
Universidad de Guadalajara

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Licenciatura en Biología



Búsqueda de proteínas que interactúan con la región 5' del Virus del Mosaico de la Caña de azúcar (SCMV) que infecta a Maíz

Tesis que para obtener el grado de Licenciado en Biología

Presenta

Ricardo Iván Alcalá Briseño

Las Agujas, Zapopan, Jalisco. 28 de agosto de 2009.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

1539/C.C. BIOLOGÍA

MC GERARDO SIMON ESTRADA MICHEL
COORDINADOR DE CONTROL ESCOLAR DEL CUCBA
P R E S E N T E

Por medio de la presente me permito saludarlo y a la vez solicitarle de la manera mas atenta, revisión de los documentos que anexo y de encontrarse completo su expediente, mucho agradeceré la elaboración del Acta de Examen en la modalidad: **Tesis e informes**, opción: **Tesis** por el alumno **RICARDO IVAN ALCALA BRISEÑO**, Código **399265256**, para obtener la Licenciatura en Biología.

Se le comunica también que la fecha de-examen será el día **VIERNES 28 de Agosto** a las **11:00 hrs.**

Agradezco de antemano su atención a la presente y le reitero mi saludo y respeto.

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"

"Año del Bicentenario de Charles Darwin"
Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 18 de Agosto del 2009


DRA . GEORGINA ADRIANA QUIROZ ROCHA
COORDINADOR DE CARRERA DE BIOLOGIA





UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

FORMATO DE PREAUTORIZACIÓN DE FECHA Y HORAS DE EXAMEN DE TITULACIÓN

Los abajo firmantes, sinodales del trabajo de titulación del (ta),:

alumno (a): Ricardo Iván Alcalá Reseño código 394265256

Manifestamos estar de acuerdo en la fecha y hora propuesta para el examen de titulación, el cual será:

Fecha: 28 DE AGOSTO DE 2009 Hora: 11:00 AM

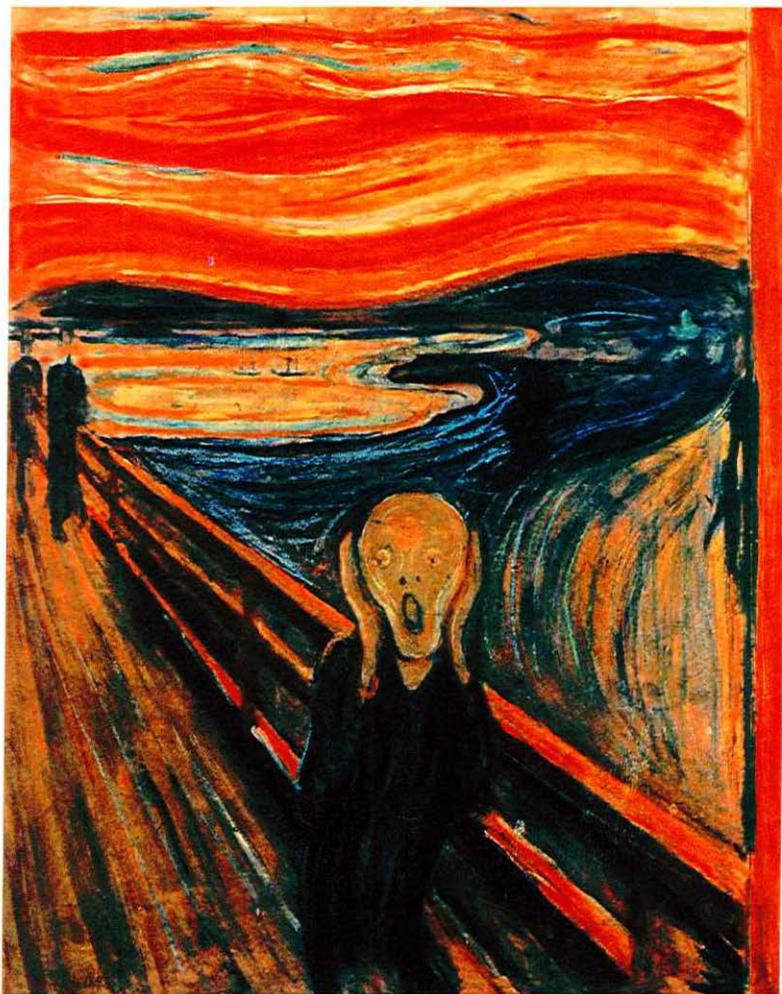
Sin otro particular por el momento nos despedimos reiterando nuestros saludos, el jurado quedará integrado de la siguiente manera.

FUNGIRÁ COMO:	GRADO	NOMBRE COMPLETO, SIN INICIALES y correo e	FIRMA
Presidente	Dra.	Carla Vanessa Sánchez Hernández sanchez.cv@cucba.udg.mx	
Secretario	Dr.	Gil Virgen Calleros gvirgen@cucba.udg.mx	
Vocai	Dra.	Anne Margarita Helena Santerre asanter@cucba.udg.mx	

1.- Vo. Bo. Secretario de la División de Ciencias Biológicas y Ambientales

2.- Vo. Bo. Coordinación de Carrera de Biología

Nota. Entregar este formato ocho días hábiles previos a la fecha de examen en Coordinación de Carrera, un ejemplar de la tesis impresa y en CD; además de la documentación requerida en el formato de Solicitud de Titulación, a efecto de solicitar los pagos correspondientes y Acta de Examen a Control Escolar.



El grito, Edvard Munch

A MI FAMILIA:

María Guadalupe, Martín y hermana. Por su apoyo y cariño incondicional.

A FERNANDA:

Por haber pasado todo éste tiempo junto a mí. Por todo...

AL RESTO DE MI FAMILIA Y AMIGOS:

Daniel y Guillermo por su apoyo, al resto por estar ahí.

A mis amigos por estar lejos o cerca, pero estar.

A TI QUE HACES FALTA:

Mario Eliza Badi Tamayo,

Por tu tiempo, cariño y fortaleza, por tu atención...

Agradecimientos

A la Dra. Laura Silva-Rosales, por haberme permitido realizar esta tesis en su laboratorio de interacción planta – virus, por su dirección, asesoría, apoyo, paciencia y ayuda en todo este primer paso hacia un objetivo. Gracias.

Al Dr. Diego González de León e Ibáñez, Ing. Susana Ruiz Castro y la Dra. Diana Trejo Savedra y al M. En C. Giovanni Chaves Bedoya, por su amistad, ayuda, comentarios, dirección, asesoría, atención y todo lo que me brindaron para poder concluir de manera exitosa este trabajo, sin su ayuda esto no hubiera terminado como fue.

A la Dra. Silvia Valdez, Armando Guerrero y a Anita, por su asesoría en toda la parte experimental de proteómica, por su atención, facilidad y grandes aportes en este trabajo.

A Fernanda Iruegas Bocardo, por su amor, apoyo, ayuda y compañía durante todo este proceso e inicio de una vida.

A la Dra. Lucila Méndez Moran, por su apoyo, amistad y ayuda con los trámites de titulación, a mis sinodales la Dra. Carla V. Sánchez Hernández, el Dr. Gil Virgen Calleros, la Dra. Anne Santerre y al Dr. Fernando Ruvalcaba, por su ayuda y comentarios críticos a la presente tesis.

Al Maestro Paco Bernal, por su apoyo y dirección desde mis inicios en la curiosidad por la ciencia.

A todos mis mentores en la Universidad. A los buenos, por su excelente enseñanza y dirección de pensamiento. A los malos, por enseñarme todo lo que no debo hacer y motivarme a la autodidaxia.

A la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano y al Dr. Luis Gabriel Brieba de Castro y Gil Velázquez, por haber donado los vectores de clonación con los controles PABP y MTF1 y la construcción del 3' UTR del virus del Norwalk.

A todos los compañeros del Cinvestav, por sus consejos, amistad y buenos momentos.

A todos mis Camaradas... y a los que olvidé.

Al Centro de Investigación de Estudios Avanzados del IPN, Campus Guanajuato, a todos sus integrantes y por lo que representa como institución.

Al CONACyT por la beca de Tesis de Licenciatura bajo el proyecto: SEP-CONACyT 2007/61154: Exploración de funciones de la región 5' del genoma de un potyvirus en maíz: Interacciones de entre proteínas y RNA durante la replicación viral.

Al Banco Santander y al Programa ECOES por la beca de término de Tesis de Licenciatura.

Al apoyo D&G Briseño-Bass, por su apoyo para finalizar esta última parte y poder dar el siguiente paso.

A la Sra. María Magdalena Ibarra Álvarez del Castillo, por su financiamiento el cual me ayudo a seguir mis objetivos.

Éste trabajo fue llevado en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, Campus Guanajuato, en el Departamento de Ingeniería Genética en el Laboratorio de Interacción Planta – Virus.

Bajo la Dirección de la **Dra. Laura Silva-Rosales**

Listado de abreviaturas.

6k1	Proteína 1 de 6 kDa
6k2	Proteína 2 de 6 kDa
AUG	Codón de inicio traduccional que codifica a Metionina
Bj	Beijín
Bris	Brisbane
BSA	Albúmina de suero bovino
CAM	Camerún
Cb	Carbenicilina
CI	Proteína de inclusión citoplásmica
CP	Proteína de la cápside
D.O.	Densidad óptica
DEPC	Dietilpirocarbonato
DP	Programación dinámica
DTT	Ditrioteitol
eIF	Factor de iniciación eucariótica
EU	Estados Unidos
FAO	Organización algo de agricultura
GD	Guandong
GTP	Guanosin trifosfato
HC-Pro	Proteína viral del componente
HN	Henan
HZ	Hangzhou
ICTV	Comité Internacional de Taxonomía Viral
IMP	Inosin monofosfato
IPTG	Isopropil-beta-D-TiogalactoPiranósido
IRES	Sitios internos de entrada a ribosomas
Jal	Jalisco
kb	kilo bases
kDa	kilo Dalton
Km	Kanamicina
LB	Luria-Broth
Lp	Linping
m7GpppN	Estructura de bonete "cap" con 7 metil guanosina
MCMV	Virus del mosaico clorótico del maíz
MDMV	Virus del enanismo del maíz

MFE	Mínimo de energía libre
MP	Monofosfato
mRNA	RNA mensajero
MTFI	Factor de transcripción mitocondrial 1
Mx	México
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica
N.D.	No Disponible
NIa-Pro	Proteína de inclusión nuclear "a" y proteinasa
NIb	Proteína de inclusión nuclear "b"
P1	Proteína 1
P2-1	Proteína viral P2-1
P2-2	Proteína viral P2-2
P3	Proteína viral 3
PABP	Proteína de unión a poly(A)
pb	Par de bases
PF	Función de Partición
poly(A)	Cola poliadenilada
RNAss(+)	RNA de cadena sencilla positiva
rNTP	Ribonucleótidos trifosfato
SCMV	Mosaico de la caña de azúcar
SD	Shandong
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida con duodecilsulfato sódico
Sp	España
SX	Shaanxi
T7	Promotor para la polimerasa T7
TE	Potenciador traduccional
TEV	Virus del jaspeado del tabaco
tRNA	RNA de transferencia
TuMV	Virus del mosaico del nabo
UTR	Región no traducible
Ver	Veracruz
VPg	Proteína ligada al genoma viral
XgS	Xiangshan
YH	Yuhang

1. Índice	12
2. Resumen	14
3. Abstract	16
4. Introducción	18
4.1 . La región 5' en virus.	18
4.2 . La región 5' en virus de plantas.	19
4.3 . Familia <i>Potyviridae</i> .	21
4.3.1. Género <i>Potyvirus</i> .	22
4.4 . Virus del mosaico de la caña de azúcar.	23
5. Antecedentes	24
6. Justificación	27
7. Hipótesis	28
8. Objetivo General	29
9. Materiales y Métodos	30
9.1 . Análisis bioinformático de la región 5'UTR.	30
9.2 . Construcción de minigenes.	31
9.3 . Purificación y digestión.	31
9.4 . Transcripción <i>in vitro</i> .	33
9.5 . Material vegetal y extracción de proteína.	33
9.6 . Inducción y purificación de proteínas recombinantes nativas.	33
9.7 . Cromatografía de afinidad a RNA.	35
10. Resultados	39
10.1 Análisis de estructuras secundarias de la región 5'UTR del SCMV.	39
10.2. Análisis filogenético de la región 5'UTR del SCMV.	40
10.3. Predicción de estructuras secundarias.	40
10.4. Síntesis de transcritos de las regiones 5'UTR.	46
10.4.1. Construcción de minigenes.	46
10.4.2. Transcripción <i>in vitro</i> de los minigenes.	47
10.5. Extracción de proteínas totales del hospedero (maíz).	47

10.6. Inducción de proteínas para los controles positivo y negativo de la interacción RNA y proteína.	48
10.7. Interacción de los RNAs de la 5'UTR con proteínas de maíz.	50
<u>11. Discusión</u>	<u>54</u>
<u>12. Conclusiones</u>	<u>59</u>
<u>13. Perspectivas</u>	<u>60</u>
<u>14. Referencias</u>	<u>61</u>
<u>15. Apéndice 1</u>	<u>67</u>

