parece comenzar con una proteína de unión a dsRNA Pasha/DiGeorge syndrome critical region gene 8 (DGCR8), uniendo el pri-miRNA y reclutando la enzima RNasa III Drosha, para formar un complejo multiprotéico llamado el microprocesador. La proteína acompañante de Drosha es "Pasha", una proteína de unión a RNA de doble cadena que puede estabilizarla en el Microprocessor [57]. Drosha, como parte catalítica del microprocessor, procesa el pri-miRNA a pre-miRNA en el núcleo. El precursor del miRNA (pre-miRNA) de ~60-70 nt [66] generado por Drosha es reconocido por la proteína de exporte nuclear Exportina 5 la cual reconoce los 2 nucleótidos no apareados del extremo 3', característicos de un corte por una RNasa III [69-71].

Una vez en el citoplasma, el pre-miRNA es reconocido por DCR y es cortado en un dúplex de ~22-23 nt formando el miRNA:miRNA\* [72-75]. Algunos miRNAs no convencionales que son definidos por usar mecanismos de maduración que no han sido anotados, tales como los *Mirtrons* que se han encontrado en moscas y mamíferos, evitan el corte por Drosha y en su lugar ocupan la maquinaria de splicing para generar el pre-miRNA. Los *Mirtrons* son Intrones muy pequeños que son escindidos y replegados en estructuras pequeñas de tallo-asa que mimetizan los pre-miRNAs y son procesados en miRNAs madurados por DCR [76].

Humanos y *C. elegans* codifican sólo para una proteína DCR, la cual puede procesar tanto siRNAs como miRNAs. Sin embargo, *Drosophila* tiene dos proteínas DCR; Dcr-2 es la enzima mayoritariamente productora de siRNAs, mientras que Dcr-1 participa en la biogénesis de miRNAs. Los alelos nulos Dcr-2 tienen un RNAi defectuoso en el ojo en la línea germinal femenina, pero apariencia silvestre y un nivel normal de procesamiento de miRNA. En contraste, Dcr-1 muestra sólo defectos suaves en RNAi pero presenta aberraciones morfológicas y defectos pleiotrópicos que son indicativos de una función alterada de miRNAs [77].

Una vez generado el dúplex miRNA:miRNA\* por una proteína DCR, este es llevado a RISC, cuyo componente principal son las proteínas Argonautas (AGO). Las proteínas AGO son capaces de discriminar entre miRNA y miRNA\* para quedarse solo con el miRNA maduro y llevar a degradación la cadena pasajera [78]. Asimismo, son encargadas de llevar el miRNA o siRNA a su mRNA blanco y acorde al apareamiento establecido (perfecto o imperfecto) dirigir el corte del mRNA (actividad “Slicer”) o su inhibición traduccional. En humanos, se han caracterizado cuatro AGOs, Ago1 a Ago4. De estas proteínas, solo Ago2 funciona como endonucleasa con actividad “Slicer” en los nucleótidos 10-11 del apareamiento mRNA-siRNA, mientras que las cuatro proteínas parecen participar en la represión traduccional mediada por miRNA [66]. En *Drosophila*, dAgo1 participa en miRNA y dAgo2 en RNAi [79].

## Vías de regulación mediadas por microRNAs en animales

Se sabe que algunas AGO han perdido la actividad de “Slicer” durante la evolución, así sólo los miRNAs unidos a AGOs que poseen esta actividad tendrán la capacidad de llevar a su blanco a la degradación por digestión endonucleolítica, mientras que los miRNAs asociados a AGOs que no poseen esta actividad tendrán la función de suprimir la traducción del blanco. Si los miRNAs son asociados a AGOs con actividad de “Slicer”, esta dependerá de las condiciones de complementariedad entre los miRNAs y su blanco. Solo una complementariedad perfecta o cercana a la perfección resultará en el corte del mRNA blanco, mientras que una complementariedad parcial, especialmente la circundante al sitio de corte (una posición entre los pares de nucleótidos 10 y 11 del miRNA), probablemente mediará la represión traduccional del mRNA blanco [57, 63, 80]. En animales, se ha determinado que para que un miRNA funcione para un mRNA blanco se debe observar el apareamiento fuerte en la región semilla “seed” de 7 nucleótidos entre la posición 2 y 8 del miRNA. Se estima que un micro RNA animal potencialmente

regula alrededor de 200 genes blanco a través de la represión traduccional en la región 3'UTR [57]. Si se tomaran las regiones 5' UTR y la región codificante, alrededor del 90% del transcriptoma humano sería regulado por miRNAs. Para hacer esto más complejo el mismo mRNA puede tener más de un sitio blanco para el mismo o diferentes miRNAs [57].

Se han propuesto algunos mecanismos de interacción de proteína - proteína y proteína - RNA para explicar la inhibición traduccional de mRNAs blancos llevada por miRNAs asociados a RISC, de los pasos río arriba a río abajo de la maquinaria de traducción de proteínas [57]. Estos son:

1. La represión de la traducción dirigida por RISC en el estadio del inicio de la traducción o post iniciación.
2. Re localización o secuestro de mRNAs blancos dirigida por miRNAs unidos a RISC hacia los cuerpos P o los gránulos de estrés (SG).
3. El decaimiento de mRNAs llevado por RISC a través de una rápida deadenilación y:
4. Degradación rápida o inmediata de las proteínas llevada por RISC posterior a la traducción, así mismo llamada degradación co-traduccional de proteínas.

Algunos estudios han demostrado que la represión de la traducción ocurre de manera posterior al inicio de la traducción. Se observó en estos casos que tanto el mRNA blanco, como el miRNA se localizan en polisomas, sugiriendo que la represión traduccional puede deberse a la caída de los polisomas durante la elongación de la traducción. Estudios más recientes han sugerido que la represión traduccional ocurre en el inicio de la traducción e involucra la interacción del Cap del mRNA con RISC [81-83]. Kiriakidou et. al. (2007), identificaron un dominio similar al de unión a Cap de eIF4E en el dominio MID de AGO2 y demostraron que este dominio une a Cap y puede ser requerido para la represión traduccional por miRNAs asociados a RISC [84]. Este mecanismo fue posteriormente validado con evidencia directa de que concentraciones crecientes del factor de inicio eukariótico 4F (eIF4F) conteniendo eIF4E inhibe la represión traduccional dirigida por let7 miRISC *in vitro* [85]. Thermann y Hentze mostraron evidencias que en *Drosophila* el miR2 asociado a RISC inhibe el inicio de la traducción dependiente de Cap, y se localiza en complejos ribonucleoprotéicos (RNPs) pesados llamados pseudopolisomas [86]. Se desconoce si el mecanismo de formación de pseudopolisomas generado por miR2 es un fenómeno general [57].

Otros resultados experimentales mostraron que eIF6 fue reclutado por RISC el cual contenía proteínas de tipo TRBP, DICER y AGO, llevando a la represión traduccional tanto en humanos como en células de gusanos en los pasos de inicio de la traducción [87]. La carga de la subunidad 60S con

eIF6 causa una represión de la traducción dosis-dependiente y la deficiencia de la formación de la subunidad 80S. Curiosamente la supresión de eIF6 abroga la represión traduccional mediada por miRNAs del mRNA blanco [88].

El compartimiento celular es otro factor que contribuye a la represión traduccional de proteínas dirigida por miRNAs. Las proteínas AGO y la represión de mRNAs son frecuentemente enriquecidas en un compartimiento citosólico especial llamado los cuerpos de procesamiento (P-bodies, también conocidos como GW-bodies). Los cuerpos P están enriquecidos en proteínas/enzimas involucradas en la degradación de mRNAs y la represión traduccional, ahí se encuentran enzimas deadenilasas, enzimas de decapping, (DCP1 y DCP2) y exonucleasas 5'-3' (Xrn1) [89]. Por otro lado los cuerpos P están físicamente separados de los ribosomas y carecen de proteínas de la maquinaria de traducción. En estas estructuras los mRNAs pueden seguir una vía de decapping y ser degradados o ser almacenados temporalmente, lo que conduce lleva a algunos autores a proponer que los miRNAs asociados a RISC tienen funciones duales; mediar la degradación de y almacenamiento de los mRNAs en los cuerpos P [57], bajo ciertas condiciones (como estrés) los mRNAs blancos de miRNAs pueden ser liberados de los cuerpos P y reclutados por los ribosomas y de esta forma reiniciar la traducción [57].

Aunque los miRNAs han sido generalmente identificados como reguladores negativos de la expresión de mRNAs, se está acumulando evidencia que bajo algunas circunstancias el miRNA potencia la traducción de su mRNA blanco. En algunos casos (condiciones de estrés) los miRNAs asociados a RISC simplemente ayudan a que el mRNA blanco sea liberado de los cuerpos P y sea reclutado a los ribosomas reiniciando la traducción a proteínas [88]. La desrepresión de la traducción de los mensajeros blanco por miRNAs requiere co-factores proteínicos que son inducidos por estrés y son capaces de liberar de la represión traduccional por interacciones con el 3' UTR de los mRNAs o por auxiliar el mRNA a re-asociarse con los polisomas. Los cofactores proteínicos actualmente encontrados incluyen proteínas de unión a elementos ricos en AU y APOBEC3G o A3G [90].

## Biogénesis de RNAs pequeños en plantas

Existen microRNAs conservados entre diferentes especies y microRNAs especie-específicos. Además, en plantas, se pueden distinguir tres clases de siRNAs: *trans-acting siRNAs (ta-siRNA)*, *natural antisense transcript-derived siRNAs (nat-siRNAs)* y *heterochromatic-siRNAs (hc-siRNAs)*.

Cada una de estas moléculas de RNA pequeño es producida por un miembro específico de la familia de Dicer y es preferencialmente cargada en un complejo RISC-AGO distinto.

## microRNAs

En plantas los miRNAs también son transcritos por la RNA Pol II, para dar lugar a un pri-miRNA con 5' Cap y cadena de poli(A) en el extremo 3', con estructuras locales de tallo-asa que son potencialmente estabilizadas por la proteína de unión a RNA DAWDLE (DDL) [91]. Los pri-miRNAs de plantas tienen una gran diversidad de tamaño y estructura comparado con sus contrapartes en animales [92]. La familia DICER en *Arabidopsis thaliana* tiene un nivel de complejidad que no ha sido visto en otros organismos muy estudiados, posee cuatro homólogos (DCL1, DCL2, DCL3 y DCL4) de los cuales, DCL1 y DCL4 se localizan en el núcleo [54]. DCL1 y DCL3 generan sRNAs de 21 y 24 nucleótidos respectivamente, cromatografías de exclusión indican que DCL1 y DCL3 residen en complejos de >660kDa y ~440 kDa respectivamente [93].

Dado que las plantas no poseen un ortólogo de Drosha, los pri-miRNAs son convertidos en pre-miRNAs y posteriormente en dúplex maduros miRNA:miRNA\* por la enzima de la familia de RNasa III DICER-LIKE1 (DCL1) en el núcleo [92, 94-97] (Figura 9a). La proteína DCL1 es acompañada por una proteína de unión a RNA de doble cadena llamada HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1) [62, 66, 97-99]. HYL1 junto con la proteína de dedo de zinc SERRATE (SE) promueven el apropiado procesamiento de los miRNAs [62, 99-102]. En este proceso también está involucrada la proteína de unión a Cap nuclear 80 (CBP80) [62]. DCL1, HYL-1, SERRATE (SE) co-localizan en cuerpos nucleares discretos nombrados dicing bodies (D-bodies), similares al microprocesador animal en la biogénesis de miRNAs, pero difieren de los previamente reportados Cuerpos de Cajal en los cuales está implicada la biogénesis de siRNAs asociados con Argonauta-4 (AGO4) [103, 104].

En plantas, la biogénesis de miRNAs y siRNAs requiere un paso adicional. Después de la liberación de miRNA:miRNA\* del precursor, Hua Enhancer 1 (HEN1) una metiltransferasa, metila el dúplex en el 2'OH de la ribosa 3' terminal [105, 106]. HEN1 metila dúplex de miRNAs y siRNAs, ya que prefiere dúplex de 21 a 24 nucleótidos con 2 nucleótidos en los extremos 3' no apareados (característica de un corte por Dicer) [106-108]. La metilación protege a los miRNAs y siRNAs de posteriores modificaciones tales como la 3' Uridilación la cual marca a miRNAs o siRNAs de cadena sencilla para su destrucción por exonucleasas de la familia SDN (SMALL RNA DEGRADING

NUCLEASE) [109]. Homólogos de HEN1 están presentes en varios invertebrados y animales vertebrados y son responsables de la metilación de los piRNAs [110-112]. Otras funciones de la metilación por HEN1 es promover o evitar la capacidad de las RNA polimerasas dependientes de RNA (RDRs) de usar los RNAs pequeños como cebadores [59], afectar el movimiento célula a célula o a distancia de los RNAs pequeños o su capacidad para regular sus blancos a través de proteínas asociadas [68].

Después de la metilación por HEN1 el dúplex miRNA:miRNA\* es transportado por el homólogo de la Exportina 5 en animales, HASTY (HST) [62], o a través de un mecanismo HST independiente al citoplasma [113] donde son clasificados para la unión adecuada al complejo RISC correspondiente, acorde a la proteína AGO encargada de llevar a cabo la función del sRNA. En *Arabidopsis thaliana* hay 10 diferentes proteínas AGO, una de las principales encontrada en complejos RISC activados por miRNAs es AGO1. Las enzimas AGO de plantas son agrupadas en tres clados acorde a información de Arabidopsis: el clado uno lo forman AGO1, AGO5, y AGO10; el clado 2, AGO2, AGO3 y AGO7; y el clado 3 incluye a AGO4, AGO6, AGO8 y AGO9 [114]. Mutaciones en homólogos AGO han sido asociadas con distintos fenotipos de desarrollo o fenotipos de RNAi [54].

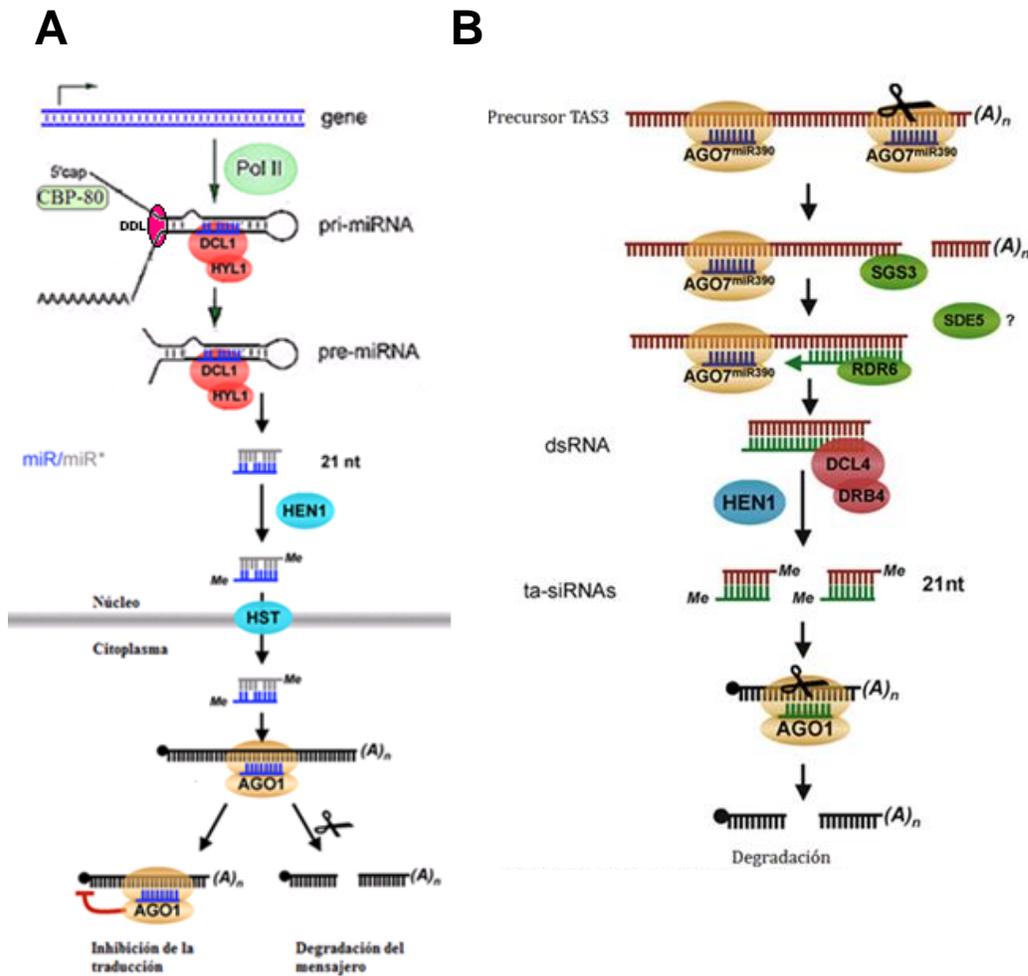


Figura 9; Mecanismo del RNAi en plantas. (A) Biogénesis de miRNAs; los miRNAs son codificados por genes transcritos por la RNA pol II, la cual genera el transcrito primario pri-miRNA. En el núcleo, la proteína Dicer-like 1 (DCL1) con ayuda de Hyponastic Leaves 1 (HYL1) y Dawdle (DDL) se encarga del procesamiento del pri-miRNA a pre-miRNA y posteriormente DCL1/HYL1 genera un dúplex de miRNA:miRNA\* de 21 nucleótidos. La metilasa HUA enhancer 1 (HEN1) se encuentra en el núcleo y metila los extremos 3' del dúplex y la exportina HASTY (HST) lo exporta al citoplasma. (B) Biogénesis de ta-siRNAs; el proceso comienza con el corte del transcrito derivado del gen TAS3 o TAS1 mediado por miR390-AGO7 o miR173-AGO1, respectivamente [66]. Una particularidad de TAS3 reside en que posee dos sitios de unión a miR390 y es procesado por AGO7 en vez de AGO1. miR390 es específico de AGO7 y es excluido de AGO1 por un mecanismo desconocido. *Modificado de:* [62].

