



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM  
POSGRADO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS  
FACULTAD DE QUÍMICA

“ANÁLISIS DE COMPLEJOS  
RIBONUCLEOPROTÉICOS FORMADOS POR  
LA PROTEÍNA DE UNIÓN A Cap, nCBP DE  
*Arabidopsis thaliana*”

T E S I S

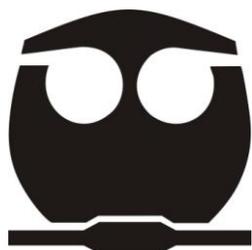
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

Biol. ALEJANDRO FLORES  
ALANIS

Tutor: Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova  
Facultad de Química



MÉXICO, D. F. DICIEMBRE DEL 2013



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.

## DEDICATORIA

A mis padres por todo el cariño y amor que me dieron y me siguen dando, por enseñarme a ser una persona responsable, trabajadora y humilde. Pero sobre todo por darme lo más importante que puedo tener en estos momentos, la vida.

A mis abuelos, por haber creído en mi sin excepción alguna, por apoyarme en toda esta travesía llamada vida, y sobre todo por el gran amor y cariño que me han brindado siempre.

Gracias a mis queridos hermanos Paola, Héctor y Carlos.

Para mis amigos Alejandra, Tania y Aldana por apoyarme y estar siempre presentes durante los momentos difíciles, pero también en los buenos; momentos que me ayudaron a ser una mejor persona.

A mi mejor amigo Daniel López por alentarme, creer y seguir creyendo en mí.

## **AGRADECIMIENTOS.**

A mi tutora de tesis, la Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por su atención, apoyo y consejos que me ayudaron durante la realización de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio por su amistad y sus consejos siempre tan oportunos.

A mi jurado de tesis por su atención, tiempo y valiosas aportaciones hacia mi trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme las puertas y dejar que mis sueños sigan haciéndose realidad. Por permitirme aprender y formarme como profesional.

Por el apoyo financiero a: CONACyT por la beca de maestría 347268/240132 y el proyecto CONACYT 81708, PAPIIT proyecto 210912, ICyTDF proyecto PIUTE 10-55 y beca por proyecto de ingresos extraordinarios de la Facultad de Química FQ-747.

## **AGRADECIMIENTOS POR APOYO TÉCNICO**

A la Dra. Verónica Monroy Martínez y al M. V. Z. Atonatiu Edmundo Gómez Martínez por haberme apoyado en la inmunización de los conejos para la producción de anticuerpos.

Al Dr. Felipe Cruz García por facilitarme el plásmido pGEX-4T-2.

## INDICE

i.	Abreviaturas utilizadas en el texto.	7
1.	Resumen.	9
2.	Introducción.	10
2.1.	El proceso de traducción en eucariontes.	10
2.2.	La familia de proteínas eIF4E.	13
2.2.1.	Estructura del sitio de unión a 7mGTP de los factores eIF4E.	13
2.2.2.	Clasificación de los factores tipo eIF4E.	15
2.2.3.	Los factores tipo eIF4E en plantas.	17
2.3.	Los factores eIF4E no solo participan en la traducción.	17
2.3.1.	Exportación nuclear de mRNAs mediada por eIF4E.	19
2.3.2.	Papel de eIF4E en el tráfico entre gránulos de ribonucleoproteínas (RNPs) citoplasmáticos.	21
2.3.3.	Papel de eIF4E en la interacción virus-planta.	24
3.	Antecedentes.	26
3.1.	La proteína Clase II de la familia eIF4E en plantas, nCBP.	26
3.2.	nCBP en otros organismos.	27
3.3.	Análisis funcional de nCBP en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	29
4.	Hipótesis.	34
5.	Objetivos.	34
5.1.	Objetivo general.	34
5.2.	Objetivos particulares.	34
6.	Metodología.	35
6.1.	Obtención de semillas a partir de plantas de <i>A. thaliana</i> silvestres (WT) y mutantes para nCBP ( <i>Atncbp-1</i> ).	35
6.2.	Esterilización y siembra de semillas de <i>A. thaliana</i> para la obtención de plántulas de 16 días.	35
6.3.	Extracción de proteínas totales.	35
6.4.	SDS-PAGE y tinción con Azul de Coomassie.	36

6.5.	<i>Western Blot.</i>	36
6.6.	Obtención de la proteína de fusión Glutación S Transferasa (GST)-nCBP.	36
6.6.1.	Clonación de la secuencia codificante de nCBP en el vector pGEM-T Easy.	36
6.6.2.	Células competentes.	37
6.6.3.	Transformación de células competentes <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ por choque térmico.	38
6.6.4.	Extracción de plásmido pGEM-nCBP por miniprep.	38
6.6.5.	Digestión con enzimas de restricción del plásmido pGEM-nCBP y el plásmido pGEX-4T-2.	38
6.6.6.	Purificación de DNA de un gel de agarosa.	39
6.6.7.	Clonación de la secuencia de nCBP en el plásmido pGEX4T-2.	39
6.6.8.	Transformación de células competentes <i>E.coli</i> BL21 RIL Codon Plus por choque térmico.	40
6.6.9.	Inducción con isopropil- $\beta$ -D-1- tiogalactopiranosido (IPTG).	40
6.7.	Purificación de la proteína de fusión GST-nCBP.	40
6.7.1.	Extracción de proteína total de bacterias.	40
6.7.2.	Purificación de proteínas bacterianas por cromatografía de afinidad con resina glutatión sefarosa 4B (RGS4B).	41
6.7.3.	Análisis funcional de la proteína de fusión por cromatografía de afinidad con resina Sefarosa $^7$ mGTP ( $^7$ mGTP-S).	42
6.8.	Co-elución de proteínas asociadas a GST-nCBP mediante ensayo de "Pull down".	42
6.9.	Tinción con plata.	43
6.10.	Análisis de proteínas por LC/MS/MS.	43
6.11.	Obtención de anticuerpos anti-nCBP.	43
6.11.1.	Inmunización de conejos.	43
6.11.2.	Dot Blot.	44
6.11.3.	Purificación del anticuerpo.	45
6.12.	Inmunoprecipitación Proteína-RNA (RIP).	45
6.13.	Extracción de RNA total.	46
7.	Resultados.	47
7.1.	Análisis molecular de las plantas <i>WT</i> y <i>Atncbp-1</i>	47
7.2.	Obtención de una proteína de fusión GST-nCBP funcional.	47

<b>7.3.</b>	Formación de complejos entre nCBP-GST y proteínas de <i>A. thaliana in vitro</i> .	50
<b>7.4.</b>	Anticuerpos policlonales anti-nCBP.	53
<b>7.5.</b>	Inmunoprecipitación de la proteína nCBP.	55
<b>8.</b>	Discusión.	57
<b>8.1.</b>	La proteína nCBP recombinante es funcional.	57
<b>8.2.</b>	nCBP es capaz de formar complejos protéicos.	57
<b>8.2.1.</b>	Proteínas de respuesta a estrés.	58
<b>8.2.2.</b>	Proteínas del citoesqueleto.	63
<b>8.2.3.</b>	Proteínas con función desconocida.	64
<b>9.</b>	Conclusiones.	66
<b>10.</b>	Perspectivas.	67
<b>11.</b>	Apéndices.	68
	A. Soluciones y medios de cultivo.	68
	B. Mapas de vectores.	72
	C. Tablas de proteínas identificadas por LC/MS/MS.	73
<b>12.</b>	Bibliografía.	77

## i. Abreviaturas.

Las abreviaturas que se utilizan en el texto se han puesto según su escritura en inglés.

<b>3'UTR</b>	Región no traducible 3'
<b>5'UTR</b>	Región no traducible 5'
<b><sup>7</sup>mGTP</b>	7-metilguanósina-tri-fosfato o análogo del 5' Cap
<b>4E-BPs</b>	Proteínas de unión a eIF4E
<b>4E-SEs</b>	Elementos sensibles a eIF4E
<b>ANK</b>	Repeticiones ankirin
<b>AtANKTM</b>	Proteínas ANK transmembranales de <i>A. thaliana</i>
<b><i>Atncbp</i></b>	Gen para nCBP de <i>A. thaliana</i>
<b><i>Atncbp-1</i></b>	Gen para la mutante nula de nCBP de <i>A. thaliana</i>
<b><i>Avr</i></b>	Gen o proteína de avirulencia
<b>BGLU</b>	β-glucosidasa
<b>cDNA</b>	Acido desoxiribonucleico complementario
<b>C-terminal</b>	Región carboxilo terminal
<b>DNA</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>eIF4E-T</b>	Proteína transpotadora de eIF4E
<b>eIFs</b>	Factores de iniciación de la traducción eucariontes
<b>ER</b>	Retículo endoplasmático
<b>FMI</b>	Genes de identidad del meristemo floral
<b>GDP</b>	Guanosina di-fosfato
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente
<b>GI</b>	Genes integradores
<b>GST</b>	Glutation S-transferasa
<b>GTP</b>	Guanosina tri-fosfato
<b>HSPs</b>	Proteínas de choque térmico
<b>IPTG</b>	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
<b>JAL</b>	Lectina relacionada a jacalina
<b>KDa</b>	Kilodaltones
<b>LC/MS/MS</b>	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
<b>LRR</b>	Repeticiones ricas en leucina
<b>NB-LRR</b>	Proteína con repeticiones ricas en leucina con dominio de unión a nucleótido
<b>MeJA</b>	Metil jasmonato
<b>Met-tRNA<sub>i</sub></b>	Ácido ribonucleico de transferencia para metionina

<b>MJRL</b>	JAL específicas a manosa
<b>NCBI</b>	Centro Nacional de Información Biotecnológica
<b>N- terminal</b>	Región amino terminal
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBs</b>	Cuerpos P o de procesamiento
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PLCP</b>	Cisteína proteasas parecidas a papaína
<b>poli(A)</b>	Secuencia de poliadenina
<b>PR</b>	Proteínas de resistencia
<b>RBPs</b>	Proteínas de unión a RNA
<b>RD21a</b>	Cisteína proteasa de respuesta a desecación 21a
<b>RIP</b>	Inmunoprecipitación proteína-RNA
<b>RNA<sub>m</sub></b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>RNPs</b>	Complejos ribonucleoprotéicos
<b>SGs</b>	Gránulos de estrés
<b>TAIR</b>	El Fondo de Información de <i>Arabidopsis</i>
<b>TUA</b>	$\alpha$ -tubulina
<b>TUB</b>	$\beta$ -tubulina
<b>VPg</b>	Proteína unida covalentemente al genoma viral
<b>WT</b>	Tipo silvestre

## 1. RESUMEN.

Un mecanismo importante de la regulación de la traducción en eucariontes involucra al factor de inicio de la traducción, eIF4E, que se une al 5' Cap (<sup>7</sup>mGTP) del RNAm para reclutar al complejo de inicio de la traducción (43S) y proceder al escaneo de la región 5'UTR del RNAm hacia el codón de inicio. La mayoría de los genomas de los organismos eucariontes tienen más de una secuencia similar a eIF4E. En plantas superiores se han encontrado tres miembros de la familia eIF4E: eIF4E, eIF(iso)4E y la proteína novedosa de unión a 5' Cap nCBP. Este último es capaz de unirse al 5' Cap con mayor afinidad que eIF4E y eIF(iso)4E, sin embargo tiene una baja actividad traduccional, sugiriendo que podría tener una función diferente a los demás factores, tal como el secuestro de RNAm para evitar su traducción. La caracterización fenotípica de una mutante homociga para nCBP en *Arabidopsis thaliana* (*Atncbp-1*) presenta un retraso en el tiempo de floración sugiriendo que nCBP participa en la regulación de la expresión génica en las vías de floración. Además, la sobreexpresión de nCBP induce la formación de gránulos citoplasmáticos aún no identificados. Por otra parte, estudios con ortólogos de nCBP en otros organismos han demostrado que estas proteínas participan en la traducción y represión traduccional selectivas. El propósito del presente trabajo es determinar si nCBP participa en la formación de complejos ribonucleoprotéicos específicos involucrados en la regulación del desarrollo, diferenciación o respuesta al ambiente de *A. thaliana*. Para demostrar lo antes mencionado, se generó una proteína recombinante GST-nCBP que es funcional; ya que es capaz de unirse al 5' Cap. Esta proteína recombinante se utilizó para ensayos de "Pull Down" y generación de anticuerpos policlonales anti-nCBP. Los resultados de los ensayos de "Pull Down" indican que nCBP forma complejos protéicos con proteínas involucradas en la respuesta a estrés, aunque las proteínas identificadas también participan en otros procesos biológicos como desarrollo y crecimiento de la planta. Por ello no se descarta la participación de nCBP en este tipo de procesos y no necesariamente en respuesta a estrés. Los anticuerpos policlonales anti nCBP generados reconocen a la proteína endógena por lo que podrían ser utilizados en futuros ensayos de inmunodetección e inmunoprecipitación proteína-RNA (RIP) para identificar a los RNAm que son reconocidos por nCBP y determinar si hay una traducción o represión selectiva en plantas como ya se ha reportado en animales.

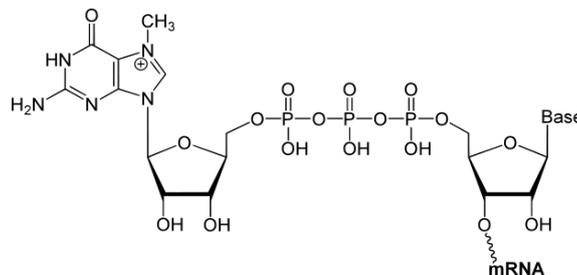
Palabras clave: Traducción, 5' Cap, factores de inicio de la traducción (eIFs), nCBP, complejos ribonucleoprotéicos (RNPs).

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. El proceso de traducción en eucariontes.

La expresión génica es fundamental para entender el funcionamiento de los seres vivos. Esta expresión es regulada a varios niveles, incluyendo la transcripción del RNA mensajero (RNAm), el procesamiento de este en un transcrito maduro y la traducción de dicho transcrito a una proteína (Muench *et al.*, 2012). En eucariontes la traducción de los RNAm consta de tres pasos esenciales regulados por diferentes grupos de proteínas denominadas factores de iniciación, elongación y terminación (Jackson *et al.*, 2010). Se considera que la regulación durante el inicio de la traducción es más estricta, ya que es el paso donde se recluta el RNAm hacia el ribosoma. Este evento es mediado por los factores de iniciación eucariontes (eIFs; Pestova *et al.*, 2007).

Los RNAm de eucariontes se distinguen por la presencia en su extremo 5' de una estructura formada por una guanina metilada en la posición 7, conectada al primer nucleótido del RNAm por un puente trifosfato, llamada 7-metilguanósina-tri-fosfato (<sup>7</sup>mGTP) o capuchón (5' Cap) (figura 1) y en el extremo 3' una secuencia de poliadeninas [poli(A)]. Ambos extremos actúan sinérgicamente ayudando al proceso de inicio de la traducción (Marcotrigiano *et al.*, 1997).



**Figura 1. Estructura del 7-metilguanósina-tri-fosfato (<sup>7</sup>mGTP) unido covalentemente al mRNA.** En todos los eucariontes esta estructura se encuentra en el extremo 5' de los RNAm y sirve para reclutar los factores de iniciación de la traducción.

El proceso de la traducción inicia con la unión del complejo ternario compuesto por eIF2/GTP/Met-tRNA<sub>i</sub> a la subunidad pequeña 40S del ribosoma formando el complejo de pre-iniciación 43S. Este complejo también contiene a eIF1, eIF1A, eIF3 y eIF5 (complejo multifactorial), donde varios de los factores son reclutados por eIF3 (oligómero formado por 7 hasta 12 subunidades diferentes) (Preiss y Hentze, 2003; Lorsch y Dever, 2010; Jackson *et al.*, 2010).

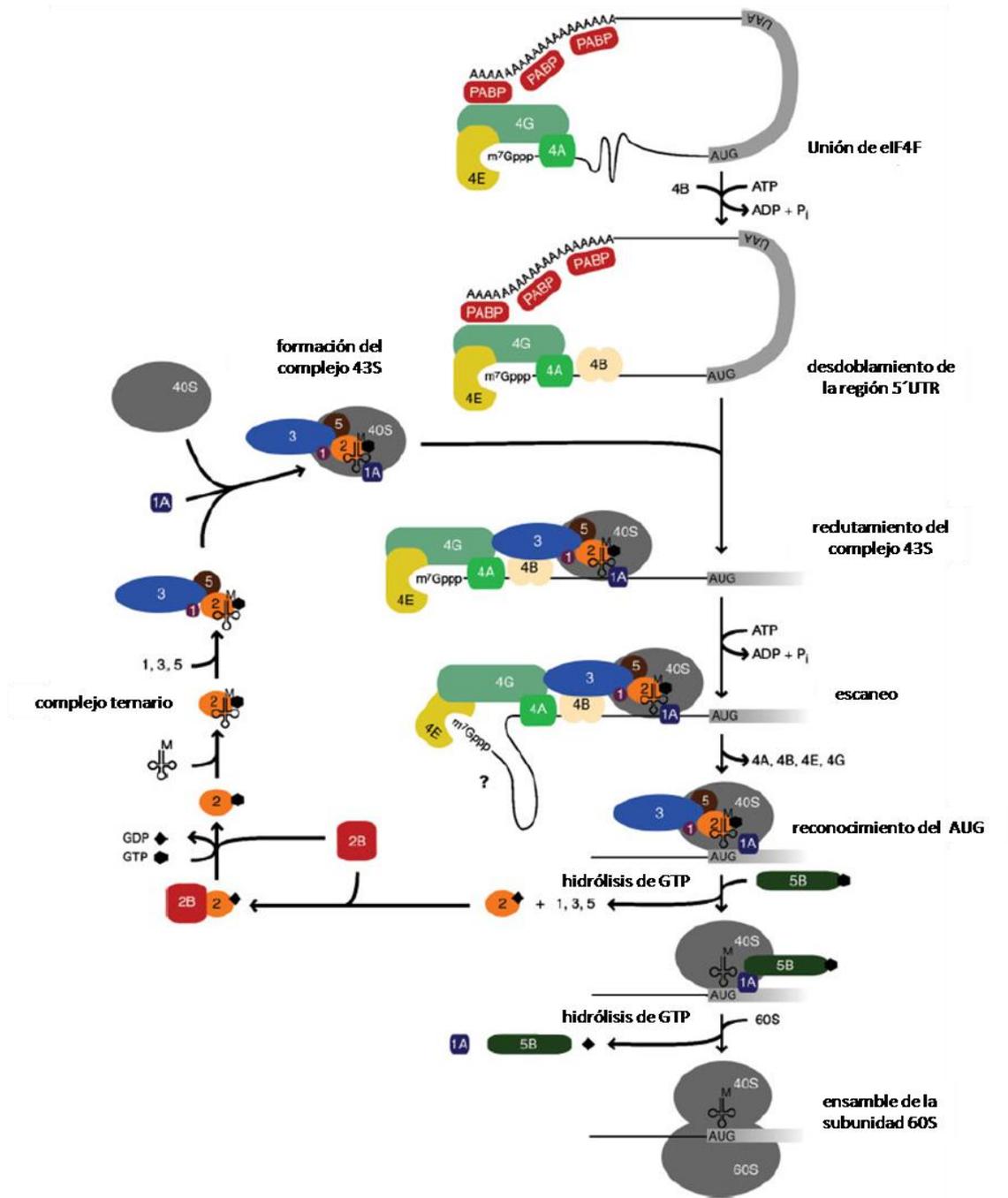
Por otra parte, eIF4E es capaz de reconocer al Cap del RNAm, y unirse establemente al mismo en presencia de eIF4G y eIF4A para formar el complejo heterotrimérico eIF4F (Preiss y Hentze, 2003; Jackson *et al.*, 2010). eIF4G es una proteína de andamiaje que contiene dominios de interacción proteína-proteína y es responsable de interaccionar con eIF4A, eIF3 y la proteína de unión a poli(A), PABP. eIF4A es una helicasa de RNA ATP-dependiente que puede desenrollar estructuras secundarias cercanas al 5' Cap del RNAm. En el extremo 5' Cap del RNAm, cerca de eIF4F, se une eIF4B para estimular la actividad de eIF4A (Preiss y Hentze, 2003; Goodfellow y Roberts, 2008).

El complejo de pre-iniciación 43S es reclutado hacia el RNAm unido a eIF4F para formar el complejo de inicio de la traducción 48S mediante interacción entre eIF3 y eIF4G (figura 2). El complejo 48S se mueve a lo largo de la región no traducible 5' (5'UTR) ayudado por la hidrólisis de ATP mediante eIF4A hasta encontrar el codón de inicio (AUG) del RNAm. El codón AUG en contexto apropiado (ACCAUGG; secuencia Kozac) es reconocido por medio de eIF1 y eIF1A y, el complejo 48S se detiene. El apareamiento adecuado entre el codón de inicio AUG y el anticodón del Met-tRNA<sub>i</sub> promueve cambios conformacionales en los factores y la subunidad 40S, lo que conlleva a la hidrólisis de GTP por eIF2 con la ayuda de eIF5. En este paso se liberan eIF1, eIF3, eIF5 y eIF2/GDP. La GTPasa eIF5B/GTP se une a la subunidad 40S y a eIF1A ocasionando la atracción de la subunidad 60S para ensamblar el ribosoma 80S, el cual una vez ensamblado, promueve hidrólisis de GTP y liberación de eIF5B y eIF1A (figura 2; Preiss y Hentze, 2003; Jackson *et al.*, 2010; Lorsch y Dever, 2010).

El acercamiento entre los extremos 5' y 3' del RNAm mediante la interacción eIF4E-eIF4G-PABP brinda una estructura pseudo-circular al complejo de inicio de la traducción facilitando el reciclaje de los ribosomas una vez que terminan la traducción e incrementando la estabilidad del RNAm (Preiss y Hentze, 2003).

En animales, hay dos pasos que se encuentran estrictamente regulados durante el inicio de la traducción. Uno de los pasos involucra al complejo ternario eIF2/GTP/Met-tRNA<sub>i</sub>; el segundo al complejo eIF4F unido al 5'Cap (Jackson *et al.*, 2010). En el primer paso, la limitante es que durante el inicio de la traducción se libera eIF2/GDP y se requiere a eIF2B (una proteína intercambiadora de Guanina) para recuperar eIF2/GTP que será utilizado nuevamente en un complejo ternario eIF2/GTP/Met-tRNA<sub>i</sub>. En condiciones de estrés, las células animales bajan sus niveles de traducción mediante la fosforilación de eIF2, la cual promueve un complejo inactivo

eIF2/GDP/eIF2B y depleción de complejo ternario. Para el segundo paso, en animales se han encontrado proteínas que unen a eIF4E (4E-BPs) e inhiben competitivamente su asociación con eIF4G. De esta manera, las células pueden regular la disponibilidad de eIF4F para la traducción activa.



**Figura 2. Inicio de la traducción dependiente de 5' Cap en eucariotes.** El complejo eIF2/GTP/Met-tRNA<sub>i</sub> se une a la subunidad ribosomal 40S y a eIF3 formando el complejo 43S. El complejo de factores eIF4F reconoce al RNAm y mediante la interacción entre eIF4G y eIF3 se recluta al complejo 43S para formar el complejo 48S. Enseguida se realiza el escrutinio de la región 5'UTR hasta localizar el codón de inicio AUG en contexto apropiado. Entonces por la hidrólisis de GTP, se disocian varios factores y se une la subunidad ribosomal 60S para iniciar la traducción. Tomado y modificado de Preiss y Hentze, 2003.

En plantas, no se han comprobado estos dos niveles de regulación. Por un lado, solamente se ha encontrado una de las 4 cinasas descritas para animales que son capaces de fosforilar a eIF2 en respuesta a condiciones de estrés. Por otra parte, aunque se ha reportado interacción de eIF4E con proteínas diferentes a eIF4G, no se ha demostrado que estas sean capaces de competir con eIF4G por la unión a eIF4E, ni que tengan un efecto en la traducción de RNAm *in vivo* (Echevarría-Zomeño *et al.*, 2013).

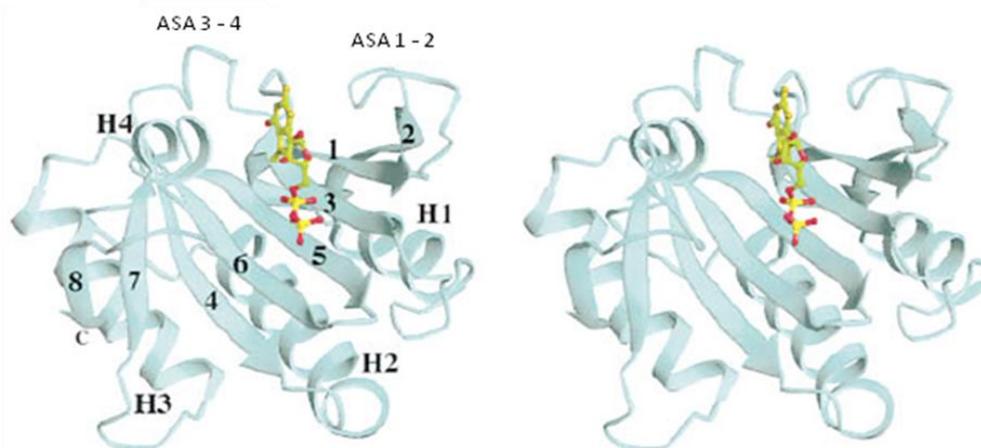
## 2.2. La familia de proteínas eIF4E.

En eucariontes eIF4E es el factor general de inicio de la traducción que interacciona con la estructura 5' Cap para reclutar el RNAm al ribosoma y ha sido estudiado en múltiples organismos. Alineamientos globales de las secuencias de nucleótidos de diversos *eIF4Es* han demostrado que los miembros de esta familia están representados en los taxones Metazoa, Viridiplantae, Fungi y Protista. Por otra parte la comparación entre la secuencia de aminoácidos de eIF4E de mamíferos, plantas y el hongo *S. cerevisiae* sugiere una secuencia núcleo o "core" muy conservada, representada por aproximadamente 160 a 170 residuos de aminoácidos. Este núcleo abarca desde la histidina (H) 37 hasta la H 200 (numeración acorde a *H.sapiens* y *M.musculus*). La secuencia consenso de esta región se resume en los residuos conservados de triptófano (W), fenilalanina (F) e histidina (H) en el patrón 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, en donde x es cualquier aminoácido (Joshi *et al.*, 2005). Se considera que esta secuencia es suficiente para la unión a 5' Cap, al factor eIF4G, a las proteínas 4E-BPs y la proteína transportadora de eIF4E (eIF4E-T) (von der Haar *et al.*, 2004; Joshi *et al.*, 2005; Jackson *et al.*, 2010). La secuencia de aminoácidos completa de los eIF4Es varía entre 200 y hasta 600 en algunos protozoarios, siendo las regiones N- y C-terminal variables en cuanto a composición y tamaño y quizás estén involucradas en la regulación de la actividad o afectando la estabilidad de la proteína (Joshi *et al.*, 2005; Jagus *et al.*, 2012).

### 2.2.1. Estructura del sitio de unión a <sup>7</sup>mGTP de los factores eIF4E.

Por medio de cristalografía se ha determinado la estructura de la proteína eIF4E de ratón (Marcotrigiano *et al.*, 1997), levadura (Matsuo *et al.*, 1997), trigo (Monzingo *et al.*, 2007) y humano (Tomoo *et al.*, 2003). Estas estructuras muestran que eIF4E es una molécula en forma de mano ahuecada o guante de beisbol, consistente de un dominio  $\alpha/\beta$ , sus elementos secundarios incluyen 3 hélices  $\alpha$  (H) largas y una corta y 8 láminas  $\beta$  anti-paralelas (S) arregladas en el siguiente orden S1-S2-H1-S3-S4-H2-S5-

S6-H3-S7-H4-S8. Las 8 láminas  $\beta$  forman una curvatura, las 3 hélices  $\alpha$  largas se posicionan prácticamente paralelas por arriba y en la misma orientación de las láminas  $\beta$ . El sitio de unión al ligando (ranura de unión a 5' Cap) es generado por la superficie cóncava de las láminas  $\beta$ , la hélice  $\alpha$  corta y el asa que conecta a las láminas  $\beta$  1 y 2. El hueco es cerrado en uno de sus extremos por el asa que conecta a las láminas  $\beta$  3 y 4, quedando el otro extremo abierto para la unión al ligando (figura 3) (Marcotrigiano *et al.*, 1997).

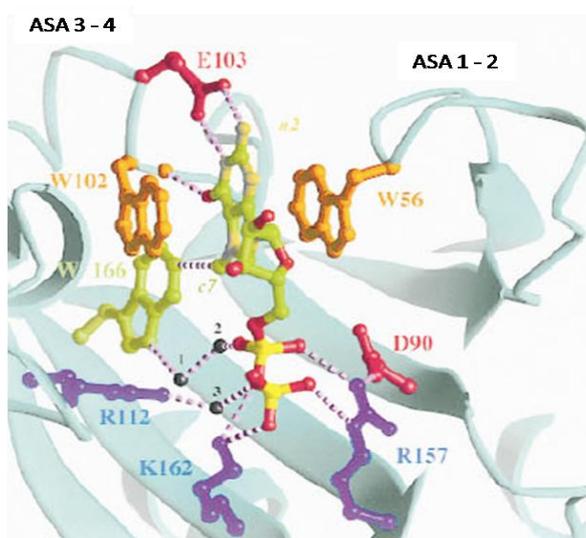


**Figura 3. Estructura de la región núcleo del factor eIF4E en eucariontes.** La estructura está basada en la secuencia de aminoácidos 28-217 del eIF4E murino. Se muestra la superficie cóncava del sitio de unión del  $^7\text{mGDP}$  al factor eIF4E; el  $^7\text{mGDP}$  se incluye en amarillo localizado en la ranura de unión al 5' Cap. Las hélices  $\alpha$  son marcadas como H1 - H4 y las láminas  $\beta$  con números 1 - 8 y el extremo C-terminal como c. Tomado y modificado de Marcotrigiano *et al.*, 1997.

El 66% de los aminoácidos (120 de los 182 que forman el núcleo) son altamente conservados, el alto nivel de identidad en la composición de aminoácidos de las secuencias reportadas y su análisis filogenético, permiten concluir que todos los eIF4Es se pliegan en la misma estructura tridimensional (Marcotrigiano *et al.*, 1997).