2. Resumen.

La región 5' UTR es una región muy interesante que actúa como potenciador traduccional (Gallie *et al.*, 1987; Carrington & Fred., 1990), puede mimetizar un tRNA (Gallie & Walbot, 1990), puede presentar sitios de entrada a ribosomas (IRES) (Basso *et al.*, 1994; Hellen & Samow, 2001; Wilkie *et al.*, 2003; Gropelli *et al.*, 2007) y existe evidencia sobre el tropismo viral de replicación en células específicas (Shaw-Jackson & Michiels, 1999). Esta región ha sido ampliamente estudiada en virus y en mRNA celulares (Michon *et al.*, 2005). *Potyviridae* es la familia de principal importancia en virus de plantas y cuenta con alrededor de 200 especies (ICTV, 2005), es causante de cuantiosas pérdidas en diferentes cultivos de importancia económica en varios países alrededor del mundo, incluyendo a México (Delgadillo, 1987; Handley *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2002; ICTV, 2002; Alegria *et al.*, 2003; Gaur *et al.*, 2003; Gamechu *et al.*, 2006; Espejel *et al.*, 2006; Achon *et al.*, 2007; Gibbs *et al.*, 2008). El virus del mosaico de la caña de azúcar (*Sugarcane mosaic virus*, SCMV) pertenece a esta familia e infecta a maíz (Delgadillo, 1987; Scheets, 1998) o a caña de azúcar (Espejel *et al.*, 2006), dependiendo del aislamiento. En este trabajo se analizó la región nucleotídica 5'UTR de trece secuencias de SCMV, once de ellas tomadas del Banco de Genes del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y dos de ellas del laboratorio de interacciones planta – virus del Cinvestav, Campus Guanajuato. Para entender la filogenia de las diferentes secuencias, en esta región del genoma, se hizo un alineamiento con el programa ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) usando el método de Neighbor-joining. El resultado de este análisis fue el agrupamiento de estas trece secuencias en dos clados, uno agrupando a los aislamientos de maíz y el segundo a los de caña de azúcar. Para ver si había una correspondencia de estos agrupamientos con estructuras secundarias en su secuencias, éstas fueron sometidas al servidor “Vienna RNA WebServers” que propone modelos de predicción de dichas estructuras (Gruber *et al.*, 2008). Se predijo una amplia variedad de estructuras secundarias que fueron clasificadas en cuatro grupos, de acuerdo a la comparación de las secuencias de los consensos: uno de México (de maíz), dos de China (de maíz y de caña de azúcar) y uno mas de Australia (de caña de azúcar). Las secuencias nucleotídicas correspondientes a estos consensos se sintetizaron *de novo*, como DNA, y se les introdujo una secuencia promotora para el fago T7 que permitiera sintetizar *in vitro* el

RNA de esta región (la 5'UTR). Estos RNA sintetizados se mezclaron con proteína total de hoja de maíz, para permitir su interacción. Los complejos interactores fueron separados por cromatografía de RNA y proteína (Caputi & Zahler, 2001; Patel *et al.*, 2005), luego de optimizar esta técnica. Para la implementación de los experimentos se diseñaron y adicionaron los siguientes controles, la proteína de unión a poly(A) (PABP, por sus siglas en inglés) que se une a la cola poly(A) del virus de Norwalk como control positivo (Escolano *et al.*, 2003) y el factor de transcripción mitocondrial 1 (MTFI, por sus siglas en inglés) aislada de *Sacharomyces cerevisiae* que se une al DNA mitocondrial de levadura (Karlok *et al.*, 2002), como control negativo. Las proteínas participantes en los complejos interactores fueron desplegadas diferencialmente y visualizadas en geles SDS-PAGE luego de su tinción con azul de Coomassie (Sambrook *et al.*, 1989) y con plata (Blum *et al.*, 1987; Mortz *et al.*, 2001). Este análisis permitió detectar y aislar (por corte en el gel), a las posibles proteínas interactuantes de maíz (con la 5'UTR viral). Estas proteínas candidatas de interacción, están en análisis por espectrometría de masas para su identificación. Una vez conocida su identidad, se podrá proponer cual es su papel en la interacción con el RNA viral.

La posibilidad de que la región 5'UTR pueda estar relacionada en la selección de los aislamiento virales con sus hospederos (maíz o caña de azúcar), no es concluyente aún con este trabajo. La identificación de las proteínas candidatas ayudará a elucidar su función, así como a planear los próximos experimentos para identificar si existe interacción de otro tipo de biomolécula, además de proteínas (RNAs pequeños, por ejemplo), que se encuentre interactuando con esta región 5'UTR.

Los resultados sugieren que la forma particular de la estructura secundaria de la 5'UTR del SCMV (y de otros virus), tiene una participación en amplio rango de funciones desconocidas hasta ahora.

3. Abstract.

The 5' untranslated region (UTR) is a very interesting region that acts as a translation enhancer (Gallie *et al.*, 1987; Carrington & Fred, 1990), mimics tRNA (Gallie & Walbot, 1990), and can have internal ribosome entry sites (IRES) (Basso *et al.*, 1994; Hellen & Sarnow, 2001; Wilkie *et al.*, 2003; Gropelli *et al.*, 2007). Additionally, there is some existing evidence for viral tropism replication in specific cell types (Shaw-Jackson & Michiels, 1999). This region has been largely studied in virus and cellular mRNA (Michon *et al.*, 2005). *Potyviridae* family is the most important plant virus, containing around 200 viral species (ICTV, 2005) causing yield losses in plants, in many crops of economic importance in many countries around the world, including Mexico (Delgadillo, 1987; Handley *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2002; ICTV, 2002; Alegria *et al.*, 2003; Gaur *et al.*, 2003; Gamechu *et al.*, 2006; Espejel *et al.*, 2006; Achon *et al.* 2007; Gibbs *et al.*, 2008). The *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) is an important virus included in this family and infecting corn (Delgadillo, 1987; Scheets, 1998) or sugarcane (Espejel *et al.*, 2006), depending on the isolate. In the present work we analyzed the sequence of the 5' UTR region of thirteen sequences of SCMV, eleven of these were taken from the GenBank from the National Center of Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and two were obtained in the laboratory of plant – virus interaction (Cinvestav, Campus Guanajuato). In order to get an insight of the phylogeny of these sequences, we aligned them using the ClustalX software (Thompson *et al.*, 1997) with the Neighbor-joining. As a result of this test a separation between these thirteen sequences into two clades was observed, one clade contained the corn isolates and the second one those from sugarcane. The results of this test were submitted to the Vienna RNA WebServers (<http://rna.tbi.univie.ac.at/>) for the secondary structure prediction of the sequences (Gruber *et al.*, 2008). A wide variety of structures were predicted which could be classified in four groups comparing the consensus sequences: one from Mexico (from corn), two from China (from corn and sugarcane) and another one from Australia (from sugarcane). Based on the consensus sequences, these nucleotide regions were synthesized *de novo*, as DNA, and a T7 phage promoter was introduced to *in vitro* synthesize the corresponding RNA (5' UTR). This RNA were mixed with total corn leaf proteins to allow their interaction. The interacting complexes were

ABSTRACT

separated by RNA – protein chromatography assays (Caputi & Zahler, 2001; Patel *et al.*, 2005) after optimizing this technique. For the implementation of the experiments the design and addition of appropriate controls, was performed i. e., the poly(A) binding protein (PABP) that binds to the poly(A) tail from Norwalk virus, as a positive control (Escolano *et al.*, 2003) and the Mitochondrial Transcription Factor 1 (MTFI) isolated from *Sacharomyces cerevisiae* that binds to the mitochondrial DNA of yeast (Karlok *et al.*, 2002), as a negative control. The proteins of these interacting complexes were analyzed by differentially displaying and visualizing them on SDS-PAGE assays stained with Coomassie blue (Sambrook *et al.*, 1989) and silver (Blum *et al.*, 1987; Mortz *et al.*, 2001). These analyses allowed to detect and isolate (by gel cutting), the possible maize interacting proteins (with the viral 5'UTR). These interacting putative proteins are on analysis by mass spectrometry for their characterization. Once their identity is known a possible role for their interaction with the viral RNA can be proposed.

The possible relation of 5'UTR regions to the viral isolates for a specific host (maize or sugarcane), is as yet not conclusive in this work. The characterization of these putative proteins could be help to elucidate their function and would also pave the way to design further assays to identify, not only proteins but other biomolecules (like small RNAs) with these 5' UTR regions.

The results obtained so far suggest that a particular form of the secondary structure of 5'UTR of SCMV (and others virus) is involved in a wide range of still unknown functions.

4. Introducción.

4.1. La región 5' en los virus.

La región 5' terminal de los RNA mensajeros (mRNA) celulares o virales está involucrada principalmente en la traducción, hasta donde se sabe por ahora. Esta región cuenta con dos características, puede estar flanqueada por un nucleótido modificado m^7GpppN (estructura de bonete o “cap”) (Kawaguchi & Bailey-Serres, 2002; Wilkie *et al.*, 2003; Gropelli *et al.*, 2007) o por una proteína viral unida covalentemente al genoma viral [VPg, por sus siglas en inglés (Viral protein linked to genome)] en su extremo 5' (Kawaguchi & Bailey-Serres, 2002; Michon *et al.*, 2005) y una región no codificante [UTR, por sus siglas en inglés (untranslated region)] antes del codón AUG/Met de reconocimiento de inicio traduccional (Carrington & Fred, 1990). Ésta región es importante y determinante en la eficiencia traduccional (Wilkie *et al.*, 2003). Molecularmente, la cap y la VPg son reconocidas por el factor de unión a cap eIF4E [eIF, por sus siglas en inglés (eucariotic Inition Factor)] que desata e inicia la compleja cascada de eventos moleculares en el reconocimiento y proceso traduccional del mRNA celular o viral (Michon *et al.*, 2005). La región 5' UTR consiste en una larga secuencia de oligonucleótidos de longitud variable y es el sitio de inicio para llevar a cabo la traducción, también puede haber presencia de estructuras secundarias, presencia de diversos codones AUGs a lo largo de la secuencia, puede presentar diferentes marcos de lectura y se ha reportado la presencia de sitios internos de entrada a ribosomas [IRES, por sus siglas en inglés (Internal Ribosome Entry Sites)] (Hellen & Sarnow, 2001; Wilkie *et al.*, 2003).

El inicio de la traducción ocurre, en la mayoría de los mRNAs celulares y en algunos mRNAs virales, a través de un mecanismo dependiente de cap, que involucra la unión de los factores traduccionales a está estructura posicionada en el extremo 5' del mRNA (Gropelli *et al.*, 2007). Para el caso de los virus de RNA que no cuentan con cap, sino una estructura análoga conocida como VPg, el mecanismo que se lleva a cabo puede ser independiente de cap (Pettit-Kneller *et al.*, 2006; Dreher & Miller, 2006; Gropelli *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2008). El mecanismo independiente de cap, denominado también de

iniciación interna, dirige el inicio de la síntesis de proteínas por sitios internos de entrada de ribosomas o IRES (Gropelli *et al.*, 2007). La familia de los *Picornaviridae* presenta dos grandes grupos de IRES bien caracterizados que difieren en su estructura secundaria. En la familia *Filoviridae* se ha descrito recientemente un nuevo grupo de IRES (Martínez-Salas *et al.*, 2008). Los IRES de los picornavirus, contenidos en la 5' UTR, tienen una larga secuencia en la que se pueden encontrar diversas estructuras secundarias que evitan el reconocimiento del codón de inicio por la subunidad ribosomal 40 S y ayuda al reclutamiento de la subunidad ribosomal 43 S cerca del codón de inicio traduccional viral (Pain, 1996; Wilkie *et al.*, 2003; Gropelli *et al.*, 2007; Martínez-Salas *et al.*, 2008). Los picornavirus son virus de RNA de cadena sencilla positiva (ssRNA+) y pertenecen al supergrupo parecido-a-picornavirus, al que también pertenecen la familia *Potyviridae* (Kasschau & Carrington, 1998), ambos virus tienen un gran número de similitudes. Los picornavirus y potyvirus presentan en su extremo 5' un análogo de cap, la VPg, un marco de lectura abierto que codifica a una sola poliproteína y en su extremo 3' una cola poliadenilada [poly(A)]. Ambos comparten una alta similitud en su secuencia de aminoácidos (Carrington & Fred, 1990). La región 5' UTR de los potyvirus tiene un largo aproximadamente de una cuarta parte de la longitud de los picornavirus. Esto no le quita importancia a las complejas estructuras que presentan en esta región, ya que se han encontrado sitios internos de entrada a ribosomas y estructuras secundarias en diferentes especies virales dentro del género *Potyvirus*. Carrington & Fred (1990) demostraron que la región 5' UTR funciona como potenciador traduccional en el virus del jaspeado del tabaco (*Tobacco etch virus*; TEV) y está presente en otros potyvirus de la familia; sin embargo, no se ha demostrado que todos los virus de la familia cuenten con esta propiedad.