### ta-si RNAs y nat-siRNAs

Los ta-siRNAs actúan en trans regulando genes blanco diferentes a los de sus orígenes. En Arabidopsis cuatro familias de genes TAS (TAS1-TAS4) poseen transcritos no codificantes que son blancos de miRNAs. Las isoformas de TAS1; TAS1a, TAS1b y TAS1c, y TAS2 son blancos de miR173;

TAS3 es blanco de miR390 y TAS4 es blanco de miR834 [115-118]. Los transcritos son cortados en posiciones específicas por el miRISC correspondiente, los fragmentos son probablemente estabilizados por la proteína Supresor de Silenciamiento Genético SGS3 y convertidos en dsRNAs por RDR6 [117, 118] enseguida DCL4 procesa los dsRNAs en ta-siRNAs de 21 nucleótidos comenzando en el final del dsRNA definido por el primer evento de corte [115, 119, 120].

La biogénesis de ta-siRNAs requiere la interacción de componentes canónicos del procesamiento de miRNAs y siRNAs [62, 116, 121], el mecanismo más descrito es el correspondiente a TAS3, el cual es necesario para el apropiado desarrollo de las plantas [62]. La diferencia central entre los ta-siRNAs y los miRNAs reside en su biogénesis, los miRNAs son producidos de precursores que forman una estructura de tallo-asa, mientras que los ta-siRNAs son producidos de precursores lineales que tienen sitios de unión a miRNAs [62].

La forma de acción de los ta-siRNAs es muy similar a la de miRNAs; se sabe que reprimen la traducción de mRNAs en trans con complementariedad perfecta, esta vía es conservada en maíz y arroz, sus mutantes exhiben defectos en la polaridad de la hoja y formación del meristemo apical en tallos respectivamente [62].

Los genomas de plantas poseen unidades de transcripción convergentes que pueden dar lugar a dsRNAs bajo ciertas condiciones de estrés biótico y abiótico dando lugar a nat-siRNAs [122-124]. La maduración de los nat-siRNAs requiere de DCL2 (produciendo siRNAs de 24 nucleótidos) o DCL1 (siRNAs de 21 nucleótidos) dependiendo del origen genómico de los transcritos traslapados, otros factores esenciales para la biogénesis son RDR6, SGS3, HYL1, HEN1, y RNAPIV [123, 124].

## hc-siRNAs

Otro tipo de siRNAs en plantas, los hc-siRNAs son de tamaño predominante de 24 nucleótidos y se piensa que su biogénesis está dada en cuerpos nucleares, y dependen de DCL3 y su proteína acompañante CLASSY1, la RdRP R2D2 y las RNA polimerasas dependientes de DNA específicas de plantas RNAPIV y RNAPV. Los dúplex de siRNA liberados por DCL3 son metilados por HEN1 y reclutados principalmente por RISC que contienen AGO4 [125-131]. Los siRNAs dependientes de RDR2 representan el mayor y más diverso conjunto de siRNAs en Arabidopsis. Son preferencialmente asociados con transposones, loci de retro-elementos y DNA repetitivo, y corresponden a regiones que contienen elevado grado de metilación de DNA. Se ha demostrado

que estos siRNAs provocan el silenciamiento genético a nivel transcripcional reclutando metilasas de DNA y de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9) [130, 132].

Los organismos eucariontes poseen tres RNA polimerasas dependientes de DNA con distintas funciones, nombradas RNA PolI, RNA PolII y RNA PolIII. La RNA PolI transcribe RNA ribosomal 45S, la RNA PolII transcribe las secuencias de DNA que codifican mRNAs y la PolIII transcribe el rRNA 5S y los RNAs de transferencia (tRNA). Las plantas superiores poseen dos polimerasas extra, RNA PolIV y RNA PolV, cuya función principal es el silenciamiento y su sub unidad catalítica a diferencia de PolII no es requerida para la viabilidad [133].

Se han caracterizado la subunidad catalítica mayor NRPD1 (PolIV) y NRPE1 (PolV), así como la segunda subunidad mayor NRPD2/NRPE2 que se comparte entre los complejos de PolIV y PolV, [133, 134]. Dos estudios recientes han mostrado que PolIV y PolV evolucionaron de la RNApolIII. El primer estudio lleva a la identificación de los componentes de la subunidades de las polimerasas IV y V y sugiere que estas polimerasas son polimerasas de tipo PolII que evolucionaron en un papel especializado en la producción de siRNAs y silenciamiento de transposones, repeticiones endógenas y transgenes [134]. En el segundo estudio, un tamizado genético directo identificó un nuevo componente referido como RDM2 (para RNA directed DNA Methylation 2), el cual muestra similitud en secuencia con la cuarta subunidad de la RNA PolII (RPB4), pero no es su ortólogo. RPB4 al parecer evolucionó para asumir diferentes funciones en los complejos RNA PolIV y PolV. RMD2 fue nombrado como NRPD4/NRPE4 para la PolIV y PolV respectivamente. NRPD4 es requerido para la acumulación en altos niveles de siRNAs, metilación de DNA y el silenciamiento transcripcional en secuencias de transposones y secuencias repetitivas. El segundo estudio confirmó que la PolIV y PolV se encuentra en un complejo multi-subunidad similar a PolII y evidenció que la funcionalidad de PolIV y PolV requiere de más subunidades unidas a su centro catalítico [134].

Los dsRNA precursores de hc-siRNAs pueden ser generados de repeticiones, secuencias invertidas o transcritos por la RNA PolII traslapados. La transcripción de la RNA mediante PolV a partir de DNA metilado puede producir ssRNA el cual es convertido en dsRNA por RDR2. El dsRNA enseguida es procesado por DCL3 en siRNAs de 24 nucleótidos los cuales son metilados por HEN1, y reclutados por AGO4 quien interactúa con el Dominio Carbonilo Terminal (CDT) WG/GW de la subunidad mayor de la PolV, NRPE1 [135]. Se plantea también la participación AGO6 en la metilación de DNA y de histonas en los loci blanco de los siRNAs [130, 136-138]. La biogénesis de hc-siRNAs también requiere a PolIV [127-129, 139, 140] quien genera transcritos precursores que

producen o amplifican la señal de siRNAs. PolIV probablemente actúa en la generación de los precursores de dsRNAs, e interactúa físicamente con AGO4 para facilitar la metilación de DNA dirigida por siRNAs [104, 135]. Vale la pena mencionar que la PolIV también está involucrada en la producción de los siRNAs naturales antisentido (nat-siRNA) usando el dsRNA formado por el traslape de los extremos 3' terminal de pares de genes [124].

## Vías de regulación mediadas por microRNAs en plantas

Los miRNAs están relacionados con distintos modos de acción, la comprensión de la función de cada miRNA depende de la relación entre el miRNA y su blanco, aunque pueden dividirse los mecanismos de acción en 3 diferentes tipos de regulación. Algunos son relacionados con la definición de los patrones de expresión espacial de sus blancos, otros evitan las variaciones excesivas en los patrones de expresión de sus blancos y finalmente se encuentra la regulación espacial de los genes blanco, este tipo de regulación incluye los gradientes opuestos de miRNA y blanco, induciendo transiciones de desarrollo [62]. Muchos de los miRNAs en plantas presentan complementariedad perfecta con sus secuencias en el mRNA blanco. Por ello, se promueve la degradación vía nucleolítica del mRNA, siempre que la proteína AGO en RISC posee la actividad de "Slicer". En plantas la inhibición de la traducción llevada por miRNAs ha sido documentada solo en pocas ocasiones y se cree que estos mecanismos son excepciones [48]. Lanet et. al., mostró que una fracción de miRNAs es asociada con polisomas en células en cultivo y plántulas de *Arabidopsis thaliana*. Una asociación que parece ser específica a miRNAs maduros debido a que la cadena pasajera de miR168 fue encontrada únicamente en fracciones no polisomales y no traducidas. Además mostraron que la asociación de miRNAs con polisomas depende de la traducibilidad de los RNAs blancos [48].

## Localización subcelular de RNAs pequeños en plantas

DCL1 y HYL1 co-localizan en cuerpos nucleares llamados Dicing-bodies o Cuerpos D (D-bodies) así mismo tienen localización en el nucleoplasma [100, 141]. En los cuerpos D podemos incluir a las proteínas SmD2 y SmD3 las cuales también las encontramos en los cuerpos de Cajal, sin embargo en los cuerpos D no encontramos nucleolina, un marcador de núcleo ni Atcolina un marcador de los cuerpos de Cajal y ellos aún están presentes en mutantes que carecen de Atcolina y por lo

tanto de cuerpos de Cajal, sugiriendo que los cuerpos D no coinciden con cuerpos de Cajal [100, 141, 142]. Algunas proteínas (ejemplo RDR2, DCL3, AGO4 y PolIVb) involucradas en la biogénesis de siRNAs colocalizan en los cuerpos de Cajal [103]. Se piensa que los precursores de siRNAs son transportados a estos complejos donde son procesados a siRNAs y los siRNAs son unidos a AGO4 y PolIV.

## Auto regulación de componentes de la maquinaria de silenciamiento en plantas

El gen de DCL1 es blanco de miR162 quien lleva a cabo el corte del mRNA de DCL1. Por otra parte, uno de los intrones de DCL1 hospeda al miR838. El procesamiento de pre-mRNA de DCL1 para liberar a miR838 probablemente genera dos transcritos truncados que se acumulan pero no dan lugar al mRNA de DCL1 [143, 144], por lo cual miR838 puede limitar también la expresión de DCL1. AGO1 es negativamente regulada por miR168 y miR403 marca a AGO2. Sin embargo, aunque la regulación de AGO1 es muy relevante para la vía de los miRNAs, el significado biológico de AGO2 en el metabolismo de los RNAs pequeños es aún desconocido.

## Uso de miRNA artificiales en *A. thaliana*

En *Arabidopsis thaliana*, los miRNA son conocidos por su importancia en la regulación de los procesos del desarrollo de la planta. Alteraciones de nucleótidos dentro de una secuencia de miRNA de 21 nt aparentemente no afecta su biogénesis, de este modo es posible modificar secuencias de miRNA de plantas para inhibir transcritos específicos.

Este método de generar miRNAs artificiales se ha utilizado para generar resistencia específica a virus, mediante el silenciamiento de la expresión de las proteínas virales [145]. El microRNA que se utilizó en estos estudios fue miR159 el cual se expresa en altos niveles en todos los órganos de *Arabidopsis thaliana*. El uso de oligonucleótidos mutados de la secuencia del miR159 permitió la expresión de microRNAs artificiales para la degradación de dos proteínas del virus del mosaico amarillo del tabaco (TYMV) y del virus del mosaico del nabo (TuMV). Para la formación del micro RNA artificial primero se seleccionó una secuencia relativamente similar a miR159a tratando de que las mutaciones requeridas fueran las mínimas posibles. Posteriormente la secuencia del

precursor de miR159 fue mutada por PCR mutagénico solo en las cadenas correspondientes a miR159a maduro y miR159a\*, manteniendo igual el resto del precursor. El precursor del miRNA artificial se insertó en un vector para posteriormente transformar plantas. Así, las secuencias blanco de del miRNA artificial fueron dos secuencias de proteínas de virus. Después de la obtención de plantas transformadas con el precursor de miRNA artificial, se observó resistencia a los virus, lo cual demuestra que esta técnica puede ser altamente específica y permite discernir entre secuencias con alto grado de identidad. Más ejemplos son mencionados en la discusión de resultados.

En este trabajo se decidió retomar el método de microRNA artificial con el propósito de apagar los genes correspondientes a eIF4E en *Arabidopsis thaliana* sin afectar a eIF(iso)4E y nCBP. Esto fue realizado con el objeto a largo plazo estudiar la función particular de eIF4E en la planta.

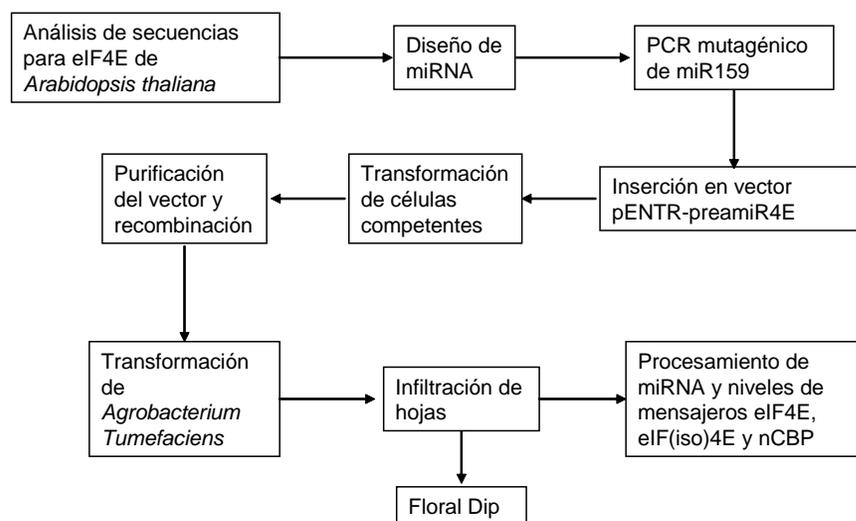
## Hipótesis

- Utilizando la tecnología de miRNAs artificiales en plantas se silenciará el factor de inicio de la traducción eIF4E sin afectar la expresión de los otros miembros de la misma familia: eIF(iso)4E ni nCBP

## Objetivos

- General
  - Obtener plantas de *Arabidopsis thaliana* silenciadas en el factor eIF4E
- Particulares
  - Diseñar un amiRNA (miRNA artificial) para el factor eIF4E de *Arabidopsis thaliana*.
  - Producir un vector que exprese el amiRNA: miR4E.
  - Transformar células de *Agrobacterium tumefaciens* y realizar la expresión transitoria del miR4E.
  - Verificar el procesamiento y apagado del eIF4E de *Arabidopsis thaliana*.

## Procedimiento experimental



## Materiales y métodos

### Material biológico

Plantas de *A. thaliana*: Se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia-0, se sembraron de 10 a 20 semillas en una maceta con sustrato Metro Mix 200 humedecida con agua, las macetas fueron cubiertas con papel aluminio e incubadas a 4 °C por 48 horas para sincronizar su germinación, posteriormente fue retirado el papel aluminio y las macetas fueron colocadas en cámara de incubación en un fotoperiodo de 8 horas de luz por 16 de oscuridad una temperatura constante de 22 °C, después de 15 días las plántulas fueron trasplantadas a macetas con sustrato Metro Mix 200. Las plantas fueron mantenidas bajo las mismas condiciones de fotoperiodo por 30 días y regadas con agua. Para cada ensayo realizado se utilizaron al menos dos plantas de *Arabidopsis* por construcción y una planta silvestre como control negativo.

Cepas de bacterias utilizadas: Se utilizaron células DH5 $\alpha$  para la amplificación del vector pENTR-pre-amiR159 así como para la transformación de la construcción pENTR-pre-a4EmiR. En el caso del vector binario pBA-DC, este fue transformado en células DB3.1, ya que el mismo expresa un gen de toxicidad para la cepa DH5 $\alpha$ . Después de la recombinación con pENTR-pre-a4EmiR este gen es escindido, por lo que el vector recombinante pBA-DC-amiR (4EmiR)4E y el control pBA-DC-amiR1 (amiR1) fueron transformados en células competentes *E. coli* DH5 $\alpha$  para la amplificación, y luego en células de *Agrobacterium tumefaciens* cepa Pvg2260/c58 para la transformación transitoria.