La formación del complejo eIF4E- $^7\text{mGDP}$  es una representación de la unión de una proteína a una base alquilada, donde la base alquilada queda en medio de los triptófanos (W) 56 y 102 de las asas S1-S2 y S3-S4 respectivamente (Marcotrigiano *et al.*, 1997; Tomoo *et al.*, 2003; von der Haar *et al.*, 2004). La interacción molecular entre la base alquilada y los W es de tipo  $\pi$ - $\pi$ ; cuando estos dos W son sustituidos por leucina (L) se abate la unión a 5' Cap, y cuando son sustituidos por P se reduce la unión a 5' Cap en un 50% o más. Por otra parte el oxígeno 6 (O6) forma un puente de hidrógeno con el grupo amino del W102, mientras que el nitrógeno 1 y 2 (N1 y N2) forman otros dos puentes de hidrógeno con los átomos de oxígeno carboxilados del ácido glutámico 103 (E); además el grupo metilo del N7 forma interacciones de van der

Waals con el anillo del W 166. En cuanto a la ribosa y a los grupos fosfato, estos se extienden desde el fondo hacia la entrada de la ranura de unión a 5' Cap y son estabilizados por puentes salinos y puentes de hidrógeno mediados por agua. Sin excepción, los W 56, 102 y 166 y el E 103 hacen contacto con el <sup>7</sup>mG y son conservados en todas las secuencias conocidas de eIF4E. Además la arginina (R) 157 que interactúa con los dos grupos fosfato también es conservada al igual que el ácido aspártico (D) 90 que estabiliza a la R 157 por puente salino. Finalmente, la R 112 y la lisina (K) 162 forman puentes de hidrógeno mediados por agua con los grupos fosfato (figura 4) (Marcotrigiano *et al.*, 1997).



**Figura 4. Estructura del complejo eIF4E-<sup>7</sup>m-GDP en eucarionotes.** La estructura muestra al <sup>7</sup>mGDP en la ranura de unión a 5' Cap, en donde se marcan los aminoácidos involucrados en el reconocimiento del 5' Cap. Los puentes de hidrógeno, interacciones de van der Waals y puentes salinos se representan con líneas punteadas, las tres moléculas de agua son marcadas con 1, 2 y 3. Tomado y modificado de Marcotrigiano *et al.*, 1997.

### 2.2.2. Clasificación de los factores tipo eIF4E.

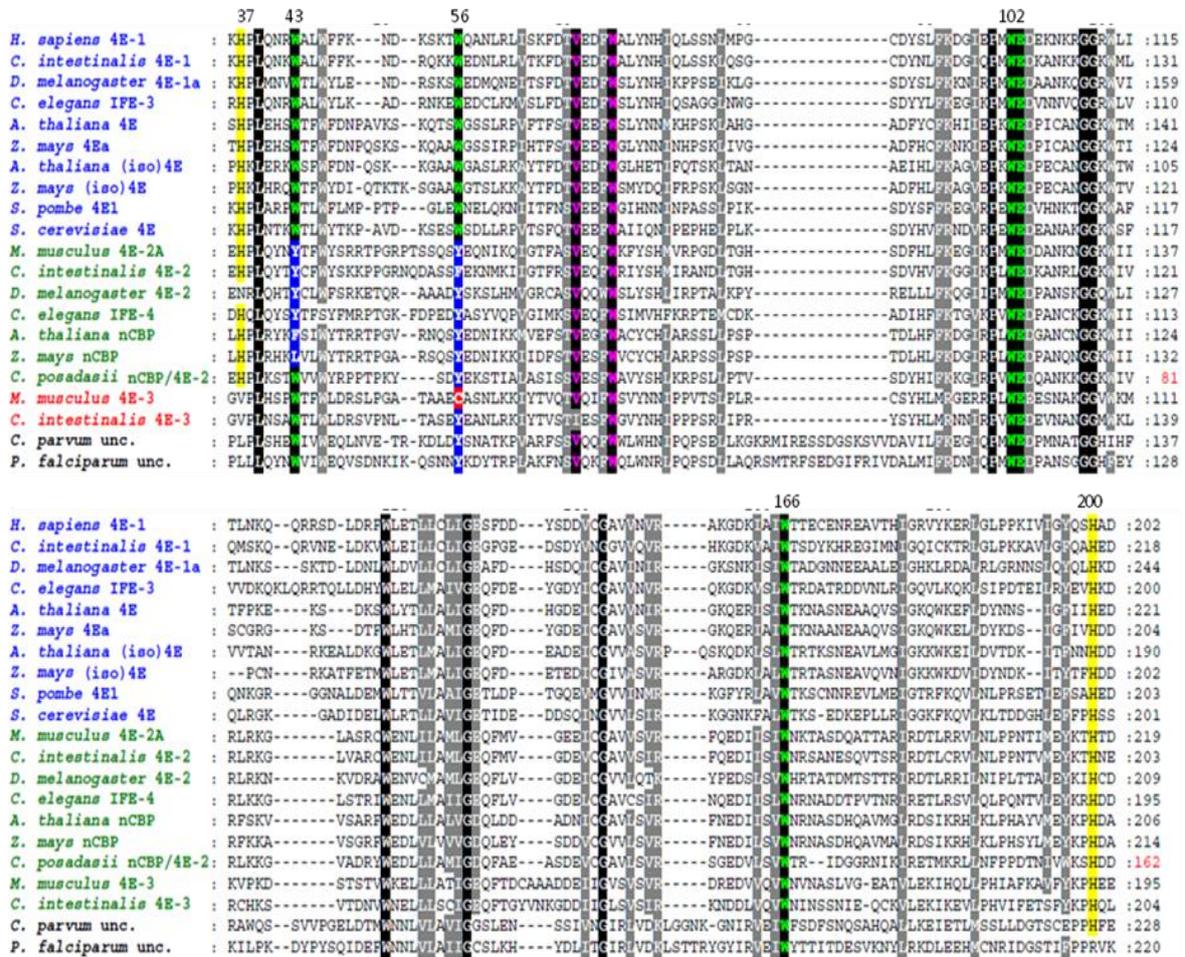
La mayoría de los genomas de organismos eucarionotes presenta múltiples copias génicas que codifican proteínas similares a eIF4E, formando familias de proteínas estructuralmente relacionadas dentro de un organismo en particular. La diversidad de funciones de las proteínas relacionadas a eIF4E aún no es completamente entendida. Aunque resulta obvio que al menos un miembro de la familia eIF4E por organismo actúa como factor de inicio de la traducción global, otros podrían encargarse de reclutar un grupo particular de RNAm, tener una actividad parcial, o incluso participar como inhibidores traduccionales. Los datos sugieren que la secuencia de eIF4E ha sido duplicada varias veces durante la evolución y las proteínas resultado de estas secuencias que son estructuralmente similares se han agrupado en tres clases principales: I, II y III (figura 5) (Joshi *et al.*, 2005).

Los miembros de la clase I se han identificado en todos los organismos eucariontes y conservan los residuos de W 43 y W 56 respecto a el eIF4E-1 de *H. sapiens*; en esta clase se incluyen eIF4E-1 de metazoarios, eIF4E (p26) y eIF(iso)4E (p28) de plantas y eIF4E de hongos. Estos miembros tienen aproximadamente 35-40% de identidad y 60-65% de similitud entre sí (Joshi *et al.*, 2005). Los miembros de esta clase son canónicos para actuar en la traducción ya que son capaces de unirse al 5' Cap, a eIF4G, y en algunos casos a las 4E-BPs; por ejemplo el eIF4E-1 de mamíferos (Joshi *et al.*, 2004), eIF4E-1B de *Danio rerio* (Robalino *et al.*, 2004), eIF4E y eIF(iso)4E en plantas (Browning, 2004) e IFE-1 -2, -3 y -5 de *Caenorhabditis elegans* (Keiper *et al.*, 2000; Syntichaki *et al.*, 2007).

Los miembros de la clase II difieren de los de la clase I en que los W 43 y 56 (respecto eIF4E-1 de *H. sapiens*) son sustituidos por otros aminoácidos hidrofóbicos como tirosina (Y), F o L. En esta clase se incluye a la familia eIF4E-2 de Metazoa y la familia nCBP de Viridiplantae. En algunos hongos patógenos del sub-filum Pezizomycotina se pueden encontrar algunos miembros de esta clase, pero están ausentes en ascomicetos. La comparación de la secuencia de aminoácidos en la región núcleo muestra que hay aproximadamente 50% de identidad y 70-80% de similitud entre los miembros de la clase II, así como un 30-35% de identidad y 60-65% de similitud con los de la clase I (Joshi *et al.*, 2005). Estudios bioquímicos han revelado que las proteínas de clase II, tales como eIF4E-2A (*H.sapiens* y *M. musculus*), IFE-4 (*C. elegans*), 4EHP (*D. melanogaster*) y nCBP (*A. thaliana*), son capaces de unirse a la estructura 5' Cap, pero su capacidad de interacción con eIF4G y participación en la traducción es variable. Mientras que eIF4E-2A y 4EHP aparentemente no interactúan con eIF4G, ni pueden complementar una cepa de *S. cerevisiae* mutante para su eIF4E endógeno (Rom *et al.*, 1998; Joshi *et al.*, 2004; Hernández *et al.*, 2005), sus ortólogos en *C. elegans* y *A. thaliana* muestran interacción con eIF4G y pueden funcionar en traducción activa (Ruud *et al.*, 1998; Dinkova *et al.*, 2005). Acorde a esto se ha propuesto que miembros de la clase II de eIF4E podrían tener un papel en la regulación de la traducción.

Finalmente, los miembros de clase III se caracterizan por tener una cisteína (C) o tirosina (Y) en la posición equivalente al W 56 del eIF4E-1 de *H.sapiens*. Estos miembros tienen entre el 25-30% de identidad y 45-55% de similitud con los de clase I y II; y solo han sido encontrados en algunos metazoarios, nidarios, moluscos, insectos y arácnidos (Joshi *et al.*, 2005). Estudios con eIF4E-3 de *M. musculus* han mostrado que la proteína interactúa con la estructura 5' Cap *in vitro*, sugiriendo que la presencia

de un solo residuo aromático es suficiente para la interacción con el 5' Cap. Además, eIF4E-3 puede interactuar con eIF4G, pero no con las 4E-BPs sugiriendo que participa en la traducción. Sin embargo, esta proteína no es capaz de complementar una cepa de *S. cerevisiae* mutante para su eIF4E endógeno (Joshi *et al.*, 2004).



**Figura 5. Clasificación de los factores eIF4E.** Se presenta la comparación de la secuencia de aminoácidos de la región núcleo de diferentes organismos. Los aminoácidos en los que se basó esta clasificación fueron los W43 y 56 equivalentes al eIF4E de clase I de *H. sapiens*. En los factores de clase I (azul) se conservan ambos W, en los de clase II (verde) ambos W son sustituidos por Y, F o L y en los de clase III (rojo) solo el W56 es sustituido por Y o C. Tomado de Joshi *et al.*, 2005.

### 2.2.3. Los factores tipo eIF4E en plantas.

Como se mencionó anteriormente, en plantas se han encontrado diferentes miembros de la familia eIF4E:, dos pertenecientes a la Clase I: eIF4E que es ortóloga a eIF4E-1 de mamíferos, eIF(iso)4E que comparte alrededor del 50% de identidad a nivel de secuencia de aminoácidos con eIF4E (Browning *et al.*, 1987; Patrick y Browning, 2012); y nCBP de la Clase II (Ruud *et al.*, 1998) que comparte alrededor del 32% de identidad a nivel de secuencia de aminoácidos con eIF4E (Joshi *et al.*, 2005).

Secuencias que representan a los genes *eIF4E* y *eIF(iso)4E* se encuentran en Angiospermas del taxón Viridiplantae sugiriendo que los genes se derivan de un evento temprano de duplicación en las plantas con flores (Hernández *et al.*, 2005; Patrick y Browning, 2012). Las proteínas correspondientes han sido estudiadas en varios tipos de plantas: trigo, arroz, maíz, tabaco, *Arabidopsis* entre otras. Cada una de estas proteínas forma complejos diferentes, eIF4F y eIF(iso)4F, mediante su interacción con las correspondientes proteínas eIF4G y eIF(iso)4G (Browning *et al.*, 2004; Bush *et al.*, 2009; Patrick y Browning, 2012). Ambos complejos tienen actividades similares en modelos de traducción *in vitro*, pero sus respectivos componentes son expresados diferencialmente, sugiriendo papeles divergentes durante el desarrollo y en respuesta a diferentes estímulos medioambientales (Rodríguez *et al.*, 1998; Dinkova *et al.*, 2011).

Por otra parte, eIF4E y eIF(iso)4E presentan selectividad en el reconocimiento de estructuras 5' Cap mono y di-metiladas, respectivamente (Carberry *et al.*, 1991); en la distribución tisular durante el desarrollo de las plantas (Rodríguez *et al.*, 1998; Dinkova y Sanchez de Jimenez, 1999), en la traducción de RNAm específicos (Dinkova *et al.*, 2011; Martínez-Silva *et al.*, 2012) y en su interacción con ciertas proteínas de virus de plantas (Robaglia y Caranta, 2006). Se ha encontrado que eIF4E es expresado ubicuamente a lo largo del desarrollo de *A. thaliana* (a excepción de tejidos en zonas especializadas de la raíz), mientras que eIF(iso)4E es expresado abundantemente en meristemos de raíz y flores. Esto sugiere que estas proteínas desempeñan una función específica en las plantas. Sin embargo, estudios con mutantes parciales para eIF4E o eIF(iso)4E en *A. thaliana* y en otras especies vegetales indicaron que las plantas son viables en ausencia del producto de alguno de estos dos genes, sugiriendo que también muestran cierta redundancia en su función (Duprat *et al.*, 2002; Combe *et al.*, 2005 y Sato *et al.*, 2005). Por otra parte, aunque tanto eIF4E como eIF(iso)4E de *A. thaliana* son capaces de complementar una cepa de *S. cerevisiae* mutante para su eIF4E endógeno, el crecimiento de la cepa complementada muestra cierto retraso en el crecimiento respecto a la cepa silvestre (Rodríguez *et al.*, 1998).

Existen dos reportes en la literatura sobre el único miembro de la clase II de eIF4E en plantas, nCBP. En un primer trabajo, nCBP fue designada como proteína novedosa de unión a Cap y se analizó su habilidad de interacción con <sup>7</sup>mGTP, eIF4G y recuperación de la traducción en el sistema de germinado de trigo depletado de eIF4E y eIF(iso)4E (Ruud *et al.*, 1998). Los resultados indicaron que nCBP podría funcionar como un factor de inicio de la traducción canónico, sin embargo su mayor afinidad al <sup>7</sup>mGTP y

menor actividad en traducción respecto a eIF(iso)4E sugirieron que su función in vivo podría ser diferente a los factores de Clase I. Por otra parte, Bush *et al.*, 2009 encontraron que nCBP se encuentra particularmente abundante en complejos de unión a <sup>7</sup>mGTP aislados de cultivos celulares en crecimiento activo, así como en zonas meristemáticas de hojas de *A. thaliana*.

### **2.3. Los factores eIF4E no solo participan en la traducción.**

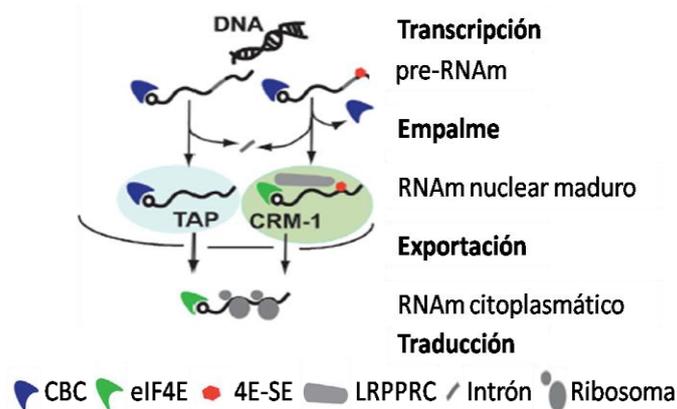
#### **2.3.1 Exportación nuclear de mRNAs mediada por eIF4E.**

En animales, eIF4E-1 es el factor más abundante de los eIFs y bioquímicamente funciona en dos niveles: (1) la traducción y (2) exportación de RNAm del núcleo hacia el citoplasma, ambos procesos dependientes de su reconocimiento del 5' Cap (Culjkovic *et al.*, 2007). Dado el papel tan importante que tiene eIF4E, no es sorprendente que sea un importante blanco para la regulación de la expresión génica en eucariontes. Recientemente se ha propuesto una hipótesis de regulación post-transcripcional llamada "Regulón del RNA", la cual propone que los RNAm contienen secuencias código en las regiones 5' y 3' UTR llamadas "elementos de secuencias no traducibles para la regulación" (USER), que permiten la unión de proteínas específicas para formar complejos de regulación traduccional (Keene y Langer, 2005; Keene, 2007). Esos complejos reguladores podrían ser proteínas involucradas en la exportación de RNAm del núcleo, en la estabilidad del RNAm en compartimentos celulares tales como cuerpos de procesamiento (PBs) o gránulos de estrés (SGs), así como en la entrada preferencial al ribosoma o secuestro de transcritos de la maquinaria traduccional (Andrei *et al.*, 2005; Anderson y Kedersha, 2006; Culjkovic *et al.*, 2007).

Tradicionalmente eIF4E fue considerado como un factor canónico en el inicio de la traducción, sin embargo algunos estudios indican que una fracción significativa de esta proteína (mas del 68%) reside en el núcleo para regular el transporte de RNAm específicos hacia el citoplasma (Iborra *et al.*, 2001; Andrei *et al.*, 2005; Ferraiuolo *et al.*, 2005; Culjkovic *et al.*, 2007). En células de mamífero, eIF4E-1 regula coordinadamente la exportación de al menos 13 RNAm específicos involucrados en proliferación y sobrevivencia, estos transcritos contienen una secuencia de 50 nucleótidos en la región 3' UTR que forman un par de estructuras tallo-asa conocido como elementos sensibles a 4E (4E-SEs). Los 4E-SEs funcionan como códigos USER en transcritos dependientes de eIF4E (Culjkovic *et al.*, 2005; 2006; 2007; 2008). Se ha encontrado que el RNAm de ciclina D que contiene 4E-SE, aumenta su exportación al citoplasma cuando se sobreexpresa el factor eIF4E, pero no aumenta su traducción

(Rousseau *et al.*, 1996). Por el contrario, la sobreexpresión de eIF4E incrementa la traducción del transcrito del factor de crecimiento epitelial vascular (VEGF) sin alterar su exportación del núcleo (Clemens y Bommer, 1999). Estos resultados sugieren que hay diferentes códigos USER para la traducción y la exportación de RNAm, y por lo tanto un desacoplamiento entre ambas acciones de eIF4E.

Algunos estudios indican que la exportación de RNAm por eIF4E es diferente a la exportación de la mayoría de los RNAm, ya que cuando se depleta el receptor nuclear NXF-1/TAP (involucrado en la exportación canónica de RNAm), no se afecta la exportación de RNAm dependientes de eIF4E, mientras que la exportación del resto de los RNAm sí se ve afectada (Culjkovic *et al.*, 2005; 2006). Por otra parte, se ha demostrado que una proteína rica en leucinas LRPPRC modula positivamente la exportación de RNAm con 4E-ESs de manera dependiente de eIF4E, en donde LRPPRC se une a eIF4E y posteriormente a los 4E-ESs del RNAm, formando un puente de interacción entre eIF4E y 4E-ES e involucrando posiblemente otros factores de exportación, como el receptor de exportación CRM-1 (Topisirovic *et al.*, 2009). La vía de exportación dependiente de eIF4E excluye a los factores involucrados en la exportación de la mayoría de los RNAm, como el complejo nuclear de unión a 5' Cap (CBC) y NXF-1/TAP, sin embargo otros factores como UAP56, hnRNPA-1 y DDX3 son comunes en ambas vías (Moore, 2005; Topisirovic *et al.*, 2009) (figura 6). Por lo que el inicio de la formación de los complejos ribonucleoproteicos (RNPs) nucleares puede ser igual para todos los RNAm y posteriormente habría un proceso de selección de ciertos complejos RNPs que aún es desconocido.



**Figura 6. Modelos del proceso de exportación del núcleo hacia el citoplasma de los RNAm en mamíferos.** El modelo describe las diferencias entre la exportación del grueso de la población de RNAm (izquierda) y los que son dependientes de eIF4E (derecha). Los RNAm con 4E-ESs son procesados de la misma manera que el resto de los RNAm pero son exportados a través de complejos RNP que contienen a eIF4E, CRM-1 y LRPPRC (mostrado en verde) mientras que el resto de los RNAm son exportados por complejos RNP que contienen a CBC y TAP (mostrado en azul). Tomado y modificado de Topisirovic *et al.*, 2009.

### **2.3.2 Papel de eIF4E en el tráfico entre gránulos ribonucleoproteicos (RNPs) citoplasmáticos.**

Una vez en el citoplasma algunos RNAm son programados para su inmediata traducción, proceso en el que hay un remodelamiento de proteínas de unión a 5' Cap y entrada al polisoma. Después de una traducción eficiente, los RNAm son deadenilados, los polisomas son desensamblados y el RNAm es degradado o almacenado. Otros RNAm son programados para una traducción tardía, permitiendo a los transcritos ser transportados y almacenados hasta el momento en que se requiera sean traducidos, en ciertos momentos del desarrollo o por estímulos del medio ambiente. En ambos casos los RNAm son empacados en gránulos RNPs hasta que reanudan su traducción o degradación (figura 7) (Bailey-Serres *et al.*, 2009). En eucariontes hay varios tipos de complejos RNPs detectados por estudios de microscopía como gránulos: (1) Gránulos de células germinales (GCG), que contienen RNAm materno requerido para las especificaciones de células germinales, algunos factores de traducción y degradación de mRNA; gránulos de estrés (SGs), que contienen muchas proteínas del complejo de inicio de la traducción 48S, subunidades ribosomales, chaperonas de RNA y de proteínas y remodeladores de complejos; cuerpos de procesamiento (PBs), que contienen principalmente proteínas de la maquinaria de degradación de RNA pero comparten algunas proteínas con GSs; y gránulos neuronales, que contienen toda la maquinaria de inicio de la traducción. Curiosamente, sin excepción, todos estos gránulos contienen a eIF4E (Anderson y Kedersha, 2006). El paso de los RNAm de una traducción activa a un proceso de degradación o almacenaje involucra eventos de remodelaje de complejos RNPs en donde participan factores que interactúan con los extremos 5' y 3' UTRs de los RNAm, como los eIFs (Tharun y Parker, 2001). Sin embargo, aún no es del todo claro si los eIFs son requeridos para la formación de gránulos citoplasmáticos.

Estudios en células humanas y de *Drosophila melanogaster* han demostrado que la proteína eIF4E se encuentra en PBs, a diferencia de otras proteínas involucradas en la traducción como eIF4G, eIF4A y eIF4B, por lo que se ha descartado que haya complejos traduccionalmente activos en estos gránulos. La presencia de eIF4E pero no de eIF4G indica que eIF4E quizás juegue un papel importante en la transición de un RNAm traduccionalmente activo a un RNAm destinado a la degradación (Andrei *et al.*, 2005; Ferrero *et al.*, 2012). Esto concuerda con reportes que han demostrado que la proteína nuclear transportadora de eIF4E (eIF4E-T) interacciona con eIF4E (Strudwick y Borden, 2002; Rong *et al.*, 2008), en el mismo sitio en el que interactúa eIF4G, posiblemente inhibiendo la traducción y promoviendo la degradación del

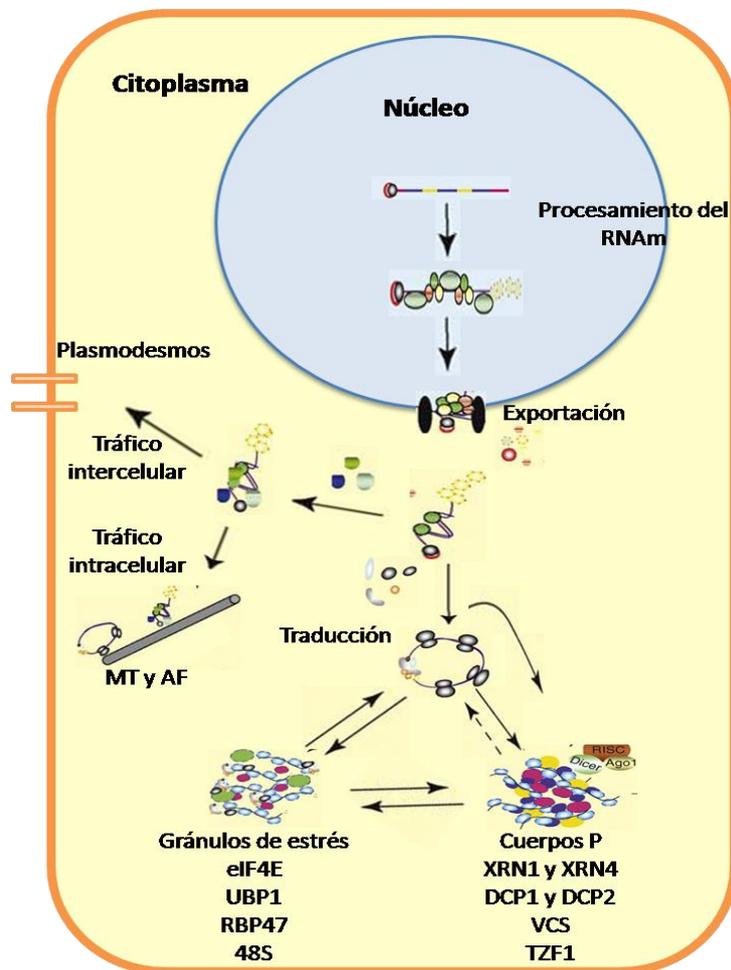
RNA<sub>m</sub>. En apoyo a esto, se encontró que eIF4E-T se localiza en PBs sugiriendo que la interacción entre eIF4E y eIF4E-T podría ocurrir en el núcleo o en el citoplasma, arrojando la traducción de ciertos mensajeros y llevándolos a PBs para establecer interacción con otras proteínas, como la helicasa DEAD box rck/p54, y formar complejos dinámicos de degradación. Curiosamente, cuando se reprime a eIF4E, eIF4E-T o Rck/p54 se inhibe la acumulación de otros factores de degradación como Dcp-1, Xrn-1 y Crc-4 en los PBs, siendo el cambio más notorio con la disminución de eIF4E. Estos datos indican que la interacción de eIF4E-T o Rck/p54 con eIF4E es muy importante para el remodelaje de los complejos RNP que formarán PBs (Andrei *et al.*, 2005).

Cabe señalar que la presencia de eIF4E en PBs sugiere que la degradación del RNA<sub>m</sub> no es inmediata, y que estos RNA<sub>m</sub> podrían ser almacenados formando complejos RNP inactivos, antes de determinarse el destino final del RNA<sub>m</sub> por subsecuentes pasos de remodelaje de los complejos RNP (Schwartz y Parker, 2000; Vilela *et al.*, 2000; Andrei *et al.*, 2005). Finalmente, se ha reportado que la proteína LRPPRC ayuda a la localización de eIF4E dentro del núcleo y la disminución de LRPPRC induce la formación de PBs, incrementando la acumulación de eIF4E en esas estructuras. Esto sugiere que LRPPRC funciona regulando la actividad de eIF4E en la exportación y traducción de RNA<sub>m</sub> con 4E-ESs (Topisirovic *et al.*, 2009).

Bajo ciertas condiciones no fisiológicas como estrés térmico o químico, se acumulan en el citoplasma estructuras RNPs inactivas llamadas gránulos de estrés (SGs). Estos gránulos almacenan complejos de inicio de la traducción inactivos que contienen a los factores eIF4E y eIF4G (figura 7) (Kimball *et al.*, 2003; Andrei *et al.*, 2005). Se cree que hay una posible relación entre los PBs y los SGs (Andrei *et al.*, 2005; Buchan *et al.*, 2008; Ferrero *et al.*, 2012); ya que evidencias recientes en *Saccharomyces cerevisiae* sugieren que la formación de PBs precede a la formación de SGs, y los PBs podrían madurar a SGs (Buchan *et al.*, 2008). Apoyando a esta hipótesis, se ha reportado que una fracción citoplasmática del factor eIF4E se moviliza hacia PBs y SGs sin la necesidad del reconocimiento del 5' Cap de los RNA<sub>m</sub>; ya que al mutar el sitio de unión a 5' Cap, ambos tipos de gránulos se forman; sin embargo al mutar el W 73 conservado del sitio de unión de eIF4E con eIF4G, eIF4E-BP y eIF4E-T se inhibe la formación de ambos tipos de gránulos (Ferrero *et al.*, 2012). Otros estudios han demostrado que HSP90 también juega un papel muy importante en la formación de PBs y SGs, y que es requerida para localización de eIF4E y eIF4E-T (Suzuki *et al.*, 2009; Matsumoto *et al.*, 2011). Todos estos datos sugieren que el remodelamiento de

complejos RNPs para formar PBs y SGs muy probablemente requiera de eIF4E y su interacción con otras proteínas como eIF4E-T, eIF4G y HSP90 entre otras, pero no necesariamente del reconocimiento del 5' Cap (Ferrero *et al.*, 2012).

En plantas al igual que en animales una vez que el RNAm es exportado al citoplasma se asocia con una variedad de ribonucleoproteínas para formar los tres principales complejos RNPs: polisomas, PBs y SGs (figura 7) (Bailey-Serres *et al.*, 2009; Davies *et al.*, 2012). Los PBs se caracterizan por tener proteínas de la maquinaria de degradación de RNAm como DCP1 y DCP2, XRN4 y AtTZF1; y los SGs por proteínas como eIF4E, RBP47, UBP1 y proteínas ribosomales (Weber *et al.*, 2008; Pomeranz *et al.*, 2010).



**Figura 7. Los complejos RNPs regulan la expresión génica postranscripcionalmente.** La biogénesis transcripcional está acoplada a eventos de procesamiento del transcrito, que incluyen la unión de diversas proteínas para formar complejos RNPs dentro del núcleo. Posteriormente, estos complejos son exportados hacia el citoplasma, en donde su destino dependerá de proteínas específicas que se unan; así estos pueden ser cargados a polisomas para la traducción activa, a microtúbulos (MT) o filamentos de actina (AF) para su tráfico y transporte intercelular o hacia la formación de gránulos citoplasmáticos, ya sean de degradación (PBs) o de almacenaje (SGs). Tomado y modificado de Bailey-Serres *et al.*, 2009.

Se ha reportado en *A. thaliana* y tabaco que bajo condiciones de estrés por calor e hipoxia aumenta la formación de PBs y SGs, interesantemente al detener la traducción con cicloheximida la formación de estos gránulos disminuye; estos resultados sugieren que: 1) la traducción se reprime y algunos RNAm son liberados de los polisomas para ser llevados a degradación o almacenaje y 2) que los RNAm al ser retenidos en los polisomas no son liberados para la formación de este tipos de gránulos (Weber *et al.*, 2008). Efectos similares se encontraron en *A. thaliana* al ser tratada con metil jasmonato (regulador endógeno de respuesta a estrés en plantas), crecimiento en oscuridad y daño mecánico, en donde aumentó la formación de complejos RNPs en zonas meristemáticas; y en protoplastos de maíz al ser tratados con cicloheximida (Pomeranz *et al.*, 2010). Estos resultados sugieren que la formación de complejos RNPs (PBs y SGs) en células de plantas es altamente regulado, particularmente en respuesta a su medio ambiente.