4.2. La región 5' en virus de plantas.

Hace 20 años se descubrieron los primeros mecanismos de inicio de la traducción en virus de RNA de animales (Mokrejs *et al.*, 2007). A finales de los años 80's y principio de los años 90's se realizaron los primeros estudios que involucran las regiones 5' y 3' UTR de virus de RNA de plantas (Gallie *et al.*, 1987; Carrington & Fred, 1990; Gallie & Walbot, 1990) que dan indicios del funcionamiento y de la importancia que tienen estas estructuras

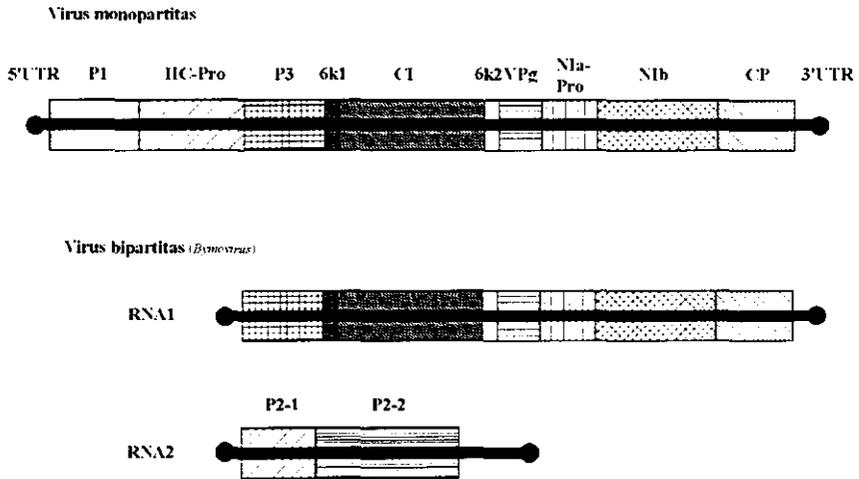
en los virus de plantas, así como el inicio de nuevas perspectivas sobre el reclutamiento de proteínas hospederas en la traducción viral y otras funciones que pudieran tener .

La estrategia de iniciación de la traducción en muchos virus de plantas, se sitúa en potenciadores traducionales [TE, por sus siglas en inglés (Translation Enhancers)] que están en la región 5'UTR o en la región 3'UTR, los cuales están basados en la complementariedad con la subunidad ribosomal 18 S o bien en la interferencia de los extremos 5' y 3' que facilitan el reclutamiento por estructuras secundarias (Mokrejs *et al.*, 2007). Diversos estudios a lo largo de varios años sobre las regiones UTR demuestran la importancia y particularidad de ciertas especies, géneros o familias virales. En los primeros trabajos Gallie y col. (1987) identificaron en la región 5'UTR del virus del mosaico del nabo (*Turnip mosaic virus*; TuMV) un potenciador de la expresión del RNA viral, probando estos resultados en diferentes organismos como en tabaco, células de *Escherichia coli* y en oocitos de *Xenopus laevis*. Carrington y Freed (1990) trabajaron con el potenciamiento de la traducción por la región 5'UTR en el TEV. Gallie y Walbot (1990) identificaron un dominio pseudoknot en la región 3'UTR en TEV que formaba una estructura tipo RNA de transferencia (tRNA) que cumplía con una función similar a la cola poly(A) y está incrementaba la expresión viral. Basso y col. (1994) encontraron la primer evidencia de un sitio interno de entrada a ribosomas en la región 5'UTR del TuMV, facilitando la entrada de ribosomas y a su vez potenciando la traducción viral. Está es la primer evidencia de IRESs en virus de planta y todos los hallazgos antes mencionados, crearon una necesidad de explotar y conocer las funciones de la región 5' o 3' UTR, así como identificar las especies virales en plantas que cuentan con está particularidad.

La región 5' no traducible en virus de plantas se encuentra hasta ahora descrita y analizada con más detalle en las familias *Luteoviridae*, *Tombusviridae* y *Potyviridae*. A pesar de la importancia que pudiese tener esta región en los mecanismos de traducción, no se ha reportado su asociación en la especificidad del hospedero que infecta a plantas, tal vez porque esta posibilidad no ha sido explorada como se plantea en este trabajo.

4.3. Familia *Potyviridae*.

La familia *Potyviridae* pertenece al grupo de los virus de ssRNA⁺ con un genoma encapsidado y consta de partículas flexibles filamentosas. Esta es la familia más grande y con mayor importancia económica dentro de los virus de plantas. Contiene seis géneros reconocidos por el Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV, 2005), con 212 especies descritas a la fecha en seis géneros: *Potyvirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Tritimovirus*, *Rymovirus* y *Bymovirus*. El género *Potyvirus* presenta alrededor de 100 especies virales y las partículas son de ~700 nm de longitud y ~11 nm de diámetro. Su transmisión es por áfidos (*Aphidae*) de manera no persistente e infectan a una gran diversidad de familias de plantas. El género *Ipomovirus* tiene un genoma de ~900 nm de longitud y ~11 nm de ancho, se transmite por mosquita blanca (*Aleyrodidae*). *Macluravirus* con un genoma de ~650 nm de longitud y ~15 nm de ancho y se transmite por áfidos. *Tritimovirus* tiene un genoma de ~700 nm de longitud y ~15 nm de ancho transmitido por ácaros (*Eriophyidae*) y está restringido a la familia *Poaceae*. *Rymovirus* consta de un genoma de ~700 nm de longitud y ~15 nm de ancho, es transmitido por ácaros y se encuentra también limitado a la familia *Poaceae*. La organización del genoma de la familia *Potyviridae* es a partir de una secuencia conservada de 10 proteínas, dos regiones UTR y una cola poly(A) (Fig. 1) a excepción del género *Bymovirus*, único dentro de la familia que tiene genoma bipartita. En este último, el RNA1 codifica para 8 proteínas y tiene dimensiones de ~580 nm. El RNA2 codifica para la P2-1, P2-2, y una región de HC-Pro (Fig. 1) y tiene dimensiones de ~280 nm de longitud y ~13 nm de ancho. Su vector es un hongo de la familia *Plasmodiophoridae* y se encuentra restringido a la familia *Poaceae* (Adams *et al.*, 2005).



Adaptado de Adams, et al. 2005

Figura 1. Representación esquemática del genoma de la familia *Potyviridae*, representando a los virus monopartitas, *Potyvirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Tritimovirus* y *Rymovirus* y virus bipartitas *Bymovirus*. El genoma de la familia consiste en 10 cistrones, flanqueados por dos regiones UTR 5' y 3'.

4.3.1. Género *Potyvirus*.

El género *Potyvirus* tiene el mayor y más importante número de especies de la familia *Potyviridae* y estos constituyen una cuarta parte de todos los virus vegetales reportados hasta ahora (ICTV, 2005). Así, este género viral se encuentra presente en una gran cantidad de familias de plantas de interés ornamental y agrícola, produciendo enormes y cuantiosas pérdidas económicas a nivel mundial. Es por tanto uno de los géneros más dañinos, causando pérdidas desde el 40 al 90 % en la producción de diferentes cultivos de una gran variedad de plantas (Noa-Carrazana, 2003; Spetz, 2003; Silva-Rosales & González-de-León, 2005).

4.3. Virus del mosaico de la caña de azúcar.

El virus del mosaico de la caña de azúcar (*Sugarcane mosaic virus*, SCMV) es un importante potyvirus que infecta a la familia Poacea, por ejemplo caña de azúcar, sorgo, trigo, maíz entre otros (ICTV, 2002), causando graves pérdidas en el sector agrícola del mundo, principalmente Estados Unidos, México, Brasil, España, Alemania, Australia, China, India y algunos países de África, infectando caña y/o maíz (Handley *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2002; Alegria *et al.*, 2003; Gaur, *et al.*, 2003; Gamechu *et al.*, 2006; Espejel *et al.*, 2006; Achon *et al.*, 2007; Gibbs *et al.*, 2008).

En México se reportó por primera vez la presencia del virus del SCMV a finales de los años ochentas en el estado de Guanajuato (Delgadillo, 1987) y sigue persistente en el país en diversos estados de la republica. El SCMV también se encuentra asociado a la enfermedad conocida como necrosis letal del maíz producida por la interacción sinérgica de un *Maclomovirus* el virus del mosaico clorótico del maíz (*Maize chlorotic mottle virus*; MCMV) y un *Potyvirus* el virus del mosaico del enanismo del maíz (*Maize dwarf mosaic virus*; MDMV) o el virus del mosaico de la caña de azúcar (SCMV) (Delgadillo, 1987; Scheets, 1998).

5. Antecedentes.

En estudios previos, Espejel y col. (2006) encontraron que el virus del SCMV-Mx aislamiento de maíz en Poza Rica, Veracruz, infecta plantas de maíz pero no plantas de caña de azúcar, mientras que el SCMV-CAM6-1 de Camerún, aislamiento de caña de azúcar infecta plantas de caña de azúcar y maíz. Estos resultados nos llamaron la atención y nos preguntamos ¿Cómo o cual es el mecanismo que hace que el aislamiento de maíz no infecte a caña de azúcar, y el de caña de azúcar pueda infectar a maíz y caña? Debido a que la región 5' del genoma es variable entre diferentes aislamientos de este virus, se decidió explorar su posible participación en la selección de hospedante.

El primer análisis de secuencias de la región 5'UTR se realizó con 10 secuencias, nueve de ellas reportadas en la página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y una secuencia generada por el laboratorio de interacción planta – virus del Cinvestav, Campus Guanajuato en donde se hizo éste estudio. El alineamiento muestra diferencias en la segunda mitad esta región. En el grupo de caña de azúcar se presentan regiones conservadas en los últimos veinte nucleótidos de la región 5'UTR (Fig. 2). En el árbol filogenético obtenido de dicho alineamiento, se muestra la tendencia de los aislamientos a agruparse por el hospedero del que fue aislado el virus: caña de azúcar o maíz.

En el trabajo experimental de Chaves-Bedoya¹, laboratorio de interacción planta – virus del Cinvestav, Campus Guanajuato, buscó si la región 5'UTR del SCMV del aislamiento de Veracruz (SCMV-Ver) interactúa con proteínas del hospedero maíz. Como estrategia experimental realizó ensayos de cromatografía de afinidad RNA y proteína. La técnica de cromatografía utilizada se basó en los trabajos de Caputi y Zahler (2001) y Patel y col., (2005) siendo modificada y adecuada para realizar los ensayos de cromatografía de afinidad de RNA viral a proteínas totales de maíz. El resultado obtenidos fue la identificación preliminar de una proteína que posiblemente interactuara con el RNA de la región 5'UTR de SCMV (Fig, 3).

¹Chaves-Bedoya, G. Trabajo experimental no publicado. 2006. Estudiante de Doctorado. Laboratorio de interacción planta – virus. Cinvestav, Campus Guanajuato.

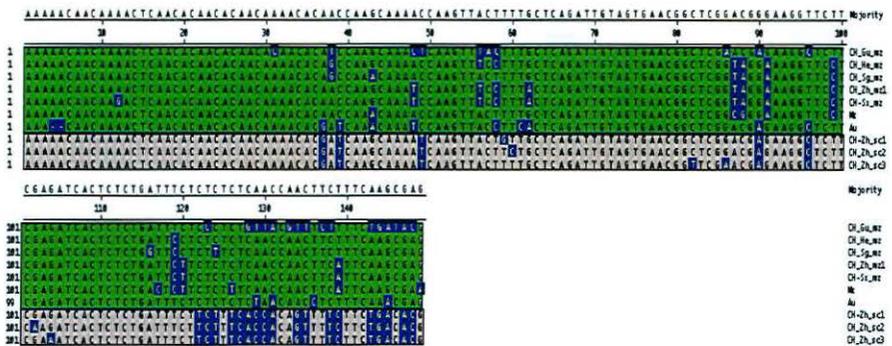


Figura 2. Alineamiento de la región 5'UTR de diez aislamientos de SCMV. Las secuencias señaladas en verde corresponde los aislados de maíz. En gris las secuencias señaladas en gris. Las cajas azules muestran las secuencias conservadas en los grupos virales.

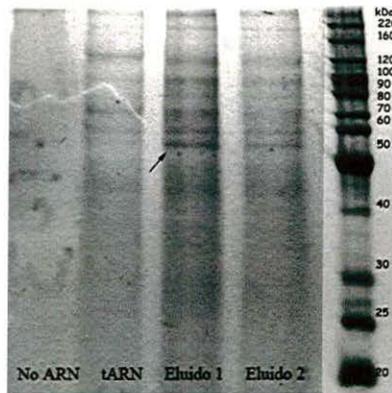


Figura 3. Gel SDS-PAGE 10 %, se muestra en los eluidos 1 y 2 una banda diferencial alrededor de 57 kDa (señalada con una flecha), que no se encuentra en el carril control con tARN, siendo la posible proteína interactora con la región 5'UTR de SCMV-Ver. Bandas proteicas visualizadas con la tinción azul brillante de Coomassie (Tomado de Chaves-Bedoya, bitácora del trabajo experimental realizado en el laboratorio de interacción planta – virus).