## Métodos

### Extracción de plásmido (miniprep)

1. Incubar un cultivo de las células transformadas en 5 mililitros (mL) de medio LB con el antibiótico apropiado a 37 °C a 150 revoluciones por minuto (rpm) toda la noche.
2. Centrifugar las células a 3000 rpm por 5 minutos.
3. Suspender la pastilla con 100 micro litros (µL) de solución 1 e incubar 5 minutos a TA
4. Agregar 250 µL de solución 2, mezclar por inversión (NO USAR VORTEX) y dejar 5 minutos en hielo.
5. Agregar 350 µL de solución 3 fría, mezclar por inversión y dejar 10 minutos en hielo.
6. Centrifugar 10 minutos a 4 °C. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
7. Agregar 1/10 de volumen de Tris-HCl 1M pH 8 (40 µL). Opcional agregar 5 µL de RNasa e incubar 30 minutos a 37 °C.
8. Agregar un volumen de Fenol:Cloroformo:Isoamilico (25:24:1).
9. Mezclar con Vortex 15 segundos.
10. Centrifugar 2 minutos.
11. Recuperar la fase superior.
12. Agregar 2 ½ volúmenes de etanol 100% frío.
13. Mezclar por inversión.
14. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
15. Centrifugar 10 minutos a 14000 rpm a 4 °C.
16. Decantar y lavar la pastilla con etanol al 80%.
17. Eliminar el etanol y secar por inversión.
18. Suspender en 40 µL de agua tratada con Di-etil pirocarbonato (DEPC).

| Solución 1 | Concentración final |
|------------|---------------------|
| Glucosa    | 50mM                |
| Tris-HCL   | 25mMpH8             |
| EDTA       | 10 mM pH8           |

| Solución 2    | Concentración final |
|---------------|---------------------|
| NaOH          | 0.2N                |
| SDS           | 1.00%               |
| Volumen final | 5 mL                |

| Solución 3                               | Concentración final |
|--|---------------------|
| Acetato de potasio/ácido acético glacial | 5M; pH=5.0          |

## Obtención de plásmido a gran escala

1. Crecer una colonia en 25 mL de medio LB con el antibiótico apropiado toda la noche a 37 °C con agitación de 150 rpm.
2. Centrifugar el cultivo a 5000 rpm por 10 minutos.
3. Eliminar sobrenadante, suspender en 5mL de NaCl 5M y repetir centrifugación.
4. Suspender en 0.6 mL de buffer de lisis (solución 1) e incubar 20 minutos en hielo.
5. Agregar 1.2 mL de una solución 2, mezclar e incubar 10 minutos en hielo.
6. Adicionar 0.75 mL solución 3. Mezclar e incubar 20 minutos en hielo.
7. Centrifugar 15 minutos a 7000 rpm.
8. Transferir sobrenadante a otro tubo y agregar 5 µL de RNasa e incubar 30 minutos a 37 °C.
9. Extraer con Fenol:Cloroformo (50:50), agitando con vortex 15 segundos.
10. Centrifugar 10 minutos a 7000 rpm y recuperar fase acuosa superior.
11. Repetir el paso anterior 2 o 3 veces.
12. Precipitar con 2 volúmenes de etanol por 5 minutos a temperatura ambiente.
13. Centrifugar 10 minutos a 8500 rpm y eliminar sobrenadante.
14. Lavar el pellet con etanol al 70%.
15. Suspender en 168 µL de agua estéril y transferir a tubo eppendorf, agregar 32 µL de NaCl 5M, mezclar y agregar 200 µL de Poli-Etilenglicol (PEG) 8000 al 13% P/V.
16. Mezclar bien y dejar los tubos a -20 °C toda la noche.
17. Centrifugar en frío 10 minutos.
18. Remover el sobrenadante, centrifugar de nuevo y extraer el PEG con pipeta.

19. Lavar la pastilla con etanol al 70%, centrifugar por 5 minutos y secar el etanol.

20. Suspender en 50  $\mu$ L de agua estéril o buffer TE, tomar 1  $\mu$ L y leer a 260 nm.

Las soluciones de trabajo 1, 2 y 3 son las mismas para la obtención de plásmido a pequeña escala (miniprep).

### Inserción de fragmentos de DNA en plásmidos mediante recombinación (tecnología Gateway)

1. En un tubo de 1.5 mL se colocaron 50 nanogramos (ng) del vector p-ENTR-pre-amiR4E y 150 ng del vector destino (pBA-DC), y se adicionaron 8  $\mu$ L de buffer TE pH 8.0.
2. Se agregaron 2  $\mu$ L de LR Clonasa<sup>TM</sup> II (Invitrogen).
3. Se incubó la reacción a 25 °C por 1 hora y se realizó la transformación en células DH5 $\alpha$ .
4. Las células transformadas con el plásmido fueron sembradas en cajas con medio LB conteniendo Espectinomicina como antibiótico.

Las células que crecieron fueron analizadas mediante PCR para verificar la transformación con la recombinación correcta.

### Obtención de células de *Agrobacterium tumefaciens* competentes para transformación por choque térmico

1. Crecer una colonia de *Agrobacterium tumefaciens* en medio YM a 28 °C toda la noche con agitación constante.
2. Inocular 2mL del cultivo anterior en 50 mL de medio YM fresco.
3. Incubar con agitación constante a 28 °C hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0.5.
4. Enfriar el cultivo en hielo por 10 minutos y centrifugar a 6000 rpm por 5 minutos a 4 °C.
5. Suspender el botón celular en 1mL de CaCl<sub>2</sub> 20 mM con glicerol al 10% y dividir en alícuotas de 100 $\mu$ L.
6. Las células pueden usarse inmediatamente para transformar o congelarse con nitrógeno líquido y guardarlas a -80 °C.

Medio YM

Manitol 0.054 M 10.0 g 182,172 g/mol

Extracto de levadura 0.4 g

NaCl 0.1 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2 g

Aforar a 1 L con H<sub>2</sub>O desionizada (Solución A).

Preparar por separado una solución de MgSO<sub>4</sub> 2 M (Solución B).

Esterilizar por autoclave (por separado la solución A de la solución B).

Antes de utilizar el medio para cultivo, agregar a la solución A la solución B en proporción de 1000:1.

Si se requiere de la adición de antibióticos, éstos deben añadirse una vez esterilizado y enfriado el medio.

## Medio YM Sólido

Preparar la solución A del medio YM.

Antes de aforar, agregar 15 g de agar por cada litro de medio YM.

Esterilizar por autoclave.

Agregar la solución B estéril a la solución A en proporción 1000:1.

Si se requiere la adición de antibióticos, estos deben añadirse una vez esterilizado y enfriado el medio.

## Transformación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* por choque térmico

1. Descongelar las células competentes en hielo.
2. Agregarles 1µg del plásmido con el que se desea transformar.
3. Congelar las células en nitrógeno líquido por 5 minutos.
4. Incubar a las células a 37 °C por 25 minutos.
5. Agregar 1 mL de medio YM sin marcadores de selección e incubar por 3 horas a 28 °C con agitación constante (225-250 rpm).
6. Centrifugar a 13 000 rpm por 30 segundos y suspender el botón celular con 100 µL de medio YM.

7. Sembrar las células en medio YM sólido con el o los marcadores de selección.
8. Incubar a 28 °C por 2 o 3 días para obtener las colonias transformantes.

### Infiltración en hojas de *Arabidopsis thaliana* con *Agrobacterium tumefaciens*

1. La cepa conteniendo el plásmido de interés es sembrada en medio LB conteniendo el antibiótico apropiado para la selección.
2. Una sola colonia es inoculada en 5 mL de medio LB con el antibiótico apropiado, y es crecida a 28 °C por 48 horas (agitación de 300 rpm).
3. Un mL de cultivo es transferido a 50 mL de medio LB con 10 mM de MES pH 5.6 y 20 µL de Acetociringona 100 mM son adicionados. Las bacterias son crecidas a 28 °C por 16 horas.
4. Cuando el crecimiento ha alcanzado una densidad óptica de 1 ( $OD_{600} = 1$ ) las bacterias son centrifugadas (4000 rpm 10 minutos) y el pellet es resuspendido en  $MgCl_2$  10 mM hasta alcanzar una densidad óptica de 2.
5. Se adiciona 75 µL de Acetociringona y las bacterias permanecen a temperatura ambiente por al menos 3 horas sin agitación.

La infiltración se realizó con una jeringa de 3 mL sin aguja en hojas extendidas (con plántulas jóvenes se observan mejores resultados). Se coloca la punta de la jeringa en el envés de la hoja y se bloquea la jeringa con un dedo de otro lado de la hoja para de este modo tener una presión contraria. Se presiona gentilmente el embolo de la jeringa para que la suspensión de *Agrobacterium* ingrese a los espacios intracelulares de la hoja. La expresión transitoria se analiza en las hojas infiltradas de 1 a 2 días después de la infiltración.

### Extracción de RNA total

La extracción del RNA total se realizó empleando el reactivo TRIzol (TRIzol® Reagent, invitrogen).

1. Se pesaron aproximadamente 100 mg de tejido, estos fueron congelados con nitrógeno líquido y se homogeneizaron macerándolos en mortero enfriado evitando que la muestra se descongelara.
2. Una vez que la muestra se encontraba homogénea se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mililitros y se adicionó 1mL de TRIzol, se agitó en vortex y posteriormente se centrifugó por 10 minutos a  $12\ 000 \times g$  en centrífuga Eppendorff 5415D a una

temperatura de 2-8 °C.

3. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio incubándolo por 5 minutos a temperatura de ambiente.
4. Transcurrido el tiempo se adicionaron 200 mL de cloroformo y se agitó por inversión durante 15 segundos.
5. Se incubó por 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó por 15 minutos a 12 000  $\times g$  a una temperatura de 2-8 °C.
6. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio se le adicionaron 500 mL de isopropanol, incubándose 10 minutos a temperatura ambiente.
7. El tubo se centrifugó por 10 min a 12 000  $\times g$  a una temperatura de 2-8 °C.
8. Se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 1 mL etanol al 100%.
9. Se mezcló por inversión y a continuación se centrifugó por 5 minutos a 7500  $\times g$  a una temperatura de 2-8°C, se eliminó el etanol y se dejó secar la pastilla.
10. Se suspendió en agua tratada con DEPC o Formamida al 50%.
11. Se tomó 1  $\mu\text{L}$  y para su cuantificación a 260 nm.

## Análisis de microRNAs por Northern Blot

1. Resolver 20-25  $\mu\text{g}$  de RNA total en un gel de Poliacrilamida al 12.5 % conteniendo 8 M de Urea y TBE 1 $\times$ , con espesor de 1mm a los cuales se les adiciono 50  $\mu\text{L}$  de Persulfato de Amonio (APS) al 20 % (p/v) y 5  $\mu\text{L}$  de TEMED (N, N, N', N' Tetramethylethylenediamine). Correr a 20 mA por 1 hora, las moléculas de RNAs pequeños de  $\sim 20$  nucleótidos migran entre los colorantes Xilen-Cianol y Azul de bromofenol. Tener mucho cuidado de no extender los tiempos de corrida ya que visto que las moléculas pequeñas tienden a pasar el fondo del tanque.
2. Usar una cámara de transferencia en semi-seco, transferir el RNA resuelto a membrana Hybond-N<sup>+</sup> (Amersham) por 35 minutos a 100 mA con TBE 0.5 $\times$ .
3. Fijar el RNA a la membrana irradiándola con luz UV por 1 minuto y 30 segundos.
4. Prehibridar al menos 20 minutos en ULTRAhyb-Oligo solution (Ambion usar 10 mL por una membrana de 10 x 10 cm) a 42 °C.
5. Adicionar el oligonucleótido marcado en el extremo 5' ( $\sim 10$  pmol) y continuar con la hibridación a 42 °C toda la noche (o al menos 10 horas).
6. Lavar dos veces con SSC 2 $\times$  conteniendo 0.1% de SDS por 15 minutos a 42 °C.

7. Exponer a placa de Rayos X o con pantalla intensificadora.

## Marcaje en el extremo 5' de oligonucleótidos

1. Colocar la siguiente reacción en hielo:
  - 3-4  $\mu\text{L}$  de  $\gamma\text{P}^{32}\text{-ATP}$  (13 o más pmol de ATP)
  - 1  $\mu\text{L}$  de oligonucleótido (10 pmol)
  - 1  $\mu\text{L}$  10X buffer, 1  $\mu\text{L}$  de T4 polinucleótido Cinasa (New England BioLabs) y  $\text{H}_2\text{O}$  para 10  $\mu\text{L}$
2. Incubar a 37 °C por 1 hora.
3. Purificar los oligonucleótidos marcados de los nucleótidos no incorporados usando una columna de Sephadex G25.

## Purificación en columnas mini Quick Spin (ROCHE)

1. Resuspender el gel de Sephadex en la columna con el buffer por cualquiera de los siguientes métodos:
  - Invertir vigorosamente la columna en algunas ocasiones. Sacudir la columna por inversión o:
  - Mezclar gentilmente con vortex de 3 –5 segundos a baja velocidad.
2. Para evitar la formación de vacío remover los extremos de las columnas en el siguiente orden:
  - Remover primero la tapa de la columna.
  - Enseguida quitar la punta de la columna.
3. Remover el exceso de buffer y empacar la columna de la siguiente manera:
  - Colocar la columna en un tubo estéril de 1.5 mL.
  - Colocar el tubo en una microcentrífuga.
  - Centrifugar a  $1000 \times g$  por 1 minuto de 15 a 25 °C.
  - Desechar el tubo colector con el buffer de elución.
4. Colocar la columna en un tubo nuevo estéril.
5. Aplicar la muestra en el centro de la columna.
6. Centrifugar el tubo a  $1000 \times g$  por 4 minutos de 15 a 25 °C.
7. Recuperar el eluato del tubo. Este contiene los ácidos nucleicos purificados.

## Solución de Acrilamida

Pesar 37.5 g de acrilamida, 2.5 g de Bis-acrilamida y 120 g de Urea, disolverlos en 50 ml de TBE 5x y llevar a un volumen final de 250 mL, con agua-DEPC.

## Southern blot

Después de la electroforesis:

1. Colocar el gel de agarosa en HCl 0.25 M hasta que los marcadores cambiaran su color y dejar por 10 minutos más.
2. Lavar el gel con agua destilada y colocarlo en buffer de desnaturalización de tal forma que cubra por completo el gel.
3. Dejarlo por 30 minutos a temperatura ambiente con agitación.
4. Lavar el gel en agua destilada y colocarlo en buffer de neutralización por 15 minutos con agitación.
5. El gel se colocó sobre un soporte que se encontraba dentro de un refractario de vidrio el cual también contenía solución NaOH 0.4M. Entre el gel y soporte fue colocado un puente de papel Wathman<sup>®</sup> humedecido con NaOH 0.4 M.
6. Sobre el gel se colocó una hoja de la membrana de nylon cargada positivamente (Hybond<sup>TM</sup>-N+ de Amersham LIFE SCIENCE) con dimensiones idénticas a las del gel y se aseguró que no quedaran burbujas entre la membrana y el gel.
7. Sobre la membrana se colocaron tres láminas de papel Wathman<sup>®</sup> cortadas con las mismas dimensiones del gel y humedecidas con NaOH 0.4M asegurándose que no quedaran burbujas.
8. Posteriormente, se colocó una torre de papel periódico con las mismas dimensiones y, sobre estas, se puso una placa de vidrio. Finalmente, sobre esta placa se colocó un peso de alrededor de 700 g. La transferencia se dejó durante 3 horas.
9. Al finalizar la transferencia se retiraron los componentes con cuidado, antes de retirar la membrana se realizó un corte en la esquina superior izquierda para marcar la orientación.

10. La fijación de DNA se realizó colocando la membrana entre dos hojas de papel filtro Whatman No 3 humedecidos en NaOH 0.4M por 30 minutos.

|                            |   |
|----------------------------|---|
| Buffer<br>desnaturalizante | 1.5M NaCl/0.5M<br>NaOH                            |
| Buffer<br>Neutralizante    | 1.5M NaCl/0.5M<br>Tris-HCl; pH<br>7.2/0.001M EDTA |

TBE 5×

En un matraz Erlenmeyer pesar 27 g de Tris grado biología molecular, 13.75 g de ácido bórico y adicionar 10 mL de EDTA 0.5M pH8. Llevar la solución a 500 mL con agua tratada con DEPC y esterilizar por autoclave.