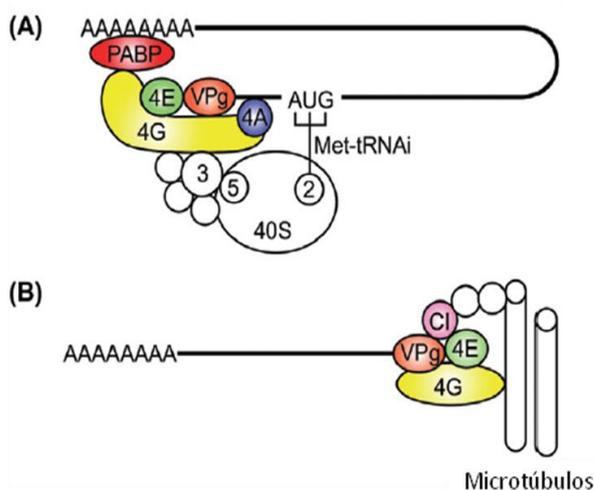
Por otra parte, por medio de colocalización se reveló que al igual que en animales los PBs y los SGs están estrechamente relacionados, sin embargo esto no implica una interacción funcional. Podría ser que los complejos RNPs puedan estar siendo transferidos de SGs a PBs para la degradación del RNAm o de los PBs a SGs para el almacenamiento del RNAm. Curiosamente, un efecto dominante negativo observado en plantas es que la pérdida del factor eIF4E y RBP47 disminuyen la formación de SGs y PBs, implicando que esas proteínas de unión a RNA son componentes esenciales para el ensamble de estos gránulos (Weber *et al.*, 2008), tal como lo reportaron en animales (Ferrero *et al.*, 2012).

### **2.3.3. Papel de eIF4E en la interacción virus-planta.**

En plantas, se ha descrito un papel muy importante de los factores eIF4E y eIF(iso)4E en la colonización por virus. Existe una gran especificidad en la interacción virus-hospedero mediada por estos factores. Se ha propuesto que dicha interacción podría promover la replicación y traducción del genoma viral, así como el movimiento del genoma viral de célula a célula y de tejidos a tejidos (Taliensky *et al.*, 2008). De los 14 genes recesivos de resistencia a virus que han sido clonados de diversas especies de plantas, 12 codifican para factores eIF4E o su isoforma eIF(iso)4E (Wang y Krishnaswamy, 2012).

Se ha reportado que eIF4E y eIF(iso)4E tienen un papel importante durante la infección por virus de la familia *Potyviridae* (Robaglia y Caranta, 2006; Nicaise *et al.*, 2007; Ashby *et al.*, 2011). Aún cuando el mecanismo por el cual eIF4E o eIF(iso)4E

están involucrados en la infección viral no es entendido del todo, se sabe que ambos factores interaccionan con una proteína unida covalentemente al genoma viral (VPg) en el extremo 5' del RNA viral de forma similar al 5' Cap (Grzela *et al.*, 2006; Yeam *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2008). Se ha sugerido que cuando eIF4E interacciona con VPg se inhibe la traducción celular por secuestro del factor por el RNA viral, promoviendo la traducción viral y la subsecuente infección (Miyoshi *et al.*, 2008; Eskelin *et al.*, 2011), por lo que se ha propuesto que VPg es un gen de avirulencia (*Avr*). Por medio de mutaciones de los factores eIF4E y eIF(iso)4E en el sitio de interacción con VPg, se ha demostrado que esta interacción es necesaria para la infección viral (Lellis *et al.*, 2002; Piron *et al.*, 2010; Wang y Krishnaswamy, 2012). Estos datos han provocado un creciente interés en eIF4E y eIF(iso)4E como marcadores de resistencia a la infección viral en plantas (Robaglia y Caranta, 2006). Por ejemplo, eIF4E es necesario para la infección del virus de la vena del trébol amarillo (CIYVV), virus Y de la papa (PVY) y virus de las manchas necróticas del melón (MNSV) entre otros (Decroocq *et al.*, 2006; Charron *et al.*, 2008; Kido *et al.*, 2008). Por su parte eIF(iso)4E pero no eIF4E es requerido para la colonización por el virus del jaspeado del tabaco (TEV), virus del mosaico del nabo (TuMV) y virus del mosaico de la lechuga (LMV) (Lellis *et al.*, 2002; Duprat *et al.*, 2002; Contreras-Paredes *et al.*, 2013). En estos estudios, a estos dos factores se les han atribuido diversas funciones durante la infección viral por su interacción con VPg: (1) traducción por el reclutamiento de la maquinaria de iniciación, (2) protección del RNA viral contra enzimas de degradación y (3) localización apropiada y transporte del RNA en complejos RNPs a través de microtúbulos (figura 8) (Lellis *et al.*, 2002; Okade *et al.*, 2009; Contreras-Paredes *et al.*, 2013). Estos y otros estudios con ortólogos de eIF4E y eIF(iso)4E en diferentes plantas revelan que hay especificidad de cada planta hospedero para el requerimiento de uno de los factores eIF4E ó eIF(iso)4E, ó de ambos, dependiendo del virus que la ataca (Revisado en Truniger y Aranda, 2009; Wang y Krishnaswamy, 2012).



**Figura 8. Modelos de la interacción y función de eIF4E/eIF(iso)4E con VPg.** A. La proteína viral VPg actúa como análogo del 5' Cap para reclutar la maquinaria traduccional y promover la traducción del genoma viral. B. eIF4E interacciona con eIF4G y con una proteína viral implicada en el movimiento y replicación del genoma viral "inclusión cilíndrica" (CI) formando un complejo que posteriormente interacciona con VPg para regular el tráfico del genoma viral a través de los plasmodesmos y favorecer el movimiento de célula a célula. Tomado de Wang y Krishnaswamy, 2012.

### 3. ANTECEDENTES.

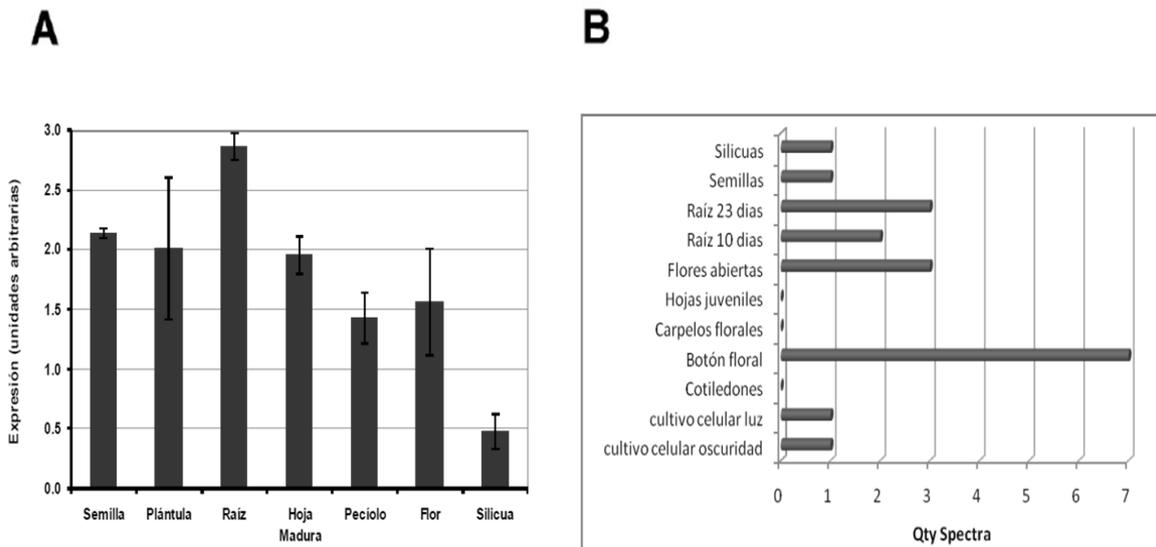
#### 3. 1. La proteína Clase II de la familia eIF4E en plantas, nCBP.

La proteína de tipo eIF4E, nCBP, que pertenece a la clase II (figura 9) se ha caracterizado físico-químicamente en *A. thaliana*. El gen *nCBP* (At5g18110) contiene 6 exones y 5 intrones, y el transcrito codifica para una proteína de 24 KDa. La proteína nCBP se une al 5' Cap con mayor afinidad que las proteínas eIF4E y eIF(iso)4E, y en análisis de doble híbrido se demostró que puede interactuar con eIF4G y eIF(iso)4G y es capaz de recuperar la traducción *in vitro* en ausencia de eIF4E y eIF(iso)4E hasta un 30% aproximadamente (Ruud et al., 1998). La baja actividad relativa para llevar a cabo la traducción sugiere que nCBP podría tener una función no canónica durante este proceso, por ejemplo, el secuestro del RNAm para evitar su traducción o el reclutamiento de mRNAs específicos para la traducción. En este sentido, se ha demostrado que ortólogos de nCBP en animales podrían realizar este tipo de funciones alternas (Cho et al., 2005; Dinkova et al, 2005).

						*1	*2		*3		
Ar nCBP	MEVLDRRDDEIRDSGNMDSIKSHYVTDVSEERRSTELKDG	HPLRYK	SI	WYTRRTPGVRNQS	EDNIKMMVEFSTVEG	80					
Wh	MTEDTEMRPASAGAEERREBELADDGDGSSAAAAGRITA---	HPL	ENAWTF	FDNPQOKSRQVA	GSTIKPIHTFSTVED	77					
Whiso4E	MAEVEAALPVAATETPEVAAEGDAGAAEAKGP-----	HKL	QRQWTF	YDIQTKPKGAA	GTSLKKGTFDFTVEE	70					
Mouse4E	MATVEPETPTTNPPEEKTESNQEVANPEHYIK-----	HPL	QNRWAL	WFFKND---	KSKTQANLRLISKFDTVED	71					
Yeast	MSVEVSKKFEENVSVDDTTATPKTVLSDSAHFDVK-----	HPL	NTKNTL	NYTKPAVD-	KSESASDLLRPVTSFQTVEE	73					
		*4		*5		*6		*7			
Ar nCBP	FWACYMLARSSLLPSPTDLHFFKDGIRPLWEDGANCNGGKMI	IRFSK---	VVSARF	WEDLLLALVGDQLDDADNI	-CG	156					
Wh 4E	FWGLYNNIHNPSKLVNMGADFHCFKNIIEPKNEPICANGGKNT	ISCGR---	GKSDTF	WHLTLLAMIGEQDFGDEI	-CG	153					
Whiso4E	FWCLYDQIFRPSKLVGSADFHLFKAGVEPKNEDEPCANGGKNT	VISSRK---	TNLDTM	WLETCLMIGEQFDRSQEI	-CG	147					
Mouse4E	FWALYNNHQLSSNLMPCDYSLFKDGIIEPKNEDEKKNRGGRL	LITLNK	QRRS	DLDRFWLETLLCLIGESFDDYSDDVCG		151					
Yeast	FWAIIQNIPEPKELPLKSDYHVFRNDRVPEWEDANAKGGKNS	FQLRGK--	ADIDEL	WLRLLAVIGETIDEDDSQING		151					
			*8								
Ar nCBP	AVLSVRFNEDIISVNNRNASDHQAVMGLRDSIKRHLKLP	HAYVMEYKPH	DASLRD	NSSYRNTWLRQ		221					
Wh 4E	AVVSVRQKQERVAINTKNAANEAAQISIGKQWKEFLDYKDS	--IGFIV	HEDAKR	SDKGPKNRYTV		215					
Whiso4E	VVASVVRQKQKLSLNTKTASNEAVQVDIGKKWKEVIDYNDK	--MVYSF	HDDSR	SQKPSRGGRYTV		209					
Mouse	AVVNVRAKGDKIAIINTTECENRDAVTHIGRVYKERLGLPP	KIVIGYQSH	ADTATK	SGSTTKNRFVW		217					
Yeast	VVLSIRKGGNKFALNTKTS-EDKEPLLRIIGGKFKQVLKLT	DGDHLEFFPH	SANGRH	PQPSITL---		213					

**Figura 9. Comparación de secuencias de nCBP con otros eIF4Es.** De acuerdo a la clasificación de Joshi et al. (2005), nCBP pertenece a la clase II y sus W 43 y 56 (en el alineamiento son el 2 y 3, respectivamente), son sustituidos por una F y una Y, respectivamente, en comparación con miembros de la clase I. *Ar*, *Arabidopsis thaliana*; *Wh*, trigo. Tomado y modificado de Ruud et al., 1998.

El análisis a nivel de mRNA en *A. thaliana* indicó que nCBP se expresa en la planta ubicuamente, siendo más abundante en semillas, plántulas jóvenes y raíces, mientras que acorde a datos de un proteoma liberado para esta planta, la proteína se encuentra mayoritariamente en botones florales, lo que sugiere una función tejido específica (figura 10).



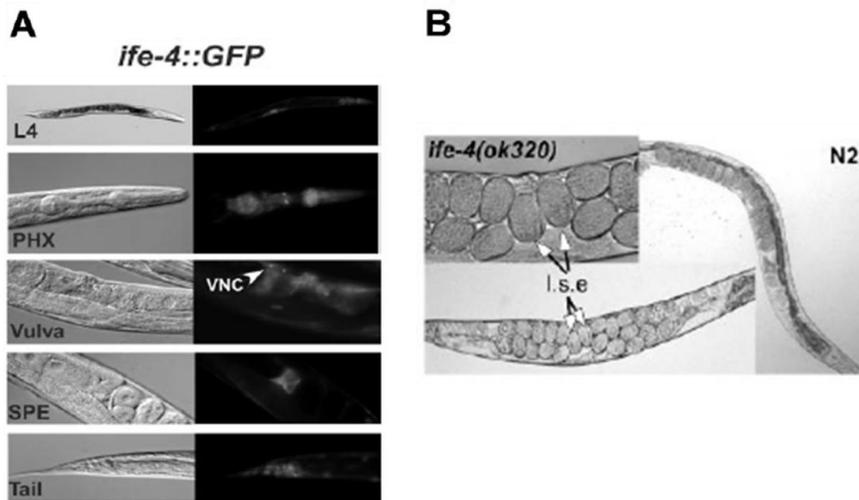
**Figura 10. Perfiles de expresión del transcrito y la proteína de nCBP en *A. thaliana*.** A. Medición de los niveles de *nCBP* por densitometría de RT-PCR semicuantitativa en diferentes tejidos de la planta a lo largo de su desarrollo. B. Expresión de la proteína nCBP en diferentes tejidos de la planta. Tomado de Hidalgo, 2007 y De la Torre, 2009.

### 3. 2. nCBP en otros organismos.

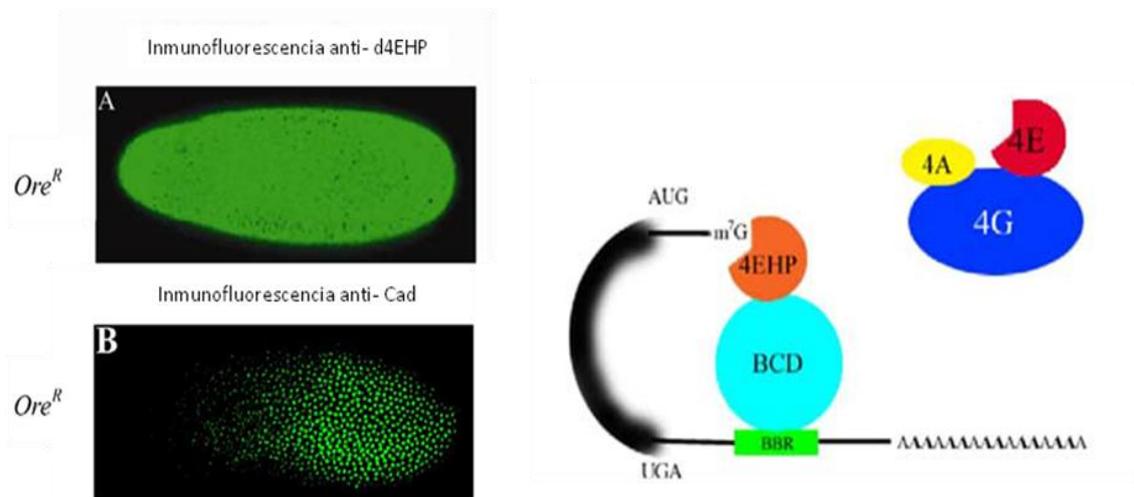
En *Caenorhabditis elegans* se ha encontrado que IFE-4, equivalente a nCBP de plantas y 4E-HP de mamíferos y *D. melanogaster* es capaz de unirse al 5' Cap y ser traduccionalmente activa. Su expresión es preferencial en músculos y neuronas de la faringe y vulva, espermateca y cordón neuronal ventral. Al depletar a este factor se observó un fenotipo pleiotrópico que incluye defecto en la ovoposición y por lo tanto un retraso en su reproducción (figura 11). Además, se encontró que en ausencia de IFE-4 se presenta una pérdida de la eficiencia de la traducción de un pequeño grupo de RNAm involucrados en la ovoposición, sugiriendo así, que IFE-4 traduce selectivamente cierto grupo de RNAm involucrados en la reproducción de *C. elegans*, pero no es esencial para la viabilidad del organismo (Dinkova *et al.*, 2005).

En *Drosophila melanogaster* se ha encontrado que la depleción del factor 4E-HP de clase II equivalente a nCBP produce defectos en el desarrollo embrionario (Cho *et al.*, 2005). En este estudio se reportó que 4E-HP muestra selectividad para ciertos RNAm durante el desarrollo, ya que es capaz de unirse al 5' Cap del RNAm de Caudal (*Cad*) y reclutar a la proteína Bicoide. Bicoide reconoce una secuencia específica en la 3'UTR del transcrito de *Cad* (región de unión a Bicoide, BBR) y se une a ella, formando un círculo cerrado 4E-HP-Bicoide-BBR que impide el reclutamiento del resto de los factores del inicio de la traducción y por lo tanto reprime la traducción del RNAm de *Cad* (figura 12). Este proceso determina la formación del eje antero-posterior de *D. melanogaster* y evidencia un papel de 4E-HP como regulador negativo de la

traducción durante etapas específicas del desarrollo (Cho *et al.*, 2005 y Hernández *et al.*, 2005).



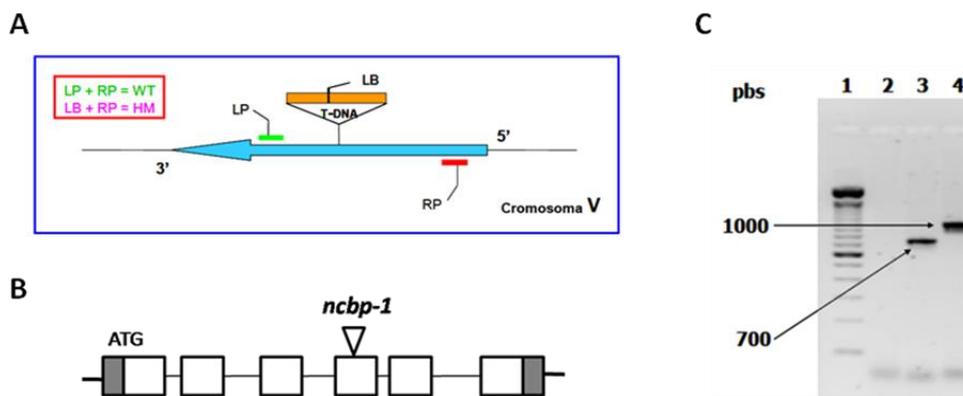
**Figura 11. Localización y función del factor IFE-4 de *C. elegans*.** A. Localización de IFE-4 fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP); la fluorescencia aparece en neuronas y músculos de la faringe (PHX), en el cordón neuronal ventral (VNC), neuronas y músculos de la vulva y espermateca (SPE). B. Fenotipo de la mutante nula *ife-4(ok320)*, que muestra retención de huevos comparado con la cepa *WT* (N2). Los embriones en estadio tardío son mostrados en la mutante (l.s.e). Tomado y modificado de Dinkova *et al.*, 2005.



**Figura 12. Localización y función del factor 4E-HP de *D. melanogaster*.** A. Localización de 4E-HP fusionada a GFP; la fluorescencia aparece en toda la larva *WT* (*Ore<sup>R</sup>*) en desarrollo. B. Por su parte la proteína Caudal (Cad) solo se expresa en la parte posterior de las larvas en desarrollo, debido a que Bicoide (BCD) que se localiza en la parte anterior promueve la regulación negativa de la traducción de Cad a través de su interacción con 4E-HP. C. Esquema que describe cómo 4E-HP inhibe la traducción del RNAm de *Cad* en la parte anterior de las larvas en desarrollo; este proceso es debido a la formación de un complejo en el que 4E-HP en lugar de unirse al resto de los eIFs, se une a la proteína Bicoide (BCD) que a su vez se une a la secuencia BBR del RNAm de *Cad* formando un círculo del mRNA inactivo para la traducción. Tomado y modificado de Cho *et al.*, 2005.

### 3. 3. Análisis funcional de nCBP en *A. thaliana*.

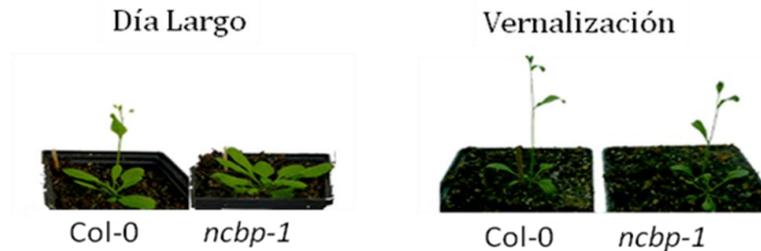
A partir de una línea mutante por inserción de T-DNA (SALK\_131503.32.70) se obtuvo una planta mutante homociga nula para *Atncbp*, en la cual hay una interrupción en el cuarto exón del gen (*Atncbp-1*). Para demostrar la inserción de T-DNA en el gen *Atncbp*, se diseñaron iniciadores específicos que abarcaron la secuencia genómica de *Atncbp* y la inserción de T-DNA (figura 13). Esta mutante no expresa el mRNA completo ni la proteína nCBP. Asimismo, se reveló por análisis de *Southern blot* que la inserción de T-DNA sólo se presenta en el gen *Atncbp* y no en otro sitio del genoma de *A. thaliana* (Hidalgo, 2007).



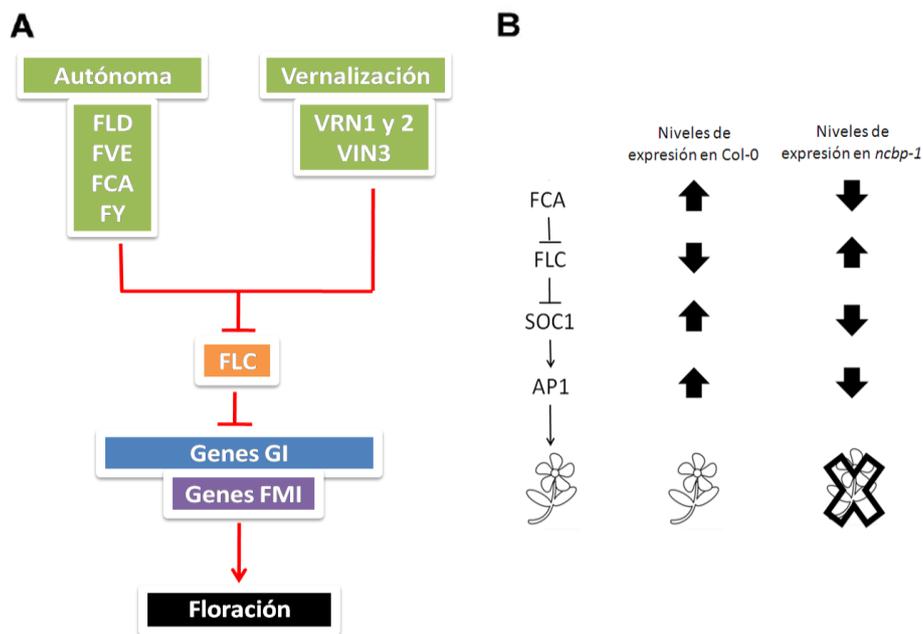
**Figura 13. Caracterización genotípica de la mutante homociga *Atncbp-1*.** A. Representación esquemática de la inserción de T-DNA en la secuencia génica de *nCBP*, se muestra la localización de los iniciadores para la caracterización genotípica. B. Representación de la inserción de T-DNA en el cuarto exon del gen *Atncbp* en la mutante *ncbp-1*, los intrones se representan con líneas y los exones con cuadros blancos, la inserción de T-DNA se representa con un triángulo invertido. C. Productos de PCR a partir de DNA genómico para la identificación de mutantes homocigas *Atncbp-1*; carril 1, marcador de peso molecular (escala de 100 pb); carril 2, amplificación de DNA de plantas silvestres (*WT*) con iniciadores que abarcan a *Atncbp* y a la inserción de T-DNA; carril 3, *Atncbp-1* con iniciadores que abarcan a *Atncbp* y a la inserción de T-DNA; carril 4, *WT* con iniciadores que solo abarcan la secuencia de *Atncbp*. Tomado de Hidalgo, 2007 y De la Torre, 2009.

Las plantas mutantes homocigas presentaron un desarrollo similar al de las plantas *WT*, a excepción de un retraso en el tiempo de floración por aproximadamente 10 días, tanto en fotoperíodo de día largo, como de día corto. Sin embargo, al utilizar un período largo de vernalización (germinación y crecimiento a 4 °C por 6 semanas bajo condiciones de día largo, 16 horas (h) de luz por 8 h de oscuridad) se observó un tiempo de floración similar entre *Atncbp-1* y *WT* (figura 14). Este hecho indica que nCBP podría participar en la regulación de la expresión de algunos genes involucrados en la vía autónoma de señalización para la floración, la cual converge con la de vernalización (figura 15) y explica el rescate del fenotipo silvestre en presencia de vernalización (Fornara *et al.*, 2010). Para demostrar lo anterior se analizó la expresión

a nivel de RNAm de algunos genes representativos de cada una de las vías de floración; los resultados indicaron que en ausencia de nCBP bajan los niveles del transcrito *FCA* y aumentan los de FLOWERING LOCUS C (*FLC*), este último participa tanto en la vía autónoma como en la de vernalización (figura 15).

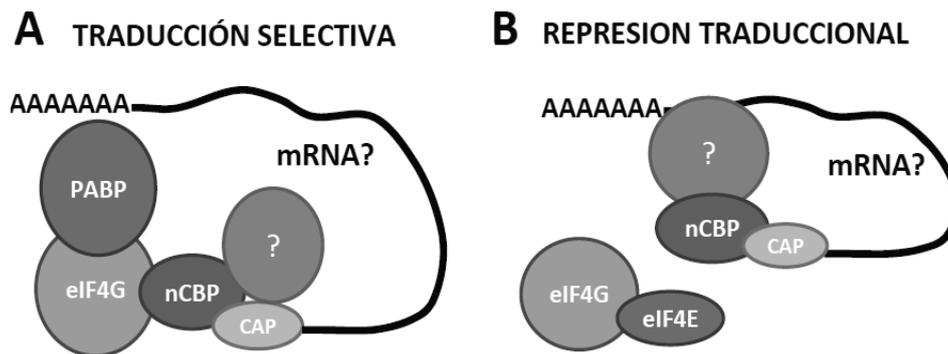


**Figura 14. Caracterización fenotípica de las plantas mutantes *Atncbp-1*.** Plantas silvestres de *A. thaliana* y la mutante *Atncbp-1*, crecidas bajo condiciones de fotoperíodo de día largo (16 h de luz por 8 h de oscuridad) y vernalización. En día largo se presenta un retraso en la floración de aproximadamente 10 días y cuando se trata con vernalización el fenotipo de la planta mutante se revierte. Tomado de De la Torre, 2009.



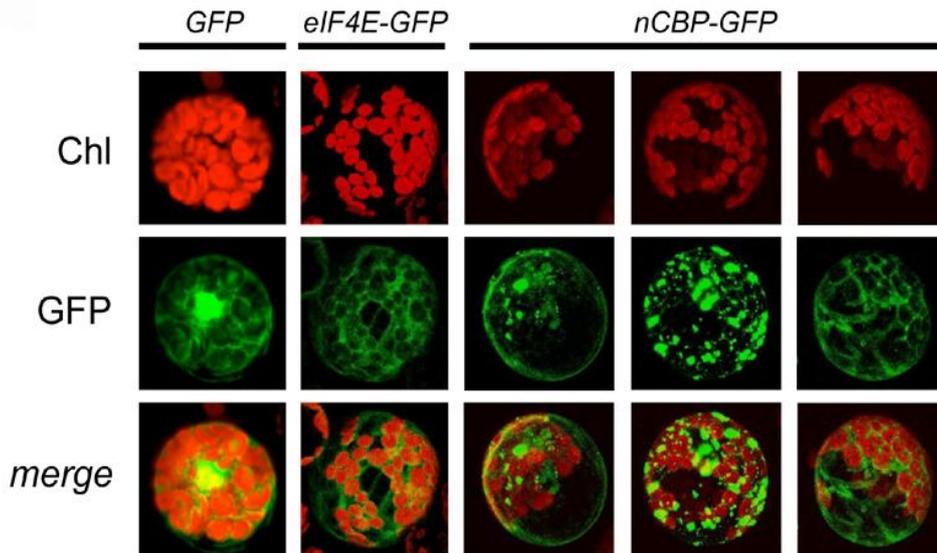
**Figura 15. Vías de floración de *A. thaliana* silvestre y mutante *Atncbp-1*.** A. La floración consiste en cambios del programa genético del meristemo apical (estado vegetativo) de la planta para convertirlo a un meristemo floral (estado reproductivo). Los genes responsables de este proceso son los genes de identidad del meristemo floral (FMI) que incluyen a APETALA 1 (*AP1*), estos genes muestran un perfil de expresión específico en el meristemo antes y después de la transición floral (Hempel *et al.*, 2000; Blázquez *et al.*, 2006). Los genes FMI son regulados a su vez por las proteínas producto de los genes integradores (GI) como SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANTS (*SOC1*). *FLC* es un represor de la floración sobre el cual convergen tanto la vía autónoma como la vía de vernalización. Los integrantes de cada una de estas vías regulan de manera negativa la expresión de *FLC*. B. Esquema de las alteraciones en la expresión del gen *FCA* (vía autónoma), *SOC1* (GI) y *AP1* (FMI) que culminan en un retraso en la floración en la planta mutante *Atncbp-1*. Tomado y modificado de De la Torre, 2009.