Las banda proteica identificada en el ensayo de cromatografía de RNA y proteína se escindió y digirió con tripsina y se envió a analizar por espectrometría de masas LC/MS/MS Termo finnigan LCQ DECA XP. El análisis del patrón de digestión identificado por la técnica antes mencionada, fue sometida a la base de datos MASCOT Peptide Mass Fingerprint, MATRIX SCIENCE (Perkins *et al.*, 1999). Los resultados

obtenidos de la base de datos de acuerdo al valor mas alto de probabilidad esta dado para la proteína Os03g0699300 encontrada en arroz, la adenilosuccinato sintetasa.

La Adenilosuccinato sintetasa (EC 6.3.4.4) tiene por lo menos las siguientes funciones dentro de la planta (Siehl *et al.*, 1996; Walters *et al.*, 1997):

1. Juega un papel importante en la biosíntesis de purina por la catálisis de la conversión de IMP dependiente de GTP y acido aspártico a MP
2. Es el sitio de acción de hidantocidina, un potente fitotoxina microbial no selectiva
3. Bloquea la conversión de IMP a AMP en la biosíntesis de purina
4. Proteína de unión a GTP-actividad GTPasa → función regulatoria en procesos celulares: de mantenimiento celular, señalamiento transmembranal, síntesis de proteínas ribosomales, polimerización de elementos del citoesqueleto.

El resultado de estos experimentos, fue criticado por la falta de controles adecuados. Esto nos lleva a rediseñar los ensayos para tener una confianza acerca del resultado obtenido adicionando los controles adecuados para aumentar la certidumbre del experimento pero continuando con la idea de que la región 5'UTR puede estar involucrada en la selección de hospedero, ya sea caña de azúcar o maíz (Espejel *et al.*, 2006; Chaves-Bedoya *et al.*, manuscrito en preparación) y sugieren la búsqueda de proteínas que se interactúen con ésta región. Adicionalmente, se busca determinar la función y posible estructura secundaria de la 5'UTR, así como a la identificación y caracterización de la función de las proteínas que pudiesen interactuar con ésta región.

6. Justificación.

El maíz (*Zea mays*) y la caña de azúcar (*Saccharum sp.*) son infectados por el virus del mosaico de la caña de azúcar con una disminución mundial en su producción para el consumo alimenticio humano y animal.

Nuestro estudio se enfocará en el virus del SCMV y el maíz, ya que México es el centro de origen de ésta especie y cuarto productor a nivel mundial (FAO, 2004).

Si bien el SCMV no presenta un riesgo potencial en México hoy en día, como lo es en China y España (Jiang & Zhou, 2002; Achon *et al.*, 2007), en combinación con el virus del enanismo del maíz (*Maize dwarf mosaic virus*; MDMV) causa la necrosis letal del maíz, reportando pérdidas entre un 75 – 80 % en México y algunos estados de EU (Delgadillo, 1987; Scheets, 1998; Nyvall, 1999).

La importancia del estudio de la región 5' del SCMV radica en que podría haber una interacción de ésta región con el hospedero a través de proteínas de la planta. La pregunta fundamental del trabajo es cuáles son estas proteínas. De no encontrar proteínas que interactúen en ésta región, la interacción podría darse a nivel de RNA o bien en otra región diferente a la 5'UTR. Así, conociendo los mecanismos de interacción molecular podremos idear estrategias para inhibir la infección o la traducción viral.

7. Hipótesis.

La región 5' del genoma del virus del mosaico de la caña de azúcar tiene importancia en la selección de hospedante e interactúa, diferencialmente, con proteínas del hospedero *Zea mays*.

8. Objetivos general.

- Identificar proteínas de maíz interactoras con la región 5'UTR del virus del mosaico de la caña de azúcar (SCMV).

8.1. Objetivos particulares.

- Realizar el análisis bioinformático de estructuras secundarias de la región 5'UTR de diversos aislamientos de SCMV.
- .Determinar la presencia de interacción, por cromatografía de afinidad, de RNA y proteínas de maíz con la región 5'UTR de SCMV
- Identificar proteínas que interactúen con la región 5'UTR de SCMV.

9. Materiales y Métodos.

9.1. Análisis bioinformático de la región 5'UTR:

- El análisis bioinformático de las trece secuencias reportadas hasta ahora, once fueron tomadas de la página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> del National Center of Biotechnology Information (por sus siglas en inglés, NCBI) y dos secuencias adicionales de la región 5'UTR del SCMV de México (Chaves-Bedoya *et al.*, manuscrito en preparación) y se sometieron al servidor de predicción de estructuras secundarias Vienna RNA webserver, (<http://rna.tbi.univie.ac.at/>) (Gruber *et al.*, 2008), RNAfold webserver (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>), con los parámetros predeterminados.

El programa Viena RNAFold para predicción de estructuras secundarias, se basa en el modelo predictivo del mínimo de energía libre (MFE, por sus siglas en inglés) de la secuencias de cadenas sencillas, utilizando el algoritmo de programación dinámica (DP, por sus siglas en inglés). La estructura de la MFE, se basa en el equilibrio de probabilidad de apareamiento de bases, calculando el algoritmo de función de partición (PF, por sus siglas en inglés) (Gruber *et al.*, 2008). La figuras y análisis del estudio de estructuras secundarias son arrojados a una salida de la plataforma Viena RNA webserver, la salida se agrupa en tres secciones, primero predicción de la estructura secundaria en anotación punto-corchete y MFE, segundo la imagen del la estructura secundaria en un mapa en el cual se muestran los resultados de MFE, probabilidad de apareamiento de las bases y diversidad del conjunto y por ultimo una representación gráfica de la estructura secundaria en un gráfico estructural y un diagrama de montaña.

- Se realizaron análisis de alineamientos de la región 5'UTR de las trece secuencias utilizando el programa ClustalX 1.83 (Thompson *et al.*, 1997) con los parámetros predeterminados. Los árboles filogenéticos no enraizados se analizaron por el método de Neighbor-joinin, con un índice de remuestreo o "bootstrap" de 1,000 repeticiones, utilizando el programa ClustalX. Se utilizó el programa njplot para la visualización de los árboles (Perrière & Gouy, 1996).

- Los grupos filogenéticos formados por el análisis de alineamiento, se sometieron al servidor de predicción de estructuras secundarias conservadas de Vienna RNA webservers, RNAalifold server (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAalifold.cgi>). De la predicción de estas estructuras secundarias, realizamos una selección de las estructuras representativas de las trece secuencias analizadas y se eligieron y seleccionaron aquellas estructuras que puedan tener importancia de acuerdo a su diferenciación en los grupos que infectan maíz o caña de azúcar y en la complejidad de la estructura secundaria formada.

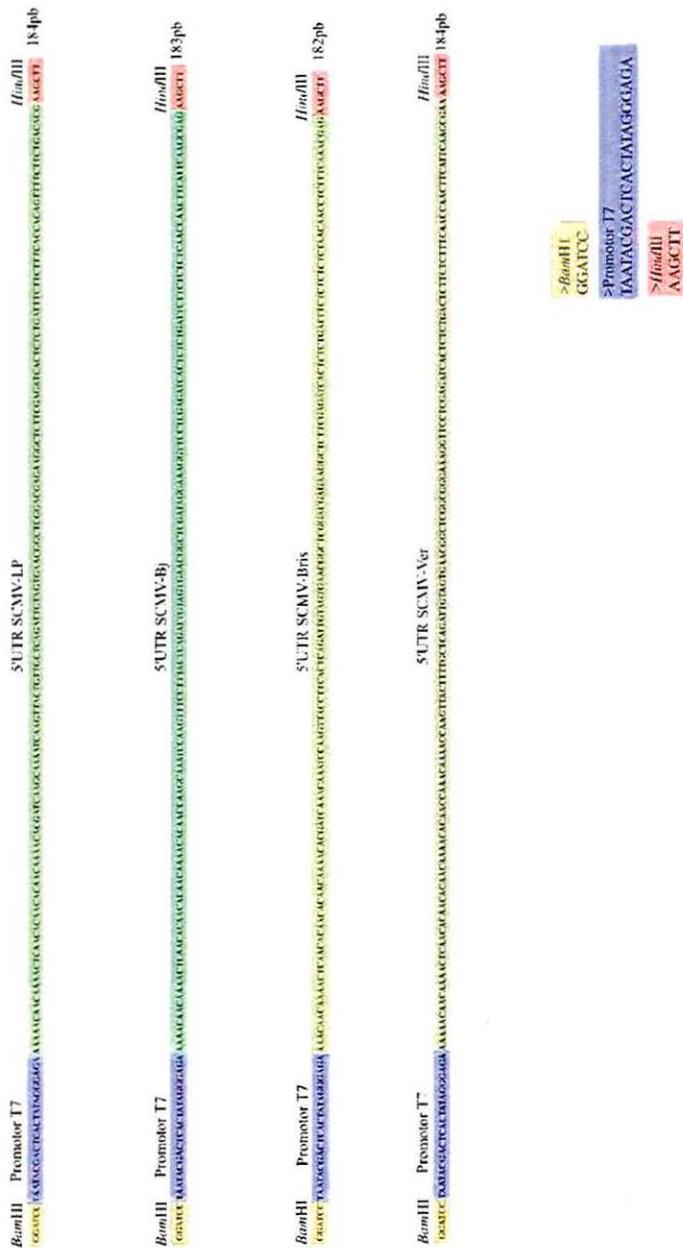
9.2. Construcción de minigenes:

- La selección de secuencias de los resultados obtenidos del análisis bioinformático fue los aislamientos correspondientes a SCMV-Lp (Liping, China), SCMV-Bj (Beijin, China), SCMV-Bris (Brisbane, Australia) y SCMV-Ver (Veracruz, México), las secuencias se mandaron a sintetizar *in vitro* en minigenes a la compañía Integrated DNA Technologies, Inc. Cada uno de los minigenes está flanqueado por las secuencias de las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III, respectivamente, para liberar el fragmento, además de una región promotora transcripcional para la RNA polimerasa T7 (Fig. 4). Los transcritos que se obtienen están en sentido. Éstos minigenes fueron insertados en el vector pIDSMART que contiene secuencias que otorgan resistencia a kanamicina (Km) para su selección en células competentes *E. coli* JM109.

9.3. Purificación y digestión:

- Las bacterias *E. coli* JM109, se crecieron a 37 °C en 5 mL de medio de cultivo líquido Luria-Broth (LB) con Km₅₀ toda la noche. Se purificaron los plásmidos con el cartucho o “kit” GeneJET plasmid Miniprep (Fermentas) según las indicaciones del fabricante. La digestión del plásmido pIDSMART se hizo incubando a 37 °C toda la noche con la enzima *Hind*III (10 U/μg) que reconoce dos únicos sitios de corte en el plásmido, uno de ellos río abajo del promotor T7 RNA polimerasa. Esta reacción se purificó con el kit *illustra* GFX DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare) de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Figura 4. Mapa de minigenes de las cuatro secuencias seleccionadas.



9.4. Transcripción *in vitro*:

- El plásmido pIDTSMART linearizado, se utilizó como templado para iniciar la reacción de transcripción *in vitro* con el kit Riboprobe Systems (Promega). La reacción de transcripción fue incubada a 37 °C durante 2 h en un volumen final de 20 μ L, utilizando 1 μ g de templado linearizado de DNA, 2.5 mM de cada ribonucleótido (rNTP), 20 U de T7 RNA polimerasa en buffer de transcripción 5 X provisto por la casa comercial. La precipitación del transcrito se realizó con 1 volumen de fenol saturado de TRIS (pH 4.7): cloroformo: alcohol isoamílico (125:4:1); 1 volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1); 0.5 volúmenes de acetato de amonio (7.5 M), 2.5 volúmenes de etanol 100 % y glicógeno; lavados de la pastilla con etanol al 70 % o por el kit RNeasy MiniElute Cleanup (QIAGEN). El RNA se resuspendió en 20 μ L H₂O tratada con dietil pirocarbonato (DEPC). La concentración de RNA fue cuantificada por espectrofotómetro “Nanodrop”™.

9.5. Material vegetal y extracción de proteína:

- Se germinaron semillas de *Zea mays* variedad DAS en cámaras de crecimiento a 25 °C, 16 h luz/8 h oscuridad durante 2 semanas. Las hojas se cortaron y molieron en mortero con N₂ líquido hasta obtener un molido fino de tejido. Se liofilizó el tejido molido de 12 a 16 h. Para la extracción de proteína se utilizaron 50 mg de tejido de maíz liofilizado y posteriormente se maceró en mortero y perlas de vidrio en N₂ líquido hasta obtener un polvo fino. Se adicionaron 400 μ l buffer de cromatografía [HEPES 10 mM (pH 7.9); MgCl 3 mM; NaCl 140 mM; Glicerol 5 %; DTT 1 mM; Triton X-100 0.01 %; COMPLETE (ROCHE)]. Se agitó a 4 °C durante 30 min en vortex a velocidad máxima y se centrifugó a 8000 xg a 4 °C durante 30 min. Se recuperó el sobrenadante y determinó la proteína por el método de Bradford.