TBE0.5×

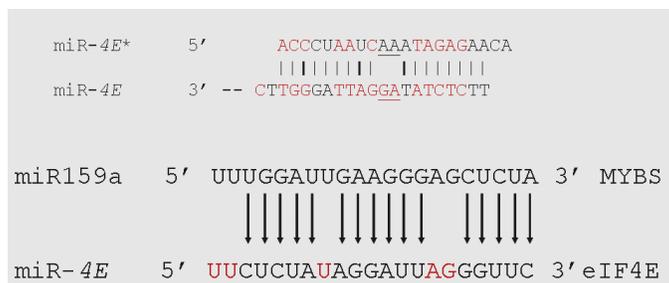
De la solución anterior se tomaron 10 mL y se llevaron a 100 mL con agua DEPC, esta no requiere de esterilización.

## Resultados

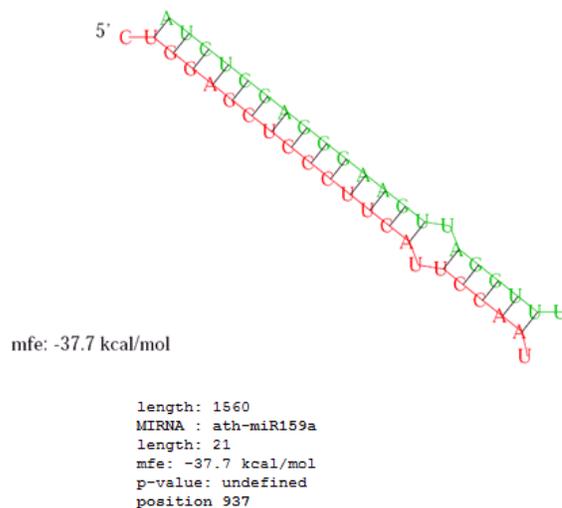
### Diseño de oligonucleótidos

En *Arabidopsis thaliana*, los miRNAs son conocidos por su importancia en la regulación de los procesos del desarrollo de la planta. Se ha planteado que alteraciones de nucleótidos dentro de una secuencia de miRNA de 21 nt no afecta su biogénesis, siempre que se conserve el grado de complementariedad dentro del precursor. De este modo es posible modificar secuencias de miRNA de plantas para dirigirlos hacia transcritos específicos como blanco. Se ha encontrado que plantas transgénicas que expresan micro RNAs artificiales (a-miRNAs), muestran represión de la expresión de proteínas blanco de estos [146-149].

En este trabajo se diseñó un a-miR para eIF4E de *Arabidopsis thaliana* usando como base las secuencias At4g18040, At1g29550 y At1g29590 que codifican para este factor. Para el diseño se tomó la secuencia de un microRNA endógeno de expresión ubicua en la planta (miR159a), y se buscaron regiones dentro de los genes seleccionados (cDNA) que fuesen parcialmente similares a miR159a y que no fuesen parte de las secuencias de otros miembros de la familia eIF4E (eIFiso4E o nCBP) o de otros genes en el genoma de *Arabidopsis thaliana*. A partir de la secuencia seleccionada (Figura 10) se realizaron mutaciones en la secuencia a miR159a de tal forma que el apareamiento entre este y el mRNA blanco (eIF4E) fuese similar al que presenta miR159a con sus blancos (Figura 11).



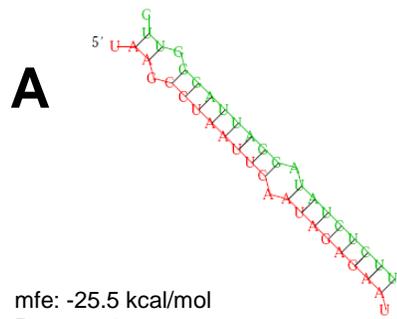
**Figura 10.** Dúplex formado por amiR4E y miR4E\*. Se muestran con flecha los cambios realizados en la secuencia de miR159a y los blancos de los miRNAs.



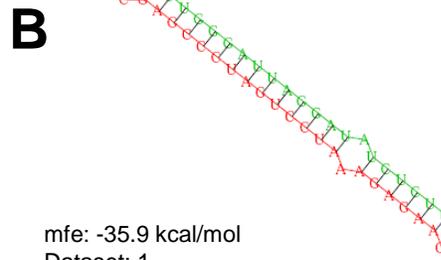
**Figura 11; Dúplex formado por miR159 con uno de sus blancos conocidos, MYB33, donde se observa un des apareamiento en el nucleótido 7 del dúplex (mfe.- energía libre mínima).**

Las predicciones realizadas (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/submission.html>) indicaron que el amiR4E diseñado posee como blanco las secuencias que codifican para eIF4E, At1g29550 y At1g29590, mientras que las secuencias de eIF(iso)4E así como de nCBP no muestran las características necesarias para ser tomados como blancos por este microRNA artificial (Figura 12). Asimismo, amiR4E muestra un desapareamiento en el nucleótido 7 con su blanco eIF4E, al igual que miR159, con su respectivo blanco.

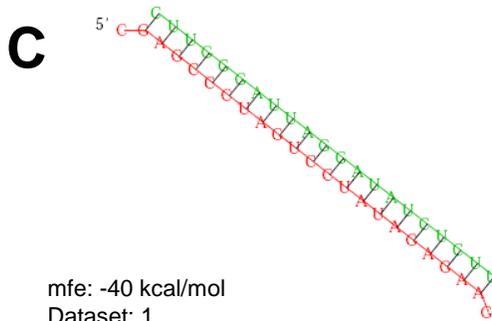
Una vez que se decidió la secuencia candidato para miR4E, se diseñaron los cebadores para la obtención del a-miRNA correspondiente (tabla 4). El cebador 5' amiR4E posee 25 nucleótidos correspondientes a la secuencia de pre-miR159, dentro de esta secuencia contiene un sitio de restricción que es reconocido por la enzima Bgl II, marcado en color rojo, seguido de la secuencia de 21 nucleótidos correspondientes a amiR4E maduro y finaliza con 16 nucleótidos del precursor de miR159, el 3' miR4E posee en su secuencia (dirección 5' - 3') 12 nucleótidos del pre miR-159<sup>a</sup> que contienen el sitio de restricción para XmaI, seguidos de los 21 nucleótidos de miR4E y finaliza con 14 nucleótidos del precursor de miR-159a.



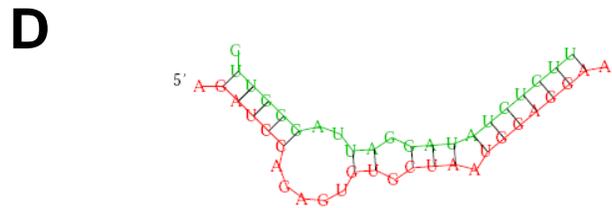
mfe: -25.5 kcal/mol  
 Dataset: 1  
 Target: AT4G18040X1\_2007  
 MIRNA: amiR4E  
 Position: 122



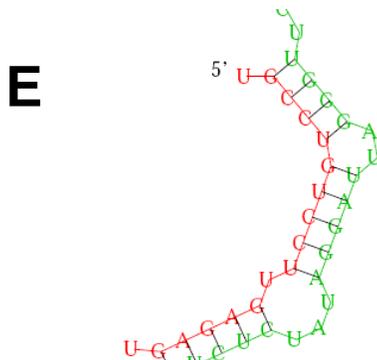
mfe: -35.9 kcal/mol  
 Dataset: 1  
 Target: AT1G29550X1\_2005  
 MIRNA: amiR4E  
 Position: 68



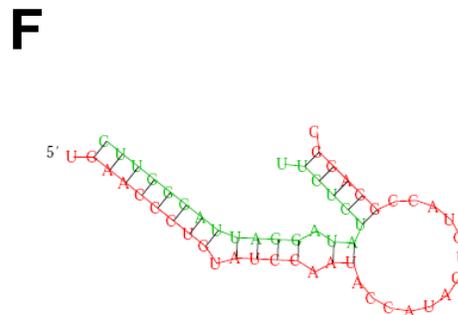
mfe: -40 kcal/mol  
 Dataset: 1  
 Target: AT1G29590X1\_2005  
 MIRNA: amiR4E  
 Position: 203



mfe: -19 kcal/mol  
 Dataset: 1  
 Target: AT5G35620X1\_2007  
 MIRNA: amiR4E  
 Position: 339



mfe: -21.1 kcal/mol  
 Dataset: 1  
 Target: AT5G35620X2\_2005  
 MIRNA: amiR4E  
 Position: 728



mfe: -23.1 kcal/mol  
 Dataset: 1  
 Target: AT5G18110X1\_2005  
 MIRNA: amiR4E  
 Position: 838

**Figura 12; Hibridaciones in sílico obtenidas para amiR4E con sus posibles blancos. En todos los casos la secuencia en color verde corresponde al micro RNA y la secuencia en rojo corresponde al mensajero blanco mostrado, el número corresponde a la posición del nucleótido en el RNA mensajero; mfe indica la energía libre mínima en el dúplex formado, At4G18040 (eIF4E-1), At1g 29550 y At1g29590 son las secuencias homologas a eIF4E, At5g35620 (eIF(iso)4E) y At5g18110 (nCBP) con miR4E.**

Tabla 4: Secuencias y características de los cebadores usados para amplificar el precursor pre-amiR4E.

| <i>Oligonucleótido</i> | <i>Secuencia</i>   | <i>Longitud (nt)</i> | <i>%GC</i> | <i>T<sub>m</sub> °C</i> |
|------------------------|--|----------------------|------------|-------------------------|
| 5'amiR4E               | 5' GAAGATCTT<br>CATCTGACGATGGAAG<br>GAACCTAATCCTATAGAGAA<br>CATGAGTTGAGCAGGG3' | 62                   | 48.4       | 70                      |
| 3'amiR4E               | 5' TGA <sup>CCCGG</sup> ATG<br>GAACCTCCTCCTATAGAGAA<br>GAAGAGTAAAAGCC 3'       | 47                   | 55.3       | 70                      |

Los nucleótidos marcados en color rojo indican el sitio de corte por Bgl II; los marcados en amarillo muestran el sitio de corte de XmaI. En letras cursivas se representan las secuencias de 5'amiR4E3'amiR4E. La amplificación del pre-amiR4E se realizó bajo una temperatura de alineamiento de 58°C.

Los productos de PCR obtenidos así como el plásmido pENTR-premiR159a fueron posteriormente digeridos con las enzimas de restricción y los fragmentos digeridos se purificaron por extracción de gel de agarosa (QIAquick Gel Extraction Kit; Qiagen) de acuerdo a las instrucciones de fabricante, una vez recuperados los fragmentos deseados estos se ligaron (pENTR y pre-amiR4E) para transformar células competentes DH5α y de este modo obtener material genético para realizar recombinaciones con el plásmido pBA-DC.

De la transformación de células DH5α con el plásmido pENTR-amiR4E se obtuvieron un total de 13 colonias y los plásmidos purificados de las colonias número 1 y 6 que mostraron amplificación del fragmento deseado, fueron secuenciados usando como cebador M13 (-20). Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante un alineamiento con la secuencia de pre-miR159a el cual se muestra en la Figura 13.

Con las secuencias obtenidas también se le realizó una predicción de estructura secundaria en el sitio WEB <http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/rna-form1.cgi> para analizar la estructura tallo-asa del precursor. Las estructuras predichas para pre-amiR4E y pre-miR159 se muestran en la Figura. 14 indicando gran similitud entre ambos precursores. Esto sugiere que la maquinaria de silenciamiento podría tomar el pre-amiR4E para un procesamiento adecuado y por ende para el apagado de eIF4E. Esta hipótesis se basa en la demostración previa de que la maquinaria de silenciamiento reconoce fundamentalmente a las estructuras secundarias de los precursores, más que las secuencias en sí [150, 151].

```

PremiR4E6      GGAACCCCTAATCAAATAGAGAACATGAGTTGAGCAGGGTAAAGAAAAGCTGCTAAGCTATG
PremiR4E1      GGAACCCCTAATCAAATAGAGAACATGAGTTGAGCAGGGTAAAGAAAAGCTGCTAAGCTATG
ath-MIR159a    GTAGAGCTCCTTAAAGTTCAAACATGAGTTGAGCAGGGTAAAGAAAAGCTGCTAAGCTATG
* *   ** * ***   *****

PremiR4E6      GATCCCATAGCCCTAATCCTTGTAAGTAAAAAAGGATTTGGTTATATGGATTGCATATC
PremiR4E1      GATCCCATAGCCCTAATCCTTGTAAGTAAAAAAGGATTTGGTTATATGGATTGCATATC
ath-MIR159a    GATCCCATAGCCCTAATCCTTGTAAGTAAAAAAGGATTTGGTTATATGGATTGCATATC
*****

PremiR4E6      TCAGGAGCTTAACTTGCCCTTTAATGGCTTTTACTCTTCTCTCTATAGGATTAGGGTTC
PremiR4E1      TCAGGAGCTTAACTTGCCCTTTAATGGCTTTTACTCTTCTCTCTATAGGATTAGGGTTC
ath-MIR159a    TCAGGAGCTTAACTTGCCCTTTAATGGCTTTTACTCTTCTT-TGGATTGAAG-GGAGCTC
***** * ** * * * **

PremiR4E6      CAT
PremiR4E1      CAT
ath-MIR159a    TAC
*

```

**Figura 13; Alineamiento de pre-amiR4E con pre-miR159a. Los asteriscos indican los nucleótidos que permanecen sin cambios en las secuencias de los precursores, los espacios vacíos indican cambios en la secuencia.**

Para la recombinación con el plásmido pBA-DC se seleccionó la construcción obtenida en la línea 6 de células transformadas de *E. coli* DH5 $\alpha$ . El plásmido pBA-DC posee sitios de recombinación homóloga con pENTR, un casete de selección *ccdB* que brinda toxicidad a las células de *E. coli* DH5 $\alpha$ , y un marcador de selección que ofrece resistencia a Espectinomicina. Durante la recombinación el casete *ccdB* es escindido y solamente el plásmido recombinante pBA-DC-pre-miR4E sería capaz de permitir el crecimiento de células DH5 $\alpha$  en presencia de espectinomicina pero no en kanamicina, mientras que células que contienen a pENTR-pre-miR4E solo serían capaces de crecer en presencia de kanamicina. La selección de las transformantes DH5 $\alpha$  candidatas en ambos antibióticos permite asegurar con mayor certeza que las células solo contengan el plásmido recombinante. Por otra parte pBA-DC contiene el promotor 35S bajo el cual quedaría pre-amiR4E y el sitio terminador de la transcripción de la nopalín sintetasa (Tnos) ambos requeridos para garantizar la expresión del precursor de microRNA artificial en plantas.



**Figura 14; Plegamientos de los precursores de micro RNAs, los cuales muestran una alta similitud con la estructura del precursor nativo de pre-miR159a.**

Se obtuvieron 110 colonias transformantes de las cuáles varias fueron seleccionadas al azar para realizar un PCR directo de la colonia con el objeto de determinar la presencia de la construcción pBA-DC-pre-amiR4E (Figura 15). Adicionalmente, las colonias fueron sembradas en medios LB,

sólido y líquido en presencia de Espectinomicina o Kanamicina para verificar la transformación correcta de las células (Tabla 5).

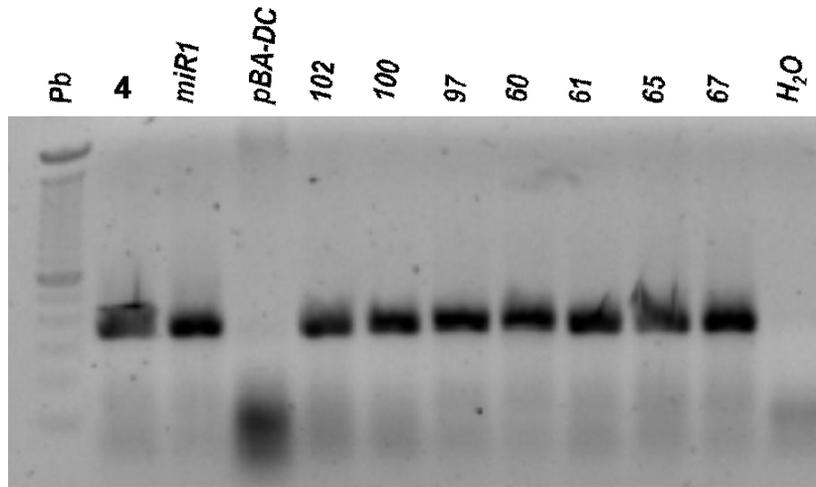


Figura 15; PCR de colonias candidatas transformadas con la reacción de recombinación entre pENTR-pre-4EmiR y pBA-DC. Los cebadores utilizados fueron 5'miR4E y 3' Tnos, usando como control negativo a pBA-DC vacío. En todas las colonias se observa la presencia del precursor del amiR4E con el terminador nos en la región 3'.