De lo anterior se puede hipotetizar que nCBP podría regular positivamente la traducción de uno o varios genes implicados en la vía autónoma de floración, en particular *FCA*. Al no estar nCBP, *FCA* baja sus niveles de expresión y por ende aumentan los niveles de *FLC* reprimiendo la floración. Por otra parte, nCBP podría reprimir la traducción de uno o varios transcritos cuyas proteínas participan como represores de la vía autónoma de floración mediante la interacción con proteínas de unión a 3'UTR, por lo que su ausencia redundaría en mayores niveles de estos represores y por ende en un retraso en la floración (figura 16). Además, los RNAm de los genes involucrados en este proceso se expresan ubicuamente, pero las proteínas solo se presentan en ciertos momentos del desarrollo de la planta, sugiriendo que estas proteínas tienen una regulación post-transcripcional o incluso post-traducciona (De la Torre, 2009). En este sentido se ha descrito, al menos para *FCA* y para *SOC1*, la presencia de mecanismos de regulación a nivel post-transcripcional mediante sus regiones 3'UTR (Quesada *et al.*, 2003; Hornyik *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2013).



**Figura 16. Posibles modelos de regulación por nCBP.** A. Traducción mediada por nCBP de RNAm específicos. B. Represión de la traducción de RNAm específicos mediante la unión de nCBP con otras proteínas que a su vez pueden interactuar con secuencias en la región 3'UTR. Tomado de Martínez-Silva *et al.*, 2009.

Finalmente, mediante la fusión de nCBP a GFP se demostró en protoplastos de *A. thaliana* que nCBP es una proteína citoplasmática, acumulada en regiones específicas del citoplasma que asemejan gránulos de tipo cuerpos P o SGs, hasta en un 75% de las células analizadas, esto en comparación con la distribución de eIF4E-GFP y GFP sola que muestran 0% de distribución en gránulos citoplasmáticos (figura 17).



**Figura 17. Localización subcelular de nCBP-GFP en protoplastos de *A. thaliana*.** La proteína nCBP-GFP es mayoritariamente citoplasmática y comparada con eIF4E-GFP o GFP sólo tiende a formar algún tipo de gránulo hasta ahora no identificado. Chl: clorofila. Resultados no publicados De la Torre, 2009.

El interés de nuestro laboratorio es elucidar la función de los diferentes miembros de la familia eIF4E en plantas. Se sabe que dichos factores son expresados en diferentes tejidos y etapas del desarrollo de manera diferencial, sugiriendo un grado de diversidad funcional. Además, existe la posibilidad de que estos factores tengan funciones particulares en la regulación de la traducción de RNAm específicos.

En *A. thaliana* se han estudiado mutantes para el factor eIF(iso)4E, estas mutantes presenta un aumento en el crecimiento de la raíz respecto a la planta silvestre, junto con la desregulación de ciertos genes específicos de la raíz, sugiriendo que eIF(iso)4E tiene un papel importante en la regulación de la expresión génica de transcritos involucrados en el desarrollo de la raíz (Martinez-Silva *et al.*, 2012). Por otra parte, la ausencia de este mismo factor proporciona resistencia a la infección por virus (Contreras-Paredes *et al.*, 2013). Para el caso del factor eIF4E, no se ha logrado obtener una mutante homociga nula, posiblemente a que la ausencia de este factor sea letal para la planta.

En trabajos previos se abordó el estudio de la función de la proteína nCBP, la cual ha sido caracterizada como una proteína de unión al 5' Cap (Ruud *et al.*, 1998). El fenotipo de una planta mutante homociga nula para nCBP sugiere que nCBP podría tener un papel importante en la regulación de la expresión génica durante el proceso de floración. Bajo un análisis más fino se encontró que en la mutante la expresión de los genes *FCA* y *FLC* de la vía autónoma de floración se encuentra alterada, además

se observó letalidad embriogénica parcial. El proceso de floración y embriogénesis son fundamentales en la biología de las plantas, el primero determina la perpetuidad de la especie; ya que gracias a dicho proceso se desarrollan los órganos sexuales que producirán los gametos y el segundo permitirá el desarrollo temprano del organismo. Si estos dos procesos son afectados por la ausencia de nCBP es de gran importancia saber en que manera esta proteína puede estar afectando tales eventos. Para poder abordar lo antes mencionado proponemos estudiar el papel de nCBP a través de sus interacciones con otras proteínas y con RNAm, sabiendo con quien interacciona, se podrá deducir parte de su función y el proceso biológico específico en el que participa.

#### **4. HIPÓTESIS.**

La proteína novedosa de unión a 5' Cap, nCBP, participa en la formación de complejos ribonucleoprotéicos específicos en *A. thaliana*.

#### **5. OBJETIVOS.**

##### **5.1. Objetivo general.**

Analizar la interacción específica de la proteína nCBP con proteínas y RNAm en *A. thaliana*.

##### **5.2. Objetivos particulares.**

- ◆ Obtención de una proteína de fusión GST-nCBP.
- ◆ Obtención de anticuerpos anti-CBP.
- ◆ Realizar ensayos de inmunoprecipitación proteína-RNA (RIP) con los anticuerpos anti-nCBP.
- ◆ Identificación de las proteínas asociadas a nCBP mediante ensayos de *pull down* y espectrometría de masas.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1. Obtención de semillas a partir de plantas de *A. thaliana* silvestres (WT) y mutantes para *nCBP* (*Atncbp-1*).

Se sembraron de 3 a 4 semillas por maceta con sustrato Metro Mix 200 o turba-agrolita-vermiculita en una relación 3:1:1.5, humedecido con agua estéril y se mantuvieron a 4 °C por 48 h en la oscuridad. Posteriormente las macetas se pasaron a 22 °C con un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad (día largo) hasta la floración. Las silíquas maduras se recolectaron para la obtención de las semillas.

### 6.2. Esterilización y siembra de semillas de *A. thaliana* para la obtención de plántulas de 16 días.

Las semillas se colocaron en un tubo de 1.5 mililitros (ml) y se les agregó 1 ml de hipoclorito de sodio (Cloralex<sup>®</sup>) al 20% con Tween-20 al 0.1%, se agitaron con vortex durante 20 minutos (min). Los tubos se centrifugaron por 10 segundos (seg) y se eliminó el sobrenadante con una micropipeta. Las semillas se enjuagaron 5 veces con 1 ml de agua estéril con agitación por 30 seg cada vez, hasta eliminar completamente el hipoclorito/Tween-20. En cada enjuague, los tubos se centrifugaron por 10 seg y se eliminó el sobrenadante con una micropipeta. Después del último lavado se agregó 1 ml de agua estéril. Las semillas desinfectadas se sembraron en cajas Petri de 90 mm SARSTEDT que contenían medio Gamborg's B-5 (No. de catalogo G5893) Sigma-Aldrich<sup>®</sup> pH 5.3 (ajustado con KOH 10 mM) complementado con sacarosa y agar al 1%, en campana de flujo laminar. Con ayuda de una micropipeta de 1 ml se colocaron las semillas de manera espaciada entre una y otra. Las cajas se sellaron y se cubrieron con aluminio para mantenerlas por 48 h a 4 °C en la oscuridad, posteriormente se pasaron a la cámara de incubación a 22 °C con un fotoperíodo de día largo. A los 16 días se colectaron las plántulas, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C hasta el momento de su uso.

### 6.3. Extracción de proteínas totales.

Para la extracción de proteínas se pulverizó 1 gramo (g) de tejido con ayuda de un mortero y pistilo en nitrógeno líquido. El polvo resultante se pasó a un tubo de 1.5 ml y se le agregó 1ml de solución de extracción <sup>7</sup>mGTP (ver apéndice A) por cada gramo de tejido pulverizado. Enseguida se centrifugó a 16,000 x g por 30 min y se recuperó el sobrenadante, este se almacenó a -70°C hasta el momento de su uso. La proteína se cuantificó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

#### **6.4. SDS-PAGE y tinción con Azul de Coomassie.**

A cada muestra de proteína se le agregó solución BRM 1X (ver apéndice A) y se hirvió a 95 °C por 5 min. Enseguida se colocaron las muestras en geles de poliacrilamida al 15 % y se separaron las proteínas con solución de corrida (ver apéndice A) a 110 Volts en un equipo Mini Protean<sup>®</sup> Tetra cell de marca BioRad. Para la tinción, el gel se incubó en una solución de azul de Coomassie (ver apéndice A) toda la noche. Al día siguiente el gel se lavó con agua/etanol al 30%, en agitación ligera hasta retirar el exceso de colorante.

#### **6.5. Western Blot.**

Una vez que las proteínas se separaron por SDS-PAGE, estas se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilo (PVDF) Immobilon P-Transfer (No. de catalogo IPVH00010) Millipore. En un primer paso, la membrana se activó con metanol al 100%, posteriormente se colocó sobre el gel y se equilibraron con solución de transferencia (ver apéndice A). Después de montar el sándwich de transferencia en el equipo MiniProtean-Transfer de BioRad se aplicó un voltaje constante de 100 por 1 h a 4 °C. La inmunodetección se realizó bloqueando inicialmente la membrana con leche al 3% en PBS 1X (ver apéndice A) por 1 h a temperatura ambiente (TA) en agitación constante, incubando enseguida con el anticuerpo primario (1:10,000, anti-nCBP donado por la Dra. Karen Browning, Universidad de Texas en Austin) disuelto en leche al 3% en PBS 1X a temperatura ambiente en agitación constante por 1 h. La membrana se lavó 3 veces con PBT (ver apéndice A) 10 min por cada lavado. Posteriormente esta se incubó con el anticuerpo secundario (1:10,000 anti-IgG de conejo) disuelto en leche al 3% en PBS 1X por 1 h a TA en agitación constante. Entonces se repitieron los ciclos de lavado con PBT. Finalmente la membrana se incubó con el reactivo quimioluminiscente “Luminata Crescendo Western HRP substrate” (No. de catalogo WBLUR0500) Millipore y se expuso a una placa radiográfica Medical X-ray General Purpose Blue de Kodak en un cuarto oscuro.

#### **6.6. Obtención de la proteína de fusión Glutación S Transferasa (GST)-nCBP.**

##### **6.6.1. Clonación de la secuencia codificante de nCBP en el vector pGEM-T Easy.**

La secuencia codificante para nCBP que se utilizó se encuentra disponible en The Arabidopsis Information Resource (TAIR; [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) con el número de acceso AT5G18110.1. Para amplificar dicha secuencia se diseñaron iniciadores específicos: sentido 5'- GCG GAT CCA TGG AGG TTT TGG ATA GG -3' y antisentido 5'- TGT CGA CCT ATC CTC TCA GCC ATG -3'. Estos contenían los sitios reconocidos por las enzimas de restricción *Bam*H-I y *Sa*I-I respectivamente. Como

templado para el PCR se utilizó la construcción pENTR-nCBP generada previamente en el laboratorio (De la Torre, 2009). La mezcla de reacción para PCR consistió de solución de reacción con KCl (3X), enzima Taq DNA Polymerase (recombinant) LC (No. de catalogo EP0403) Fermentas (1 unidad por reacción), MgCl<sub>2</sub> (2 mM), dNTPs (200 µM), iniciadores (300 µM), plásmido (50 ng por reacción) y agua grado PCR alcanzando un volumen final de 15 µl. La condición de la reacción fue la siguiente: desnaturalización a 94 °C por 15 seg, alineamiento a 60 °C por 30 seg y extensión a 72 °C por 1 min, 30 ciclos en un termociclador MJ Mini 48-Well Personal Thermal Cycler de BioRad. Finalmente las muestras se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% y TBE 0.5X (ver apéndice A) se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron a la luz ultravioleta en un transiluminador Fluor-S™ Multimager de BioRad.

El producto de PCR para la región codificante de nCBP se insertó en el plásmido pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector (No. de catalogo A1360) Promega Corporation (ver apéndice B). Siguiendo las indicaciones del proveedor se preparó la siguiente reacción:

2X Rapid Ligation buffer, T4 DNA Ligase	5 µl
pGEM <sup>®</sup> -T Easy Vector (50ng)	1 µl
Producto de PCR	1 µl
T4 DNA Ligase (3 u/µl)	1 µl
Agua libre de nucleasas	2 µl
Volumen final	10 µl

Se incubó la reacción a 4 °C toda la noche y se almacenó a -20 °C hasta el momento de su uso en la transformación.

### 6.6.2. Células competentes.

Se inoculó una colonia de la cepa de *E. coli* a utilizar (DH5α o BL21 RIL codon plus) en un matraz de 250 ml con 50 ml de medio LB (ver apéndice A) y se dejó crecer toda la noche a 37 °C con agitación de 200 rpm. Al día siguiente se inocularon 2 ml del cultivo anterior en 200 ml de medio LB fresco en un matraz de 2 litros (L). El cultivo se incubó a 37 °C con agitación hasta alcanzar una densidad óptica a 590 nm (DO<sub>590</sub>) de 0.375. Se vació el cultivo en dos tubos estériles pre-enfriados, se incubó a 4 °C por 10 min y se centrifugó a 4,000 x g por 7 min a 4 °C. Posteriormente se decantó el sobrenadante y se resuspendió suavemente cada botón en 10 ml de solución de CaCl<sub>2</sub> fría, enseguida se incubó a 4 °C por 30 min y después se centrifugó a 4,000 x g por 5

min a 4 °C. Finalmente el sobrenadante se decantó nuevamente y el botón de células se resuspendió en 5 ml de la solución de CaCl<sub>2</sub> frío, se hicieron alícuotas de 100 µl congeladas en nitrógeno (N<sub>2</sub>) líquido y se guardaron a -70 °C.

### 6.6.3. Transformación de células competentes *E.coli* DH5α por choque térmico.

Se descongelaron las células competentes a 4 °C, una vez descongeladas se mezclaron cuidadosamente 100 µl de las células con 5 µl de la reacción de ligación y se incubaron por 10 min a 4 °C, enseguida se pasaron a 42 °C por 1.5 min y después nuevamente a 4 °C por 10 min. Se les agregó 1 ml de medio LB y se incubaron 1 h a 37 °C. Pasada la hora se sembraron 100 µl de la solución bacteriana en cajas con medio LB solido conteniendo 100 µg/ml ampicilina, las cuales se incubaron toda la noche a 37 °C. De las colonias crecidas se resembraron al menos 5 colonias en cajas con medio LB solido conteniendo 100 µg/ml ampicilina y se pusieron a crecer toda la noche a 37 °C para confirmar su resistencia al antibiótico.

### 6.6.4. Extracción de plásmido pGEM-nCBP por miniprep.

Se puso a crecer una colonia bacteriana en 5 ml de medio líquido LB/ampicilina (100 µg/ml) toda la noche a 37 °C con agitación constante de 220 rpm. Al día siguiente se centrifugó el cultivo a 10,000 x g por 5 min, se decantó el sobrenadante y se utilizó el kit Wizard<sup>®</sup>Plus SV Minipreps DNA Purification System para la extracción del plásmido siguiendo las indicaciones del proveedor (No. de catalogo A1330) Promega Corporation. El plásmido purificado se almacenó a -20 °C.

### 6.6.5. Digestión con enzimas de restricción del plásmido pGEM-nCBP y el plásmido pGEX-4T-2.

Las reacciones de digestión fueron las siguientes:

Plásmido pGEM:nCBP		Plásmido pGEX-4T-2 (No. de catalogo 28-9545-50)	
NEBuffer 3 10X	4 µl	NEBuffer 3 10X	1 µl
Purified BSA 10mg/ml	4 µl	Purified BSA 10mg/ml	1 µl
<i>Bam</i> HI 20u/µl	1 µl	<i>Bam</i> HI 20u/µl	1 µl
<i>Sal</i> I 20u/µl	1 µl	<i>Sal</i> I 20u/µl	1 µl
DNA (3 µg)	12 µl	DNA (600 ng)	1 µl
Agua libre de nucleasas	18 µl	Agua libre de nucleasas	5 µl
Volumen final	40 µl	Volumen final	10 µl

Se incubaron a 37°C por 2.5 h.

Las digestiones se separaron en electroforesis con un gel de agarosa al 1% y TBE 0.5X (ver apéndice A), el gel fue teñido con bromuro de etidio y se visualizaron las bandas de DNA por luz ultravioleta en un transiluminador Fluor-S™ Multilmager de BioRad. Se localizó la banda correspondiente al amplicón de nCBP y la correspondiente al plásmido pGEX-4T-2 linearizado (ver apéndice B), las cuales fueron cortadas del gel y purificadas.

#### **6.6.6. Purificación de DNA de un gel de agarosa.**

Se cortó el fragmento de DNA visualizado en el transiluminador, con una navaja limpia y se utilizó el Kit QIAquick Gel Extraction para la recuperación del DNA siguiendo las instrucciones del proveedor (No. de catalogo 28704) QUIAGEN. El DNA se almacenó a -20 °C.

#### **6.6.7. Clonación de la secuencia de nCBP en el plásmido pGEX4T-2.**

El amplicón correspondiente a nCBP y plásmido pGEX-4-T2 linearizado recuperados del gel se ligaron usando el Rapid DNA Ligation Kit (No. de catalogo 11635379001) Roche. Siguiendo las indicaciones del proveedor se preparó la siguiente reacción:

Vector pGEX-4-T2 (90 ng)	1 µl
Producto de PCR ncbp (200ng)	5 µl
Agua libre de nucleasas	2 µl
DNA Dilution Buffer1X	2 µl
T4 DNA Ligation Buffer	10 µl
T4 DNA ligase (5 u/µl)	1 µl
Volumen final	21 µl

La mezcla se incubó por 10 min a TA y se almacenó a -20°C hasta el momento de su uso.

Con la ligación se transformaron células *E. coli* DH5α competentes. De las colonias crecidas en presencia de antibiótico de selección se sembraron al menos 5 colonias en cajas con medio LB solido conteniendo 100 µg/ml ampicilina y se pusieron a crecer toda la noche a 37 °C. Para seleccionar las colonias que contenían la construcción se purificó el plásmido y se realizo una amplificación por PCR para nCBP como ya se describió anteriormente.

#### **6.6.8. Transformación de células competentes *E.coli* BL21 RIL Codon Plus por choque térmico.**

Se descongelaron las células competentes a 4 °C, una vez descongeladas se mezclaron 100 µl de las células con 5 µl de la reacción de ligación y se incubaron 30 min a 4 °C, enseguida se pasaron a 42 °C por 30 seg y después nuevamente a 4 °C. Entonces se agregaron 250 µl de medio SOC (No. de catalogo 15544-034) Invitrogen™ precalentado y la mezcla se incubó 1 h a 37 °C en agitación constante de 225 rpm. Pasado este tiempo los tubos se centrifugaron 2 min 4,000 x g a 4 °C, la pastilla de células se resuspendió en 100 µl de medio LB y el total de estas se sembró en cajas con medio LB sólido conteniendo 100 µg/ml ampicilina, las cuales se incubaron toda la noche a 37 °C. De las colonias crecidas se sembraron al menos 5 colonias en cajas con medio LB sólido conteniendo 100 µg/ml ampicilina y se pusieron a crecer toda la noche a 37 °C para seleccionar las que contenían la construcción. El plásmido correspondiente a la construcción GST-nCBP en pGEX-4T2 fue secuenciado por la unidad de síntesis y secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología, UNAM, las secuencias obtenidas se analizaron con el programa BioEdit Sequencing Alignment Editor versión 5.0.9 Copyright© y BLASTX 2.2.28+ del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) para verificar que no hubiera desplazamiento en el marco de lectura o mutaciones en la secuencia.

#### **6.6.9. Inducción con isopropil-β-D-1- tiogalactopiranosido (IPTG).**

Se tomó una de las colonias positivas para la construcción GST-nCBP y se sembró en 5 ml de medio LB líquido (conteniendo 100 µg/ml de ampicilina). El cultivo se mantuvo en agitación constante de 220 rpm a 37 °C toda la noche. Al día siguiente se inoculó un matraz con 150 ml de medio LB fresco sin el antibiótico de selección con 400 µl del cultivo anterior y se incubó en agitación constante de 220 rpm a 37 °C hasta alcanzar una DO de 0.6, aproximadamente a las 3-4 h. Posteriormente se agregó IPTG a una concentración final de 0.1 mM y se mantuvo en agitación constante de 220 rpm a 25 °C por 3 h más. Después del periodo de inducción se colocó el cultivo en hielo y se centrifugó a 4,000 x g a 4 °C, se decantó el sobrenadante y se usó la pastilla de células para la extracción de proteínas. Opcionalmente, las células se guardaron a -70 °C hasta el momento de su uso.

### **6.7. Purificación de la proteína de fusión GST-nCBP.**

#### **6.7.1. Extracción de proteína total de bacterias.**

Se resuspendió cuidadosamente con micropipeta la pastilla de células inducidas con IPTG en 12 ml de solución de extracción 1X (ver Apéndice A).

Inmediatamente se agregó 1 mg de lisozima, 2  $\mu$ l de PMSF y 10  $\mu$ l de un cocktail de inhibidores de proteasas libre de EDTA Complete™ (No. de catalogo 04693159001) Roche por cada ml de solución de extracción y se incubó 1 h a 4 °C en rotación ligera. Posteriormente se agregó 0.7 % de sarcosil y se mezcló muy bien por inversión, enseguida se agregó 3 % de Triton X-100 y 20 mM de CHAPS y se incubó 15 min a 4 °C en rotación ligera. Pasado este tiempo se centrifugó a 15, 000  $\times g$  a 4 °C. Finalmente se filtró el sobrenadante en 3 capas de gasa. El filtrado se guardó a -70 °C hasta el momento de su uso.

### **6.7.2. Purificación de proteínas bacterianas por cromatografía de afinidad con resina glutatión sefarosa 4B (RGS4B).**

Se tomó la resina necesaria para la purificación, tomando en cuenta las siguientes consideraciones:

1. 1ml de cultivo bacteriano con cualquier plásmido pGEX produce aproximadamente 2.5  $\mu$ g de proteína de fusión.
2. 1ml de RGS4B une aproximadamente 5mg de proteína de fusión.

Se equilibró la RGS4B agregándole 10 volúmenes de solución de extracción 1X y se agitó por inversión, se centrifugó a 500  $\times g$  a 4 °C y se eliminó el sobrenadante. Finalmente se agregaron a la resina 1.33 ml de solución de extracción 1X por cada ml de RGS4B. Entonces se incubó la RGS4B con el extracto protéico bacteriano por 30 min a temperatura ambiente en rotación ligera. Posteriormente se centrifugó a 500  $\times g$  a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se lavó la resina con 10 volúmenes de solución de extracción 1X con 0.5 % de Triton X-100 y PMSF. Se repitió el paso de lavado con solución de extracción 1X con 0.1 % de Triton X-100. Enseguida se incubó la resina con 1ml de glicina 2M pH 3 1h a 4 °C en rotación ligera, pasado el tiempo se centrifugó 4 min a 500  $\times g$  a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante (fracción 1, F1) con la proteína eluida). Después se incubó nuevamente la resina con 500  $\mu$ l de glicina 2M pH 3, 5 min a temperatura ambiente en rotación ligera, se centrifugó 4 min a 500  $\times g$  y se recuperó el sobrenadante (F2). Este último pasó se repitió hasta obtener 5 fracciones. Enseguida se realizó una elución con cloruro de potasio 1M (F6). Finalmente se lavó la resina 3 veces alternadamente con 500  $\mu$ l de Tris-HCl 0.1M + 0.5 M de NaCl pH 8.9 y acetato de sodio 0.1M + 0.5 M de NaCl pH 5.2 en rotación a TA. Cada vez se centrifugó 4 min a 500  $\times g$  a 4 °C y se recuperó el sobrenadante (F7-F12). Las fracciones se guardaron a -70 °C hasta el momento de su uso.

### **6.7.3. Análisis funcional de la proteína de fusión por cromatografía de afinidad con la resina Sefarosa <sup>7</sup>mGTP (<sup>7</sup>mGTP-S).**

Se equilibró la resina <sup>7</sup>mGTP-S agregándole 10 volúmenes de solución <sup>7</sup>mGTP (ver apéndice A) y se agitó por inversión, se centrifugó a 500 x g a 4 °C y se eliminó el sobrenadante. Finalmente se agregó a las resina solución <sup>7</sup>mGTP hasta alcanzar su volumen original. La proteína de fusión purificada de la RGS4B se diluyó con 1 volumen de solución <sup>7</sup>mGTP y se incubó con 300 µl de 7mGTP-S 1.5 h a 4°C en rotación ligera. Posteriormente se centrifugó a 500 x g por 1 min a 4°C, se recuperó la resina y se depositó en una microcolumna de 10 ml Poly-Prep® (No. de catalogo 731-1550) BioRad. Se lavó la resina con 5 ml de solución 7mGTP B (ver apéndice A), seguido de 5 ml de solución 7mGTP C (ver apéndice A). Posteriormente la resina se incubó con 2 ml del solución 7mGTP D (ver apéndice A) 1.5 h a 4 °C en rotación ligera. Se recuperó el eluato que contenía proteínas unidas al ligando en 5 fracciones y posteriormente se agregaron 3 ml de solución 7mGTP E recuperándose 3 fracciones más. Las fracciones se almacenaron a -70 °C hasta el momento de su uso.

### **6.8. Co-elución de proteínas asociadas a GST-nCBP mediante ensayo de “Pull down”.**

Preparación de la resina RGS4B. Se equilibró la resina lavándola cuatro veces con 10 volúmenes de TGEM 0.1 (ver apéndice A) frío, por cada lavado se centrifugó a 800 x g a 4 °C por 2 min y se eliminó el sobrenadante. La resina se resuspendió en 3 volúmenes de TGEM 0.1 frío y se mantuvo a 4 °C hasta el momento de su uso.

Interacción de la resina con la proteína de fusión. Se diluyó la proteína de fusión purificada (500 ng) en 1 volumen de TGEM 0.1 frío y se incubó con 20 µl de la resina equilibrada, 1 h a 4 °C en rotación ligera. Se centrifugó a 800 x g a 4 °C por 2 min y se eliminó el sobrenadante. La resina se lavó dos veces con 10 volúmenes de TGEM 1.0 (ver apéndice A) frío y dos veces con TGMC 0.1 (ver apéndice A) frío, en cada lavado se centrifugó a 800 x g a 4 °C por 2 min y se eliminó el sobrenadante. Al final de los lavados se guardó la resina en 2 volúmenes de TGMC 0.1 y se almacenó a 4 °C hasta el momento de su uso.

Preparación del extracto proteico. Para la extracción de proteínas de *A.thaliana* se pulverizaron plántulas de 16 días en nitrógeno líquido con ayuda de un mortero y pistilo. Al pulverizado resultante se le agregó TGMC 0.1 frío 1 ml/g de tejido, se mezcló por vortex y se centrifugó a 16,000 x g a 4 °C por 20 min. Se recuperó el sobrenadante y las proteínas se cuantificaron por el método de Bradford.

Interacción de la proteína de fusión con sus posibles blancos. Se incubó la proteína de fusión unida a la resina con 2 mg de proteína total de *A. thaliana* a 4 °C toda la noche en rotación. Al día siguiente, se centrifugó la resina a 800 x g a 4 °C por 2 min, se retiró el sobrenadante y la resina se lavó cuatro veces con 10 volúmenes de TGEM 0.1 frío. Por cada lavado la mezcla se centrifugó a 800 x g a 4 °C por 2 min y se eliminó el sobrenadante. Finalmente, las proteínas unidas a la resina se recuperaron en 15 µl de solución BRM 1X, se hirvieron por 5 min y se separaron por SDS-PAGE como ya se describió anteriormente.

### **6.9. Tinción con plata.**

El gel se incubó en metanol al 50%, ácido acético al 20% y 1 % de formaldehído al 37% por mínimo 2 h. Posteriormente se lavó el gel con etanol al 35% 3 veces por 20 min. Se prosiguió a sensibilizar el gel con tiosulfato de sodio al 0.02% por 2 min en agitación, se retiró la solución y se lavó con agua destilada 3 veces por 5 min. Entonces se agregó la solución de tinción (ver apéndice A) y se dejó teñiendo por 30 min en agitación, se repitieron los lavados con agua y el gel se incubó con la solución de revelado (ver apéndice A) hasta que aparecieron las bandas. Se detuvo el revelado con metanol al 50%, ácido acético al 20% y 1 % de formaldehído al 37% por 30 min en agitación. Finalmente se rehidrató el gel con agua.

### **6.10. Análisis de proteínas por LC/MS/MS.**

Las bandas de interés observadas en el gel teñido con plata se cortaron y se enviaron al Departamento de Espectrometría de Masas en East Tennessee State University, en donde se utilizó el método de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS/MS) para identificar los péptidos de la digestión trípica de proteínas contenidas en las bandas. Las secuencias de los péptidos obtenidos se compararon con la base de datos de *A. thaliana* en el NCBI. Se tomaron en cuenta los parámetros de calidad del pico correspondiente a los péptidos, el número de péptidos y la presencia de péptidos únicos detectados para cada proteína.

### **6.11. Obtención de anticuerpos anti-nCBP.**

#### **6.11.1. Inmunización de conejos**

La proteína recombinante GST-nCBP se unió a la resina RGS4B como ya se describió anteriormente, se incubó con 25 mM de trombina (No. catalogo 27084601) GE Healthcare a temperatura ambiente toda la noche en agitación ligera. Al día siguiente se centrifugó a 500 x g a 4 °C, se recuperó el sobrenadante (fracción con nCBP), se separó en un gel SDS-PAGE y se visualizó por tinción con Coomassie. Se

cortó la banda del gel de acrilamida y se solubilizó en solución salina mas adyuvante incompleto de Freund's (No. catalogo F-5506) Sigma<sup>®</sup>, con esta solución se inmunizaron los conejos.

Se utilizaron conejos hembras de 1 año de edad, los cuales fueron transportados al área de manipulación. La manipulación fue lo mas gentil y despacio posible para evitar el uso de tranquilizantes. Las inyecciones se hicieron con ayuda de una aguja calibre 21 en diferentes partes de los animales para obtener una mejor respuesta inmune. Las extracciones sanguíneas se hicieron con una aguja calibre 22.

En el día cero se obtuvo el suero pre inmune (3 ml) de los animales y se aplicó una inyección subcutánea a una concentración de 0.5 mg de la proteína recombinante en un volumen final de 2.8 ml de solución salina mas adyuvante de Freund's (1:1). A los días 7 y 14 días se aplicaron inyecciones con la misma dosis. Al día 21 se hizo una sangría de prueba (1 ml) y se reforzó la inmunización con una inyección a una concentración de 1 mg de la proteína recombinante en el ganglio poplítico. Al día 28 se aplicó la última inyección subcutánea con la misma dosis y al siguiente (día 29) se hizo la sangría de cosecha (120-150 ml) por punción cardiaca, antes se anestesiaron los animales con xilacina/ketamina (5/35 mg/Kg) intramuscular. Este procedimiento causó la muerte del animal.

Todas las muestras de sangre se mantuvieron a 37°C por 45 min y posteriormente se centrifugaron a 11,000 x g 10 min a temperatura ambiente. Se recuperó el suero y se almacenó a -70 °C hasta el momento de su uso. El anticuerpo se tituló por dot blot.