9.6. Inducción y purificación de proteínas recombinantes nativas.

Controles experimentales:

Las dos proteínas usadas como controles en los experimentos fueron recombinantes y etiquetadas con colas de seis histidinas: una de ellas fue la proteína de unión a la cola de poli adeninas de RNA (PABP, por Poly(A) Binding Protein) aislada del primate *Homo*

sapiens y la otra, un factor de transcripción mitocondrial (MTFI por Mitochondrial Transcription Factor 1) aislada de la levadura, *Saccharomyces cerevisiae*.

- Las cepas de *E. coli* JM109 o DH5 α se transformaron por choque térmico con los vectores de expresión conteniendo los genes codificantes para PABP y MTFI. Los plásmidos correspondientes se purificaron como se ha mencionado anteriormente y se usaron para transformar por choque térmico las cepas de *E. coli* BL21. Posteriormente se crecieron en medio LB/Cb₁₀₀ hasta alcanzar la fase logarítmica (con una D.O de 0.6) y se indujo la expresión de las proteínas a partir de los genes clonados en los vectores de expresión (previamente mencionados como PABP y MTFI) con isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido (IPTG): 0.4 M para MTFI y 0.5 M para PABP. Ambos fueron incubados durante 4 h a 37 °C. Las bacterias se centrifugaron a 3800 g durante 10 min y se desechó el sobrenadante. Las bacterias en las pastillas precipitadas se almacenaron a -20 °C hasta su posterior uso.
- Para realizar la purificación se realizó la lisis bacteriana con 5 mL de buffer de cromatografía de lisis [HEPES 10 mM (pH 7.9); MgCl 3 mM; NaCl 140 mM; Glicerol 5 %; DTT 1 mM; Imidazole 10 mM; 50 mM PMSF (Sigma); COMPLETE (ROCHE); 20 mg/mL de Lizosima (Sigma)]. Se incubó en hielo durante 30 min, con agitación cada 10 min. Se sonicó (SONICS vibra cell TM) a 200-300 W seis veces con intervalos de 10 seg de sonicación y 10 seg sin sonicación. Todo el procedimiento se realizó sobre hielo. El lisado bacteriano se centrifugó a 10000 g durante 30 min y se recuperó la fase acuosa. La fase acuosa se incubó con 1 mL de perlas de agarosa de Ni-NTA (QIAGEN o Clonotech), a 4 °C en agitación durante 2 h. Después de agitar, se pasó, por gravedad, a través de una columna poly-prep chromatography (BIO-RAD). La columna se lavó dos veces con 4 mL de buffer de cromatografía de lavado [HEPES 10 mM (pH 7.9); MgCl 3 mM; NaCl 140 mM; Glicerol 5 %; DTT 1 mM; Imidazole 20 mM] a 4 °C. Las proteínas unidas se eluyeron con buffer de cromatografía de elución [HEPES 10 mM (pH 7.9); MgCl 3 mM; NaCl 140 mM; Glicerol 5%; DTT 1 mM; Imidazole 250 mM] incubando durante 1 h la primer elución y 30 min la segunda y tercer elución, el procedimiento se realizó a 4 °C. Posteriormente se determinó la proteína por el método de Bradford.

Método de Bradford:

- Para evaluar la cantidad de proteína total de maíz y de proteína recombinante (PABP y MTFI) se utilizó el método de Bradford y el protocolo para placas de microtítulo recomendado por el fabricante (Bio-Rad Protein Assay; Bio-Rad); El método (*dye-binding*), se basa en la unión entre un colorante aniónico ácido (Azúl de Coomassie R-250) y las proteínas que forman un complejo que puede ser detectado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 595 nm. El colorante azul de Coomassie se une a aminoácidos principalmente básicos y aromáticos, especialmente la arginina.
- Se realizó una curva estándar de proteína a partir de una solución de albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma) de seis concentraciones (0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mg/mL). Se mezclaron 10 μ L de cada muestra con 200 μ L del reactivo de Bradford (diluido previamente con agua en una proporción 1:5 v/v), se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 595 nm. Cada muestra se evaluó por triplicado.

9.7. Cromatografía de afinidad a RNA (Fig. 5):

- Se oxidaron 50 μ g del RNA sintetizado *in vitro* con periodato de sodio 10 mM en buffer de acoplado (acetato de sodio 100 mM, pH 5.0) y se incubaron a 4 °C en oscuridad durante 2 h. El RNA oxidado fue precipitado con 2.5 volúmenes de etanol absoluto a -20 °C durante 2 h, y resuspendido en buffer de acoplado. Se equilibraron 500 μ L de perlas de agarosa dihidrazida adipica ácida (Sigma) con el buffer de acoplado y se mezclaron con el RNA oxidado. Esto se incubó a 4 °C durante 12-16 h en agitación suave. Se precipitó el RNA unido a las perlas y se lavaron dos veces con NaCl 2 M y tres con buffer de cromatografía [HEPES-KOH 10 mM (pH 7.9); MgCl 3 mM; NaCl 140 mM; Glicerol 5 %; DTT 1 mM; Triton X-100 0.01 %]. Finalmente, el RNA unido a las perlas, se incubó con el extracto proteico a 4 °C durante 1 h. El complejo de proteína de maíz con el RNA viral resultante ya unido a las perlas se lavó cuatro veces con buffer de cromatografía y el sobrenadante se desechó. Por último, este complejo se lavó dos veces con dos soluciones crecientes de NaCl 0.5 M y 1 M en buffer de cromatografía. Se recuperaron las fracciones de

cada uno de los lavados. Los dos sobrenadantes de 1 M de NaCl en buffer de cromatografía se concentraron en centrifugación con vacío en un “speed vac” (*Maxy-Dry Lyo*, Maxi dry Plus; Heto, Dinamarca y/o Savant liophilizer Mildford, ME) hasta un volumen de ~50 μ L. Posteriormente se juntaron los sobrenadantes con cuidado de no llevarse las perlas, se precipitaron con Clean Up (GE Healthcare) según indican las indicaciones del fabricante. Las muestras de proteínas precipitadas se rehidrataron con buffer Laemli para proteínas de alto peso molecular y se analizaron por geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 10 % y se visualizaron con tinción Phast Blue, azul de Coomassie (Sambrook *et al.*, 1989) y tinción de plata (Blum *et al.*, 1987; Mortz *et al.*, 2001) utilizadas de acuerdo a la sensibilidad de la técnica.

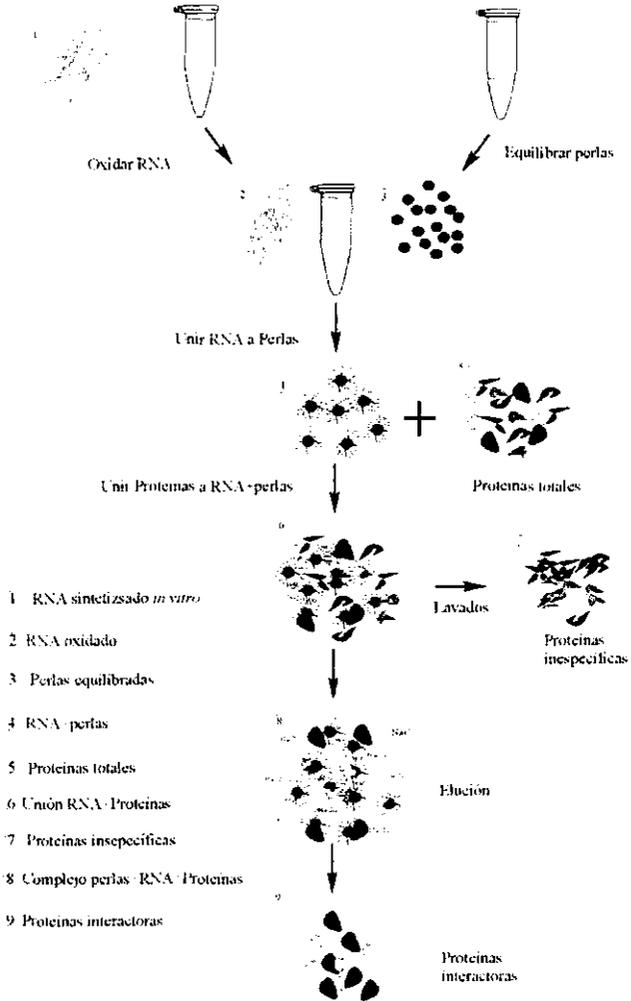
Gel SDS-PAGE:

- Electroforesis en gel de poliacrilamida con duodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) al 10%, que consta de dos fases, la primer fase concentradora (o stacking) y una fase desnaturizante (o resolving). Es la técnica utilizada para separar proteínas de acuerdo a su movilidad electroforética. Los geles desnaturizantes, se montaron en moldes de cristal Mini PROTEAN® 3 System de 1 y 1.5 mm de grosor. Los geles SDS-PAGE fueron preparados con Acrilamida/bis-Acrilamida 40 % (SIGMA); Tris-HCl 1 M (pH 6.8 y 8.8); SDS 10 %; Persulfato de amonio 0.1 %; TEMED (Amersham Biosciences). Las muestras fueron preparadas con Buffer de Laemli 1 X [13.5 % Tris-HCl 0.5 M (pH. 6.8); 10.8 % Glicerol 100 %; 21.6 % SDS 10 %; 0.05 % Brilliant Blue R (Sigma); 2.5 % β -Mercaptoetanol] para proteínas de alto peso molecular. Se agregaron 7 μ l de Buffer de Laemli e hirvieron durante 5 min. Se cargaron al gel SDS-PAGE y se corrieron con una corriente eléctrica provista por una fuente de poder PowerPac Basic™ (BIORAD) desde la fase concentradora a 80 volts hasta la fase desnaturizante. Cuando se está en la fase desnaturizante se realiza a 100 volts. El tiempo empleado durante la electroforesis es de aproximadamente 3 h. Las cámaras de electroforesis utilizadas son Mini PROTEAN® tetra cell (BIO-RAD).

MATERIALES Y METODOS

- Las bandas proteicas diferenciales teñidas e indicadoras de una interacción con el RNA de acuerdo a su comparación con los controles que contienen proteínas que no se unen a RNA, fueron escindidas y enviadas a un servicio de identificación de péptidos por espectrometría de masas de acuerdo a su perfil de digestión por proteasas.

Figura 5. Cromatografía de afinidad a RNA.



Cromatografía de afinidad RNA - proteínas.

10. Resultados

10.1. Búsqueda de secuencias de la región 5'UTR del SCMV.

Para analizar si la diversidad de la estructura secundaria de la región 5'UTR del SCMV que pudiera estar implicada en la interacción con proteínas del hospedante, se buscaron las secuencias disponibles y obtuvieron los números de acceso de la base de datos del Genk Bank del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Se encuentran reportadas 11 secuencias de la región 5'UTR del SCMV que corresponden a secuencias de genomas completos. Se extrajeron las once secuencias correspondientes a la región de interés de esos once genomas, además de dos secuencias genómicas adicionales disponibles en Chaves-Bedoya y col. (manuscrito en preparación) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Secuencias usadas para el análisis de la región 5'UTR, sus números de acceso en el banco de genes, país y hospedante de origen.

No.	Nombre	No. Acceso	País	Aislado
1	SCMV-Ver	N.D.	México	Maíz
2	SCMV-Jal	N.D.	México	Maíz
3	SCMV-Sp	AM110759	España	Maíz
4	SCMV-Bj	AY042184	China	Maíz
5	SCMV-SX	AY569692	China	Maíz
6	SCMV-HZ	AJ297628	China	Maíz
7	SCMV-SD	AY149118	China	Maíz
8	SCMV-HN	AF494510	China	Maíz
9	SCMV-Bris	AJ278405	Australia	Maíz
10	SCMV-GD	AJ310105	China	Maíz
11	SCMV-YH	AJ310104	China	Caña
12	SCMV-XgS	AJ310103	China	Caña
13	SCMV-LP	AJ310102	China	Caña

N.D.= No Disponible

10.2. Análisis filogenético de la región 5'UTR del SCMV.

Para conocer la filogenia de esta región se construyeron árboles filogenéticos con las trece secuencias nucleotídicas de la región 5'UTR del SCMV de los diferentes aislamientos. La figura 6, muestra los agrupamientos de los aislamientos de maíz y de caña de azúcar, usados en el análisis de alineamientos que se separan en dos grupos o clados: el grupo maíz y el grupo caña de azúcar. Los grupos se dividen de una manera esperada de acuerdo al origen de los aislamientos (maíz o caña de azúcar). Se encontró un comportamiento diferente en un aislamiento de China (SCMV-GD) que es de maíz y se agrupó con el de caña de azúcar. Los aislamientos mexicanos (SCMV-Jal y SCMV-Ver) se agrupan con el aislamiento de España (SCMV-Sp) y cinco aislamientos chinos (SCMV-Bj, SX, HZ, SD y HN), estos aislamientos forman un gran grupo de maíz y un aislamiento australiano (SCMV-Bris) queda en una rama externa del grupo maíz. Los aislamientos de caña de azúcar provenientes de China (SCMV-YH, XgS y LP) forman un grupo altamente conservado entre ellos y como se mencionó anteriormente un aislamiento de maíz que se agrupa en ese clado.