El análisis por PCR muestra que en todas las líneas seleccionadas existe la presencia de la construcción. Sin embargo, al crecer las colonias en presencia de espectinomicina o kanamicina, se observó que la mayor parte de las líneas seleccionadas es capaz de crecer en presencia de ambos antibióticos (Tabla 5). Esto indica que algunas líneas transformantes podrían contener el plásmido pENTR-pre-amiR4E sin recombinar. Solo dos líneas mostraron susceptibilidad a Kanamicina y resistencia a Espectinomicina (líneas 4 y 97) al mismo tiempo que fueron positivas para el PCR de pBA-DC-pre-amiR4E. Estas líneas fueron crecidas en medio LB con Espectinomicina para la formación de stocks de glicerol y su posterior uso para transformación de *Agrobacterium tumefaciens* y las posterior infiltración de hojas de *Arabidopsis thaliana*.

Tabla 5: Selección en antibióticos de líneas transformantes de DH5 $\alpha$ .

| Colonia | LB+KAN<br>(S) | LB +SPM<br>(l) | LB+KAN<br>(l) | LB+SPM<br>(S) | PCR<br>pre4E |
|---------|---------------|----------------|---------------|---------------|--------------|
| 4       | -             | +              | -             | +             | +            |
| 9       | -             | +              | +             | +             |              |
| 60      | -             | +              | +             | +             | +            |
| 61      | -             | +              | +             | +             | +            |
| 63      | -             | +              | +             | +             |              |
| 64      | -             | +              | +             | +             |              |
| 65      | -             | +              | +             | +             | +            |
| 67      | -             | +              | +             | +             | +            |
| 74      | -             | -              | -             | -             |              |
| 75      | -             | +              | +             | +             |              |
| 97      | -             | +              | -             | +             | +            |
| 100     | -             | +              | +             | +             | +            |
| 102     | -             | +              | +             | +             | +            |

La selección se realizó en medios sólido (S) y líquido (l), las líneas 4 y 97 muestran la susceptibilidad a Kanamicina y resistencia a Espectinomicina. A las líneas 9, 63, 64, 74 y 75 no se les realizó PCR, por lo cual no se muestra ese resultado.

El plásmido pBA-DC-pre-4EmiR fue transformado en *Agrobacterium tumefaciens* acorde al protocolo descrito en materiales y métodos. Previo a la infiltración de la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* transformada en hojas de *Arabidopsis thaliana* se realizaron infiltraciones en hojas *Nicotiana tabacum* variedad Xanti para determinar la expresión y procesamiento correcto de amiR4E. Se utilizaron plantas de 3 meses de edad y 48 horas post infiltración (HPI) se realizó la extracción y purificación de RNA total de hojas infiltradas así como de hojas sin infiltrar. A partir del RNA total obtenido (Figura 16) se realizó un ensayo de Northern blot utilizando como sonda 5' amiR4E. Asimismo, se realizó la detección del RNA pequeño nuclear (snRNA) U6 como control de carga y la de miR159 nativo como control de microRNAs. Los ensayos de Northern blot mostraron niveles similares en del snRNA U6 y también fue posible detectar el miR159 (Figura 17, panel A). Sin embargo al realizar la hibridación contra amiR4E (Figura 17, panel B) no fue posible detectar ninguna banda.

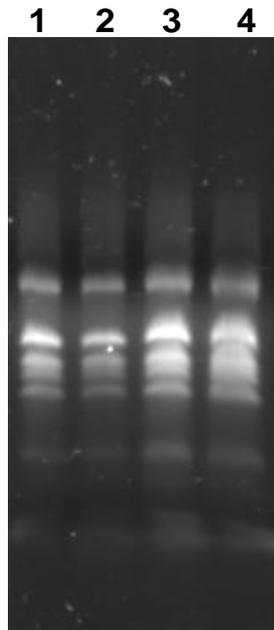


Figura 16; RNA total obtenido de hojas infiltradas de *Nicotiana tabacum*. Cuatro diferentes plantas fueron inoculadas con *Agrobacterium tumefaciens* transformado con pBA-DC-amiR4E obtenido de la cepa 4 (carriles 1 y 2) o 97 (carriles 3 y 4).

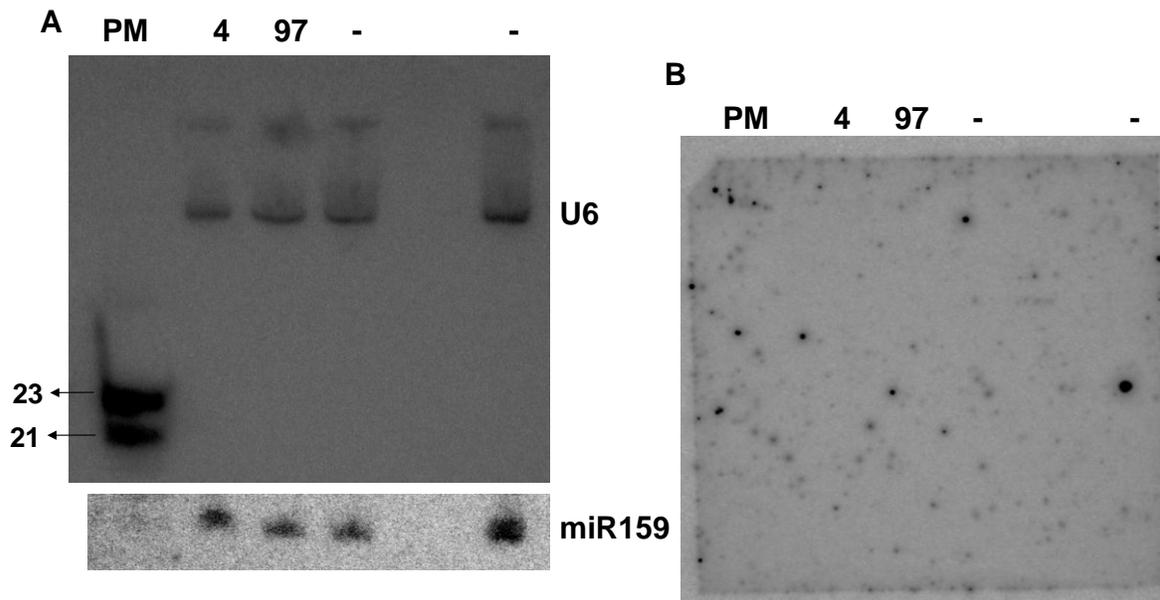
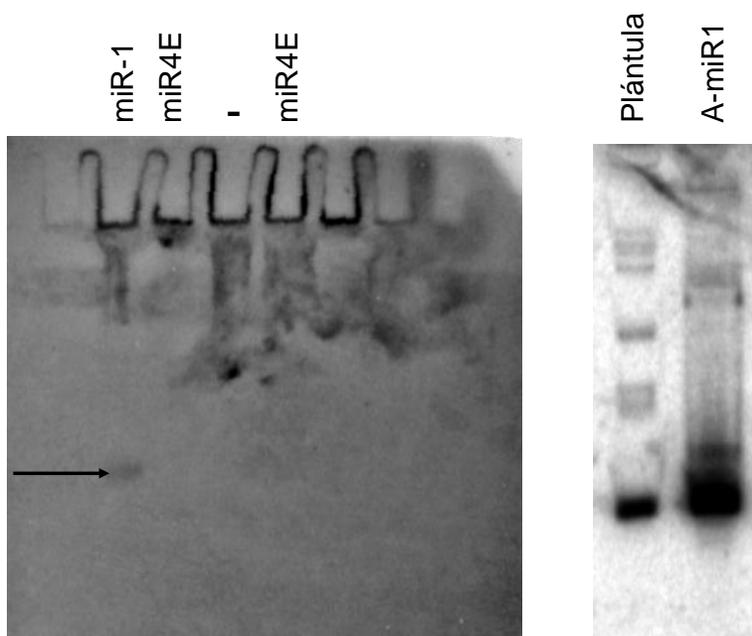


Figura 17; Northern blot realizado contra miR159a U6 y marcador de peso molecular, A) se observa la presencia de los RNAs pequeños en la transferencia y que estos poseen buena calidad, así mismo se observa que las cantidades de U6 son similares en los casos. B) Northern blot contra amiR4E, se muestra la membrana completa y no se observa en la presencia del microRNA artificial amiR4E maduro.

Al observar los resultados anteriores se plantearon tres posibilidades:

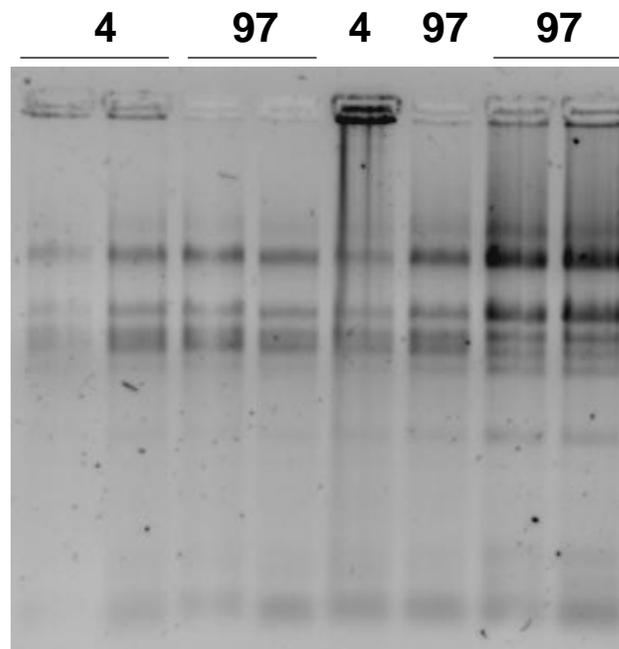
1. La infiltración no es exitosa.
2. No se expresa el precursor de amiR4E.
3. El precursor no se está procesando de manera correcta.

Para verificar la primera de las posibilidades se realizó una infiltración con un microRNA artificial (A-miR1) del que se tenía certeza de su expresión como microRNA maduro en hojas de tabaco mediante infiltración con *Agrobacterium tumefaciens* transformado con la construcción del precursor. El A-miR1 fue donado por el Dr. José Luis Reyes Taboada, en el Instituto de Biotecnología (IBT) en Cuernavaca, Morelos. El ensayo de Northern blot con RNA total obtenido a partir de hojas de tabaco infiltrado con *Agrobacterium tumefaciens* conteniendo el precursor de A-miR1 como control se muestra en la Figura 18. En el mismo ensayo se probaron nuevamente las infiltraciones con la construcción para el precursor de 4EmiR, sin embargo en el Northern blot no se observó señal al hibridar con la sonda de 4EmiR anti-sentido (imagen no mostrada).



**Figura 18.** Northern blot de A-miR1 utilizado como control para detectar de manera exitosa el procesamiento de un microRNA artificial en hojas de tabaco infiltradas. A) la flecha indica la presencia de AmiR1, sin embargo esta misma membrana fue hibridada contra miR4E y no se observó su expresión, en todos los casos se cargaron 25 µg de RNA total en cada carril. B) presencia de miR1 nativo en plántulas de frijol y el A-miR1 expresado y procesado (Imagen obtenida por los colaboradores del Instituto de biotecnología).

Dado que si se observó un procesamiento correcto para A-miR1 se pensó en la posibilidad de que el precursor de amiR4E no esté siendo expresado. A partir de este momento se decidió utilizar plántulas de *Arabidopsis thaliana* para determinar si el amiR4E diseñado podría funcionar en la planta donde finalmente se pretendía lograr el silenciamiento del factor eIF4E. Se realizó una infiltración en hojas de *Arabidopsis thaliana*, se ocuparon 3 plantas por cada una de las construcciones y dos plantas sin infiltrar como controles. Los RNAs obtenidos mostraron buena calidad (Figura 19) y se obtuvo la cantidad suficiente para realizar los ensayos de Northern Blot. Con los mismos RNAs se realizó un ensayo RT-PCR para amplificar el precursor de 4EmiR y de esta manera evaluar su expresión en las hojas infiltradas.



**Figura 19; RNA total obtenido de hojas de *Arabidopsis thaliana* infiltradas con las construcciones (4 y 97). Las muestras de RNAs totales fueron cuantificadas y se realizaron ensayos de Northern blot y RT-PCR para buscar la presencia del precursor.**

Para el RT-PCR se utilizaron como cebadores un oligo ubicado en el extremo 5' del pre-amiR4E (5'amiR4E) y varias opciones de oligos el extremo 3': el 3' pre4E que se ubica dentro del precursor de 3'amiR4E, el 3' inner, que se ubica en posición 3' inmediatamente posterior al pre-a4EmiR el 3'Tnos el cual se ubica dentro del terminador de la nopalina sintasa que forma parte del transcrito primario (Figura 20).

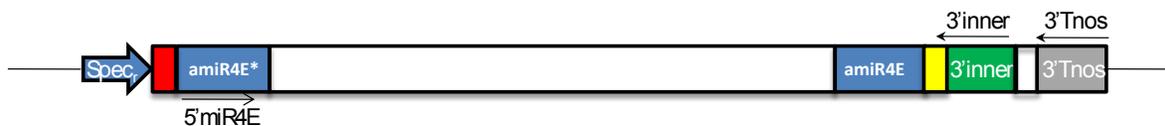


Figura 20; Esquema del transcrito del precursor de a4EmiR. Se indican con flechas los cebadores usados para los ensayos de RT-PCR para hojas infiltradas y sin infiltrar, el cuadro en rojo indica el sitio de restricción de BglII y el cuadro amarillo el sitio de restricción para XmaI.

La síntesis de cDNA se realizó con la enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y la reacción de PCR con la enzima Taq DNA polymerase (Invitrogen) bajo las mismas condiciones de amplificación del precursor mencionadas anteriormente. El análisis por RT-PCR indicó la presencia de transcrito para el precursor de amiR4E en las hojas infiltradas con las construcciones 4 y 97 (Figura 21). Como control se utilizaron ensayos de PCR para los plásmidos que contienen cada una de estas construcciones.

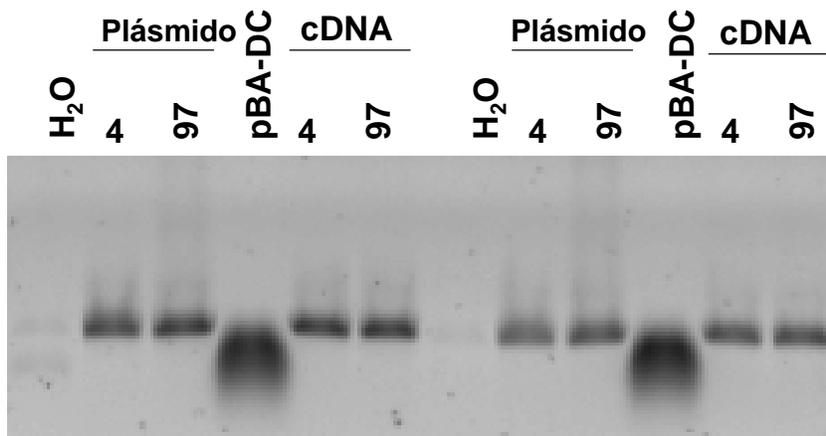
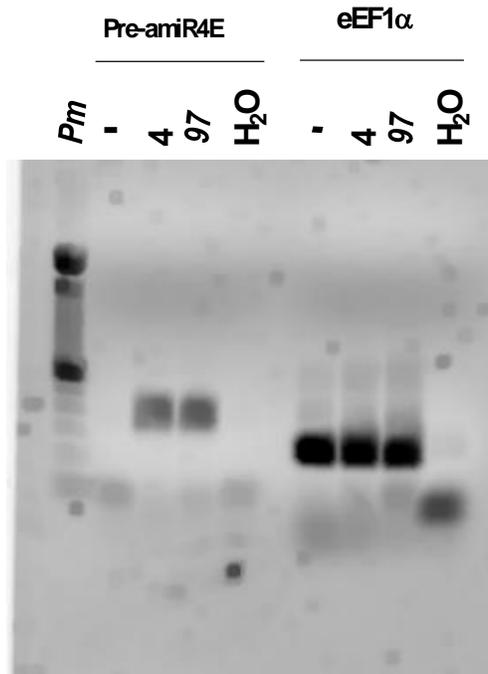


Figura 21; Amplificación del precursor de amiR4E de a partir de cDNA de hojas infiltradas de *Arabidopsis thaliana*, se usó como control negativo el plásmido vacío pBA-DC, y como control positivo a pBA-DC-pre-amiR4E (Plásmido). Los oligos utilizados como cebadores en las reacciones correspondientes se indican en la parte superior de la figura.

Así mismo se realizó la amplificación del precursor de amiR4E usando los cebadores de 5' pre4E y 3'Tnos indicando la presencia de una banda de aproximadamente 300 pb (Figura 22). Estos resultados indican que el precursor para a4Emir se está expresando en las hojas infiltradas. Para comprobar que la banda que se estaba amplificando realmente correspondía a 4EmiR, se realizó un ensayo de Southern blot con los fragmentos amplificados.