#### **6.11.2. Dot Blot.**

Sobre una membrana PVDF se marco una región de aproximadamente 3-4 mm de diámetro, se colocó la proteína recombinante dentro de la marca lentamente y se dejó secar la membrana. Entonces se bloquearon los sitios no específicos con leche al 3% y PBS 1X por 1 h a temperatura ambiente en agitación constante. Posteriormente la membrana se lavó 2 veces con PBT y una tercera con PBS 1X de 5 min cada lavado. Enseguida se incubó con el anticuerpo (1:250 anti nCBP) disuelto en leche al 3% y PBS 1X, por 1 h a temperatura ambiente en agitación constante. Se repitió la serie de lavados y la membrana se incubó con el anticuerpo secundario (1:10,000 anti-IgG) disuelto en leche al 3% y PBS 1X, por 1 h a temperatura ambiente en agitación constante. Finalmente la membrana se lavó 2 veces con PBT y se reveló como se describe para el *western blot*.

### 6.11.3. Purificación del anticuerpo.

Se purificó 2.5 mg de la proteína GST-nCBP y se unió a la resina RGS4B como se describe en el punto 6. 7. 2. de metodología. Todos los pasos siguientes de purificación se realizaron a 4 °C en un cuarto frío.

Se incubó la resina con 15 ml del suero del conejo inmunizado por 1 h en rotación ligera, se centrifugó a 500 x g por 5 min, se retiró el suero y la resina se transfirió a una microcolumna de 10 ml Poly-Prep<sup>®</sup> (No. de catalogo 731-1550) BioRad. Posteriormente se lavó la resina 2 veces con 4 ml de PBT. Entonces se eluyeron 12 fracciones con las siguientes soluciones:

Fracciones 1-3. 500 µl c/u (MgCl<sub>2</sub> 1.4 M, glicerol 10%, HEPES 50mM pH 7.6)

4-6. 250 µl c/u (ácido acético 0.5%, NaCl 150 mM)

7-9. 250 µl c/u (glicina 2M pH 2.0)

10-12. 500 µl c/u (MgCl<sub>2</sub> 3M, HEPES 75 mM pH 7.2, etilenglicol 25%)

Las fracciones 4-9 se neutralizaron inmediatamente con 250 µl PBS 1X pH 7.0.

Finalmente, 15 µl de cada fracción se analizaron por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie, el resto se guardó a -70 °C.

### 6.12. Inmunoprecipitación.

Lisado celular. Se pulverizaron plántulas de 16 días de *A. thaliana* en nitrógeno líquido con ayuda de un mortero y pistilo, al pulverizado resultante se agregó solución de lisis PLB (ver apéndice A) frío 1 ml/g de tejido, se mezcló por vortex y se centrifugó a 16,000 x g a 4 °C por 20 min. Se recuperó el sobrenadante y se pasó a un tubo estéril.

Preparación de la resina proteína A agarosa. Se equilibró la resina al 50% lavándola dos veces con 10 volúmenes de PLB frío, por cada lavado se centrifugó a 800 x g a 4 °C por 2 min y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió la resina en 1 volumen de PLB frío y se mantuvo a 4 °C hasta el momento de su uso.

Preclareado. Se agregaron 50µl de la resina equilibrada por ml de lisado celular, enseguida se incubó 1 h a 4 °C en rotación ligera. Al final de la incubación, la mezcla se centrifugó a 800 x g por 2 min a 4 °C y el sobrenadante se traspasó a un tubo nuevo. Este paso se repitió una vez más.

Interacción del anticuerpo con la proteína blanco y la resina. El lisado preclareado se incubó con el anticuerpo (1:1,000) toda la noche a 4 °C en rotación ligera. Posteriormente se incubó con la resina equilibrada 50 µl/ml de lisado 4 h a 4 °C en rotación ligera y pasado el tiempo se centrifugó a 800 x g por 2 min a 4 °C, finalmente se eliminó el sobrenadante.

### **6.13. Extracción de RNA total.**

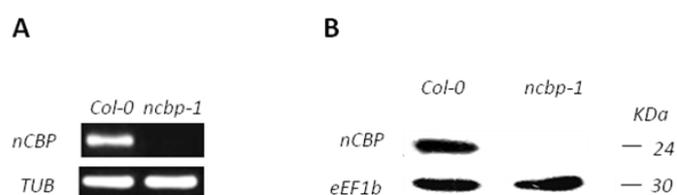
Se pesaron 100 mg de tejido y se pulverizaron con nitrógeno líquido en un mortero previamente esterilizado y enfriado. No dejar que el tejido pulverizado se seque, para ello agregar nitrógeno antes de que este se evapore por completo. Posteriormente el tejido pulverizado se transfirió a un tubo de 1.5 ml estéril e inmediatamente se agregó 1 ml de TRIzol<sup>®</sup> (No. de catalogo 15596-026) Invitrogen<sup>™</sup> y se agitó por vortex. La mezcla se incubó a temperatura ambiente por 5 min y se centrifugó a 12000 x g por 10 min a 4 °C. Se tomó la fase acuosa, cuidando no tomar la capa superior que contiene lípidos, se le agregó 200 µl de cloroformo frío, se agitó por vortex por 15 seg y se incubó a temperatura ambiente por 3 min, entonces se centrifugó a 12000 x g por 15 min a 4 °C y se transfirió la fase acuosa a un tubo estéril. Inmediatamente se agregó 500 µl de alcohol isopropílico frío, se incubó a temperatura ambiente por 10 min y se centrifugó a 12000 x g por 10 min a 4 °C (el RNA aparece como un pellet ligeramente blanco). Se decantó el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 ml de etanol frío al 75%, enseguida se agitó por vortex, se centrifugó a 7500 x g por 5 min a 4°C y se decantó el sobrenadante. Posteriormente se dejó secar el pellet al aire por 15 min, pero no completamente para facilitar su disolución, y se resuspendió en 15 µl de agua DEPC.

Finalmente para verificar la integridad del RNA, se tomaron 2 µl de RNA y se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y TBE 1X (ver apéndice A), el gel fue teñido con bromuro de etidio y visualizado por luz ultravioleta en un transiluminador Fluor-S<sup>™</sup> Multilmager de BioRad. El RNA sobrante se almacenó a -70°C hasta el momento de su uso.

## 7. RESULTADOS.

### 7.1. Análisis molecular de las plantas *WT* y *Atncbp-1*.

Para asegurar que todos los experimentos se hicieran con las líneas de plantas correctas, *WT* y mutante nula para la proteína nCBP (*Atncbp-1*), se analizó la presencia de nCBP, nivel de RNAm y proteína por RT-PCR y *Western blot*, respectivamente. Este análisis se realizó para plántulas de 16 días crecidas en día largo, ya que se había determinado previamente que nCBP se expresa principalmente en tejidos jóvenes (figura 19). Los resultados indicaron que la línea *Atncbp-1* (*ncbp-1*) no presenta mRNA o proteína correspondiente a nCBP por lo que es considerada como mutante nula para dicha proteína. Esto aseguró que los experimentos posteriores se hicieron con las líneas de plantas correctas.



**Figura 19. Análisis molecular de líneas de *A. thaliana* *WT* y *Atncbp-1*.** A. Niveles de transcrito de nCBP determinados por RT-PCR a partir de RNA total. Como control de carga se utilizó la amplificación de tubulina (TUB). Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 1%. B. Niveles de proteína nCBP determinados por *Western blot* utilizando anticuerpos contra la proteína nCBP de *A. thaliana* (donados por K.S. Browning). Se separaron 10  $\mu$ g de proteína total de la línea silvestre (*WT*) y mutante (*ncbp-1*). Como control de carga se usó un anticuerpo contra el factor de elongación 1b (eEF1b) en la misma membrana. Ambos experimentos se hicieron en plántulas de 16 días de *A. thaliana*.

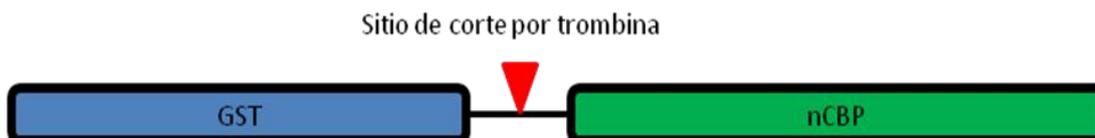
### 7.2. Obtención de una proteína de fusión GST-nCBP funcional.

Para poder estudiar la interacción de nCBP con otras proteínas *in vitro*, se hizo una proteína recombinante GST-nCBP, para ello se utilizó el plásmido pGEX-4T-2 que contiene la secuencia codificante para la proteína Glutathion S-transferasa (GST) bajo el promotor de la T7 polimerasa y la región reguladora del operón Lac, seguida de un sitio de corte por trombina y un sitio de clonación que contiene múltiples secuencias reconocidas por enzimas de restricción (Apéndice B). La secuencia codificante para la proteína nCBP se insertó en el plásmido utilizando las enzimas *Bam*H-I y *Sal* I, lo que produciría una proteína de fusión recombinante GST-nCBP en presencia del inductor Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), que puede ser cortada por trombina (figura 20B). La secuenciación de esta construcción (pGEX-4T-2-nCBP) demostró que la secuencia de nCBP está en marco de lectura con GST y sin mutaciones (figura 20A).

**A**

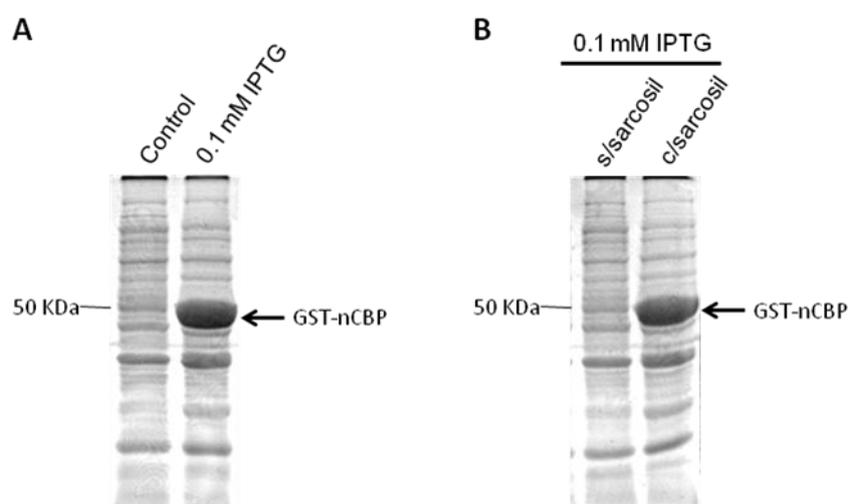
```
1   ATG TCC CCT ATA CTA GGT TAT TGG AAA ATT AAG GGC CTT GTG CAA CCC ACT CGA CTT CTT TTG GAA
    M S P I L G Y W K I K G L V Q P T R L L L E
67  TAT CTT GAA GAA AAA TAT GAA GAG CAT TTG TAT GAG CGC GAT GAA GGT GAT AAA TGG CGA AAC
    Y L E E K Y E E H L Y E R D E G D K W R N
133 AAA AAG TTT GAA TTG GGT TTG GAG TTT CCC AAT CTT CCT TAT TAT ATT GAT GGT GAT GTT AAA TTA
    K K F E L G L E F P N L P Y Y I D G D V K L
199 ACA CAG TCT ATG GCC ATC ATA CGT TAT ATA GCT GAC AAG CAC AAC ATG TTG GGT GGT TGT CCA AAA
    T Q S M A I I R Y I A D K H N M L G G C P K
265 GAG CGT GCA GAG ATT TCA ATG CTT GAA GGA GCG GTT TTG GAT ATT AGA TAC GGT GTT TCG AGA ATT
    E R A E I S M L E G A V L D I R Y G V S R I
131 GCA TAT AGT AAA GAC TTT GAA ACT CTC AAA GTT GAT TTT CTT AGC AAG CTA CCT GAA ATG CTG AAA
    A Y S K D F E T L K V D F L S K L P E M L M
197 ATG TTC GAA GAT CGT TTA TGT CAT AAA ACA TAT TTA AAT GGT GAT CAT GTA ACC CAT CCT GAC TTC
    K F E D R L C H K T Y L N G D H V T H P D F
463 ATG TTG TAT GAC GCT CTT GAT GTT GTT TTA TAC ATG GAC CCA ATG TGC CTG GAT GCG TTC CCA AAA
    M L Y D A L D V V L Y M D P M C L D A F P K
529 TTA GTT TGT TTT AAA AAA CGT ATT GAA GCT ATC CCA CAA ATT GAT AAG TAC TTG AAA TCC AGC AAG
    L V C F K K R I E A I P Q I D K Y L K S S K
595 TAT ATA GCA TGG CCT TTG CAG GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGT GGT GGC GAC CAT CCT CCA AAA TCG
    Y I A W P L Q G W Q A T F G G G D H P P K S
661 GAT CTG GTT CCG CGT GGA TCC ATG GAG GTT TTG GAT AGG AGA GAC GAT GAG ATC AGG GAC TCG
    D L V P R G S M E V L D R R D D E I R D S
724 GGA AAC ATG GAC AGC ATC AAG TCA CAC TAT GTT ACC GAC TCT GTT TCC GAG GAA CGC CGC TCT CGT
    G N M D S I K S H Y V T D S V S E E R R S R
790 GAG CTC AAG GAT GGA GAC CAT CCT TTA CGG TAC AAG TTT TCG ATA TGG TAC ACT CGT CGC ACA CCA
    E L K D G D H P L R Y K F S I W Y T R R T P
854 GGG GTT CGG AAC CAG TCT TAT GAA GAT AAC ATC AAG AAG ATG GTA GAA TTC AGC ACG GTT GAA
    G V R N Q S Y E D N I K K M V E F S T V E
916 GGA TTT TGG GCC TGC TAC TGT CAC CTT GCT CGT TCT TCT CTC TTG CCT AGT CCA ACA GAT CTT CAT
    G F W A C Y C H L A R S S L L P S P T D L H
982 TTC TTT AAG GAT GGG ATT CGT CCA TTG TGG GAG GAT GGT GCC AAC TGC AAT GGA GGA AAG TGG
    F F K D G I R P L W E D G A N C N G G K W
1045 ATC ATA CGT TTC TCA AAA GTT GTA TCT GCT CGC TTC TGG GAG GAT CTG CTT CTT GCG TTG GTA GGC
    I I R F S K V V S A R F W E D L L L A L V G
1111 GAC CAG CTT GAT GAT GCT GAT AAC ATA TGT GGG GCA GTA CTG AGT GTC CGT TTC AAC GAG GAC ATC
    D Q L D D A D N I C G A V L S V R F N E D I
1177 ATT AGT GTA TGG AAT CGC AAT GCT TCT GAC CAT CAG GCA GTG ATG GGT TTG AGA GAC TCA ATC AAG
    I S V W N R N A S D H Q A V M G L R D S I K
1243 CGG CAT TTG AAG TTG CCT CAT GCA TAT GTC ATG GAA TAC AAG CCA CAC GAT GCT TCT CTC CGC GAC
    R H L K L P H A Y V M E Y K P H D A S L R D
1309 AAC TCT TCC TAC AGA AAC ACA TGG CTG AGA GGA TAG
    N S S Y R N T W L R G
```

**B**



**Figura 20. Representación esquemática de la proteína de fusión GST-nCBP.** A. Secuencia de la construcción pGEX-4T-2-nCBP. B. Representación esquemática de la proteína de fusión GST-nCBP. La secuencia de aminoácidos en azul corresponde a la proteína GST, los aminoácidos en rojo representan al sitio de corte por trombina y los aminoácidos en verde corresponden a la proteína nCBP.

La construcción pGEX-4T-2-nCBP se clonó en células *E. coli* RIL BL21 Codon Plus para optimizar el uso de codones raros para la bacteria y la proteína de fusión fue inducida en presencia de 0.1 mM de IPTG (figura 21A). Sin embargo, al intentar recuperar la proteína GST-nCBP en la fracción soluble del extracto proteico bacteriano no se observó la banda correspondiente en una separación SDS-PAGE, sugiriendo que la proteína se encontraba en fracciones insolubles (cuerpos de inclusión). Para recuperar una proteína soluble, el extracto se trató con sarcosil al 0.7 % logrando obtener a GST-nCBP en fracciones solubles (figura 21B).

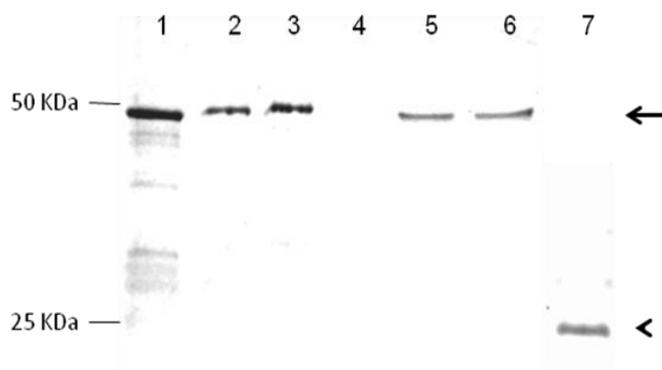


**Figura 21. Inducción y purificación de GST-nCBP.** Las proteínas se separaron por SDS-PAGE en geles al 12% y se tiñieron con azul de Coomassie. A. Lisado celular de bacterias sin inducir (control) e inducidas con IPTG 0.1 mM por 3 h a 24 °C. B. Extracto soluble de proteínas totales de bacterias inducidas con IPTG sin tratamiento (s/sarcosil) y tratado con 0.7 % de sarcosil (c/sarcosil). La flecha indica a la proteína de fusión GST-nCBP de aproximadamente 50 KDa.

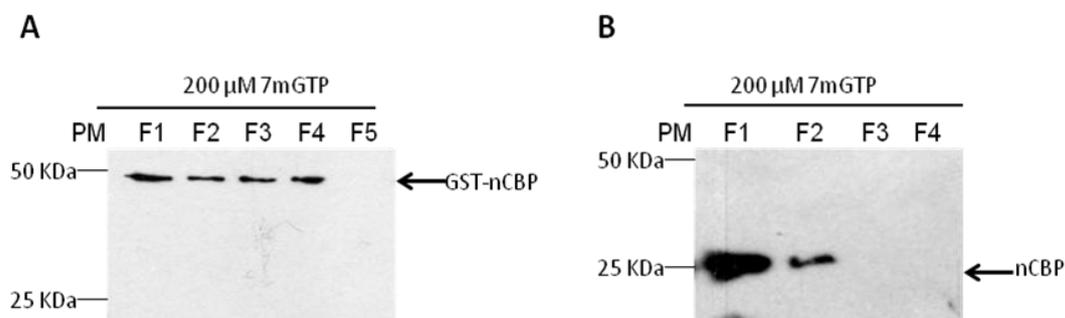
nCBP es una proteína de unión a 5' Cap (7mGpppN; donde N es cualquier nucleótido) por lo que para analizar la funcionalidad de esta proteína en su versión fusionada (GST-nCBP) se probó su capacidad de unión a un análogo de su ligando, <sup>7</sup>mGTP. Para esto, primero se unió la proteína de fusión a la resina glutatión sefarosa 4B y luego se dividió la resina en dos partes. La primera se purificó por elución con glicina y tris-HCl y la segunda por corte con trombina (figura 22) observando la presencia de la proteína de fusión (carriles 1 a 6) y nCBP sola después del corte con trombina (carril 7), respectivamente.

Las fracciones descritas se sometieron por separado a cromatografía de afinidad utilizando resina <sup>7</sup>mGTP sefarosa. Dado que durante el procedimiento se pierde material, la cantidad de proteína presente en el eluato era insuficiente para detectarse

por SDS-PAGE y tinción con Coomassie. Por esta razón se realizó un *Western blot* con las fracciones obtenidas por la cromatografía de afinidad, utilizando un anticuerpo anti-nCBP donado por K.S. Browning de la Universidad Texas en Austin, USA. Se observó que tanto la fusión GST-nCBP (figura 23A), como nCBP sola (figura 23B) son capaces de unirse a  $^7\text{mGTP}$ , demostrando su funcionalidad.



**Figura 22. Purificación de GST-nCBP y nCBP recombinantes utilizando glutatión sefarosa 4B.** Extractos de proteína total de bacterias inducidas fueron solubilizados con 0.7% de sarcosil e incubados con glutatión sefarosa. La proteína recombinante purificada fue separada por SDS-PAGE y teñida con azul de Coomassie. Carril 1-3, la elución de GST-nCBP fue realizada con glicina 2M pH 3. Carril 4, elución con KCl 1M. Carril 5 y 6, elución con Tris-HCl pH 8.9 y 5.2 respectivamente. Carril 7, fracción recuperada por corte con trombina. La flecha indica la proteína de fusión GST-nCBP de aproximadamente 50 KDa y la punta de flecha indica la proteína recombinante nCBP de aproximadamente 25 KDa liberada por el corte con trombina.

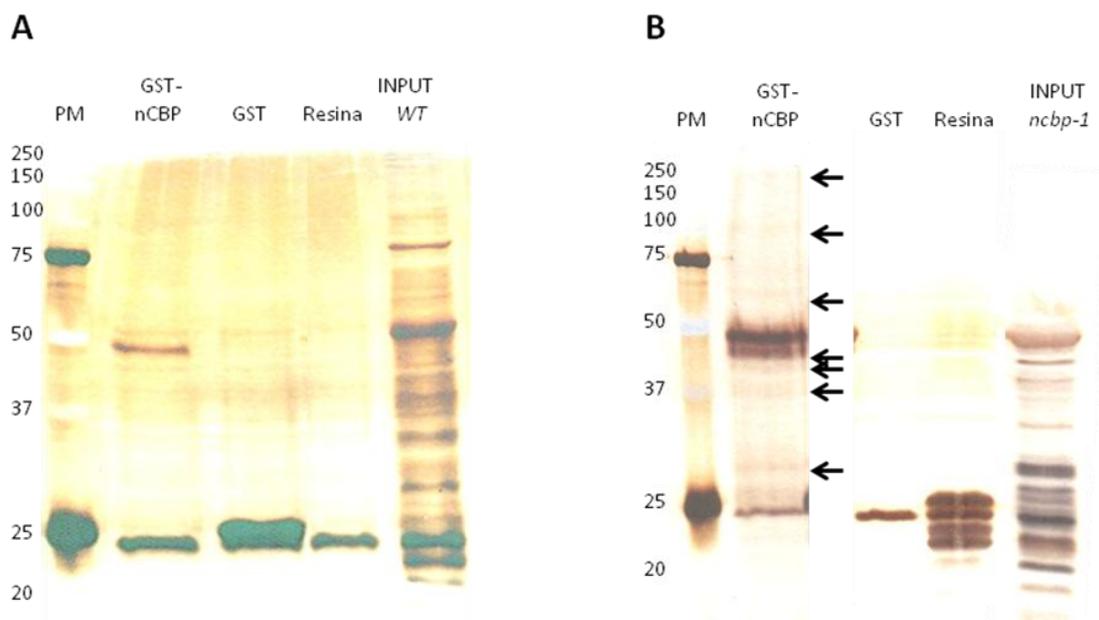


**Figura 23. Análisis de la funcionalidad de GST-nCBP y nCBP sola recombinantes.** A. Fracciones obtenidas de la cromatografía de afinidad con  $^7\text{mGTP}$ -sefarosa para la proteína de fusión GST-nCBP. B. Fracciones obtenidas de la cromatografía de afinidad con  $^7\text{mGTP}$ -sefarosa para la proteína recombinante nCBP generada mediante corte con trombina. Se utilizaron 20  $\mu\text{l}$  de cada fracción eluida con 200  $\mu\text{M}$  de  $^7\text{mGTP}$ . Las proteínas fueron detectadas mediante *Western blot* contra nCBP de *A. thaliana* con un anticuerpo donado por la Dra. Karen S. Browning (Universidad de Texas en Austin).

### 7.3. Formación de complejos entre nCBP-GST y proteínas de *A. thaliana in vitro*.

Ya que se demostró que la proteína GST-nCBP purificada por el método descrito anteriormente es funcional, comprobamos que sea capaz de interactuar con otras proteínas, para lo cual GST-nCBP se unió a la resina glutatión sefarosa 4B y se

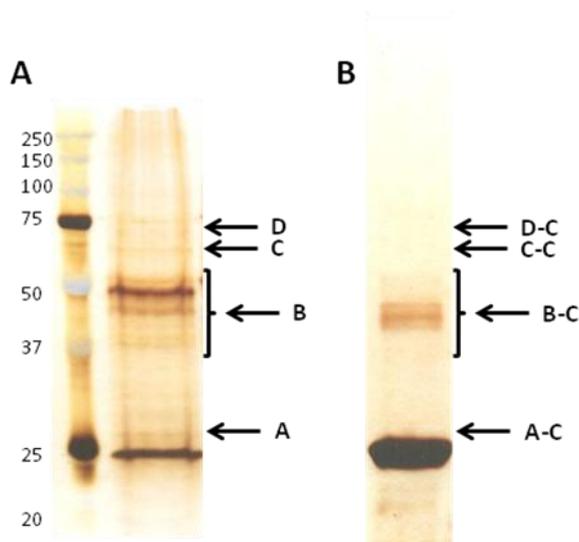
incubó con extracto proteico de plántulas silvestres (*WT*), para finalmente recuperar los complejos que se formaron mediante “*Pull down*”. Como controles del experimento de “*Pull down*” se utilizó la incubación del extracto de proteínas de *A. thaliana* con la resina unida a GST o la resina sola, ya que los extractos pueden contener GSTs endógenas, así como proteínas que interaccionen con GST o que se unan inespecíficamente a la resina. Los complejos recuperados se separaron por SDS-PAGE y se visualizaron por tinción con plata (figura 24A). Se observaron varias bandas correspondientes a proteínas diferentes a la proteína de fusión (50 kDa), en particular una banda cercana a los 25 kDa. Sin embargo, la misma banda se observó en los controles sin GST-nCBP, por lo que esta debe representar a proteínas de la familia de GST de plantas capaces de unirse a glutatión. Por otra parte, las bandas minoritarias se observaron tanto en la incubación con la resina unida a nCBP-GST como con la resina unida a GST sola, por lo que probablemente se trata de interacciones independientes de nCBP.



**Figura 24. Análisis de complejos protéicos formados por GST-nCBP mediante ensayos de “pull down”.** A. Extracto proteico de plántulas *WT* y B. Extracto proteico de plántulas *ncbp-1*. Para el “*Pull down*”, las proteínas totales de plántulas de 16 días fueron incubadas en presencia de resina glutatión-sefarosa 4B unida a GST-nCBP, GST o sola (Resina) y posteriormente eluidas. INPUT: el extracto de proteínas sin tratamiento; PM: marcador de masa molecular. Las proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE y reveladas mediante tinción con plata. Las flechas indican las proteínas que interaccionaron con la proteína de fusión, pero no con GST o la resina sola.

Acorde a este resultado se hipotetizó que probablemente la nCBP endógena en las plántulas silvestres se encontraba formando complejos con proteínas, por lo que había poca probabilidad de que la GST-nCBP recombinante encontrara las proteínas con las

cuales interaccionar. Por esta razón se realizó el mismo procedimiento de “Pull down” pero con extracto proteico de plántulas mutantes *Atncbp-1* (figura 24B). En este ensayo se pudo observar la presencia de bandas que solamente aparecían en presencia de la proteína de fusión (indicadas con flechas), y que no estaban en los controles. Los ensayos de “Pull down” se repitieron al menos 3 veces y las bandas que fueron reproducibles se identificaron por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, LC/MS/MS. Por otra parte también se sometieron al mismo procedimiento las porciones de gel correspondiente al control de “Pull down” Resina sola aún cuando no hubiese bandas visibles (figura 25).



**Figura 25. Identificación de proteínas que interaccionan con GST-nCBP por LC/MS/MS.** A. Las bandas co-eluidas con GST-nCBP reproduciblemente en tres experimentos de “Pull down” independientes (A – D) fueron cortadas del gel e identificadas por LC/MS/MS. B. Las regiones correspondientes a estas bandas en el control de “Pull down” con solo Resina (A-C – D-C) fueron sometidas al mismo procedimiento.

La identificación de proteínas fue basada en el NCBI y se tomaron en cuenta varios parámetros para su confiabilidad: 1) que la probabilidad de que su identificación sea al azar sea baja ( $P_{pro} < 1$ ); 2) que el score representando la exactitud de la masa correspondiente a los péptidos teóricos de la proteína sea alto ( $XC > 10$ ) y 3) que el número de péptidos únicos identificados para la proteína sea mayor a 2. Por otra parte, se descartaron las proteínas que fueron identificadas tanto en el “Pull down” para GST-nCBP como para la Resina sola (control) (ver apéndice C). Una vez reducido el número de candidatos, cada proteína se buscó en The Arabidopsis Information Resource (TAIR) para obtener sus pesos moleculares estimados y su número de acceso correspondiente (tabla 1), así como la abundancia de la proteína en la etapa de desarrollo/tejido analizado acorde al proteoma de *A.thaliana*. Todas las proteínas abundantes no aparecen en la tabla 1; ya que se consideró que su presencia

podría ser debida a su alta abundancia. Sin embargo, para descartar la posibilidad de interacción con nCBP habría que realizar experimentos adicionales.

**Tabla 1. Listado de las proteínas que forman complejos con nCBP.** Se presentan los pesos moleculares estimados y números de acceso del TAIR de las proteínas que cumplieron con los parámetros de confianza y son relativamente poco abundantes en la planta.