10.3. Predicción de estructuras secundarias.

Se utilizó el programa Vienna RNAFold para predicción de estructuras secundarias, basándose en el modelo de predicción del mínimo de energía libre (MFE, por sus siglas en inglés) y ésta basado en el equilibrio de probabilidad de apareamiento de bases, calculando el algoritmo de función de partición (Gruber *et al.*, 2008) (Fig. 7).

La predicción de cada una de las estructuras secundarias de la región 5'UTR de SCMV provenientes de maíz y caña de azúcar (Fig. 8), da un panorama de la gran variabilidad que tiene esta región. La semejanza que mantienen los clados respecto a la estructura secundaria predicha es consistente en algunos casos. Las secuencias de los aislamientos de cada uno de los clados, fueron agrupadas y analizadas por el servidor de predicción de consensos de estructuras secundarias evidenciando cuatro posibles estructuras consenso (Fig. 9).

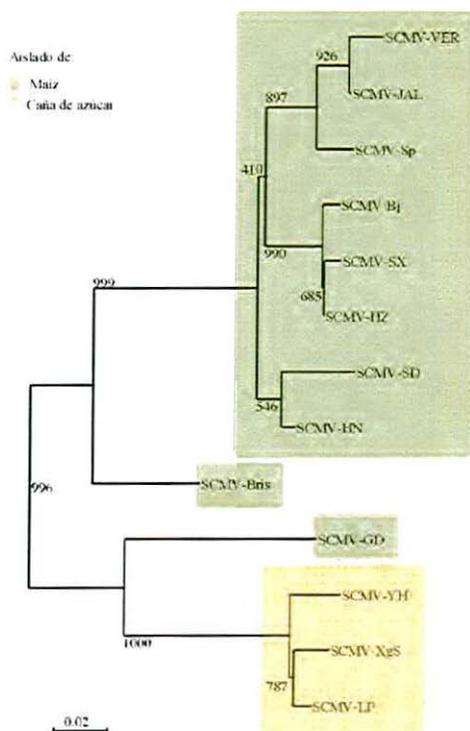


Figura 6. Árbol filogenético de la región 5'UTR de *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) de trece secuencias sin enraizar con el método de Neighbor-joining utilizando el programa de alineamientos ClustalX (1.86) con un índice de remuestreo o "bootstrap" de 1000 repeticiones. Las cajas de colores representan el hospedero del cual provienen los aislamientos. Verde para maíz y amarillo para caña de azúcar.

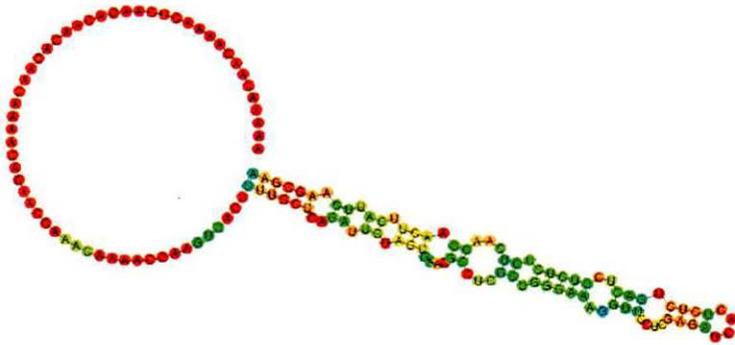


Figura 7. Composición de una estructura secundaria (SCMV-Ver), conformada por estructuras de tallo y asa. El código de color que rodea al nucleótido en la gama del azul al rojo, indican la probabilidad de apareamiento de bases, siendo el rojo la probabilidad mas alta con un valor de 1 y el morado la mas baja con un valor de 0.

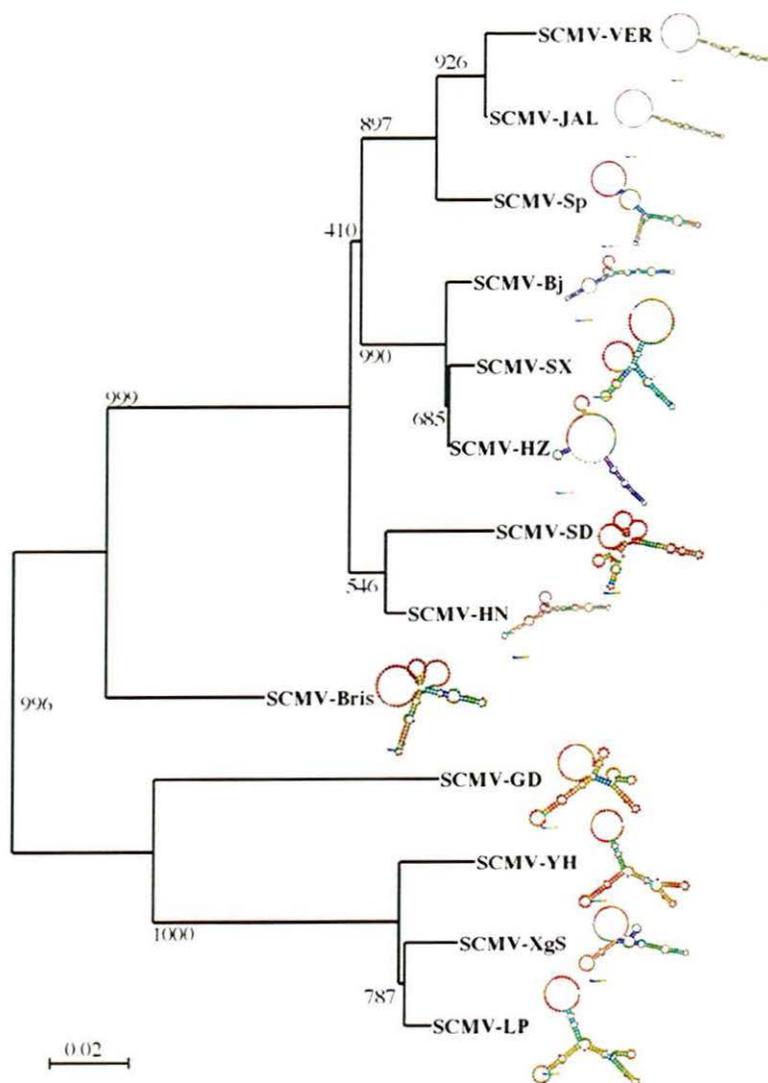


Figura 8. Árbol filogenético donde se representa la variabilidad de las estructuras secundarias según la predicción del programa Vienna RNAFold para cada uno de los aislamientos en su región 5'UTR del SCMV.

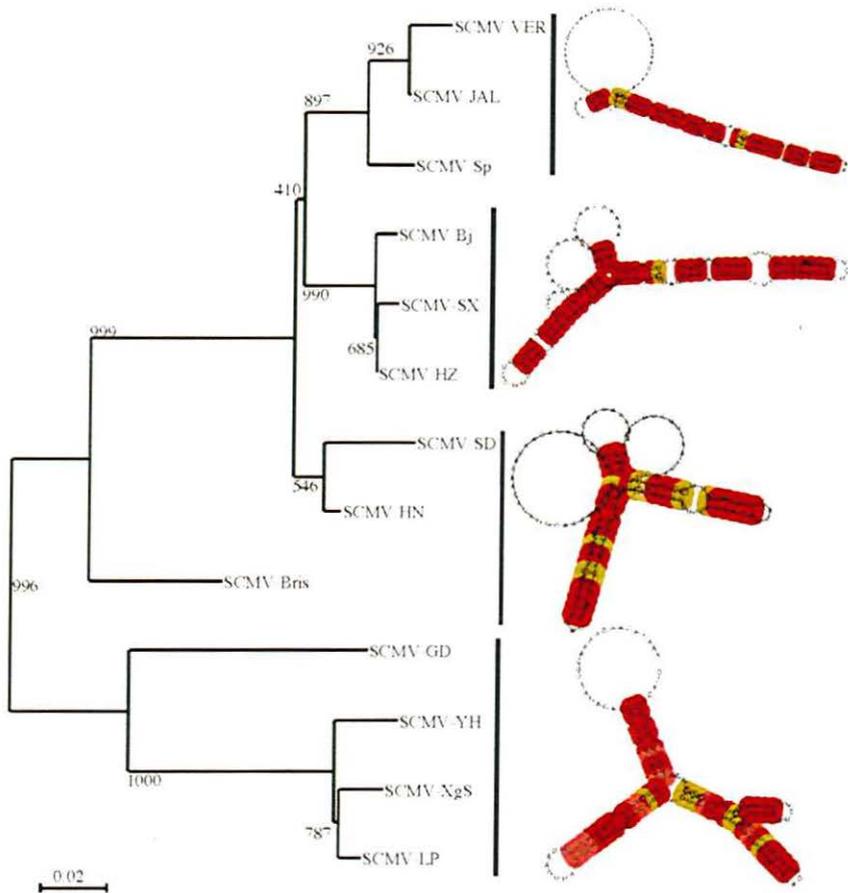


Figura 9. Árbol filogenético donde se muestran los grupos de la región 5'UTR de SCMV, la barra del lado derecho indica los aislamientos que generaron el consenso para la predicción de la estructura secundaria, los colores indican el tipo de pares de base en el consenso, siendo el rojo el menos variable y el morado el más variable. Los colores débiles indican la incompatibilidad de pares de bases del consenso.

De los consensos estructurados por el análisis predictivo, hemos elegido una estructura representativa cada uno de los cuatro grupos consenso derivados del análisis de las 13 secuencias de aislamientos de SCMV. Dos de estas estructuras son del hospedero caña de azúcar y dos de maíz (Fig. 10).

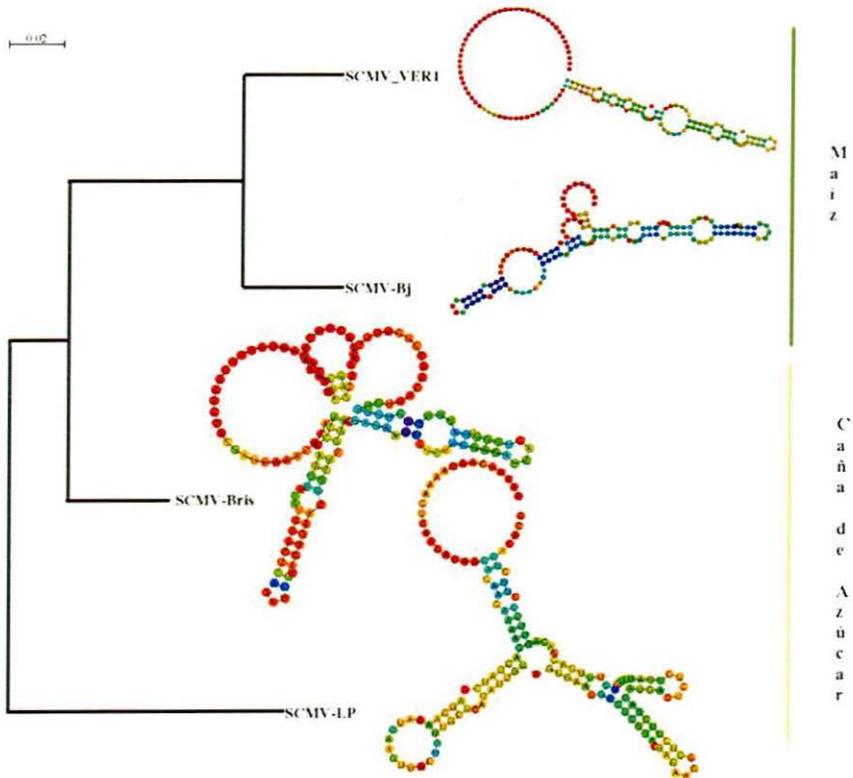


Figura 10. Árbol filogenético para representar la variedad de estructuras secundarias de la región 5'UTR del SCMV elegidas para ser sintetizadas para el análisis de interacción RNA y proteína. La barra de color de lado derecho indica el hospedero del que fue aislado, verde para maíz y amarillo para caña de azúcar.

10.4. Síntesis de transcritos de las regiones 5'UTR.

10.4.1. Construcción de minigenes.

Con la finalidad de obtener transcritos *in vitro* de las regiones virales de interés e identificar proteínas del hospedero interactuantes, se diseñaron y posteriormente se mandaron sintetizar los DNA *in silico* en forma de minigenes. A cada uno de esos minigenes (Cuadro 2) se les agregó la secuencia de la región promotora de la RNA polimerasa del fago T7, para realizar la transcripción de la secuencia 5'UTR. En los extremos se adicionaron las regiones de reconocimiento para los sitios de restricción *Bam*HI y *Hind*III, el primero en el extremo 5' y el segundo en el extremo 3' (Fig. 8). Los minigenes se mandaron a sintetizar a la casa comercial Integrated DNA Technologies (IDT).