**Figura 22; Amplificación del precursor de miR4E por PCR utilizando los oligos 5' pre4E y 3'Tnos como cebadores. Se utilizó la amplificación del factor de elongación eEF1 $\alpha$  como control para el cDNA y H<sub>2</sub>O como control negativo, (-) hojas sin infiltrar.**

Para el Southern blot, se realizó nuevamente la amplificación por PCR de las muestras anteriores, los fragmentos se transfirieron a una membrana, y esta fue hibridada contra amiR4E antisentido (Figura 23). Se observó que en todos los casos menos en la muestra correspondiente a hojas sin infiltrar la banda fue identificada por la sonda utilizada.

Las mismas muestras de RNA fueron sometidas a un análisis por Northern blot para microRNAs. La membrana resultante fue analizada primero con sondas para el snRNA U6 y para el microRNA endógeno miR159 (Figura 24). En la detección de snRNA U6 se observaron cantidades similares para hojas no infiltradas (-) y las infiltraciones con construcciones 4 y 97. La presencia de miR159a también se observó en las tres muestras, aunque con una menor intensidad en las muestras de hojas infiltradas. Es posible que esto se deba al estrés al cual fueron sometidas estas hojas. Al realizar un la detección de miR4E, no fue posible detectar señal alguna en la membrana (Figura 25).

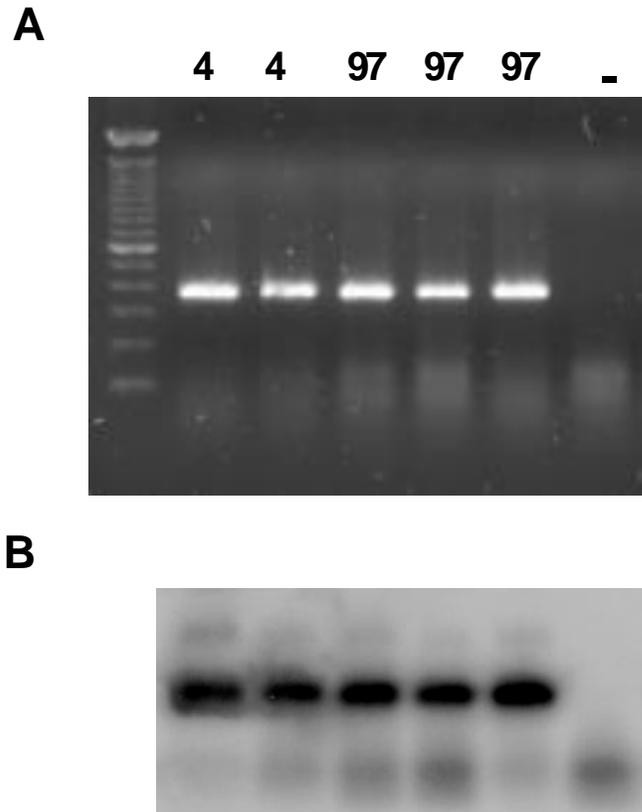


Figura 23; Southern blot para el fragmento de pre-a4EmiR amplificado a partir de cDNA de plantas infiltradas (4,97) y no infiltradas (-).

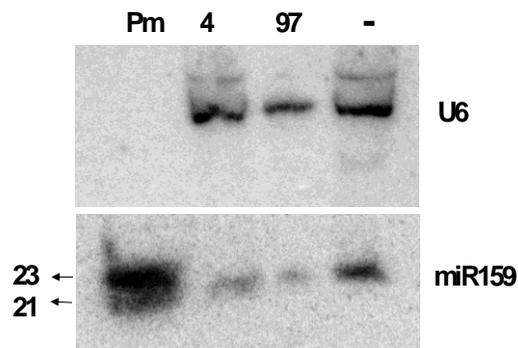
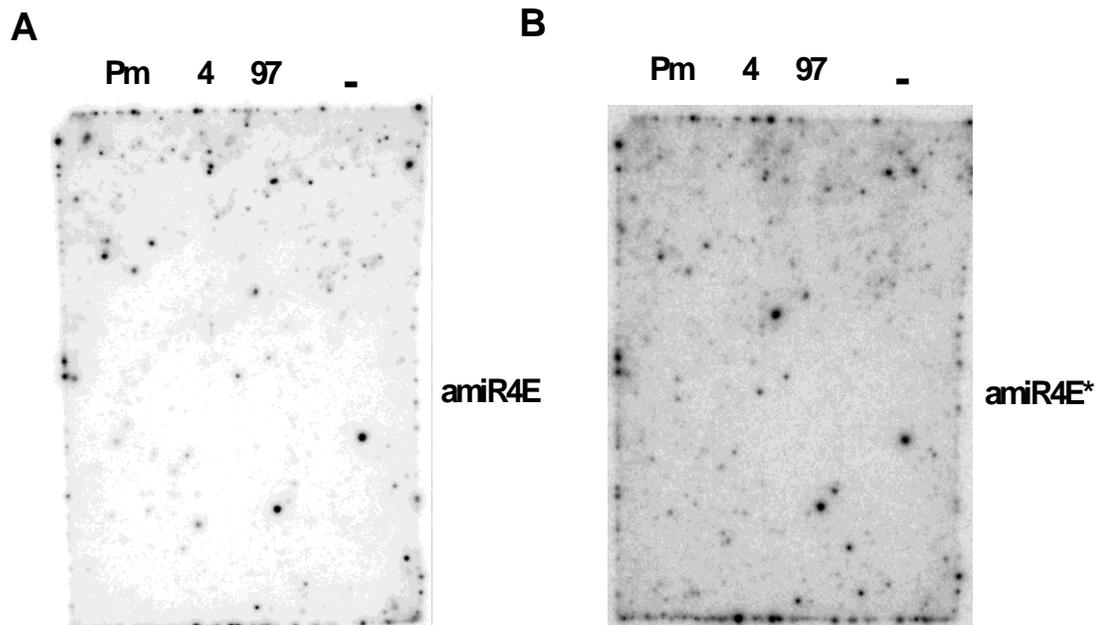


Figura 24; Northern blot para U6 y miR159 con muestras de RNA total obtenido a partir de hojas infiltradas con las construcciones de pre-4EmiR (4,97) y no infiltradas (-). PM, marcador de RNAs pequeños reconocido con su sonda apropiada; se señalan la banda de 21 y 23 nt.

También se realizó la hibridación de la membrana con una sonda anti-sentido para la cadena pasajera amiR4E\* (Figura 25, Panel B), pero no se observó la presencia de ninguna señal. Estos resultados indican que probablemente el procesamiento del precursor pre-a4EmiR no se está realizando de manera adecuada.



**Figura 25; Northern blot para detectar a 4EmiR (A) y 4EmiR\*(B) en muestras de RNA total obtenido a partir de hojas infiltradas con las construcciones de pre-4EmiR (4,97) y no infiltradas (-). Pm, marcador de RNAs pequeños.**

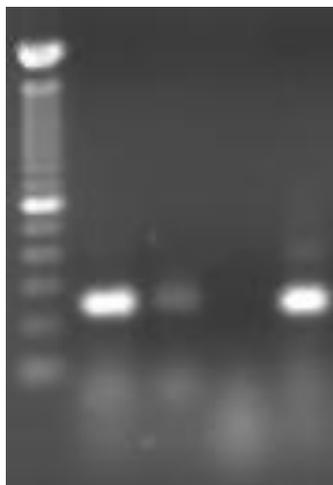
Dado el resultado anterior, se planteó como posibilidad que la amplificación observada en las Figuras 21, 22 y 23 del precursor de amiR4E sea debida a la presencia del plásmido, y no del transcrito. Para descartar esto, se decidió realizar varios ensayos de PCR con el RNA total extraído:

1. Tratamiento con DNasa y RT-PCR.
2. Tratamiento con RNasa y RT-PCR.
3. PCR sin síntesis de cDNA.
4. RT-PCR convencional de las muestras.

De las muestras de RNA total se tomaron 15 µg para el tratamiento con DNasa (RQ1 RNase Free DNase Promega) y RNasa A. En este análisis se esperaba obtener amplificación del precursor en las muestras tratadas con DNasa y el RT-PCR convencional, mientras que para las muestras tratadas

con RNasa y solo RNA sin reverso-transcripción se esperaba no obtener amplificación del fragmento.

|       |   |   |   |   |
|-------|---|---|---|---|
| DNasa | + | - | - | - |
| RNasa | - | + | - | - |
| RT    | + | + | - | + |
|       | 1 | 2 | 3 | 4 |



**Figura 26; Reacciones de PCR de las muestras de RNA total de plantas infiltradas con la construcción 4 en presencia de distintos tratamientos.**

Este análisis (Figura 26) indicó la presencia del precursor en las muestras que tratadas con DNasa y RT-PCR convencional, así como una amplificación de menor intensidad en la muestra tratada con RNasa. Esto puede deberse a que el tratamiento no fue lo suficientemente exhaustivo, o al hecho de que siendo el precursor de microRNAs una estructura de tallo-asa (RNA de doble cadena), la RNasa A no lo pudiera procesar eficientemente.

Para corroborar la presencia del precursor en hojas infiltradas fue realizado un ensayo de Northern blot usando como sonda el precursor amplificado por PCR, en lugar de la sonda antisentido solo para 4EmiR. En este caso, el gel se dejó correr por más tiempo para tener una mayor resolución en los fragmentos de peso mayor (Figura 27). Se observa la presencia de señal por encima de los 125 nt (U6) en plantas infiltradas (I) y con menor intensidad en no infiltradas (-). Esto puede ser debido a que parte del precursor para amiR4E es idéntico al pre-miR159, por lo que podría reconocer también al pre-miR159 endógeno.

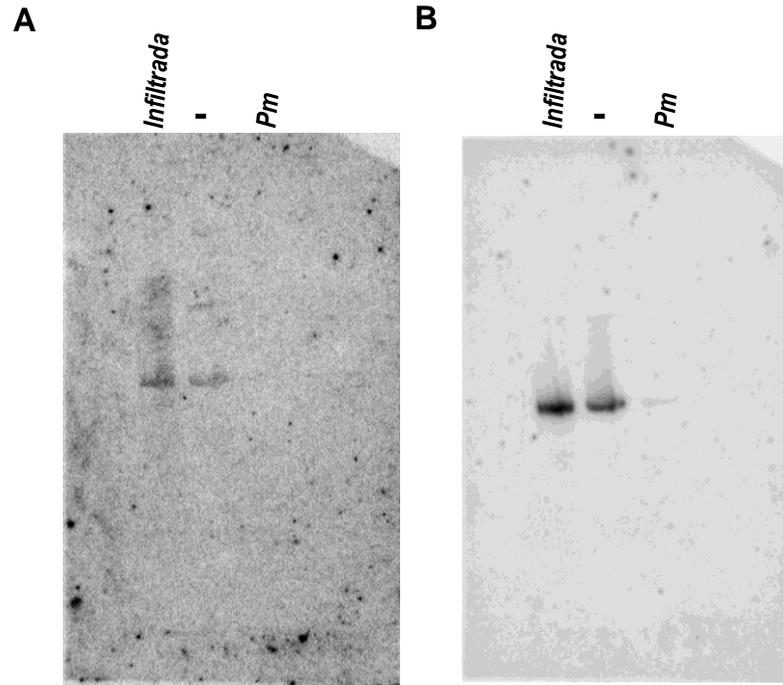


Figura 27; Northern Blot utilizando como sonda el precursor de amiR4E (A). Se realizó una hibridación con el snRNA U6 como control (B) para comparar el tamaño de las bandas detectadas.

## Análisis de resultados

En este trabajo se diseñó un microRNA artificial para lograr el silenciamiento del factor de inicio de la traducción eIF4E en *Arabidopsis thaliana*. En 2007, Qu y colaboradores mostraron que la expresión transitoria así como estable de un miRNA artificial en plantas de *Nicotiana benthamiana* puede inhibir la expresión del gen 2b del virus del mosaico del pepino (CMV, por sus siglas en inglés), siendo el nivel de resistencia de las plantas transformadas equivalente al nivel de expresión del amiRNA, en su trabajo realizaron 12 cambios a la secuencia del miR171a de *Arabidopsis thaliana* [149], Liu C., [147] usando la secuencia de miR169d de *Arabidopsis thaliana* se logró silenciar exitosamente la expresión del gen GUS:GFP en ensayos de expresión transitoria de este gen, Park W., [148] realizó cambios en miR319a de *Arabidopsis thaliana* insertado en el plásmido pRS300 para silenciar el gen de identidad de los órganos florales AP1, generaron 2 construcciones amiR-*ap1A* y amiR-*ap1B*, de las plantas transformadas observaron que en la generación T1 de amiR-*ap1A* ~40% de la población mostraba fenotipos morfológicos obvios y en la mitad de los casos mostraban un fenotipo fuerte de *ap1* y que por el contrario las plantas transformadas con amiR-*ap1B* poseen flores normales, lo que indica que está construcción no es funcional.

En el diseño del microRNA artificial se buscaron secuencias de 21 nucleótidos que fuesen compartidas por eIF4E, At1g29550 y At1g29590 y que no estuviesen presentes en eIF(iso)4E o nCBP, sin embargo en muchos de los casos las secuencias de 21 nucleótidos seleccionadas, en las cuales el número de cambios era menor a 10 nucleótidos, eran compartidas por eIF(iso)4E y/o nCBP junto con eIF4E y alguna de las secuencias homólogas, lo que indicaba que eIF(iso)4E o nCBP eran blancos de estos microRNAs, por lo cual fueron descartados y se utilizó una secuencia en la que hubiese un mayor número de cambios pero que no tuviera como blancos a eIF(iso)4E o nCBP.

En trabajos anteriores se realizaron una gran cantidad de cambios en la secuencia de miR159 [145] (17 cambios para el reconocimiento de p69 y 15 cambios para el reconocimiento de HC-Pro) sin afectar la estructura del precursor y permitiendo la expresión del microRNA maduro así como su función.

En el diseño del amiR4E se realizaron 16 cambios de nucleótidos (Figura 9), en cada una de las cadenas (miR/miR\*), los cálculos de energía libre y estructura del dúplex son similares a los mostrados por miR159a/miR159a\*, pero dado el gran número de cambios es posible que estos adquieran relevancia para la estructura de pre-miR4E *in vivo*, para el reconocimiento de complejos que realizan el procesamiento, o incluso para la estabilidad del miRNA maduro. Todo esto podría llevar a un procesamiento del pre-amiR4E diferente al que corresponde a pre - miR159a, indicando a la célula que este es un microRNA aberrante y lo dirija a su degradación. Estas hipótesis son posibles ya que en este trabajo, se observó la expresión del precursor pre-amiR4E mediante Northern blot y PCR (figuras 19, 20 y 24), pero nunca se pudo detectar al miR4E correspondiente.

La expresión del precursor de amiR4E fue posible tanto en hojas de *Nicotiana tabacum* como de *Arabidopsis thaliana*, sin embargo no se logró un procesamiento hasta el amiR4E maduro que es la molécula efectora de silenciamiento. Sin embargo el diseño aparentemente adecuado de un microRNA artificial no garantiza el éxito en su procesamiento por la maquinaria de silenciamiento endógena de la planta, como fue mostrado por Park con amiR-*ap1B*. El precursor que porta el amiR4E adquiere un plegamiento adecuado, prácticamente idéntico al de pre-miR159 *in silico* (Figura 13). No obstante esto no implicó que la maduración del microRNA fuese correcta. Esto podría deberse a que *in vivo*, las condiciones internas de la célula pueden dar como resultado la formación de una estructura diferente a la mostrada *in silico*, debido a condiciones de estrés que puede sufrir la planta (altas temperaturas, plagas, etc.). Antecedentes en la literatura han mostrado que cambios en la estructura de miR319 [148] así como de miR159 [145, 146] pueden llevar desde una disminución en la expresión de los micro RNAs maduros hasta la inhibición de la expresión de estos [150]. Estos trabajos también mostraron que el procesamiento de estos microRNAs en particular se lleva a cabo de manera diferente a la vía canónica de RNAs pequeños de plantas.

En plantas el procesamiento de los RNAs pequeños comúnmente comienza desde el reconocimiento del asa del precursor hacia la base de este [150]. Sin embargo, en el caso de miR319 y miR159 el procesamiento ocurre de manera contraria, es decir primero se reconoce de la base del precursor y luego el asa [150]. Por otra parte, aunque una idea generalizada es que lo más importante en el reconocimiento del precursor de miRNAs por el complejo de Dicer y otras

proteínas es la estructura de tallo asa, hay trabajos que indican que la secuencia de nucleótidos también podría jugar un papel importante en el reconocimiento [152].