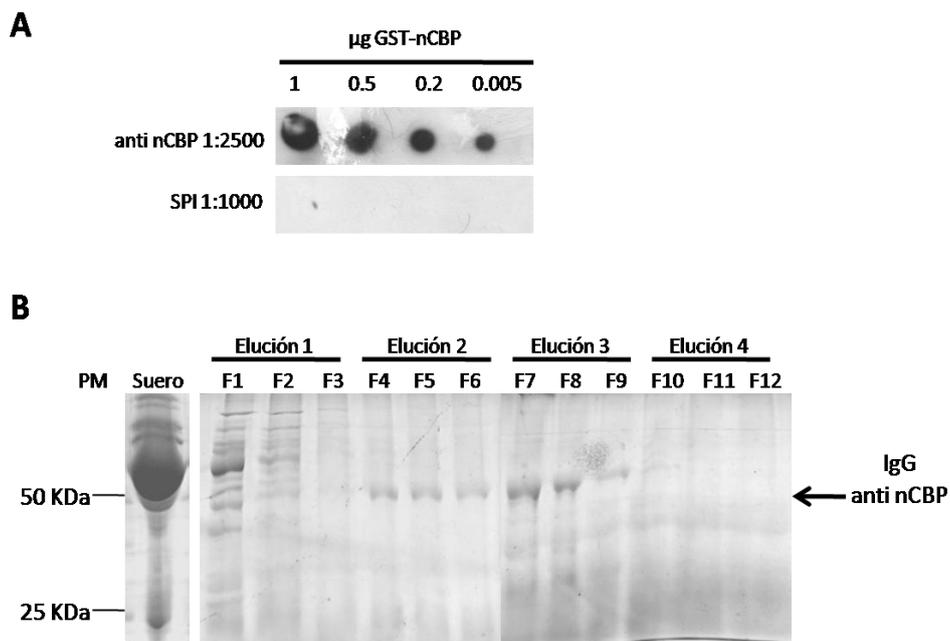
<b>Proteína</b>	<b>Peso Molecular Estimado (KDa)</b>	<b>No. de acceso TAIR</b>
<b>Lectina 31 relacionada a jacalina</b>	<b>32.0</b>	<b>AT3G16430</b>
<b>Lectina 30 relacionada a jacalina</b>	<b>32.0</b>	<b>AT3G16420</b>
<b>Cisteína proteasa RD21a</b>	<b>51.0</b>	<b>AT1G47128</b>
<b>Proteína de resistencia a enfermedades rica en leucina</b>	<b>41.2</b>	<b>AT2G15320</b>
<b>Tubulina alfa subunidad 3/5</b>	<b>49.6</b>	<b>AT5G19770</b>
<b>Tubulina alfa subunidad 2/4</b>	<b>49.5</b>	<b>AT1G04820</b>
<b>Tubulina alfa subunidad 6</b>	<b>49.5</b>	<b>AT4G14960</b>
<b>Proteína de choque térmico 81-2</b>	<b>83.1</b>	<b>AT5G56030</b>
<b>Proteína de choque térmico 81-3</b>	<b>80.0</b>	<b>AT5G56010</b>
<b>Proteína con repeticiones ankirin</b>	<b>59.6</b>	<b>AT5G60070</b>

Algunas proteínas presentan un peso molecular estimado que no coincide con su localización en el gel, esto podría deberse a que están sufriendo algún proceso de proteólisis (en el caso de RD21a, ver discusión) o que están interaccionando con otras proteínas de una manera muy fuerte que las condiciones desnaturalizantes no pudieron separarlas y en el gel migran con un retraso, como en el caso de la proteína de resistencia a enfermedades que aparece en las muestras C y D, y la proteína con repeticiones ankirin que aparece en la muestra D.

#### **7.4. Anticuerpos policlonales anti-nCBP.**

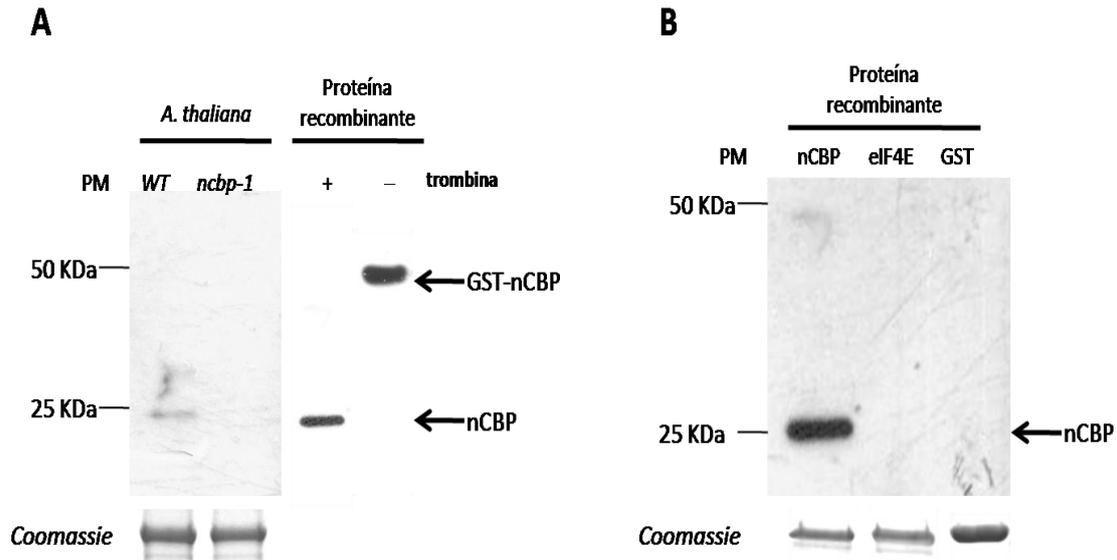
Uno de nuestros objetivos es identificar aquellos RNAm que son reconocidos por nCBP por medio de la técnica de inmunoprecipitación, por lo que es indispensable el uso de anticuerpos que reconozcan a la proteína nCBP nativa. Para obtener nuestros anticuerpos anti-nCBP, la proteína nCBP recombinante purificada por corte con trombina se utilizó para inmunizar un conejo y obtener anticuerpos policlonales. El suero del conejo inmunizado obtenido en la sangría de prueba a los 21 días se probó por *Dot blot* a una dilución de 1:2500 con diferentes concentraciones de la proteína recombinante GST-nCBP para ver si había buena titulación. Con esa dilución se obtuvo un buen título; ya que detectó hasta 5 ng de la proteína recombinante, por su

parte el suero preinmune (SPI) no da señal de reconocimiento con las mismas concentraciones (figura 26A). A los 29 días después de la primera inmunización se recuperó el suero de los conejos, se purificó por cromatografía de afinidad utilizando como antígeno la proteína de fusión unida a la resina glutatión sefarosa, se obtuvieron 12 fracciones, de las cuales las dos primeras aún presentaban proteínas contaminantes y a partir de la cuarta fracción se logró recuperar el anticuerpo puro, este aparece como una banda a la altura de 50 KDa correspondientes a las inmunoglobulinas G (IgG) (figura 26B)



**Figura 26. Purificación del anticuerpo policlonal anti nCBP.** A. *Dot blot* con diferentes concentraciones de la proteína recombinante, la dilución de 1:2500 detecta hasta 5 ng de la proteína recombinante. SPI (suero preinmune). B. Fracciones del anticuerpo anti nCBP separadas por SDS-PAGE y teñidas con azul de Coomassie, a partir de la fracción 4 y hasta la 9 se aprecian la IgG anti nCBP. Para eluir el anticuerpo se utilizaron 4 soluciones diferentes (Elución 1-4), ver metodología apartado 6.11.3.

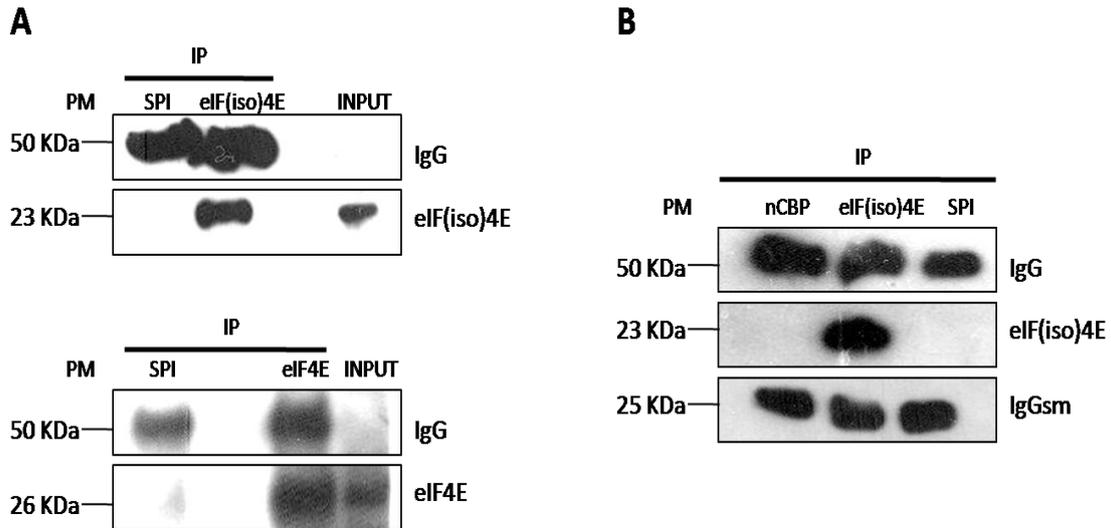
Una vez purificado el anticuerpo se probó su especificidad mediante *Western blot* de extractos protéicos de plántulas de 16 días y en contra de la proteína recombinante GST-nCBP, nCBP, GST-eIF4E y GST, estas dos últimas como controles de que no haya entrecruzamiento con otro factor de inicio de la traducción y con una posible contaminación de GST al momento de inmunizar al conejo (figura 27). Este anticuerpo se utilizará en futuros ensayos de inmunoprecipitación proteína-RNA (RIP).



**Figura 27. Anticuerpo policlonal anti nCBP.** A. El anticuerpo purificado se utilizó en *Western blot* a una concentración de 1  $\mu\text{g/ml}$  en extractos protéicos de plántulas *WT* y *ncbp-1* (30  $\mu\text{g}$ ), y las proteínas recombinantes GST-nCBP y nCBP (25  $\mu\text{g}$ ), el panel inferior muestra a la proteína Rubisco de los extractos protéicos de plántulas como control de carga. B. Para verificar que no haya reconocimiento inespecífico el anticuerpo se probó contra eIF4E y GST, el panel inferior muestra la proteína recombinante como control de carga.

### 7.5. Inmunoprecipitación de la proteína nCBP.

Para estandarizar la técnica de inmunoprecipitación, se utilizaron los anticuerpos anti eIF(iso)4E, anti eIF4E y anti nCBP donados por K.S. Browning. Los resultados indicaron que los anticuerpos anti eIF(iso)4E y anti eIF4E solo inmunoprecipitan a las respectivas proteínas y a la IgG de 50 kDa (figura 28A), por lo que podría ser utilizado para ensayos RIP. Sin embargo, el anticuerpo anti nCBP no sería adecuado para este tipo de ensayos; ya que al hacer la inmunoprecipitación se observó que este anticuerpo reconoce la subunidad menor de las IgGs (22 kDa) enmascarando a nCBP que tiene un peso similar de 25 KDa (figura 28B) y resultando en señal positiva aún en la muestra de suero pre-inmune (SPI).



**Figura 28. Ensayos de inmunoprecipitación.** A. Se probaron dos anticuerpos para la estandarización de los ensayos de inmunoprecipitación, En el panel superior el anticuerpo anti eIF(iso)4E y en el inferior el anticuerpo anti eIF4E. B. El anticuerpo anti nCBP donado por K. S. Browning no es funcional para los ensayos RIP; ya que reconoce a la subunidad menor de las IgGs (IgGsm). IP, inmunoprecipitación. SPI, suero preinmune.

Dado que durante el desarrollo de este trabajo, no se contó con anticuerpo para nCBP útil para ensayos de RIP, y no fue hasta recientemente que obtuvimos un nuevo anticuerpo anti nCBP generado durante el proyecto (vease el apartado 7.4), se propone su uso en el futuro para los ensayos RIP.

## 8. DISCUSIÓN.

### 8.1. La proteína nCBP recombinante es funcional.

Usualmente por medio de ingeniería genética las proteínas son sobreexpresadas en *E. coli* como proteínas de fusión, comúnmente unidas covalentemente a una etiqueta como la glutatión S-transferasa (GST) (Smith y Johnson, 1998), cola de histidinas (His<sub>6</sub> tag) (Pryor y Leiting, 1997), proteína de unión a maltosa (MBP) (Kapust y Waugh, 1999), tioredoxina (LaVallie *et al.*, 1993) o proteína pequeña parecida a ubiquitina modificada (SUMO) (Butt *et al.*, 2005). Estos sistemas de fusión pretenden incrementar la solubilidad de las proteínas de interés con un solo paso de purificación eficiente, excepto las que llevan His<sub>6</sub> tag. Sin embargo, muchas proteínas recombinantes, específicamente aquellas de origen eucarionte, se agregan en cuerpos de inclusión (Frangioni y Neel, 1993; Tao *et al.*, 2010). En el presente trabajo se obtuvo una proteína de fusión GST-nCBP que se agrega en cuerpos de inclusión, y con un método rápido, simple y eficiente (ver metodología 6.7.1), logramos solubilizar a la proteína GST-nCBP (figura 21B) con una buena eficiencia de unión a la resina glutatión sefarosa. Por otra parte, nCBP es un miembro de los factores del inicio de la traducción, y es una proteína de unión al 5'Cap. La proteína GST-nCBP purificada por este método demostró mantener su funcionalidad; ya que es capaz de unirse al <sup>75</sup>mGTP como proteína de fusión (GST-nCBP) y sola (nCBP) (figura 23).

### 8.2. nCBP es capaz de formar complejos protéicos.

Uno de los logros de nuestro estudio fue demostrar por primera vez que el factor de inicio de la traducción nCBP es capaz de formar complejos protéicos en la planta *A. thaliana*. Los resultados obtenidos por el análisis proteómico de los complejos formado mediante ensayos de “pull down” son de gran interés, ya que las proteínas identificadas parecen estar involucradas en procesos de respuesta a estrés y no en la formación del complejo de inicio de la traducción (figura 29).

Es importante recalcar que los extractos protéicos utilizados fueron del total de la plántula y por lo tanto esto involucra diferentes complejos de unión a 5'Cap dependiendo del tipo y ciclo celular en el que se encuentren. Se ha reportado que nCBP solo es detectada en complejos de unión a 5'Cap en tejidos de activo crecimiento como meristemas, hojas nacientes y cultivos celulares en proliferación (hasta los 4 días), pero no es detectable en extractos protéicos totales de los mismos tejidos (Bush *et al.*, 2009), indicando que la mayoría o el total de la proteína esta participando en reconocimiento del 5'Cap.

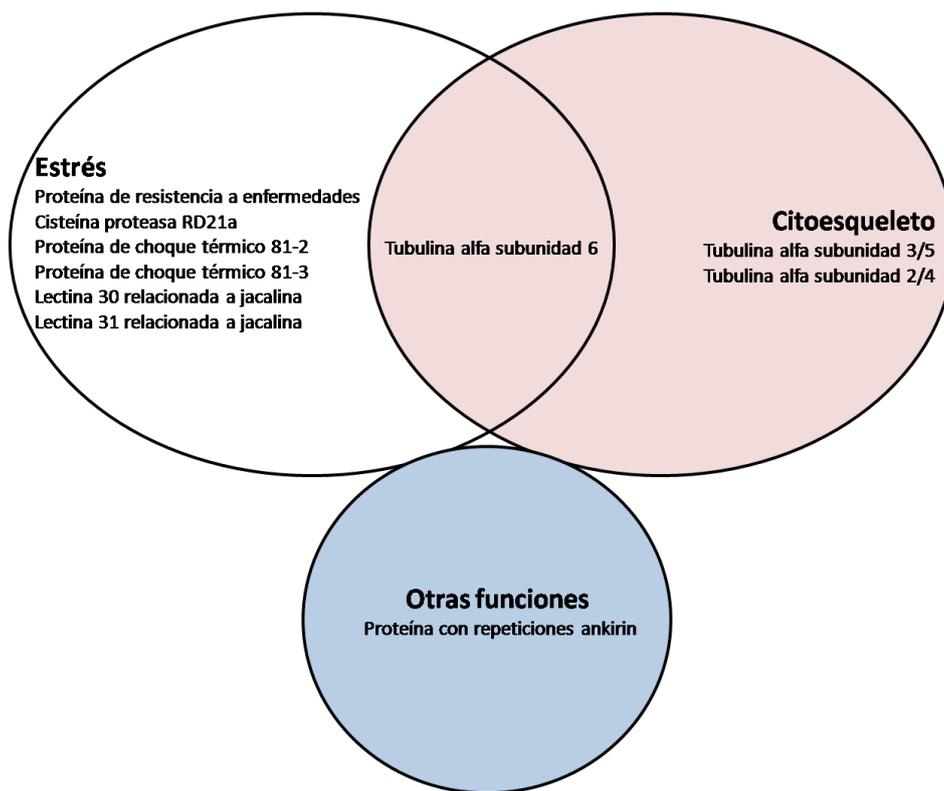
Cuando agregamos la proteína nCBP recombinante a extractos totales de la plántula mutantes para nCBP, muy posiblemente los complejos nativos de unión a 5'Cap que formaría ya están siendo remplazados por alguno de los otros dos factores (eIF4E o eIF(iso)4E), ya que se ha demostrado que estos factores pueden ser parcialmente redundantes en su función (Duprat *et al.*, 2002 y Combe *et al.*, 2005). Por lo que la unión del resto de los factores de inicio de la traducción (eIF4A, eIF4G o eIF(iso)4G) a nCBP pudiese ser mínima o nula, de tal manera que no fue posible detectarlos. Además, no se sabe si nCBP participa en la traducción *in vivo*. La interacción entre nCBP y proteínas diferentes a los factores de inicio de la traducción sugiere que esta proteína puede participar en algún otro proceso del metabolismo de RNA, como exportación del núcleo, localización en gránulos citoplasmáticos e incluso inhibición traduccional.

Lo antes descrito es apoyado por estudios que han demostrado que los complejos de unión a 5'Cap son dinámicos dependiendo del tipo y ciclo celular. Cuando se hicieron análisis de estas proteínas en la planta se encontro que los factores eIF4A y eIF(iso)4E son los mejor expresados en meristemos y hojas nacientes, medianas y desarrolladas. Sin embargo, el factor eIF4E solo se encuentra en baja expresión en meristemos y una mayor expresión en hojas nacientes, el factor eIF4G solo se expresa en hojas nacientes y los factores eIF(iso)4G y nCBP no son detectados. Al hacer el mismo análisis por la captura de los complejos con  $^7$ mGTP, el factor eIF4A y eIF4G no son detectados, el factor eIF4E es detectado en todos los tejidos, el factor eIF(iso)4E es detectado en meristemos, hojas nacientes y en hojas medianas pero muy poco en hojas desarrolladas, finalmente, el factor eIF(iso)4G y nCBP son detectados en meristemos y va disminuyendo su expresión en hojas nacientes y medianas, hasta desaparecer en hojas desarrolladas (Bush *et al.*, 2009). Este hecho sugiere que tal vez las proteínas de unión a 5'Cap recluten ciertas proteínas dependiendo de la etapa de crecimiento, y por lo tanto su función sea diferente a la canónica según las necesidades de la planta. Por otra parte, de manera natural nCBP podría estar llevando a cabo otras funciones independientes de su unión a 5'Cap en tejidos poco proliferativos, como se ha propuesto para el factor eIF4A el cual bajo ciertas condiciones de crecimiento no aparece en los complejos de unión a 5'Cap (Bush *et al.*, 2009).

### **8.2.1. Proteínas de respuesta a estrés.**

Entre las proteínas identificadas que interaccionan con nCBP se encuentran dos lectinas relacionadas a jacalinas (JALs), la proteína de unión a PYK10 (PBP1)/JAL

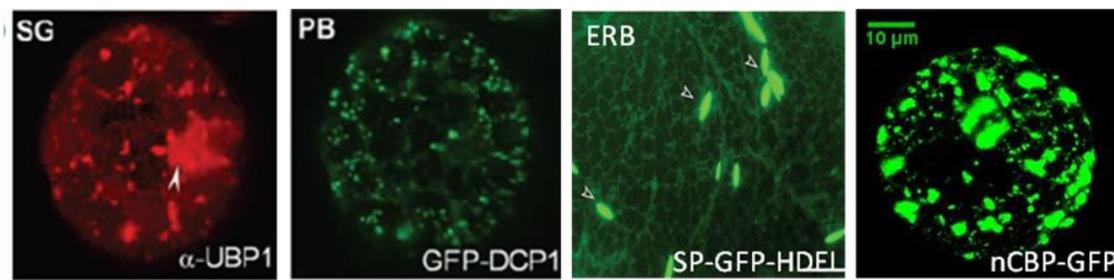
30 PBP1/JAL30 y JAL31. Las jacalinas son una familia de proteínas pertenecientes al grupo de las lectinas (Sastry *et al.*, 1986) que reconocen y se unen específicamente a carbohidratos libres o unidos a proteínas y lípidos. En plantas las JALs se dividen en dos subfamilias según su estructura y especificidad de reconocimiento de carbohidratos: Las JALs específicas a galactosa (GJRLs) localizadas en vacuola y las JALs específicas a manosa (MJRLs) localizadas en citoplasma y núcleo (Peumans *et al.*, 2000; Van Damme *et al.*, 2008; Lannoo y Van Damme, 2010). PBP1/JAL30 y JAL31 pertenecen a la subfamilia de las MJRLs.



**Figura 29. Clasificación de las proteínas que interactúan con nCBP.** La mayoría de las proteínas se clasifican como proteínas de respuesta a enfermedades.

nCBP podría estar interactuando con PBP1/JAL30 y JAL31 en el citoplasma, estando implicada en la regulación de la actividad de las JALs para formar cuerpos parecidos a vesículas derivados del retículo endoplasmático (ER) llamados “cuerpos del retículo endoplasmático” (figura 30) (Gunning, 1998; Hayashi *et al.*, 2001; Hawes, 2001; Ahn *et al.*, 2010). En *A. thaliana* estos cuerpos se acumulan en plántulas y raíces y se inducen en hojas dañadas, sugiriendo que son componentes del sistema de defensa (Hayashi *et al.*, 2001). Estudios bioquímicos han demostrado que PBP1/JAL30 y JAL31 tienen papeles antagónicos; ya que en plantas mutantes nulas para *jal23* y *jal31* los cuerpos disminuyen de tamaño. A estas JALs se les denominó polimerizadoras; ya que cuando no están presentes, los agregados no se pueden

formar. Contrariamente, en las mutantes nulas *pbp1/jal30* y *jal22* los agregados aumentan de tamaño. A estas otras JALs se les denominó inhibitorias, sugiriendo que cuando están presentes inhiben la formación de estos agregados (Nagano *et al.*, 2008). Interesantemente nuestros resultados indican que nCBP interacciona con una JAL de tipo inhibitoria (PBP1/JAL30) y otra de tipo polimerizadora (JAL31) probablemente resultando en un equilibrio para la formación de gránulos regulada por estas proteínas. Una posible hipótesis sería que de manera natural nCBP está interaccionando con ambas JALs, al presentarse algún daño celular nCBP ayuda a que JAL 31 pase a formar parte de los cuerpos del retículo maduros para activar algunas  $\beta$ -glucosidasas y comience la defensa de la célula, y cuando el daño es minimizado ayude al recambio de JAL31 por PBP1/JAL30 y entonces se inhiba la formación de más agregados.



**Figura 30. Comparación de los diferentes gránulos citoplasmáticos descritos en plantas.** Los gránulos de estrés (SGs) contienen proteínas del complejo de inicio de la traducción 48S y chaperonas de RNA, como UBP1; los cuerpos de procesamiento (PBs) contienen proteínas de la maquinaria de degradación de RNA, como DCP1 y los cuerpos del retículo endoplasmático (ERBs) contienen algunas proteínas con la secuencia de retención de retículo (HDEL). Se muestra la localización de la proteína nCBP-GFP, la cual aún no se sabe qué tipo de gránulo citoplasmático podría estar formando. Los SGs y PBs son en protoplastos del mesófilo de tabaco, los ERBs de células epidermales de *A. thaliana* y la imagen de nCBP en protoplastos de *A. thaliana*. La escala para todas las imágenes es de 10  $\mu$ m. Tomado y modificado de Hayashi *et al.*, 2001; Weber *et al.*, 2008; y De la Torre, 2009.

Nuestros resultados indican que nCBP también interactúa con la cisteína proteasa de respuesta a desecación 21a (RD21a), RD21a es un miembro de la familia de las cisteína proteasas parecidas a papaína (PLCPs) (Koizumi *et al.*, 1993; van der Hoorn *et al.*, 2004; Kaschani *et al.*, 2010; Bozkurt *et al.*, 2011; Shindo *et al.*, 2012). En plantas las PLCPs son enzimas muy estables implicadas en la percepción de patógenos, señales de resistencia a enfermedades, defensa en contra de insectos y hongos, senescencia, muerte celular programada, maduración del fruto y acumulación de proteínas en semillas y tubérculos (van der Hoorn, 2008; Martínez *et al.*, 2012).

RD21a se sintetiza como un gran precursor de 51 KDa (tabla 1) que se acumula en cuerpos del retículo, posteriormente pasa a vacuolas en donde se presenta como

intermediario y finalmente madura a una proteína de 26 KDa. En plántulas de *A. thaliana* estresadas, los cuerpos del retículo que contienen a RD21a se fusionan unos con otros y eventualmente con vacuolas, liberando su contenido en el interior de la vacuola, en donde RD21a madura (Hayashi *et al.*, 2001). Se descarta la posibilidad de que la interacción entre nCBP y RD21a sea en cuerpos del retículo; ya que la proteína RD21a que interacciona con nCBP es de un peso aproximado de 26 KDa (figura 25) (RD21a madura) que se localiza en vacuolas (Hayashi *et al.*, 2001; Carter *et al.*, 2004; Ondzighi *et al.*, 2008), apoplasto (Charmont *et al.*, 2005) o lisosomas (Richau *et al.*, 2012). Estos resultados nos permiten especular que nCBP se podría estar uniendo a RD21a durante su proceso final de maduración en los cuerpos del retículo, que están siendo fusionados con vacuolas o entre sí mismos. Por otra parte, los gránulos de nCBP-GFP vistos en protoplastos de *A. thaliana* por De la Torre, 2009 (figura 30) podrían corresponder a alguno de estos eventos de fusión. Finalmente, el complejo formado por nCBP con RD21a podría estar participando en procesos de desarrollo como se propone para algunos ortólogos en trigo (Shi y Xu, 2009) o en procesos aún desconocidos en plántulas, y no necesariamente en respuesta a estrés.

Otro grupo de proteínas que responden a estrés son las proteínas de choque térmico (HSPs). En eucariontes estas proteínas están agrupadas en familias según su peso molecular: HSP100, 90, 70, 60 y las HSPs de bajo peso molecular (Milioni y Hatzopolus, 1997; Finka *et al.*, 2011). En el presente trabajo se encontró que nCBP interacciona con HSP81.2 y HSP81.3 (tabla 1) pertenecientes a la familia de las HSP90s. Su función es ayudar al plegamiento de proteínas “clientes” manteniendo la integridad estructural y funcional de dichas proteínas. Se han reportado más de 200 proteínas “clientes” que abarcan un amplio rango de procesos biológicos, por lo que se piensa que las HSP90s son encargadas de la homeostasis protéica (Buchner *et al.*, 1999; Momose *et al.*, 2002; Queitsch *et al.*, 2002; Te *et al.*, 2007; Lotz *et al.*, 2008; Toogun *et al.*, 2008; Wandinger *et al.*, 2008; Picard, D. HSP90 interactors. <http://www.picard.ch/downloads/Hsp90interactors.pdf>; Cha *et al.*, 2009; Mittelman *et al.*, 2010; Specchia *et al.*, 2010; Taipale *et al.*, 2010; Hartson y Matts, 2012; Li *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012); ya que la inhibición de HSP90 resulta en la degradación vía proteosoma de sus proteínas “clientes” culminando en muerte celular. (Lotz *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008; Tsaytler *et al.*, 2009).

En *A. thaliana* HSP81.2 Y HSP81.3 son proteínas con un peso molecular de 81 KDa con localización citoplasmática y nuclear (Milioni y Hatzopolus, 1997; Krishna y Gloor, 2001). nCBP podría estar colaborando con HSP81.2 y HSP81.3 en diversos procesos

biológicos esenciales para la planta o incluso nCBP podría ser una proteína “cliente”. No se descarta la posibilidad de que HSP90s puedan ser parte de algún gránulo citoplasmático aún desconocido en donde estabiliza a nCBP, RD21a y las JALs 30 y 31. Estas conjeturas son apoyadas por estudios que indican que las HSP90s citoplasmáticas modulan la resistencia de *A. thaliana* a insectos, virus y herbivoría mediante la estabilización y funcionalización de proteínas de resistencia a enfermedades (Takahashi *et al.*, 1992; Hubert *et al.*, 2003; Sangster *et al.*, 2007), durante el desarrollo (Koning *et al.*, 1992; Marrs *et al.*, 1993; Reddy *et al.*, 1998), en respuesta al frío (Krishna *et al.*, 1995) y al tratamiento con brasinoesteroides (Wilén *et al.*, 1995; Dhaubhadel *et al.*, 1999).

Otros estudios con mutantes nulas, tratamientos con inhibidores y RNAs de interferencia para HSP90s han revelado que la represión de las proteínas citoplasmáticas HSP 81.1, 81.2, 81.3 y 81.4 produce variaciones en la morfología de las hojas y tallos, así como retraso en el tiempo de floración, sin impactar la viabilidad de la planta, (Queitsch *et al.*, 2002; Sangster *et al.*, 2007; Sangster *et al.*, 2008). Por lo tanto, las HSP90s citoplasmáticas son reguladoras de la respuesta de la planta al medio ambiente y esenciales para el establecimiento de la morfología durante el desarrollo. No obstante, estas generalizaciones no dependen de la función de una sola HSP90 si no de la función de todas las HSP90 citoplasmáticas en conjunto (Sangster *et al.*, 2007; 2008). El hecho de que las HSP90s participen en el proceso de floración (Sangster *et al.*, 2007), como también se observó para nCBP, sugiere que algunos complejos ribonucleoprotéicos (RNPs) o multiprotéicos que involucran ambos tipos de proteínas podrían participar en la inducción de la floración.

Además, en animales también se ha demostrado que HSP90 juega un papel muy importante en la formación de PBs y SGs y es requerida para la localización de eIF4E a estos gránulos (Suzuki *et al.*, 2009; Matsumoto *et al.*, 2011), por lo que no se descarta la posibilidad de que nCBP podría estar cumpliendo con la misma función en plantas.

Otra proteína de respuesta a estrés que interacciona con nCBP es una proteína de resistencia a enfermedades (R). Las proteínas R se dividen en dos clases: aquellas proteínas que contienen un dominio de repeticiones ricas en leucina (LRRs) extracitoplasmático y las que contienen un LRRs citoplasmático, también llamadas proteínas con repeticiones ricas en leucina con dominio de unión a nucleótido (NB-LRRs). Todas estas proteínas están involucradas en las interacciones específicas

proteína-proteína (Jones y Jones, 1997; McHale *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007; Tameling y Joosten, 2007; Rafiqi *et al.*, 2009). En células sanas las NB-LRRs existen de forma inactiva asociadas a complejos de proteínas chaperonas, entre ellas las HSP90s, que ayudan a las NB-LRRs a su buen plegamiento y estabilidad, así como al reconocimiento intermolecular y cambios conformacionales que sufren en su estados activo e inactivo (Hubert *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004; Schulze-Lefert, 2004; Azevedo *et al.*, 2006; Boter *et al.*, 2007).