Cuadro 2. Relación de los minigenes correspondientes a las cuatro regiones 5'UTR seleccionadas para análisis de interacción RNA y proteína.

No.	Nombre	No. Acceso	País	Aislado
1	SCMV-Ver	N.D.	México	Maíz
2	SCMV-Bj	AY042184	China	Maíz
3	SCMV-Bris	AJ278405	Australia	Caña
4	SCMV-LP	AJ310102	China	Caña

N.D.= No Disponible

10.4.2. Transcripción *in vitro* de los minigenes.

Después de verificar la integridad de los minigenes, se realizaron ensayos de síntesis de transcritos *in vitro* para la obtención de RNA correspondiente a la 5'UTR de los 4 aislamientos de SCMV (Fig. 11).

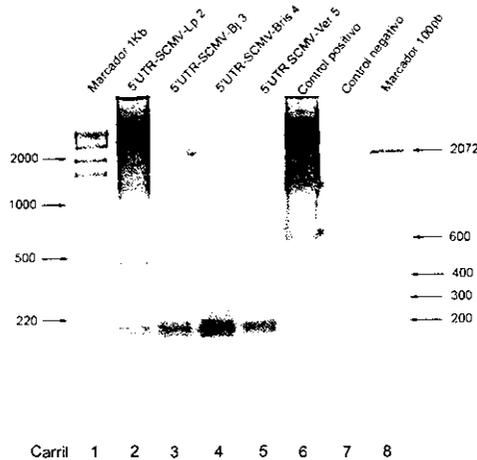


Figura 11. Gel de agarosa esteril al 2 % en donde se muestran los transcritos *in vitro* de la región 5'UTR de maíz y caña de azúcar. Los transcritos esperados son de ~150 pb. El control positivo transcribe dos bandas, señaladas con asteriscos de un tamaño de 2,346 pb (superior) y 1,065 pb (inferior). De lado izquierdo se encuentra el marcador de tamaño de 1 kb y en lado derecho, el de 100 pb.

10.5. Extracción de proteínas totales del hospedero (maíz).

La extracción de proteína fue estandarizada por extracción convencional tipo Laemli a partir de hojas de maíz de 15 días de edad. Inicialmente se identificó cual fue la relación peso volumen más indicado (50 mg de tejido / 400 µl de Buffer de cromatografía) para obtener un mayor rendimiento de proteína total de maíz (datos no mostrados). Se hizo un análisis de electroforesis de las proteínas extraídas en geles desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 10 %, para determinar la calidad de las proteínas totales de maíz extraídas. (Fig. 12)

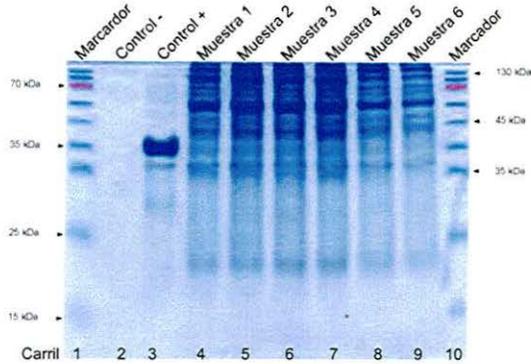


Figura 12. Gel SDS-PAGE donde se muestra la calidad de proteínas totales de maíz DAS (muestra 1 al 6). Una proteína recombinante como control carga y un carril sin muestra, a los extremos está el marcador de peso molecular.

10.6. Inducción de proteínas para los controles positivo y negativo de la interacción RNA y proteína.

Estos fueron el control positivo y negativo respectivamente. La PABP *in vivo* se une a la cola de poly(A) del mRNA, por otro lado la MTFI interactúa *in vivo* con el DNA mitocondrial de levadura para ubicar las regiones promotoras. En la figura 13 se muestra la inducción y purificación de PABP, en la figura 14 se muestra la inducción y purificación de MTFI.

El tamaño de las proteínas expresadas fue el esperada y dentro de los rangos indicados por los laboratorios que construyeron los respectivos cDNAs y de acuerdo con las proteínas recombinantes que ellos han reportado.

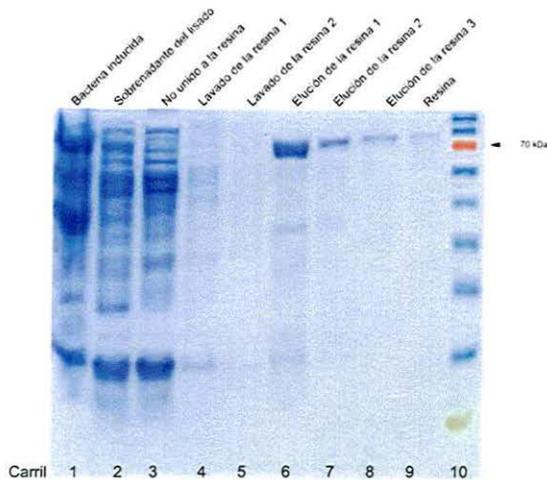


Figura 13. Gel SDS-PAGE de la inducción y purificación de las proteínas PABP recombinantes etiquetadas con histidinas. Carril 1 y 2: lisados bacterianos. Carril 3: sobrenadante del lisado bacteriano no unido a la resina. Carril 4 y 5 corresponden los lavados hechos a la resina. Carril 6 – 8: eluciones hechas a la resina. Carril 9: cantidad de proteína que queda pegada a la resina. La proteína PABP etiquetada pesa alrededor de 74 kDa.

Las proteínas recombinantes fueron obtenidas de manera nativa, esto para poder realizar los ensayos de interacción con RNA. La metodología de purificación nativa reduce la cantidad de proteína obtenida al momento de la purificación de la resina. El rendimiento de la cantidad de proteína nativa respecto a la desnaturizante, disminuye alrededor de un 50% en su concentración final de ~ 0.136 y ~ 0.112 mg totales de PABP y MTFI respectivamente (datos no mostrados).

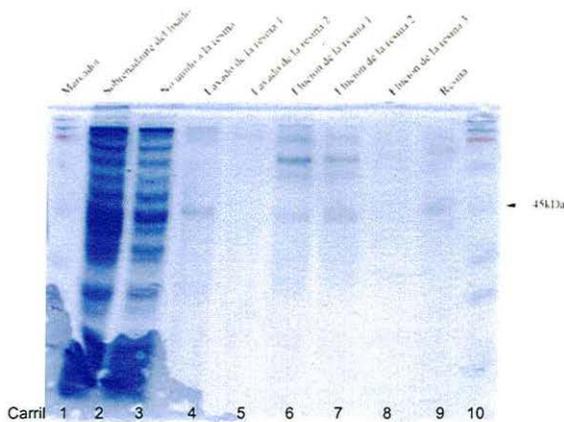


Figura 14. Gel SDS-PAGE de la inducción y purificación de las proteínas MTFI recombinantes etiquetadas con histidinas. En los extremos se encuentra el marcador de peso molecular. Carril 2: sobrenadante del lisado bacteriano. Carril 3: lisado bacteriano no unido a la resina. Carril 4 y 5: corresponden los lavados hechos a la resina. Carril 6 – 8: las eluciones de la resina. Carril 9: cantidad de proteína que queda pegada a la resina. La proteína etiquetada pesa alrededor de 45 kDa.

10.7. Interacción de los RNAs de la 5'UTR con proteínas de maíz.

Para explorar las interacciones de RNA y proteína se hicieron ensayos de cromatografía de afinidad. Los posibles complejos interactores de RNA y proteína se aislaron y se observaron en geles SDS-PAGE al 10 %. En el análisis de las interacciones con los cuatro RNAs de interés (o problemas), de las 5'UTRs de los diferentes aislamientos antes mencionados, se incluyó un control de proteínas totales que pudieran interactuar con las perlas que enlazan al RNA. Se incluyó además un control técnico para verificar que, dentro de la población de las proteínas totales, habría una interactora con un RNA conocido como es la de la cola poly(A); un control negativo de una proteína que no interactuará con RNA, como lo es MTFI y un control positivo de una proteína purificada que se sabe que interactúa con RNA, específicamente con su cola poliadenilada, como lo es la PABP (Fig. 15 y 17). También se incluyeron controles que permitieran monitorear si hay interacción de la PABP y el MTFI con las perlas de agarosa dihidrazida adípica ácida (Fig. 16).

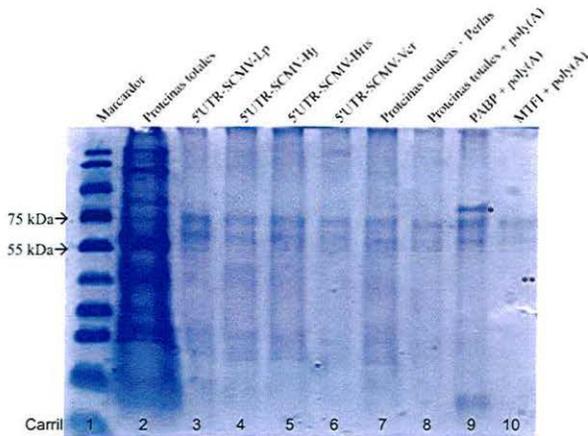


Figura 15. Gel SDS-PAGE, se muestran las proteínas obtenidas de la cromatografía de RNA y proteína. En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular, segundo carril proteínas totales de maíz. Carril 2 al 5: proteínas que posiblemente interactúen con el RNA de la región 5'UTR de los cuatro aislamientos virales. Carril 6 al 10: controles positivo y negativo del experimento. El símbolo * apunta al tamaño esperado de PABP (control positivo). Los símbolos ** apuntan al tamaño esperado de MTFI (control negativo que, como se esperaba, no estuviera presente). Tinción con Phast Gel Blue R.

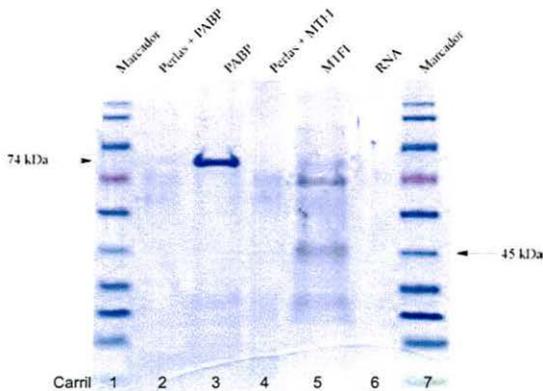


Figura 16. Gel SDS-PAGE mostrando ausencia de interacción de los controles con las perlas de agarosa. En los carriles 3 y 5: se encuentran solo las proteínas PABP y MTFI recombinantes purificadas. En los carriles 2 y 4: se corrieron las perlas con las dos proteínas respectivamente. En los extremos se encuentra los marcadores de peso molecular. Tinción con Phast Gel Blue R.

RESULTADOS

Para comprobar que no hay interacción de PABP y MTFI con perlas de agarosa dihidrazida adípica ácida se hizo una reacción de interacción entre ambos componentes. En la figura 16 (carriles 2 y 4), no hay detección de las bandas correspondientes a ambos controles cuando se cargaron los extractos de perlas luego de ponerlas a interactuar con dichas proteínas.

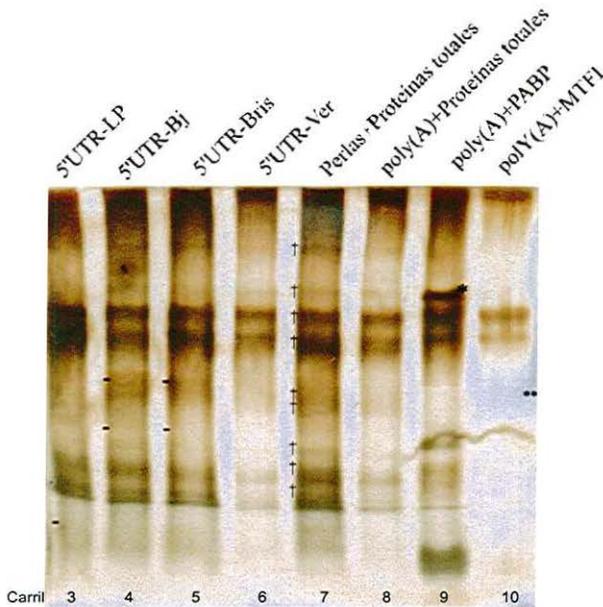


Figura 17. Gel SDS-PAGE teñido con plata mostrando 5 posibles proteínas de maíz interactoras, señalados con -, con los aislamientos de la región 5' UTR del SCMV.

En la figura 17 se puede definir mejor el bandeo diferencial de los RNAs 5' UTR de los problemas respecto a las proteínas totales de maíz con interacción con perlas de agarosa dihidrazida adípica ácida. Las proteínas de interés se encuentran señaladas con -, el bandeo señalado con † será eliminado como patrón de bandeo diferencial, ya que se encuentran en el control de interacción de proteínas totales de maíz con perlas de agarosa dihidrazida adípica ácida.