Una técnica mediante la cual es posible el silenciamiento de eIF4E y sus secuencias homólogas en *Arabidopsis thaliana* es el uso de técnicas como hairpin RNA o inclusive el uso de secuencias de microRNAs específicos para cada una de las secuencias que codifican para eIF4E, esta posibilidad permitiría el silenciamiento de todas las secuencias y también podría permitir el observar si las secuencias de At1g29550 y At1g29590 son traducidas en proteínas funcionales, ya que como se mencionó antes sólo se conoce la secuencia de los mensajeros pero es desconocido si estas secuencias son traducidas en proteínas funcionales.

Otro método es el silenciamiento genético inducido por virus (VIGS) una tecnología que explota el mecanismo de defensa antiviral mediado por RNA. En plantas infectadas con virus no modificados el mecanismo está dirigido específicamente contra el genoma viral. Sin embargo, con los vectores de virus llevando insertos derivados de los genes del hospedero, el proceso puede ser adicionalmente dirigido en contra de los mRNAs correspondientes [153], el costo es relativamente bajo. Hoy en día, muchos vectores derivados de virus han sido optimizados para silenciar más de una planta hospedera, tal como el vector derivado de virus TRV, el cual es usado para *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana benthamiana* [154].

La inoculación con virus es realizada en plantas hospederas usando diferentes métodos tales como agro infiltración y transcripción *in vitro* [154].

Un método simple fue desarrollado para construir un RNA de tallo asa rápida y efectivamente. Este método empalma dos fragmentos de DNA de virus o genes de planta a una secuencia quimérica usando PCR de sobre extensión (OE-PCR); enseguida esta secuencia quimérica es unida con la secuencia de un intron para generar una construcción de RNA de tallo asa en un paso mediado por OE-PCR. Este método no es dependiente de enzimas de restricción, no requiere consumibles caros, por lo que el tallo asa puede ser construido rápidamente y sin costo [155].

## Conclusiones

- Fue posible la expresión de un precursor de un micro RNA artificial diseñado con base en secuencias específicas de un precursor de micro RNA conocido (pre-miR159) usando como blanco las secuencias codificantes a los RNAs mensajeros de eIF4E, At1g29550 y At1g29590.
- No fue posible el silenciamiento de eIF4E y las secuencias At1g29550 y At1g29590 de manera transitoria en hojas de *Arabidopsis thaliana* al menos por la técnica de microRNA artificial con el diseño realizado.

## Bibliografia

1. Gebauer, F. and M.W. Hentze, *Molecular mechanisms of translational control*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(10): p. 827-35.
2. Gingras, A.C., B. Raught, and N. Sonenberg, *eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation*. Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 913-63.
3. Sonenberg, N. and A.C. Gingras, *The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth*. Curr Opin Cell Biol, 1998. **10**(2): p. 268-75.
4. Hernandez, G. and P. Vazquez-Pianzola, *Functional diversity of the eukaryotic translation initiation factors belonging to eIF4 families*. Mech Dev, 2005. **122**(7-8): p. 865-76.
5. Mitchell, S.F. and J.R. Lorsch, *Should I stay or should I go? Eukaryotic translation initiation factors 1 and 1A control start codon recognition*. J Biol Chem, 2008. **283**(41): p. 27345-9.
6. Robaglia, C. and C. Caranta, *Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection*. Trends Plant Sci, 2006. **11**(1): p. 40-5.
7. Valasek, L., et al., *Interactions of eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3) subunit NIP1/c with eIF1 and eIF5 promote preinitiation complex assembly and regulate start codon selection*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(21): p. 9437-55.
8. Nanda, J.S., et al., *eIF1 controls multiple steps in start codon recognition during eukaryotic translation initiation*. J Mol Biol, 2009. **394**(2): p. 268-85.
9. Cheung, Y.N., et al., *Dissociation of eIF1 from the 40S ribosomal subunit is a key step in start codon selection in vivo*. Genes Dev, 2007. **21**(10): p. 1217-30.
10. Browning, K.S., *Plant translation initiation factors: it is not easy to be green*. Biochem Soc Trans, 2004. **32**(Pt 4): p. 589-91.
11. Mohammad-Qureshi, S.S., M.D. Jennings, and G.D. Pavitt, *Clues to the mechanism of action of eIF2B, the guanine-nucleotide-exchange factor for translation initiation*. Biochem Soc Trans, 2008. **36**(Pt 4): p. 658-64.
12. Hinnebusch, A.G., *eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes*. Trends Biochem Sci, 2006. **31**(10): p. 553-62.
13. Yahalom, A., et al., *Arabidopsis eIF3e is regulated by the COP9 signalosome and has an impact on development and protein translation*. Plant J, 2008. **53**(2): p. 300-11.
14. Rogers, G.W., Jr., et al., *Modulation of the helicase activity of eIF4A by eIF4B, eIF4H, and eIF4F*. J Biol Chem, 2001. **276**(33): p. 30914-22.
15. Cheng, S. and D.R. Gallie, *Wheat eukaryotic initiation factor 4B organizes assembly of RNA and eIFiso4G, eIF4A, and poly(A)-binding protein*. J Biol Chem, 2006. **281**(34): p. 24351-64.
16. Marintchev, A., et al., *Topology and regulation of the human eIF4A/4G/4H helicase complex in translation initiation*. Cell, 2009. **136**(3): p. 447-60.
17. Cheng, S., et al., *Translation initiation factor 4B homodimerization, RNA binding, and interaction with Poly(A)-binding protein are enhanced by zinc*. J Biol Chem, 2008. **283**(52): p. 36140-53.
18. Cheng, S. and D.R. Gallie, *eIF4G, eIFiso4G, and eIF4B bind the poly(A)-binding protein through overlapping sites within the RNA recognition motif domains*. J Biol Chem, 2007. **282**(35): p. 25247-58.
19. Joshi, B., et al., *Phylogenetic analysis of eIF4E-family members*. BMC Evol Biol, 2005. **5**: p. 48.

20. Rhoads, R.E., T.D. Dinkova, and R. Jagus, *Approaches for analyzing the differential activities and functions of eIF4E family members*. Methods Enzymol, 2007. **429**: p. 261-97.
21. Niedzwiecka, A., et al., *Biophysical studies of eIF4E cap-binding protein: recognition of mRNA 5' cap structure and synthetic fragments of eIF4G and 4E-BP1 proteins*. J Mol Biol, 2002. **319**(3): p. 615-35.
22. Sonenberg, N. and T.E. Dever, *Eukaryotic translation initiation factors and regulators*. Curr Opin Struct Biol, 2003. **13**(1): p. 56-63.
23. Rodriguez, C.M., et al., *The Arabidopsis thaliana cDNAs coding for eIF4E and eIF(iso)4E are not functionally equivalent for yeast complementation and are differentially expressed during plant development*. Plant J, 1998. **13**(4): p. 465-73.
24. Bokros, C.L., et al., *Function of the p86 subunit of eukaryotic initiation factor (iso)4F as a microtubule-associated protein in plant cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(15): p. 7120-4.
25. Rom, E., et al., *Cloning and characterization of 4EHP, a novel mammalian eIF4E-related cap-binding protein*. J Biol Chem, 1998. **273**(21): p. 13104-9.
26. Joshi, B., A. Cameron, and R. Jagus, *Characterization of mammalian eIF4E-family members*. Eur J Biochem, 2004. **271**(11): p. 2189-203.
27. Tee, A.R., J.A. Tee, and J. Blenis, *Characterizing the interaction of the mammalian eIF4E-related protein 4EHP with 4E-BP1*. FEBS Lett, 2004. **564**(1-2): p. 58-62.
28. Cho, P.F., et al., *A new paradigm for translational control: inhibition via 5'-3' mRNA tethering by Bicoid and the eIF4E cognate 4EHP*. Cell, 2005. **121**(3): p. 411-23.
29. Hernandez, G., et al., *Functional analysis of seven genes encoding eight translation initiation factor 4E (eIF4E) isoforms in Drosophila*. Mech Dev, 2005. **122**(4): p. 529-43.
30. Ruud, K.A., et al., *Identification and characterization of a novel cap-binding protein from Arabidopsis thaliana*. J Biol Chem, 1998. **273**(17): p. 10325-30.
31. Goyer, C., et al., *TIF4631 and TIF4632: two yeast genes encoding the high-molecular-weight subunits of the cap-binding protein complex (eukaryotic initiation factor 4F) contain an RNA recognition motif-like sequence and carry out an essential function*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(8): p. 4860-74.
32. Zapata, J.M., M.A. Martinez, and J.M. Sierra, *Purification and characterization of eukaryotic polypeptide chain initiation factor 4F from Drosophila melanogaster embryos*. J Biol Chem, 1994. **269**(27): p. 18047-52.
33. Browning, K.S., *The plant translational apparatus*. Plant Mol Biol, 1996. **32**(1-2): p. 107-44.
34. Gradi, A., et al., *A novel functional human eukaryotic translation initiation factor 4G*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(1): p. 334-42.
35. Prevot, D., J.L. Darlix, and T. Ohlmann, *Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G*. Biol Cell, 2003. **95**(3-4): p. 141-56.
36. Bradley, C.A., et al., *Mass spectrometric analysis of the N terminus of translational initiation factor eIF4G-1 reveals novel isoforms*. J Biol Chem, 2002. **277**(15): p. 12559-71.
37. Hinton, T.M., et al., *Functional analysis of individual binding activities of the scaffold protein eIF4G*. J Biol Chem, 2007. **282**(3): p. 1695-708.
38. Mayberry, L.K., et al., *Evidence for variation in the optimal translation initiation complex: plant eIF4B, eIF4F, and eIF(iso)4F differentially promote translation of mRNAs*. Plant Physiol, 2009. **150**(4): p. 1844-54.
39. Mangus, D.A., M.C. Evans, and A. Jacobson, *Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression*. Genome Biol, 2003. **4**(7): p. 223.

40. Gorgoni, B. and N.K. Gray, *The roles of cytoplasmic poly(A)-binding proteins in regulating gene expression: a developmental perspective*. Brief Funct Genomic Proteomic, 2004. **3**(2): p. 125-41.
41. Belostotsky, D.A. and R.B. Meagher, *Differential organ-specific expression of three poly(A)-binding-protein genes from Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(14): p. 6686-90.
42. Duprat, A., et al., *The Arabidopsis eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses*. Plant J, 2002. **32**(6): p. 927-34.
43. Hidalgo, *Obtención y caracterización de mutantes homocigas nulas de un miembro de la familia eIF4E:NCBP (novel Cap-Binding Protein) en Arabidopsis thaliana*. Tesis de Licenciatura, 2007.
44. Oulhen, N. and P. Cormier, *[eIF4E and developmental decisions: when translation drives the development]*. Med Sci (Paris), 2006. **22**(5): p. 507-13.
45. Zhou, F.F., et al., *Knockdown of eIF4E suppresses cell growth and migration, enhances chemosensitivity and correlates with increase in Bax/Bcl-2 ratio in triple-negative breast cancer cells*. Med Oncol, 2010.
46. Keiper, B.D., et al., *Functional characterization of five eIF4E isoforms in Caenorhabditis elegans*. J Biol Chem, 2000. **275**(14): p. 10590-6.
47. Combe, J.P., et al., *Translation initiation factors eIF4E and eIFiso4E are required for polysome formation and regulate plant growth in tobacco*. Plant Mol Biol, 2005. **57**(5): p. 749-60.
48. Lanet, E., et al., *Biochemical evidence for translational repression by Arabidopsis microRNAs*. Plant Cell, 2009. **21**(6): p. 1762-8.
49. Tang, G., *siRNA and miRNA: an insight into RISCs*. Trends Biochem Sci, 2005. **30**(2): p. 106-14.
50. Castanotto, D., et al., *Combinatorial delivery of small interfering RNAs reduces RNAi efficacy by selective incorporation into RISC*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(15): p. 5154-64.
51. Mahfouz, M.M., *RNA-directed DNA methylation: mechanisms and functions*. Plant Signal Behav, 2010. **5**(7): p. 806-16.
52. Ngo, H., et al., *Double-stranded RNA induces mRNA degradation in Trypanosoma brucei*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(25): p. 14687-92.
53. Elbashir, S.M., et al., *Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs*. Methods, 2002. **26**(2): p. 199-213.
54. He, L. and G.J. Hannon, *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(7): p. 522-31.
55. Vella, M.C. and F.J. Slack, *C. elegans microRNAs*. WormBook, 2005: p. 1-9.
56. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
57. Tang, G., et al., *The art of microRNA: various strategies leading to gene silencing via an ancient pathway*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1779**(11): p. 655-62.
58. Vaucheret, H., *Plant ARGONAUTES*. Trends Plant Sci, 2008. **13**(7): p. 350-8.
59. Hutvagner, G. and M.J. Simard, *Argonaute proteins: key players in RNA silencing*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(1): p. 22-32.
60. Tolia, N.H. and L. Joshua-Tor, *Slicer and the argonautes*. Nat Chem Biol, 2007. **3**(1): p. 36-43.
61. Aliyari, R. and S.W. Ding, *RNA-based viral immunity initiated by the Dicer family of host immune receptors*. Immunol Rev, 2009. **227**(1): p. 176-88.

62. Garcia, D., *A miRacle in plant development: role of microRNAs in cell differentiation and patterning*. *Semin Cell Dev Biol*, 2008. **19**(6): p. 586-95.
63. Brodersen, P., et al., *Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs*. *Science*, 2008. **320**(5880): p. 1185-90.
64. Voinnet, O., *Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs*. *Cell*, 2009. **136**(4): p. 669-87.
65. Chen, D., et al., *Plant siRNAs from introns mediate DNA methylation of host genes*. *RNA*, 2011. **17**(6): p. 1012-24.
66. Czech, B. and G.J. Hannon, *Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes*. *Nat Rev Genet*, 2011. **12**(1): p. 19-31.
67. Cai, X., C.H. Hagedorn, and B.R. Cullen, *Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs*. *RNA*, 2004. **10**(12): p. 1957-66.
68. Lee, Y., et al., *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. *EMBO J*, 2004. **23**(20): p. 4051-60.
69. Bussing, I., et al., *The nuclear export receptor XPO-1 supports primary miRNA processing in C. elegans and Drosophila*. *EMBO J*, 2010. **29**(11): p. 1830-9.
70. Gruber, J.J., et al., *Ars2 links the nuclear cap-binding complex to RNA interference and cell proliferation*. *Cell*, 2009. **138**(2): p. 328-39.
71. Sabin, L.R., et al., *Ars2 regulates both miRNA- and siRNA- dependent silencing and suppresses RNA virus infection in Drosophila*. *Cell*, 2009. **138**(2): p. 340-51.
72. Ketting, R.F., et al., *Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in C. elegans*. *Genes Dev*, 2001. **15**(20): p. 2654-9.
73. Hutvagner, G., et al., *A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA*. *Science*, 2001. **293**(5531): p. 834-8.
74. Gonzales, A., J. Kertesz, and G. Tayac, *Eugenics as Indian removal: sociohistorical processes and the de(con)struction of American Indians in the southeast*. *Public Hist*, 2007. **29**(3): p. 53-67.
75. Bernstein, E., et al., *Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference*. *Nature*, 2001. **409**(6818): p. 363-6.
76. Flynt, A.S., et al., *MicroRNA biogenesis via splicing and exosome-mediated trimming in Drosophila*. *Mol Cell*, 2010. **38**(6): p. 900-7.
77. Tijsterman, M. and R.H. Plasterk, *Dicers at RISC; the mechanism of RNAi*. *Cell*, 2004. **117**(1): p. 1-3.
78. Xie, Z., K. Khanna, and S. Ruan, *Expression of microRNAs and its regulation in plants*. *Semin Cell Dev Biol*, 2010. **21**(8): p. 790-7.
79. Pillai, R.S., S.N. Bhattacharyya, and W. Filipowicz, *Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms?* *Trends Cell Biol*, 2007. **17**(3): p. 118-26.
80. Gandikota, M., et al., *The miRNA156/157 recognition element in the 3' UTR of the Arabidopsis SBP box gene SPL3 prevents early flowering by translational inhibition in seedlings*. *Plant J*, 2007. **49**(4): p. 683-93.
81. Seggerson, K., L. Tang, and E.G. Moss, *Two genetic circuits repress the Caenorhabditis elegans heterochronic gene lin-28 after translation initiation*. *Dev Biol*, 2002. **243**(2): p. 215-25.
82. Petersen, C.P., et al., *Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells*. *Mol Cell*, 2006. **21**(4): p. 533-42.