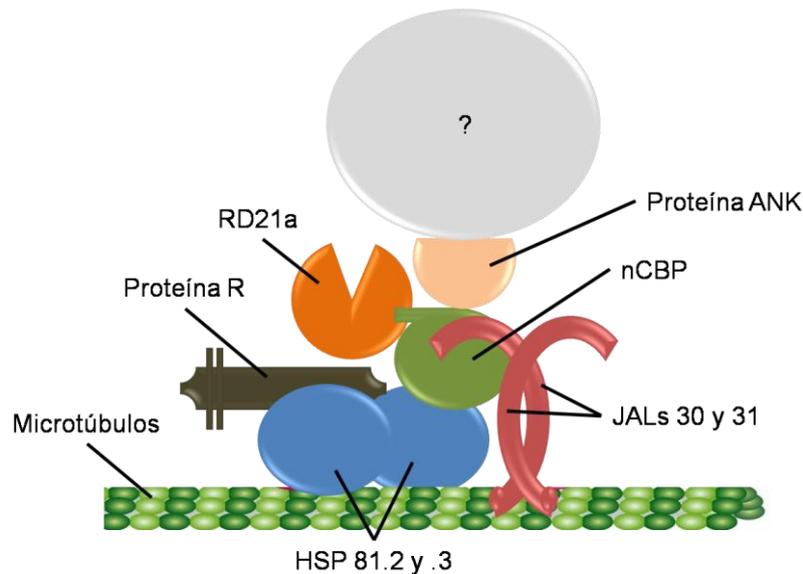
Nuestros resultados arrojan que la proteína R que interacciona con nCBP (AT2G15320) pertenece a las NB-LRRs. En plantas las NB-LRRs tienen un importante papel en el reconocimiento de las proteínas de avirulencia (Avr) e inicio de la señalización de defensa (Kobe y Kajava, 2001; McHale *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007; Tameling y Joosten, 2007; Moffett, 2009; Rafiqi *et al.*, 2009). Las NB-LRRs además de estar involucradas en la señalización inducida por patógenos, también pueden tener funciones en procesos celulares como tolerancia a drogas, desarrollo y fotomorfogénesis, las cuales son independientes o indirectamente relacionados con la respuesta inmune (Tameling y Joosten, 2007).

Los ensayos de “*Pull down*” realizados en este trabajo no permiten discernir si nCBP puede interactuar directamente con la NB-LRR (AT2G15320) o indirectamente a través de una HSP90 citoplasmática (Belkhadir *et al.*, 2004). Sin embargo, dada la regulación de la actividad de las NB-LRRs por chaperonas y su propia funcionalidad en complejos con otras proteínas, se puede hipotetizar que nCBP es parte de la formación de agregados protéicos en ciertos gránulos citoplasmáticos en *A. thaliana* que contienen proteínas como JAL 30 y JAL31, RD21a y a la proteína NB-LRR (AT2G15320). Estos gránulos podrían ser estabilizados por HSP81.2 y HSP81.3 y transportados por microtúbulos (figura 31). La remodelación y composición de dichos gránulos podría depender de la condición medioambiental o de la etapa del desarrollo de la planta.

### **8.2.2. Proteínas del citoesqueleto.**

Otras proteínas que interactúan con nCBP son  $\alpha$ -tubulinas ( $\alpha$ -tubulina (*TUAs* 1-6), excepto la 5). Al igual que eIF4E (Ferrero *et al.*, 2012), nCBP podría estar formando gránulos citoplasmáticos que impliquen una reorganización del citoesqueleto, en donde estos gránulos pueden estar participando en respuesta a estrés o en funciones del desarrollo morfológico. Esto es apoyado por estudios en donde se ha demostrado que los microtúbulos están involucrados en el desarrollo morfológico y respuesta a patógenos y estrés en plantas, ya sea por su función

intrínseca o por el transporte de complejos de proteínas involucradas en dichos eventos. Por lo que no es inesperado encontrar proteínas del citoesqueleto asociadas a complejos grandes de proteínas o ribonucleoproteínas, ya que es la manera en la que la célula va a lograr su localización precisa en el sitio donde se requiere su función (Ueda *et al.*, 1999; Bao *et al.*, 2001; Marcus *et al.*, 2001; Wang y Nick, 2001; Komis *et al.*, 2002; Thitamadee *et al.*, 2002; Takemoto *et al.*, 2003; Abe *et al.*, 2004 y 2005; Lü *et al.*, 2007 y Hardham *et al.*, 2008).



**Figura 31. Posibles interacciones de nCBP.** Dadas las características de las proteínas encontradas en este trabajo, nCBP podría estar interactuando directa o indirectamente con ellas para la formación de algún tipo gránulos citoplasmáticos o un complejo de transporte vesicular.

### 8.2.3. Proteínas con función desconocida.

nCBP también interactúa con una proteína con repeticiones ankirin (ANK), AT5G60070, en *A. thaliana* esta proteína es parte de una familia de proteínas transmembrales (AtANKTMs). En general las AtANKTMs se expresan en los diferentes órganos (raíces, hojas, flores, meristemos, hojas caulinares y silículas y en tres estadios del desarrollo). Sin embargo el transcrito de *At5g60070* no se ha logrado detectar en ninguno de los tejidos antes mencionados y a diferencia de la mayoría, no se tiene información del patrón de expresión del transcrito en condiciones de estrés (Becerra *et al.*, 2004).

Algunas AtANKTMs son ampliamente expresadas, pudiendo tener una función general o pleiotrópica, mientras que otros como *At5g60070* tienen una expresión mas restringida y por lo tanto podrían tener una función más específica durante ciertos estadios del desarrollo de la planta (Becerra *et al.*, 2004). En este trabajo se encontró

a AT5G60070 en plántulas de 16 días por lo que esta podría participar en el desarrollo temprano de *A. thaliana*. Aunque no podemos saber qué función pudiera tener en el complejo de proteínas que forma nCBP, muy probablemente este cumpliendo una función de proteína andamio (figura 31), ya que, en eucariontes estas proteínas son encontradas en el núcleo, citoplasma, membrana celular, mitocondria y medio extracelular, actuando como andamios para interacciones entre proteínas que cumplen diversas funciones en procesos de regulación del ciclo celular y respuesta al ambiente (Michael y Bennett, 1992; Sedgwick y Smerdon, 1999; Bennett y Chen, 2001; Mosavi *et al.*, 2004). Sin embargo, en plantas, pocas proteínas con repeticiones ANK han sido caracterizadas (Zhang *et al.*, 1992; Cao *et al.*, 1997; Albert *et al.*, 1999; Zimmermann y Sentenac, 1999; Jonas-Straube *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2002; Chinchilla *et al.*, 2003; Kuhlmann *et al.*, 2003) y su localización aún no es del todo clara. Por lo que es de gran interés seguir a esta proteína y su posible función en *A. thaliana*.

Finalmente, acorde a la búsqueda bibliográfica descrita, los resultados obtenidos en este trabajo son difíciles de interpretar. Al ser nCBP una proteína de unión a 5'Cap, se esperaba que está participara en la formación de complejos de tipo RNPs, donde al menos algunas de las proteínas interactoras serían proteínas de unión a RNA o factores de traducción. Sin embargo, entre las proteínas identificadas no aparecen factores de traducción o proteínas relacionadas con el metabolismo de RNA y la formación de SGs y PBs (Ferrero *et al.*, 2012). Los gránulos observados por De la Torre (2009) se asemejan a SGs más que a PBs o cuerpos del retículo (figura 30), sin embargo, definitivamente se requiere determinar su naturaleza mediante marcadores específicos. La presencia o morfología de estos gránulos irregulares y grandes formados por nCBP podrían ser artefactos debido a la sobreexpresión de nCBP o la misma generación de los protoplastos que implica un estrés para las células. Por ejemplo, en células de mamíferos, la sobreexpresión de componentes de PBs crean PBs de tamaño y morfología anormal (Kedersha y Anderson, 2007). Por otra parte, la localización observada también podría pertenecer a una mezcla de los gránulos RNPs ya descritos, por lo que estudios más finos de localización para nCBP son necesarios para el entendimiento completo de su función y de esta manera, tomando los antecedentes antes descritos y nuestros datos, podremos obtener mayor conocimiento del interactoma de nCBP para finalmente lograr un mayor entendimiento de la biología de esta proteína.

## 9. CONCLUSIONES.

- ♣ La proteína de fusión GST-nCBP generada en este trabajo es funcional; ya que es capaz de unirse al  $^{75}\text{S}$ mGTP.
- ♣ nCBP participa en la formación de complejos protéicos, al parecer involucados en la respuesta a estrés; ya que las proteínas identificadas se categorizan como de respuesta a estrés.
- ♣ Los anticuerpos policlonales anti-nCBP obtenidos en el laboratorio reconocen a la proteína nCBP endógena, por lo tanto pueden ser utilizados para experimentos de inmunodetección e inmunoprecipitación.
- ♣ Este es el primer trabajo que demuestra que la proteína de inicio de la traducción, nCBP, es capaz de formar complejos protéicos en la planta *A. thaliana*.

## 10. PERSPECTIVAS.

- ♣ Utilizar los anticuerpos policlonales contra nCBP generados en este trabajo en ensayos RIP en *A. thaliana*.
- ♣ Identificar los RNAm que puedan estar siendo reconocidos específicamente por nCBP *in vivo*.
- ♣ Corroborar las interacciones observadas mediante otros métodos, como por ejemplo co-inmunoprecipitación.
- ♣ Hacer pruebas de colocalización de la proteína nCBP con marcadores de diferentes gránulos citoplasmáticos que han sido descritos hasta este momento.
- ♣ Hacer estudios de respuesta a estrés y analizar la dinámica de expresión de nCBP y las proteínas que se unen a ella.

## 11. APÉNDICES.

### A. SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO.

#### Azul de Commassie

Sulfato de amonio	8%
Acido fosfórico	2%
Azul de commassie	0.1%
Metanol	20%

#### Medio LB pH 7.0

Bactotripton	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
NaCl	5 g/L
Si el medio es solido	10g/L

Esterilizar por autoclave

#### PBT

PBS 1X	
Tween 20	0.1%

#### Solución <sup>7</sup>mGTP

HEPES pH 7.6	20 mM
Glicerol	10%
KCl	100 mM
EDTA	0.2 mM
DTT	0.5 mM
PMSF	10 mM
Inhibidores de proteasas (Complete™ libre de EDTA)	1 mM

Agregar el DTT, PMSF e inhibidores de proteasas al momento de usarse.

#### Solución <sup>7</sup>mGTP B

Solución <sup>7</sup> mGTP	
PMSF	2 mM
DTT	0.5 mM

#### Solución <sup>7</sup>mGTP C

Solución <sup>7</sup> mGTP	
PMSF	2 mM
DTT	0.5 mM
GTP	100 µM (stock 50 mg/ml)

**Solución <sup>7</sup>mGTP D**Solución <sup>7</sup>mGTP

PMSF	2 mM
DTT	0.5 mM
<sup>7</sup> mGTP	200 μM (stock 20 mM)

**Solución <sup>7</sup>mGTP E**Solución <sup>7</sup>mGTP

PMSF	2 mM
DTT	0.5 mM
KCl	0.5 M

**Solución BRM 3X**

SDS	2%
Glicerol	10%
Tris pH 6.8	60 mM
Azul de bromofenol	0.001%
β-mercaptoetanol	100 mM

**Solución de CaCl<sub>2</sub>**

CaCl <sub>2</sub>	60 mM
Glicerol	15%
PIPES pH 7.0	10 mM

Esterilizar por autoclave

**Solución de corrida pH 8.3 10X**

Tris base	250 mM
Glicina	2.5 M
SDS	1%

**Solución de extracción 5X**

Tis-HCl pH 8.1	120 mM
NaCl	400 mM
EDTA	5 mM

Agregar 1mM de DTT al momento de usarse 1X

**Solución de fosfatos salino (PBS) pH 7.4 10X**

NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	10 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	2 mM

**Solución de lisis PLB.**

KCl	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
HEPES pH 7	10 mM
NP-40 (Igepal)	0.5 %
DTT	1 mM
In hibidor de proteasas (Complete™ libre de EDTA)	25 µl ml <sup>-1</sup>

Agregar el DTT y Complete al momento de usarse.

**Soluciones para tinción de plata.**

## Solución A

Nitrato de plata	0.8 g
Agua	4 ml

## Solución B

NaOH	21 ml al 0.36%
Hidróxido de amonio	1.4 ml

## Solución de tinción.

Agregar por goteo la solución A en la solución B, si la solución queda turbia, agregar hidróxido de amonio hasta que quede transparente y aforar a 100ml

**Solución de revelado.**

Citrato de sodio	1 ml 1%
Formaldehido	0.1 ml al 37%

Aforar con agua a 100ml.

**Solución de transferencia 1X**

Solución de corrida 1X	10%
Metanol	20%
Agua destilada	70%

**TBE 5X pH 8.0**

Tris-HCl	450 mM
Acido bórico	450 mM
EDTA	20 mM

**TGEM 0.1**

Tris-HCl pH 7.9	20 mM
Glicerol	20 %
EDTA	1 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
Nonidet P-40 (Igepal)	0.1 %
NaCl	100 mM
DTT	1 mM
PMSF	0.2 mM
Complete libre de EDTA	1 mM

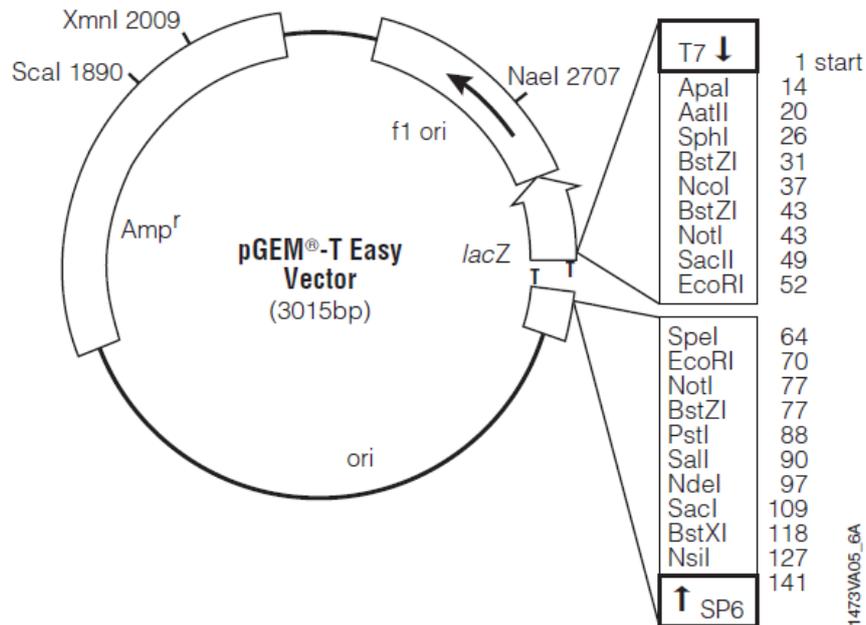
**TGEM 1.0**

Tris-HCl pH 7.9	20 mM
Glicerol	20 %
EDTA	1 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
NP-40 (Igepal)	0.1 %
NaCl	1 M
DTT	1 mM
PMSF	0.2 mM
Complete libre de EDTA	1 mM

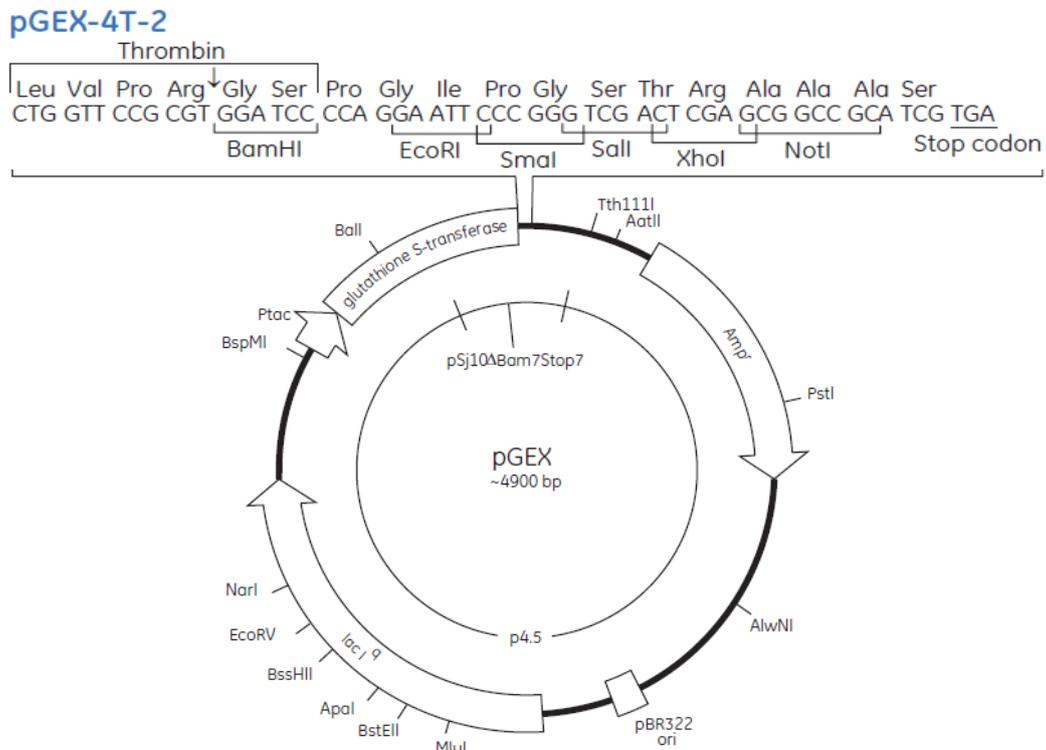
**TGMC 0.1**

Tris-HCl pH 7.9	20 mM
Glicerol	20 %
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
CaCl <sub>2</sub>	5 mM
NP-40 (Igepal)	0.1 %
NaCl	100 mM
DTT	1 mM
PMSF	0.2 mM
Complete libre de EDTA	1 mM

## B. MAPA DE VECTORES.



Mapa del pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector (No. de catalogo A1360) Promega Corporation. Para mayores detalles consultar el manual técnico.



Mapa del pGEX-4T-2 Vector (No. de catalogo 28-9545-50) GE Healthcare. Para mayores detalles consultar el manual técnico.

### C. TABLAS DE LAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR LC/MS/MS.

Listado del total de proteínas identificadas por LC/MS/MS. Las proteínas se presentan según aparecieron en la muestra del gel que se mando a secuenciar (A - D) y sus respectivos controles (A-C - D-C). En negritas las proteínas seleccionadas como confiables.

<b>Muestra A</b>				
Proteína	P <sub>pro</sub> <1	XC>10	No. de peptidos	No de acceso NCBI
<b>Lectina relacionada a Jacalina 31</b>	.009	10.2	2	15228199
<b>Proteína de unión a PYK10</b>	.009	10.2	2	15228198
Lectina putativa	.009	10.2	2	21594017
Glutación S-transferasa 11	.008	50.2	24	15218640
Glutación S-transferasa 1	.008	40.2	18	15218640
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa A	.008	10.1	2	30688425
AC013430 7 F3F9.11	.007	40.2	7	8052534
Glutación S-transferasa TAU 20	.007	30.2	5	15218311
Glutación S-transferasa putativa inducible por 2,4-D	.007	20.1	3	21592638
Glutación S-transferasa ERD13	.007	10.3	2	15224582
S-formilglutación hidrólasa	.007	10.2	2	15227376
Esterasa D putativa	.007	10.2	2	21593226
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa B	.006	10.1	2	15217555
Glutación S-transferasa PM24	.006	50.2	35	15235401
Glutación S-transferasa 16	.006	30.2	26	15227063
T14P8.11	.006	30.2	21	319395
<b>Cisteína proteasa RD21a</b>	.006	18.1	4	18401614
Cisteína proteasa RD21A	.006	18.1	4	62320725
ATP sintasa subunidad gama 1	.006	20.2	6	18412632
AT4G04640	.006	10.2	4	222424965
Factor de elongación Tu	.006	10.2	2	15237059
<b>Proteína con repeticiones ankirin</b>	.004	14.2	6	15238604
<b>Muestra A control</b>				
Glutación S-transferasa PM24	.005	10.1	1	15235401
Glutación S-transferasa 16	.005	10.1	1	15227063
Atpm24.1 Glutación S-transferasa	.005	10.1	1	21555418
Proteína RING finger	.005	10.1	6	42562365
Proteína superroot 1	.004	6.1	1	15225387
Proteína desconocida	.004	16.1	2	20268715
Proteína con repeticiones armadillo parecida a beta-catenina	.004	16.1	2	186509834
Factor de elongación Tu	.009	10.2	1	15237059

<b>Muestra B</b>				
Proteína	P <sub>pro</sub> <1	XC>10	No. de peptidos	No de acceso NCBI
<b>Tubulina alfa subunidad 3/5</b>	.009	48.2	5	15241168
<b>Tubulina alfa subunidad 2/4</b>	.009	40.2	4	15220329
<b>Tubulina alfa subunidad 6</b>	.009	40.2	4	15233627
AF428406_1 AT4g14960/dl3520c	.009	40.2	4	16226462
Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa subunidad mayor	.008	80.3	14	7525041
Nueva proteína de unión a 5'Cap, nCBP	.008	70.3	57	3108209
Factor de inicio de la traducción eIF4E	.008	70.3	57	15238740
Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa subunidad mayor	.006	70.2	12	139389650
Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa	.006	60.2	11	1944432
Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa subunidad mayor	.006	60.2	11	27752799
Factor de elongación Tu	.006	10.2	1	15237059
Precursor del factor de elongación Tu de cloroplasto putativo	.006	10.2	1	23397095
Subunidad mayor de Rubisco	.006	20.1	2	2315136
ATP sintasa subunidad beta CF1	.005	10.1	1	7525040
ATP sintasa subunidad beta	.005	10.1	1	73658412
Catalasa 3	.005	10.2	1	18394888
Proteína desconocida	.005	10.2	1	21593072
Catalasa 3	.005	10.2	1	42571565
Proteína RING finger	.004	10.1	1	42562365
Tubulina beta	.004	10.1	1	15227559
<b>Muestra B control</b>				
Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa subunidad mayor	.005	50.2	5	7525041
Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa subunidad mayor	.005	40.2	4	139389650
Proteína RING finger	.005	10.1	7	42562365
Proteína desconocida	.004	10.1	2	20268715
Proteína con repeticiones armadillo parecida a beta-catenina	.004	10.1	2	186509834
Ribulosa bifosfato carboxilasa/oxigenasa activasa	.004	10.2	1	18405145
At2g39730/T517.3	.004	10.2	1	15450379
Fosfatasa 2C 24 putativa	.004	8.2	1	15227078
Subunidad mayor de Rubisco	.004	10.2	1	2315136
Proteína cinasa AGC dependiente de cAMP y cGMP	.004	4.1	1	15235548

<b>Muestra C</b>				
Proteína	P <sub>pro</sub> <1	XC>10	No. de peptidos	No de acceso NCBI
Ribulosa bifosfato carboxilasa/oxigenasa activasa	.009	20.2	2	18405145
At2g39730/T517.3	.009	20.2	2	15450379
Nueva proteína de unión a 5'Cap, nCBP	.007	50.3	28	3108209
Factor de inicio de la traducción eIF4E	.007	50.3	28	15238740
<b>Proteína de choque térmico 81-2</b>	.006	12.2	3	15241115
<b>Proteína de choque térmico 81-3</b>	.006	12.2	3	15241113
Proteína de choque térmico 90	.006	12.2	3	24429604
AT5g56010/MDA7_5	.006	12.2	3	15215642
Proteína de choque térmico 81-2 (HSP81-2)	.006	12.2	3	23397152
Proteína de choque térmico 81-1	.006	10.1	1	15237214
Chaperona molecular HtpG	.006	10.1	1	15241102
Proteína de choque térmico de 81KDa	.006	10.1	1	217855
Factor de elongación Tu	.006	10.2	1	15237059
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa B	.005	20.2	2	15217555
Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa subunidad mayor	.005	30.2	3	7525041
Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa	.005	30.2	3	1944432
Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa subunidad mayor parcial (cloroplasto)	.005	30.2	3	27752799
Proteína con repeticiones ricas en leucina	.004	12.2	2	15226087
Proteína de resistencia a enfermedades con repeticiones ricas en leucina	.004	8.2	4	21554189
<b>Muestra C control</b>				
Factor de elongación Tu	.008	10.2	1	15237059
Precursor del factor de elongación Tu de cloroplasto putativo	.008	10.2	1	23397095
Proteína ORF1 retroelemento Athila putativa	.004	10.1	4	4388724
Proteína hipotética	.004	10.1	1	4587599
Proteína de unión a DNA de la familia HORMA	1.0	10.1	1	30689305
Proteína de unión a FAD con dominio BBE	1.0	4.1	1	15217586

<b>Muestra D</b>				
Proteína	P <sub>pro</sub> <1	XC>10	No. de peptidos	No de acceso NCBI
Nueva proteína de unión a 5'Cap, nCBP	.007	40.3	28	3108209
Factor de inicio de la traducción eIF4E	.007	40.3	28	15238740
Factor de elongación 1-alfa	.004	20.2	2	15239308
AC026875_2 T6D22.2	.004	20.2	4	8778823
Atg07930/T6D22_3	.004	20.2	2	15081765
Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa subunidad mayor	.004	10.2	1	7525041
Subunidad mayor de Rubisco	.004	10.2	1	2315136
<b>Proteína de resistencia a enfermedades con repeticiones ricas en leucina</b>	.004	26.2	9	21554189
Proteína con repeticiones ricas en leucina	.004	20.2	10	15226087
H96762 Proteína hipotética F6D5.1	.004	4.2	5	25406280
Proteína de la familia de factores de transcripción PLATZ	1.0	8.1	1	79322310
Peptidil-prolil isomerasa PASTICCINO1	1.0	10.2	1	18409970
Ologopeptidasa B	1.0	8.1	1	18403046
<b>Muestra D control</b>				
H96762 Proteína hipotética F6D5.1	.005	12.2	3	25406280
Homocisteína metil-transferasa	.004	10.1	1	15238686
Metionina sintasa independiente de cobalamin	.004	10.1	1	47600741
At5g17920.MP17_60	.004	10.1	1	15982743
Proteína abundante de la embriogénesis tardía, grupo 6	.004	8.1	1	15227781
Proteína de la familia de las helicasas dependiente de ATP	1.0	8.1	1	18390848

## 12. BIBLIOGRAFÍA.

Abe T y Hashimoto T (2005) Altered microtubule dynamics by expression of modified  $\alpha$ -tubulin protein causes right-handed helical growth in transgenic *Arabidopsis* plant. *Plant J.* 43: 191-204.

Abe T, Thitamadee S y Hashimoto T (2004) Microtubule defects and cell morphogenesis in the *lefty1lefty2* tubulin mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 45: 211-220.

Albert S, Despres B, Guilleminot J, Bechtold N, Pelletier G, Delseny M y Devic M (1999) The EMB 506 gene encodes a novel ankyrin repeat containing protein that is essential for the normal development of *Arabidopsis* embryos. *Plant J.* 17: 169-179.

Ahn YO, Shimizu B, Sakata K, Gantulga D, Zhou C, Bevan DR y Esen A (2010) Scopolin-hydrolyzing  $\beta$ -glucosidases in roots of *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 51: 132-143.

Anderson P y Kedersha N (2006) RNA granules. *J Cell Biol.* 172: 803-808.

Andrei MA, Ingelfinger D, Heintzmann R, Achsel T, Rivera-Pomar R y Lührmann R (2005) A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies. *RNA.* 11: 717-727.

Ashby JA, Stevenson CE, Jarvis GE, Lawson DM y Maule AJ (2011) Structure-based mutational analysis of eIF4E in relation to *tosbm1* resistance to pea seed-borne mosaic virus in pea. *PLoS One.* 6:e15873.

Azevedo C, Betsuyaku S, Peart J, Takahashi A, Noel L, Sadanandom A, Casais C, Parker J y Shirasu K (2006) Role of SGT1 in resistance protein accumulation in plant immunity. *EMBO J.* 25: 2007-2016.

Bailey-Serres J, Sorenson R y Juntawong P (2009) Getting the message across: cytoplasmatic ribonucleoprotein complex. *Trends Plant Sci.* 4: 443-453.

Bao Y, Kost B y Chua NH (2001) Reduced expression of  $\alpha$ -tubulin genes in *Arabidopsis thaliana* specifically affects root growth and morphology, root hair development and root gravitropism. *Plant J.* 28: 145-157.

Becerra C, Jahrman T, Puigdomènech P y Vicient CM (2004) Ankyrin repeat-containing proteins in *Arabidopsis*: characterization of a novel and abundant group of genes coding ankyrin-transmembrane protein. *Gene.* 340: 111-121.

Belkhadir Y, Subramaniam R y Dangl J (2004) Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Curr Opin Plant Biol.* 7: 391-399.

Bennett V y Chen L (2001) Ankyrins and cellular targeting of diverse membrane proteins to physiological sites. *Curr Opin Cell Biol.* 13: 61-67.

Blázquez MA, Ferrándiz C, Madueno F y Parcy F (2006) How floral meristems are built? *Plant Mol Biol.* 60: 855-870.

Boter M, Amigues B, Peart J, Breuer C, Kadota Y, Casais C, Moore G, Kleanthous C, Ochsenbein F, Shirasu K y Guerois R (2007) Structural and functional analysis of SGT1 reveals that its interaction with HSP90 is required for the accumulation of Rx, an R protein involved in plant immunity. *Plant Cell*. 19: 3791-804.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72: 248-254.

Browning KS (2004) Plant translation initiation factors: it is not easy. *Bioch Soc Trans*. 32: 589-591.

Browning KS, Lax SR y Ravel JM (1987) Identification of two messenger RNA cap binding proteins in wheat germ. *J Biol Chem*. 262: 11228-11232.

Bozkurt TO, Schornack S, Win J, Shindo T, Ilyas M, Oliva R, Cano LM, Jones AM, Huitema E, van der Hoorn RA y Kamoun S (2011) *Phytophthora infestans* effector AVRblb2 prevents secretion of a plant immune protease at the haustorial interface. *Proc Natl Acad Sci USA*. 108: 20832-20837.

Buchan JR, Muhlrud D y Parker R (2008) P bodies promote stress granule assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*. 183: 441-455.

Buchner J (1999) Hsp90 & Co.: a holding for folding. *Trends Biochem Sci*. 24: 136-141.

Bush MS, Hutchins AP, Jones AME, Naldrett MJ, Jarmolowski A, Lloyd CW y Doonan JH (2009) Selective recruitment of proteins to 5' cap complexes during the growth cycle in *Arabidopsis*. *Plant J*. 59: 400-412.

Butt TR, Edavettal SC, Hall JP y Mattern MR (2005) SUMO fusion technology for difficult to express proteins. *Protein Expr Purif*. 43: 1-9.

Cao H, Glazebrook J, Clarke JD, Volko S y Dong X (1997) The *Arabidopsis* NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell*. 88: 57-63.

Carberry SE, Darzynkiewicz E y Goss DJ (1991) A comparison of the binding of methylated cap analogues to wheat germ protein synthesis initiation factors 4F and (iso)4F. *Biochemistry*. 30: 1624-1627.

Carter C, Pan S, Zouhar J, Avila EL, Girke T y Raikhel NV (2004) The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins. *Plant Cell*. 16: 3285-3303.

Cha JY, Ermawati N, Jung MH, Su'udi M, Kim KY, Kim JY, Han Cd, Lee KH y Son D. (2009) Characterization of orchardgrass p23, a flowering plant Hsp90 cohort protein. *Cell Stress Chaperones*. 14: 233-243.

Charmont S, Jamet E, Pont-Lezica R y Canut H (2005) Proteomic analysis of secreted proteins from *Arabidopsis thaliana* seedlings: improved recovery following removal of phenolic compounds. *Phytochemistry*. 66:453-461.

Charron C, Nicolai M, Gallois JL, Robaglia C, Moury B, Palloix A y Caranta C (2008) Natural variation and functional analyses provide evidence for co-evolution between plant eIF4E and potyviral VPg. *Plant J*. 54: 56-68.

Chinchilla D, Merchan F, Megias M, Kondorosi A, Sousa C y Crespi M (2003) Ankyrin protein kinase: a novel type of plant kinase gene whose expression is induced by osmotic stress in alfalfa. *Plant Mol Biol*. 51: 555-566.

Cho PF, Poulin F, Cho-Park YA, Cho-Park IB, Chicoine JD, Lasko P y Sonenberg N (2005) A new paradigm for translational control: inhibition via 5'-3' mRNA tethering by Bicoid and the eIF4E cognate 4EHP. *Cell*. 121: 411-423.

Clemens MJ y Bommer UA (1999) Translational control: the cancer connection. *Int J Biochem Cell Biol*. 31: 1-23.

Combe JP, Petracek ME, van Eldik G, Meulewaeter F y Twell D (2005) Translation initiation factors eIF4E and eIFiso4E are required for polysome formation and regulate plant growth in tobacco. *Plant Mol Biol*. 57: 749-760.

Contreras-Paredes CA, Silva-Rosales L, Daròs JA, Alejandri-Ramírez ND y Dinkova TD (2013) The absence of eukaryotic initiation factor eIF(iso)4E affect the systemic spread of a *Tobacco etch virus* isolate in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant-Microbe Interact*. 26: 461-470

Culjkovic B, Tan K, Orolicki S, Amri A, Meloche S y Borden KL (2008) The eIF4E RNA regulon promotes the Akt signaling pathway. *J Cell Biol*. 181: 51-63.

Culjkovic B, Topisirovic I y Borden KLB (2007) Controlling gene expression through RNA regulons. *Cell Cycle*. 6: 65-69.

Culjkovic B, Topisirovic I, Skrabanek L, Ruiz-Gutierrez M y Borden KL (2006) eIF4E is a central node of an RNA regulon that governs cellular proliferation. *J Cell Biol*. 175: 415-26.

Culjkovic B, Topisirovic I, Skrabanek L, Ruiz-Gutierrez M y Borden KL (2005) eIF4E promotes nuclear export of cyclin D1 mRNAs via an element in the 3'UTR. *J Cell Biol*. 169: 245-56.

Davies E, Stankovic B, Vian A y Wood AJ (2012) Where has all the message gone? *Plant Sci*. 185-186: 23-32.

Decroocq V, Sicard O, Alamillo JM, Lansac M, Eyquard JP, García JA, Candresse T, Le Gall O y Revers F (2006) Multiple resistance traits control *Plum pox virus* infection in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant-Microbe Interact*. 19: 541-549.

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

Dhaubhadel S, Chaudhary S, Dobinson KF y Krishna P (1999) Treatment with 24-epibrassinolide, a brassinosteroid, increases the basic thermotolerance of *Brassica napus* and tomato seedlings. *Plant Mol Biol.* 40: 333-342.

Dinkova TD, Marquez-Velazquez NA, Aguilar R, Lazaro-Mixteco P y Sanchez de Jimenez E (2011) Tight translational control by the initiation factors eIF4E and eIF(iso)4E is required for maize seed germination. *Seed Science Research.* 21: 85–93.

Dinkova TD, Keiper BD, Korneeva NL, Aamodt EJ y Rhoads RE (2005) Translation of a small subset of *Caenorhabditis elegans* mRNAs is dependent on a specific eukaryotic translation initiation factor 4E isoform. *Mol Cell Biol.* 25: 100-113.

Dinkova TD y Sanchez de Jimenez E (1999) Differential expression and regulation of translation initiation factors -4E and -iso4E during maize germination. *Physiol Plant.* 107: 419-425.

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

Echevarría-Zomeño S, Yángüez E, Fernández-Bautista N, Castro-Sanz AB, Ferrando A y Castellano MM (2013) Regulation of translation initiation under biotic and abiotic stresses. *Int J Mol Sci.* 14: 4670-4683.

Eskelin K, Hafrén A, Rantalainen KI y Mäkinen K (2011) Potyviral VPg enhances viral RNA translation and inhibits reporter mRNA translation *in planta*. *J Virol.* 85: 9210-9221.

Ferraiuolo MA, Basak S, Dostie J, Murray EL, Schoenberg DR y Sonenberg N (2005) A role for the eIF4E-binding protein 4E-T in P-body formation and mRNA decay. *J Cell Biol.* 170: 913-24.

Ferrero PV, Layana C, Paulucci E, Gutiérrez P, Hernández G y Rivera-Pomar RV (2012) Cap binding-independent recruitment of eIF4E to cytoplasmic foci. *Biochim Biophys Acta.* 1823: 1217-1224.

Finka A, Mattoo RUH y Goloubinoff P (2011) Meta-analysis of heat- and chemically upregulated chaperone genes in plant and human cells. *Cell Stress Chaperones.* 16: 15-31.

Fornara F, de Montaigu A y Coupland G (2010) SnapShot: Control of flowering in *Arabidopsis*. *Cell.* DOI 10.1016/j.cell.2010.04.024

Frangioni JV y Neel BG (1993) Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal Biochem.* 210: 179-187.

Goodfellow IG y Roberts LO (2008) Eukaryotic initiation factor 4E. *Int J Biochem Cell Biol.* 40: 2675-2680.

Grzela R, Stokovska L, Andrieu JP, Dublet B, Zagorski W y Chroboczek J (2006) Potyvirus terminal protein VPg, effector of host eukaryotic initiation factor eIF4E. *Biochimie*. 88: 887-896.

Gunning BES (1998) The identity of mystery organelles in *Arabidopsis* plants expressing GFP. *Trends Plant Sci*. 3: 417.

Hardham AR, Takemoto D y White RG (2008) Rapid and dynamic subcellular reorganization following mechanical stimulation of *Arabidopsis* epidermal cells mimics responses to fungal and oomycete attack. *BMC Plant Biology*. 8: 63.

Hartson SD y Matts RL (2012) Approaches for defining the Hsp90- dependent proteome. *Biochim Biophys Acta*. 1823: 656-667.

Hayashi Y, Yamada K, Shimada T, Matsushima R, Nishizawa N, Nishimura M y Hara-Nishimura I (2001) A proteínase-storing body that prepares for cell death or stresses in the epidermal cells of *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*. 42: 894-899.

Hawes C, Saint-Jore C, Martin B y Zheng HQ (2001) ER confirmed as the location of mystery organelles in *Arabidopsis* plants expressing GFP! *Trends Plant Sci*. 6: 245-246.

Hempel FD, Welch DR y Feldman LJ (2000) Floral induction and determination: where is flowering controlled? *Trends plant Sci*. 5: 17-21.

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

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

Hornyik C, Terzi LC y Simpson GG (2010) The spen family protein FPA controls alternative cleavage and polyadenylation of RNA. *Dev Cell*. 18: 203-213.

Hubert DA, Tornero P, Belkhadir Y, Krishna P, Takahashi A, Shirasu K y Dangl JL (2003) Cytosolic HSP90 associates with and modulates the *Arabidopsis* RPM1 disease resistance protein. *EMBO J*. 22: 5679-5689.

Iborra FJ, Jackson DA y Cook PR (2001) Coupled transcription and translation within nuclei of mammalian cells. *Science*. 293: 1139-1142.

Jagus R, Bachvaroff, Joshi B y Place AR (2012) Diversity of eukaryotic translational initiation factor eIF4E in protists. *Comp Funct Genomics*. doi: 10.1155/2012/134839.

Jackson RJ, Hellen CUT y Pestova TV (2010) The mechanism of eukaryotic translation and principles of its regulation. *Nature Reviews*. 10: 113-127.

Jonas-Straube E, Hutin C, Hoffman NE y Schünemann D (2001) Functional analysis of the protein-interacting domains of chloroplast SRP43. *J Biol Chem*. 276: 24654-24660.

Jones DA y Jones JDG (1997). The role of leucine-rich repeat proteins in plant defences. *Adv Bot Res.* 24: 89-167.

Joshi B, Lee K, Maeder LD y Jagus R (2005) Phylogenetic analysis of eIF4E-family members. *BMC Evol Biol.* 5: 48

Kedersha N y Anderson P (2007) Mammalian stress granules and processing bodies. *Methods Enzymol.* 431: 61-81.

Kapust RB y Waugh DS (1999) *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci.* 8: 1668-1674.

Kaschani F, Shabab M, Bozkurt T, Shindo T, Schornack S, Gu C, Ilyas M, Win J, Kamoun S y van der Hoorn RA (2010) An effector-targeted protease contributes to defense against *Phytophthora infestans* and is under diversifying selection in natural hosts. *Plant Physiol.* 154: 1794-1804.

Keene JD (2007) RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat Rev Genet.* 8: 533-543.

Keene JD y Lager PJ (2005) Post-transcriptional operons and regulons co-ordinating gene expression. *Chromosome Res.* 13: 327-337.

Keiper BD, Lamphear BJ, Deshpande AM, Jankowska-Anyszka M, Aamodt EJ, Blumenthal T y Rhoads RE (2000) Functional characterization of five eIF4E isoforms in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem.* 275:10590-10596.

Khan MA, Miyoshi H, Gallie DR y Goss DJ (2008) Potyvirus genome-linked protein, VPg, directly affects wheat germ *in vitro* translation: Interactions with translation initiation factors eIF4F and eIFiso4F. *J Biol Chem.* 283: 1340-1349.

Kido K, Mochizuki T, Matsuo K, Tanaka C, Kubota K, Ohki T y Tsuda S (2008) Functional degeneration of the resistance gene *nsv* against Melon necrotic spot virus at low temperature. *Europ J Plant Pathol.* 121: 189-194.

Kim HS, Abbasi N y Choi SB (2013) Bruno-like proteins modulate flowering time via 3'UTR-dependent decay of *SOC1* mRNA. *New Phytol.* 198: 747-756.

Kimball SR, Horetsky RL, Ron D, Jefferson LS y Harding HP (2003) Mammalian stress granules represent sites of accumulation of stalled translation initiation complexes. *Am J Physiol.* 284: C273-C284.

Kobe B y Kajava AV (2001) The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol.* 11: 725-32.

Koizumi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Tsuji H y Shinozaki K (1993) Structure and expression of two genes encode distinct drought-inducible cysteine proteínases in *Arabidopsis thaliana*. *Gene.* 129: 175-182.

Komis G, Apostolakos P y Galatis B (2002) Hyperosmotic stress induces formation of tubulin microtubules in root-tip cells of *Triticum turgidum*: their probable involvement in protoplast volume control. *Plant Cell Physiol.* 43: 911-922.

Koning AJ, Rose R y Comai L (1992) Developmental expression of tomato heat-shock cognate protein 80. *Plant Physiol.* 100: 801-811.

Krishna P y Gloor G (2001) The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress Chaperones.* 6: 238-246.

Krishna P, Sacco M, Cherutti JF y Hill S (1995) Cold-induced accumulation of Hsp90 transcripts in *Brassica napus*. *Plant Physiol.* 107: 915-923.

Kuhlmann M, Horvay K, Strathmann A, Heinekamp T, Fischer U, Böttner S y Dröge-Laser W (2003) The  $\alpha$ -helical D1 domain of the tobacco bZIP transcription factor BZI-1 interacts with the ankyrin-repeat protein ANK1 and is important for BZI-1 function, both in auxin signaling and pathogen response. *J Biol Chem.* 278: 8786-8794.

Lannoo N y Van Damme EJM (2010) Nucleocytoplasmic plant lectins. *Biochim Biophys Acta.* 1800: 190-201.

LaVallie ER, DiBlasio EA, Kovacic S, Grant KL, Schendel PF y McCoy JM (1993) A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Biotechnology.* 11: 187-193.

Lellis AD, Kasschau KD, Whitham SA y Carrington JC (2002) Loss of susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF(iso)4E during *Potyvirus* infection. *Curr Biol.* 12: 1046-1051.

Li J, Soroka J y Buchner J (2012) The Hsp90 chaperone machinery: conformational dynamics and regulation by co.chaperones. *Biochem Biophys Acta.* 1823: 624-635.

Liu J, Liu X, Dai L y Wang G (2007) Recent progress in elucidating the structure, function and evolution of disease resistance genes in plants. *J Genet Genomics.* 34: 765-776.

Liu Y, Burch-Smith T, Schiff M, Feng S y Dinesh-Kumar SP (2004) Molecular chaperone Hsp90 associates with resistance protein N and its signaling proteins SGT1 and Rar1 to modulate an innate immune response in plants. *J Biol Chem.* 279: 2101-2108.

Lorsch JR y Dever TE (2010) Molecular view of 43S complex formation and starts site selection in eukaryotic translation initiation. *J Biol Chem.* 285: 21203-21207.

Lotz GP, Brychzy A, Heinz S y Obermann WM (2008) A novel HSP90 chaperone complex regulates intracellular vesicle transport. *J Cell Sci.* 121: 717-723.

Lü B, Gong Z, Wang J, Zhang J y Liang J (2007) Microtubule dynamics in relation to osmotic stress-induced ABA accumulation in *Zea mays* roots. *J Exp Bot.* 58: 2565-2572.

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

- Marcus AI, Moore RC y Cyr RJ (2001) The role of microtubules in guard cell function. *Plant Physiol.* 125: 387-395.
- Marrs KA, Casey ES, Capitant SA, Bouchard RA, Dietrich PS, Mettler IJ y Sinibaldi RM. (1993) Characterization of two maize HSP90 heat shock protein genes: expression during heat shock, embryogenesis and pollen development. *Dev Genet.* 14: 27-41.
- Martínez M, Cambra I, González-Melendi, Santamaría ME y Díaz I (2012) C1A cysteine-proteases and their inhibitors in plants. *Physiol Plant.* 145: 85-94.
- Martínez-Silva AV, De la Torre DS y Dinkova TD (2009) Los factores de traducción tipo eIF4E en planas: redundancia y diversidad funcional. *Mensaje Bioquímico.* 33: 25-37.
- Martínez-Silva AV, Aguirre-Martínez C, Flores-Tinoco CE, Alejandri-Ramírez ND y Dinkova TD (2012) Translation initiation factor AtelF(iso)4E is involved in selective mRNA translation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *PLoS One.* 7:e31606.
- Matsumoto K, Minami M, Shinozaki F, Suzuki Y, Abe K, Zenno S, Matsumoto S y Minami Y (2011) Hsp90 is involved in the formation of P-bodies and stress granules. *Biochem Biophys Res Commun.* 407: 720-724.
- Matsuo H, Li H, McGuire AM, Fletcher CM, Gingras AC, Sonenberg N y Wagner G (1997) Structure of translation factor eIF4E bound to m7GDP and interaction with 4E-binding protein *Nat Struct Biol.* 4: 717-724.
- McHale L, Tan X, Koehl P y Michelmore RW (2006). Plant NBS-LRR proteins: Adaptable guards. *Genome Biol.* 7: 212.
- Michaely P y Bennett V (1992) The ANK repeat: a ubiquitous motif involved in macromolecular recognition. *Trends Cell Biol.* 2: 127-129.
- Milioni D y Hatzopoulos P (1997) Genomic organization of *Hsp90* gene family in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol.* 35: 955-961.
- Mittelman D, Sykoudis K, Hersh M, Lin Y y Wilson JH (2010) Hsp90 modulates CAG repeat instability in human cells. *Cell Stress Chaperones.* 15: 753-759.
- Miyoshi H, Okade H, Muto S, Suehiro N, Nakashima H, Tomoo K y Natsuaki T (2008) Turnip mosaic virus VPg interacts with *Arabidopsis thaliana* eIF(iso)4E and inhibits *in vitro* translation. *Biochimie.* 90: 1427-1434.
- Moffett P (2009) Mechanism of recognition in dominant *R* gene mediated resistance. *Adv Virus Res.* 75: 1-33.
- Momose F, Naito T, Yano K, Sugimoto S, Morikawa Y y Nagata K (2002) Identification of Hsp90 as a stimulatory host factor involved in influenza virus RNA synthesis. *J Biol Chem.* 277: 45306-45314.

Monzingo AF, Dhaliwal S, Dutt-Chaudhuri A, Lyon A, Sadow JH, Hoffman DW, Robertus JD y Browning KS (2007) The structure of eukaryotic translation initiation factor-4E from wheat reveals a novel disulfide bond. *Plant Physiol.* 143: 504-1518.

Moore MJ (2005) From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science.* 309: 1514-1518.

Mosavi LAK, Cammett TJ, Desrosiers DC y Peng ZY (2004) The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Sci.* 13: 1435-1448.

Muench DG, Zhang C y Dahodwala M (2012) Control of cytoplasmatic translation in plants. *WIREs RNA.* 3: 178-194.

Nagano AJ, Fukao Y, Fujiwara M, Nishimura M y Hara-Nishimura I (2008) Antagonistic jacalin-related lectins regulate the size of ER body-type  $\beta$ -glucosidase complex in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 49: 969-980.

Nicaise V, Gallois JL, Chafiai F, Allen LM, Schurdi-Levraud V, Browning KS, Candresse T, Caranta C, Le Gall O y German- Retana S (2007) Coordinated and selective recruitment of eIF4E and eIF4G factors for potyvirus infection in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 581: 1041-1046.

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

Ondzighi CA, Christopher DA, Cho EJ, Chang SC y Staehelin LA (2008) *Arabidopsis* protein disulfide isomerase-5 inhibits cysteine proteases during trafficking to vacuoles before programmed cell death of the endothelium in developing seeds. *Plant Cell.* 20: 2205-2220.

Patrick RM y Browning KS (2012) The eIF4F and eIFiso4F complexes of plants: an evolutionary perspective. *Comp Funct Genomics.* doi: 10.1155/2012/287814

Pestova TV, Lorsch JR y Hellen CUT (2007) The mechanism of translation initiation in eukaryotes. En *Translational Control in Biology and Medicine* eds. Mathews MB, Sonenberg N y Hershey JWB. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Peumans WJ, Hause B y Van Damme EJM (2000) The galactose-binding and mannosebinding jacalin-related lectins are located in different sub-cellular compartments. *FEBS Lett.* 477: 186-192.

Picard D. HSP90 interactors. <http://www.picard.ch/downloads/Hsp90interactors.pdf>.

Piron F, Nicolai M, Minoia S, Piednoir E, Moretti A, Salgues A, Zamir D, Caranta C y Bendahmane A (2010) An induced mutation in tomato *eIF4E* leads to immunity to two potyviruses. *PLoS One.* 5: e11313.

Pomeranz MC, Hah C, Lin PC, Kang SG, Finer JJ, Blackshear PJ y Jang JC (2010) The *Arabidopsis* tandem zinc finger protein AtTZF1 traffics between the nucleus and cytoplasmic foci and binds both DNA and RNA. *Plant Physiol.* 152: 151-165.

Preiss T y Hentze MW (2003) Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation. *BioEssays.* 25: 1201-1211.

Pryor KD y Leiting B (1997) High-level expression of soluble protein in *Escherichia coli* using a His6-tag and maltose-binding-protein double-affinity fusion system. *Protein Expr Purif.* 10: 309-319.

Quesada V, Macknight R, Dean C y Simpson GG (2003) Autoregulation of FCA pre-mRNA processing controls *Arabidopsis* flowering time. *EMBO J.* 22: 3142-3152.

Queitsch C, Sangster TA y Lindquist S (2002) Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. *Nature.* 417: 618-624.

Rafiqi M, Bernoux M, Ellis J y Dodds PN (2009) In the trenches of plant pathogen recognition: role of NB-LRR protein. *Semin Cell Dev Biol.* 20: 1017-1024.

Reddy RK, Chaudhary S, Patil P y Krishna P (1998) The 90 kDa heat shock protein (Hsp90) is expressed throughout *Brassica napus* seed development and germination. *Plant Sci.* 131: 131-137.

Richau KH, Kaschani F, Verdoes M, Pansuriya TC, Niessen S, Stüber K, Colby T, Overkleeft HS, Bogyo M y Van der Hoorn RA (2012) Subclassification and biochemical analysis of plant papain-like cysteine proteases displays subfamily-specific characteristics. *Plant Physiol.* 158: 1583-1599.

Robaglia C y Caranta C (2006) Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Trends Plant Sci.* 11: 40-45.

Robalino J, Joshi B, Fahrenkrug SC y Jagus R (2004) Two zebrafish eIF4E family members are differentially expressed and functionally divergent. *J Biol Chem.* 279: 10532-10541.

Rodriguez CM, Freire MA, Camilleri C y Robaglia C (1998) The *Arabidopsis thaliana* cDNAs coding for eIF4E and eIF(iso)4E are not functionally equivalent for yeast complementation and are differentially expressed during plant development. *Plant J.* 13: 465-473.

Rom E, Kim HC, Gingras AC, Marcotrigiano J, Favre D, Olsen H, Burley SK y Sonenberg N (1998) Cloning and characterization of 4EHP, a novel mammalian eIF4E-related cap-binding protein. *J Biol Chem.* 273:13104-13109.

Rong L, Livingstone M, Sukarieh R, Petroulakis E, Gingras AC, Crosby K, Smith B, Polakiewicz RD, Pelletier J, Ferraiuolo MA y Sonenberg N (2008) Control of eIF4E cellular localization by eIF4E-binding proteins, 4E-BPs. *RNA.* 14: 1318-1327.

- Rousseau D, Kaspar R, Rosenwald I, Gehrke L y Sonenberg N (1996) Translation initiation of ornithine decarboxylase and nucleocytoplasmic transport of cyclin D1 mRNA are increased in cells overexpressing eukaryotic initiation factor 4E. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93: 1065-1070.
- Ruud AK, Kuhlow C, Goss DJ y Browning KS (1998) Identification and characterization of a novel Cap-binding protein from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*. 273: 10325-10330.
- Sangster TA, Bahrami A, Wilczek A, Watanabe E, Schellenberg K, McLellan C, Kelley A, Won S, Queitsch C y Lindquist S (2007) Phenotypic diversity and altered environmental plasticity in *Arabidopsis thaliana* with reduced Hsp90 levels. *PLoS One*. 2: e648
- Sangster TA, Salathia N, Undurraga S, Milo R, Schellenberg K, Lindquist S y Queitsch C (2008) HSP90 affects the expression of genetic variation and developmental stability in quantitative traits. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105: 2963-2968.
- Sastry MVK, Banerjee P, Patanjali SR, Swamy MJ, Swarnalatha GV y Surolia A (1986) Analysis of saccharide binding to *Artocarpus integrifolia* lectin reveals specific recognition of T-antigen ( $\beta$ -D-Gal(1, 3)D-GalNAc). *J Biol Chem*. 261: 11726-11733.
- Sato M, Nakahara K, Yoshii M, Ishikawa M y Uyeda I (2005) Selective involvement of members of the eukaryotic initiation factor 4E family in the infection of *Arabidopsis thaliana* by potyviruses. *FEBS Lett*. 15: 1167-1171.
- Schulze-Lefert P (2004) Plant immunity: the origami of receptor activation. *Curr Biol*. 14: R22-4.
- Schwartz DC y Parker R (2000) mRNA decapping in yeast requires dissociation of the cap binding protein, eukaryotic translation initiation factor 4E. *Mol Cell Biol*. 20: 7933-7942.
- Sedgwick SG y Smerdon SJ (1999) The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biochem Sci*. 24: 311-316.
- Shi C y Xu LL (2009) Characters of cysteine endopeptidases in wheat endosperm during seed germination and subsequent seedling growth. *J Integr Plant Biol*. 51: 52-57.
- Shindo T, Misas-Villamil JC, Hörger AC, Song J y van der Hoorn RAL (2012) A role in immunity for *Arabidopsis* cysteine protease RD21, the ortholog of the tomato immune protease C14. *PLoS One*. 7: e29317
- Smith DB y Johnson KS (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*. 67: 31-40.
- Specchia V, Piacentini L, Tritto P, Fanti L, D'Alessandro R, Palumbo G, Pimpinelli S y Bozzetti MP (2010) Hsp90 prevents phenotypic variation by suppressing the mutagenic activity of transposons. *Nature*. 463: 662-665.
- Strudwick S y Borden KL (2002) The emerging roles of translation factor eIF4E in the nucleus. *Differentiation*. 70: 10-22.

- Suzuki Y, Minami M, Suzuki M, Abe K, Zenno S, Tsujimoto M, Matsumoto K y Minami Y (2009) The Hsp90 inhibitor geldanamycin abrogates colocalization of eIF4E and eIF4E-transporter into stress granules and association of eIF4E with eIF4G. *J Biol Chem.* 284: 35597-35604.
- Syntichaki P, Troulinaki K, Tavernarakis N (2007) Protein synthesis is a novel determinant of aging in *Caenorhabditis elegans*. *Ann N Y Acad Sci.* 1119:289-295.
- Taipale M, Jarosz DF y Lindquist S (2010) HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11: 515-528.
- Takahashi T, Naito S y Komeda Y (1992) Isolation and analysis of the expression of two genes for the 81-kilodalton heat-shock proteins from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 99: 383-390.
- Takemoto D, Jones DA y Hardham AR (2003) GFP-tagging of cell components reveals the dynamics of subcellular re-organization in response to infection of *Arabidopsis* by oomycete pathogens. *Plant J.* 33: 775-792.
- Taliansky M, Torrance L y Kalinina NO (2008) Role of plant virus movement proteins. *Method Mol Biol.* 451: 33-54.
- Tameling WI y Baulcombe DC (2007). Physical association of the NB-LRR resistance protein Rx with a Ran GTPase-activating protein is required for extreme resistance to potato virus X. *Plant Cell.* 19:1682-1694.
- Tao H, Liu W, Simmons BN, Harris HK, Cox TC y Massiah MA (2010) Purifying natively folded proteins from inclusion bodies using sarkosyl, Triton X-100, y CHAPS. *Bio Techniques.* 48: 61-64.
- Te J, Jia L, Rogers J, Miller A y Hartson SD (2007) Novel subunits of the mammalian Hsp90 signal transduction chaperone. *J Prot Res.* 6: 1963-1973.
- Tharun S y Parker R (2001) Targeting an mRNA for decapping: Displacement of translation factors and association of the Lsm1p-7p complex on deadenylated yeast mRNAs. *Mol Cell.* 8: 1075-1083.
- Thitamadee S, Tsuchihara K y Hashimoto T (2002) Microtubule basis for left-handed helical growth in *Arabidopsis*. *Nature.* 417: 193-196.
- Tomoo K, Shen X, Okabe K, Nozoe Y, Fukuhara S, Morino S, Sasaki M, Taniguchi T, Miyagawa H, Kitamura K, Miura K y Ishida T (2003) Structural features of human initiation factor 4E, studied by X-ray crystal analyses and molecular dynamics simulations. *J Mol Biol.* 328: 365-383.
- Toogun OA, Dezwaan DC y Freeman BC (2008) The hsp90 molecular chaperone modulates multiple telomerase activities. *Mol Cell Biol.* 28: 457-467.

Topisirovic I, Siddiquin N, Lapointe VL, Trost M, Thibault P, Bangeranye K, Piñol-Roma S y Borden KLB (2009) Molecular dissection of the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) export-competent RNP. *EMBO J.* 28: 1087-1098.

Truniger V y Aranda MA (2009) Recessive resistance to plant viruses. *Adv Virus Res.* 75: 119-159

Tsaytler PA, Krijgsveld J, Goerdayal SS, Rüdiger S y Egmond MR (2009) Novel Hsp90 partners discovered using complementary proteomic approaches. *Cell Stress Chaperones.* 14: 629-638

Ueda K, Marsuyama T y Hashimoto T (1999) Visualization of microtubules in living cells of transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasm.* 206: 201-206.

Van Damme EJM, Lannoo N y Peumans WJ (2008) Plant lectins. *Adv Bot Res.* 48: 107-209.

van der Hoorn RAL (2008) Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. *Annu Rev Plant Biol.* 59: 191-223.

van der Hoorn RAL, Leeuwenburgh MA, Bogyo M, Joosten MHAJ y Peck SC (2004) Activity profiling of papain-like cysteine proteases in plants. *Plant Physiol.* 135: 1170-1178.

Vilela C, Velasco C, Ptushkina M y McCarthy JE (2000) The eukaryotic mRNA decapping protein Dcp1 interacts physically and functionally with the eIF4F translation initiation complex. *EMBO J.* 19: 4372-4382.

von der Haar T, Gross JD, Wagner G y McCarthy JE (2004) The mRNA cap-binding protein eIF4E in post-transcriptional gene expression. *Nat Struct Mol Biol.* 11: 503-511.

Wandinger SK, Richter K y Buchner J (2008) The Hsp90 chaperone machinery. *J Biol Chem.* 283: 18473-18477.

Wang A y Krishnaswamy S (2012) Eukaryotic translation initiation factor 4E-mediated recessive resistance to plant viruses and its utility in crop improvement. *Mol Plant Pathol.* 13: 795-803.

Wang QY y Nick P (2001) Cold acclimation can induce microtubular cold stability in a manner distinct from abscisic acid. *Plant Cell Physiol.* 42: 999-1005.

Weber C, Nover L y Fauth M (2008) Plant stress granules and mRNA processing bodies are distinct from heat stress granules. *Plant J.* 56: 517-530.

Wilen RW, Sacco M, Gusta LV y Krishna P (1995) Effects of 24-epibrassinolide on freezing and thermotolerance of bromegrass (*Bromus inermis*) cell cultures. *Physiol Plant.* 95: 195-202.

Wu Z, Gholami AM y Kuster B (2012) Systematic identification of the HSP90 regulated proteome. *Mol Cel Proteomics.* 11: 1-14.

Yan J, Wang J y Zhang H (2002) An ankyrin repeat-containing protein plays a role in both disease resistance and antioxidation metabolism. *Plant J.* 29: 193-202.

Yeam I, Cavatorta JR, Ripoll DR, Kang BC y Jahn MM (2007) Functional dissection of naturally occurring amino acid substitutions in eIF4E that confers recessive potyvirus resistance in plants. *Plant Cell.* 19: 2913-2928.

Zhang H, Scheirer DC, Fowle W y Goodman HM (1992) Expression of antisense or sense RNA of an ankyrin repeat-containing gene blocks chloroplast differentiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 4: 1575-1588.

Zhao R, Kakihara Y, Gribun A, Huen J, Yang G, Khanna M, Costanzo M, Brost RL, Boone C, Hughes TR, Yip CM y Houry WA (2008) Molecular chaperone Hsp90 stabilizes Pih1/Nop17 to maintain R2TP complex activity that regulates snoRNA accumulation. *J Cell Biol.* 180: 563-578.

Zimmermann S y Sentenac H (1999) Plant ion channels: from molecular structures to physiological functions. *Curr Opin Plant Biol.* 2: 477-482.