83. Olsen, P.H. and V. Ambros, *The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in Caenorhabditis elegans by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation*. Dev Biol, 1999. **216**(2): p. 671-80.
84. Kiriakidou, M., et al., *An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation*. Cell, 2007. **129**(6): p. 1141-51.
85. Mathonnet, G., et al., *MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F*. Science, 2007. **317**(5845): p. 1764-7.
86. Thermann, R. and M.W. Hentze, *Drosophila miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation*. Nature, 2007. **447**(7146): p. 875-8.
87. Chendrimada, T.P., et al., *MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6*. Nature, 2007. **447**(7146): p. 823-8.
88. Ceci, M., et al., *Release of eIF6 (p27BBP) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly*. Nature, 2003. **426**(6966): p. 579-84.
89. Fenger-Gron, M., et al., *Multiple processing body factors and the ARE binding protein TTP activate mRNA decapping*. Mol Cell, 2005. **20**(6): p. 905-15.
90. Huang, J., et al., *Derepression of microRNA-mediated protein translation inhibition by apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) and its family members*. J Biol Chem, 2007. **282**(46): p. 33632-40.
91. Yu, B., et al., *The FHA domain proteins DAWDLE in Arabidopsis and SNIP1 in humans act in small RNA biogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(29): p. 10073-8.
92. Reinhart, B.J., et al., *MicroRNAs in plants*. Genes Dev, 2002. **16**(13): p. 1616-26.
93. Qi, Y., A.M. Denli, and G.J. Hannon, *Biochemical specialization within Arabidopsis RNA silencing pathways*. Mol Cell, 2005. **19**(3): p. 421-8.
94. Henderson, I.R., et al., *Dissecting Arabidopsis thaliana DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning*. Nat Genet, 2006. **38**(6): p. 721-5.
95. Kurihara, Y. and Y. Watanabe, *Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(34): p. 12753-8.
96. Park, W., et al., *CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in Arabidopsis thaliana*. Curr Biol, 2002. **12**(17): p. 1484-95.
97. Vazquez, F., et al., *The nuclear dsRNA binding protein HYL1 is required for microRNA accumulation and plant development, but not posttranscriptional transgene silencing*. Curr Biol, 2004. **14**(4): p. 346-51.
98. Han, M.H., et al., *The Arabidopsis double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(4): p. 1093-8.
99. Kurihara, Y., Y. Takashi, and Y. Watanabe, *The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis*. RNA, 2006. **12**(2): p. 206-12.
100. Fujioka, Y., et al., *Location of a possible miRNA processing site in SmD3/SmB nuclear bodies in Arabidopsis*. Plant Cell Physiol, 2007. **48**(9): p. 1243-53.
101. Gregory, B.D., et al., *A link between RNA metabolism and silencing affecting Arabidopsis development*. Dev Cell, 2008. **14**(6): p. 854-66.
102. Laubinger, S., et al., *Dual roles of the nuclear cap-binding complex and SERRATE in pre-mRNA splicing and microRNA processing in Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(25): p. 8795-800.
103. Pontes, O., et al., *The Arabidopsis chromatin-modifying nuclear siRNA pathway involves a nucleolar RNA processing center*. Cell, 2006. **126**(1): p. 79-92.

104. Li, C.F., et al., *An ARGONAUTE4-containing nuclear processing center colocalized with Cajal bodies in Arabidopsis thaliana*. Cell, 2006. **126**(1): p. 93-106.
105. Yang, Z., et al., *HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(2): p. 667-75.
106. Yu, B., et al., *Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis*. Science, 2005. **307**(5711): p. 932-5.
107. Akbergenov, R., et al., *Molecular characterization of geminivirus-derived small RNAs in different plant species*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(2): p. 462-71.
108. Li, J., et al., *Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in Arabidopsis*. Curr Biol, 2005. **15**(16): p. 1501-7.
109. Ramachandran, V. and X. Chen, *Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in Arabidopsis*. Science, 2008. **321**(5895): p. 1490-2.
110. Horwich, M.D., et al., *The Drosophila RNA methyltransferase, DmHen1, modifies germline piRNAs and single-stranded siRNAs in RISC*. Curr Biol, 2007. **17**(14): p. 1265-72.
111. Kirino, Y. and Z. Mourelatos, *The mouse homolog of HEN1 is a potential methylase for Piwi-interacting RNAs*. RNA, 2007. **13**(9): p. 1397-401.
112. Saito, K., et al., *Pimet, the Drosophila homolog of HEN1, mediates 2'-O-methylation of Piwi-interacting RNAs at their 3' ends*. Genes Dev, 2007. **21**(13): p. 1603-8.
113. Park, M.Y., et al., *Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(10): p. 3691-6.
114. Nonomura, K., et al., *A germ cell specific gene of the ARGONAUTE family is essential for the progression of premeiotic mitosis and meiosis during sporogenesis in rice*. Plant Cell, 2007. **19**(8): p. 2583-94.
115. Allen, E., et al., *microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants*. Cell, 2005. **121**(2): p. 207-21.
116. Axtell, M.J., et al., *A two-hit trigger for siRNA biogenesis in plants*. Cell, 2006. **127**(3): p. 565-77.
117. Peragine, A., et al., *SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in Arabidopsis*. Genes Dev, 2004. **18**(19): p. 2368-79.
118. Vazquez, F., et al., *Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of Arabidopsis mRNAs*. Mol Cell, 2004. **16**(1): p. 69-79.
119. Gascioli, V., et al., *Partially redundant functions of Arabidopsis DICER-like enzymes and a role for DCL4 in producing trans-acting siRNAs*. Curr Biol, 2005. **15**(16): p. 1494-500.
120. Yoshikawa, M., et al., *A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in Arabidopsis*. Genes Dev, 2005. **19**(18): p. 2164-75.
121. Montgomery, T.A., et al., *Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation*. Cell, 2008. **133**(1): p. 128-41.
122. Henz, S.R., et al., *Distinct expression patterns of natural antisense transcripts in Arabidopsis*. Plant Physiol, 2007. **144**(3): p. 1247-55.
123. Katiyar-Agarwal, S., et al., *A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(47): p. 18002-7.
124. Borsani, O., et al., *Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in Arabidopsis*. Cell, 2005. **123**(7): p. 1279-91.
125. Smith, L.M., et al., *An SNF2 protein associated with nuclear RNA silencing and the spread of a silencing signal between cells in Arabidopsis*. Plant Cell, 2007. **19**(5): p. 1507-21.
126. Kasschau, K.D., et al., *Genome-wide profiling and analysis of Arabidopsis siRNAs*. PLoS Biol, 2007. **5**(3): p. e57.

127. Klug, A., *The tobacco mosaic virus particle: structure and assembly*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1999. **354**(1383): p. 531-5.
128. Onodera, Y., et al., *Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation*. Cell, 2005. **120**(5): p. 613-22.
129. Watson, J.M., et al., *RNA silencing platforms in plants*. FEBS Lett, 2005. **579**(26): p. 5982-7.
130. Xie, Z., et al., *Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants*. PLoS Biol, 2004. **2**(5): p. E104.
131. Huang, J. and M. Kertesz, *Theoretical analysis of intermolecular covalent pi-pi bonding and magnetic properties of phenalenyl and spiro-biphenalenyl radical pi-dimers*. J Phys Chem A, 2007. **111**(28): p. 6304-15.
132. Hamilton, A., et al., *Two classes of short interfering RNA in RNA silencing*. EMBO J, 2002. **21**(17): p. 4671-9.
133. Pikaard, C.S., et al., *Roles of RNA polymerase IV in gene silencing*. Trends Plant Sci, 2008. **13**(7): p. 390-7.
134. Ream, T.S., et al., *Subunit compositions of the RNA-silencing enzymes Pol IV and Pol V reveal their origins as specialized forms of RNA polymerase II*. Mol Cell, 2009. **33**(2): p. 192-203.
135. El-Shami, M., et al., *Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components*. Genes Dev, 2007. **21**(20): p. 2539-44.
136. Qi, Y., et al., *Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation*. Nature, 2006. **443**(7114): p. 1008-12.
137. Zheng, X., et al., *Role of Arabidopsis AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing*. EMBO J, 2007. **26**(6): p. 1691-701.
138. Zilberman, D., X. Cao, and S.E. Jacobsen, *ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation*. Science, 2003. **299**(5607): p. 716-9.
139. Sanchez-Vargas, I., et al., *RNA interference, arthropod-borne viruses, and mosquitoes*. Virus Res, 2004. **102**(1): p. 65-74.
140. Mosher, R.A., et al., *PollIVb influences RNA-directed DNA methylation independently of its role in siRNA biogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(8): p. 3145-50.
141. Fang, Y. and D.L. Spector, *Identification of nuclear dicing bodies containing proteins for microRNA biogenesis in living Arabidopsis plants*. Curr Biol, 2007. **17**(9): p. 818-23.
142. Song, L., et al., *Arabidopsis primary microRNA processing proteins HYL1 and DCL1 define a nuclear body distinct from the Cajal body*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(13): p. 5437-42.
143. Rajagopalan, R., et al., *A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in Arabidopsis thaliana*. Genes Dev, 2006. **20**(24): p. 3407-25.
144. Xie, Z., K.D. Kasschau, and J.C. Carrington, *Negative feedback regulation of Dicer-Like1 in Arabidopsis by microRNA-guided mRNA degradation*. Curr Biol, 2003. **13**(9): p. 784-9.
145. Niu, Q.W., et al., *Expression of artificial microRNAs in transgenic Arabidopsis thaliana confers virus resistance*. Nat Biotechnol, 2006. **24**(11): p. 1420-8.
146. Duan, C.G., et al., *Artificial MicroRNAs highly accessible to targets confer efficient virus resistance in plants*. J Virol, 2008. **82**(22): p. 11084-95.
147. Liu, C., et al., *A simple artificial microRNA vector based on ath-miR169d precursor from Arabidopsis*. Mol Biol Rep, 2010. **37**(2): p. 903-9.
148. Park, W., J. Zhai, and J.Y. Lee, *Highly efficient gene silencing using perfect complementary artificial miRNA targeting AP1 or heteromeric artificial miRNA targeting AP1 and CAL genes*. Plant Cell Rep, 2009. **28**(3): p. 469-80.

149. Qu, J., J. Ye, and R. Fang, *Artificial microRNA-mediated virus resistance in plants*. J Virol, 2007. **81**(12): p. 6690-9.
150. Bologna, N.G., et al., *A loop-to-base processing mechanism underlies the biogenesis of plant microRNAs miR319 and miR159*. EMBO J, 2009. **28**(23): p. 3646-56.
151. Zhang, X. and Y. Zeng, *The terminal loop region controls microRNA processing by Drosha and Dicer*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(21): p. 7689-97.
152. Biberger, C. and E. von Angerer, *1-Benzyl-2-phenylindole- and 1,2-diphenylindole-based antiestrogens. Estimation of agonist and antagonist activities in transfection assays*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1998. **64**(5-6): p. 277-85.
153. Lu, R., et al., *Virus-induced gene silencing in plants*. Methods, 2003. **30**(4): p. 296-303.
154. Unver, T. and H. Budak, *Virus-induced gene silencing, a post transcriptional gene silencing method*. Int J Plant Genomics, 2009. **2009**: p. 198680.
155. Yan, P., et al., *Simple construction of chimeric hairpin RNA for virus resistance in plants*. J Virol Methods, 2010. **166**(1-2): p. 101-5.



menor significa que existe mayor posibilidad de que el RNA pequeño sea capaz de entrar en contacto con el mRNA blanco.

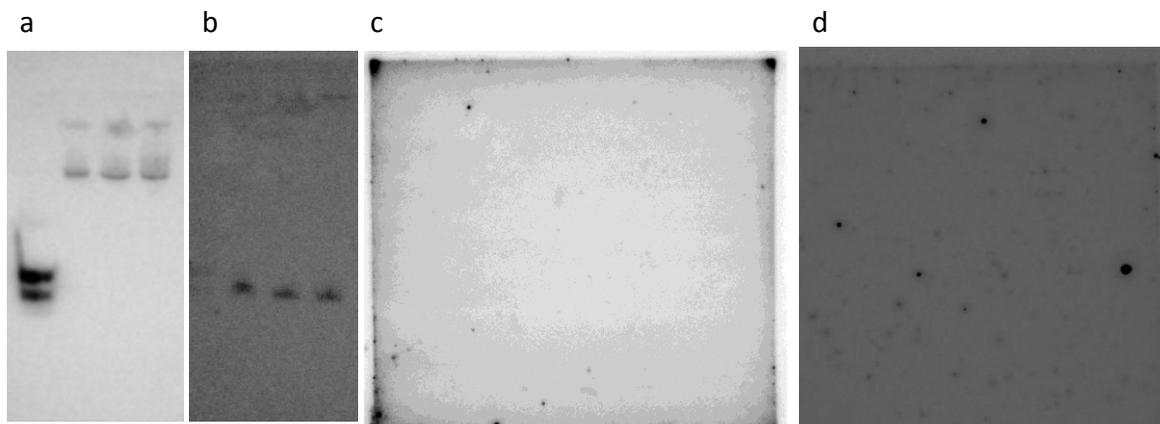
Inhibición.- Tipo de inhibición que se espera en el blanco del RNA pequeño.

Multiplicidad.- Número de sitios en los cuales el RNA pequeño puede alinear con la secuencia del RNA blanco.

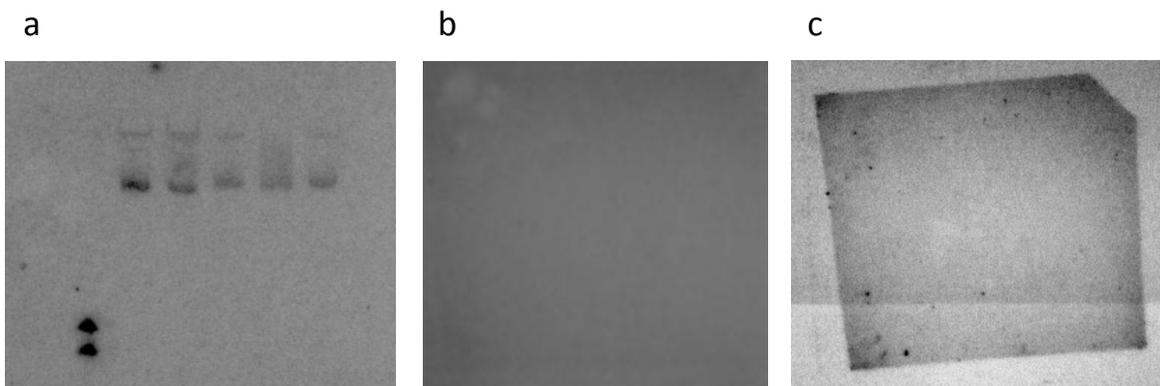
Dentro de la tabla se muestra el apareamiento que tendrán el miRNA y el blanco, en todos los casos la secuencia en la parte superior corresponde al miRNA y en la parte inferior al mRNA blanco, los números indican la posición de los nucleótidos en la secuencia del mRNA.

## Anexo II

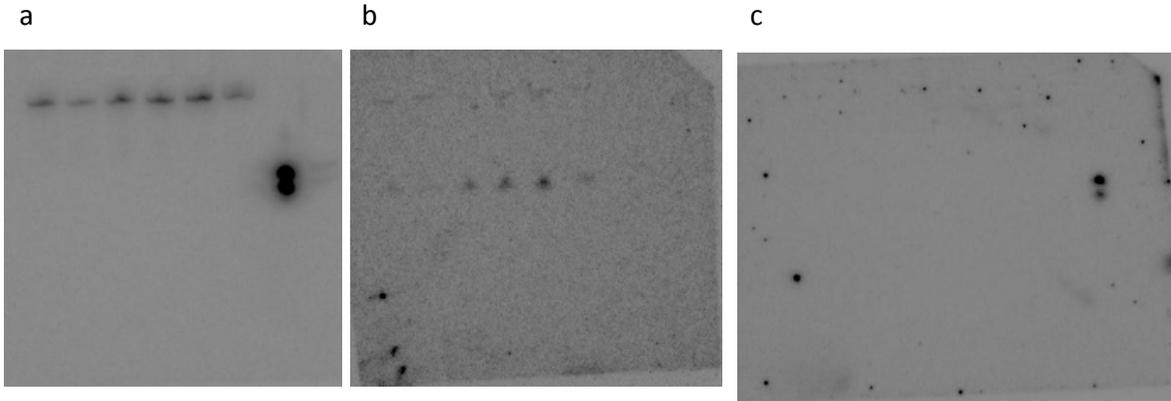
Ensayos Norther blot de RNAs pequeños y cadenas complementarias, se muestran 3 ensayos en los cuales además de la búsqueda del miRNA maduro se realizó la hibridación contra la cadena pasajera, en los 3 casos se tomaron 25  $\mu\text{g}$  de RNA de hojas infiltradas de *Arabidopsis thaliana*.



Norther Blot a) U6 y marcador de peso molecular, b) miR159, c) Cadena anti sentido miR4E y d) Cadena pasajera



a) U6 y peso molecular, b) AsmiR4E y c) cadena pasajera



a) U6 y peso molecular, b) AsmiR159 y c) cadena pasajera