Las posibles proteínas interactoras con la región 5'UTR del SCMV se identificaron únicamente en los dos aislamientos de Beijín (Bj) y Brisbane (Bris) y no en los de Linping (Lp) ni en el de Veracruz (Ver).

RESULTADOS

Las bandas de las proteínas identificadas como posible interactoras fueron escindidas y enviadas para su análisis por espectrometría de masas MS-Masas, independientemente de la necesidad de repetir este ensayo de cromatografía de afinidad de los complejos de RNA y proteínas.

11. Discusión.

Los análisis filogenéticos realizados en la región 5'UTR de las trece secuencias del virus del mosaico de la caña de azúcar, ya sea aislamientos de maíz o de caña de azúcar, demuestran que hay una separación en grupos virales respecto al organismo del cual fueron aislados, manteniendo una relación entre el hospedero (maíz o caña) y el aislamiento viral. En los trabajos en donde se reportan las secuencias de ácidos nucleicos y amino ácidos, las filogenias realizadas son principalmente de la proteína de la cápside, en donde también se identifica esta asociación aislamiento viral – hospedero, aunque no tan claramente (Chen *et al.*, 2002; Fan *et al.*, 2003; Zhong *et al.*, 2005; Achon *et al.*, 2007).

Al realizar los análisis de predicción de estructuras secundarias de la 5'UTR, se compararon tres programas de predicción de estructuras secundarias: mfold (Zuker, 2003), Vienna RNA fold (Gruber *et al.*, 2008) y RNA frabase (Popenda *et al.*, 2008). Debido a que los resultados de cada uno de los servidores en línea arrojaron resultados similares en la predicción de estructuras secundarias, la selección del programa de predicción de estructuras secundarias se hizo con base en la facilidad de manejo de la plataforma del servidor y por la posibilidad de hacer comparaciones por consensos en las similitudes de las secuencias. Al realizar los análisis de diversidad de estructura secundaria con el servidor Vienna RNAfold de la región 5' UTR, se infirió, por predicción probabilística que ésta es una estructura muy variable en cada aislamiento viral. A pesar de que las diferencias entre éstas pueden darse en un solo nucleótido, mantienen una consistencia estructural en cada agrupación de los aislamientos virales. La región 5'UTR de los aislamientos virales elegidos del SCMV, fue seleccionada por la diversidad que mostraban en su estructura secundaria, partiendo del supuesto que las interacciones de las diferentes secuencias de la región 5'UTR estén interactuando con proteínas del hospedero y que estas pueden intervenir en la selección de especies hospederas, como es propuesto de manera similar en picornavirus (Shaw-Jackson & Michiels, 1999).

Las secuencias elegidas (entre las trece disponibles), para realizar los ensayos de cromatografía de afinidad RNA y proteínas, muestran un mínimo de similitud del 80% y un

máximo de 92% (datos no mostrados). Sin embargo, las diferencias de cada una de estas estructuras entre aislamientos son grandes. Las estructuras tallo-asa de cada una de estas secuencias da particularidad a cada una de las regiones 5'UTR como se muestra en la figura 8, teniendo una mayor complejidad, en la estructura secundaria predicha, las secuencias aisladas de caña de azúcar. Las diferencias detectadas a nivel de estructura secundaria permitieron establecer la hipótesis de trabajo y probarla experimentalmente.

En contraste a los experimentos previos de cromatografía de afinidad obtenidos en el laboratorio de interacción planta virus del Cinvestav, Campus Guanajuato, realizados y mencionados en la sección de antecedentes, en lo que la región 5'UTR del SCMV-Ver mostró la presencia de bandas proteicas diferenciales, indicadoras de una interacción, no se detectó una proteína equivalente interactora. Sin embargo, si se encontró un par de proteínas interactoras putativas para los 5'UTR de los aislamientos SCMV-Bj y SCMV-Bris y una para el aislamiento SCMV-Lp con una banda de bajo peso molecular. Las bandas proteicas cortadas del gel de poliacrilamida fueron enviadas a análisis de MS-Masas. Esta diferencia puede deberse al diseño y uso de controles adecuados que permitieron descartar a las proteínas totales de maíz que interactuaron con las perlas de agarosa dihidrazida adipica ácida usadas en la cromatografía de afinidad. En la figura 17 se destaca un múltiple patrón de bandeo que ejemplifica este punto. Al realizar los experimentos del protocolo de cromatografía de afinidad RNA – Proteína, modificado de Patel y col. (2005) y Caputi y Zahler (2001), en esta parte experimental no se realizó el llamado preclareo, reportado por Patel y col. (2005) en el cual se incuban las proteínas totales con sólo perlas de agarosa dihidrazida adipica ácida, para evitar la interacción inespecífica de proteína con las perlas, en el proceso de interacción de proteínas y perlas con el RNA de interés. En el ensayo de cromatografía de afinidad de RNA y proteína (Fig. 15) se pueden observar dos bandas entre el marcador de ~ 70 y ~ 55 kDa. Éste patrón constante de bandeo se identificó en todas las muestras trabajadas con perlas de agarosa dihidrazida adipica ácida. Esto podría ser indicativo de que pueda haber una contaminación en las perlas, o en alguna otra fuente durante el manejo de la cromatografía por la cual se estén presentando esas bandas inespecíficas de manera consistente.

No se caracterizaron aún las proteínas que interactuaron con el RNA de la región 5'UTR de los diferentes aislamientos de SCMV, pero sin lugar a duda abrirán un panorama más amplio de cuales fueran esas posibles interacciones y su función biológica en relación con el hospedero y el huésped intracelular obligado. En estudios previos de interacción RNA – Proteínas con otros miembros de la familia *Potyviridae* se han reportado proteínas que interactúan con la región 5'UTR, familias proteicas que están involucrados con los factores de traducción de eucariotes (eIF), como el eIF4F, o particularmente eIF4G, así como facilitando el reclutamiento de la subunidad 40s en TEV (Kneller *et al.*, 2006) y de manera indirecta una mutante de *Arabidopsis thaliana* para eIF(iso)4E, previniendo la infección en *Turnip mosaic virus* (TuMV), *Lettuce mosaic virus* (LMV) y TEV y no para *Clover yellow vein virus* (CIYVV) (Robaglia & Caranta, 2006). Tanguay y Gallie (1997) identificaron una proteína de unión a RNA de 102 kDa (p102) que une a los extremos 5' y 3' UTR de *Tobacco mosaic virus* (TMV) y potencia la traducción de éste virus. Probaron la presencia de esta proteína principalmente en germen de trigo. Para sustentar la hipótesis de que esta es una proteína que se encuentra en todo el reino Plantae, analizaron plantas monocotiledóneas, dicotiledóneas y gimnospermas: maíz, arroz, tabaco, chicharo, soya, algodón, pino, nuez, jitomate, cebada, zanahoria y amapola y en todas estas muestras encontraron la proteína p102. Lo anterior sugiere que esta proteína juega un papel importante en la eficiente traducción de virus de plantas. En el caso de este trabajo, las bandas diferenciales putativas de proteínas interactoras en la 5'UTR podrían estar asociadas a la estructura y posiblemente no serían universales pues están presentes en tres de los seis aislamientos probados independientemente del origen del aislamiento (maíz o caña de azúcar).

En esta segunda parte, se discutirá cuales fueron los aportes de este trabajo de tesis adicionales a los que ya se había iniciado antes en el laboratorio de interacción planta virus del Cinvestav Campus Guanajuato. En los ensayos previos únicamente se había trabajado con el aislamiento de SCMV de Veracruz. Para este trabajo de tesis se utilizaron tres secuencias más de otros aislamientos virales de China y Australia, además de la secuencia de Veracruz con el fin de contestar de la mejor manera posible a la hipótesis planteada. Por ello las secuencias fueron sintetizadas *de novo* e insertadas en los llamados “minigenes”,

para discernir si esta región está interactuando de manera diferencial entre los aislamientos virales y las proteínas del hospedero.

En los ensayos previos de cromatografía de afinidad RNA y proteínas, no se contaba con los controles negativos y positivos de la técnica de cromatografía, así como la verificación de la interacción de las proteínas totales de maíz con las perlas de agarosa dihidrazida adípica ácida. Éste trabajo de tesis permitió diseñar, adicionar y probar dichos controles. El control positivo PABP fue reportado previamente en ensayos de interacción con el Virus de Norwalk, ésta interacción con PABP fue corroborada mediante ensayos de entrecruzamiento en Gutiérrez-Escolano y col. (2003). El control negativo MTF1 ésta siendo utilizado en ensayos de reconocimiento de secuencias promotoras transcripcionales en mitocondria de levadura *S. cerevisiae* (Velazquez, comunicación personal) (Fig. 15 y 17). Los controles técnicos de la interacción de proteínas totales de maíz con perlas ya se discutieron antes. También adicionamos los controles pertinentes para verificar que los controles positivo y negativo, no estuvieran interactuando con las perlas. Esto nos permitió darle soporte a los ensayos de cromatografía de afinidad de RNA y proteína. Con estos controles listos para ser usados se podrán hacer nuevos ensayos de interacciones de la 5'UTR de los diferentes aislamientos con proteínas de maíz y posiblemente de caña de azúcar.

Los resultados obtenidos de la cromatografía de afinidad de RNA y proteína, son positivos refiriéndose a estandarización, los resultados salieron conforme a lo que se esperaba encontrar en los controles, así como la diferencia de patrones en los problemas correspondientes a la 5'UTR de los aislamientos virales. Sin embargo, todavía falta mejorar la concentración de proteína recuperada de la cromatografía de afinidad para poder caracterizar las proteínas putativas de interacción por espectrometría de masas. Ya optimizado el sistema, se puede llevar a cabo la repetición de los ensayos de manera serial y así corroborar los datos encontrados en éste primer ensayo de exploración de la región 5'UTR del virus del mosaico de la caña de azúcar que infecta.

DISCUSION

La optimización de este sistema y la obtención de posibles proteínas interactoras con la 5'UTR obvia la necesidad de explorar otros sistemas de interacción de RNA y proteína como el sistema de tres híbridos en donde se analiza este tipo de interacción en un sistema heterólogo en levadura (SenGupta *et al.*, 1996; Hook *et al.*, 2005). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de validar las proteínas obtenidas usando ambos métodos.

La caracterización de las proteínas candidatas ayudará a elucidar su función, así como a planear los próximos experimentos para identificar si existe interacción de otro tipo de biomolécula, además de proteínas (RNAs pequeños, por ejemplo), que se encuentre interactuando con esta región 5'UTR.

12 Conclusiones.

- Se encontro diferencia en la predicción de estructuras secundarias de la región 5'UTR entre los diferentes aislamientos virales. La filogenia de la región 5'UTR muestra una separación respecto al hospedero del cual fue aislado.
- Se determinaron interacciones entre proteínas de maíz y la región 5'UTR del SCMV.
- Se destaca la presencia de 5 posibles proteínas provenientes de 3 aislamientos que interactuaron con la región 5'UTR del SCMV.

13. Perspectivas.

- Realizar los ensayos por triplicado de los ensayos de cromatografía de afinidad RNA y proteína.
- Caracterizar las proteínas que interactúan con el RNA del SCMV y asignar su papel biológico en la infección.
- Explorar si la región 3' UTR del SCMV interactúa con proteínas del hospedero maíz y realizar los ensayos de cromatografía de RNA y proteína.
- Explorar si otras biomoléculas (RNA) podrían estar interactuando con la región 5' UTR.

14. Referencias.

- Achon, M. A. Serrano, L. Alonso-Ducñas, N. y Porta, C. 2007. Complete genome sequence of Maize dwarf mosaic and Sugarcane mosaic virus isolates coinfecting maize in Spain. *Archives of Virology*. 152: 2073-2078.
- Adams, J. M. Antoniw, J. F. y Fauquet, C. M. 2005. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae. *Archives of Virology*. 150:459-479.
- Alegria, O. M. Royer, M. Bousalem, M. Chatenet, M. Peterschmitt, M. Girard, J-C. y Rott, P. 2003. Genetic diversity in the coat protein coding region of eighty-six sugar cane mosaic virus isolates from eight countries, particularly from Cameroon and Congo. *Archives of Virology*. 148:357-372.
- Basso, J. Dallaire, P. Charest, P. J. Devantier, Y. y Laliberté, J-F. 1994. Evidence for an internal ribosome entry site within the 5' non-translated region of turnip mosaic potyvirus RNA. *Journal of General Virology*. 75: 3157-3165.
- Carrington, J. C. y Freed, D. D. 1990. Cap-independent enhancement of translation by plant potyvirus 5' nontranslated region. *Journal of Virology*. 64(4): 1590-1597.
- Caputi, M. y Zahler, A. M. 2001. Determination of the RNA binding specificity of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) H/H'/F/2H9 family. *The Journal of Biological Chemistry*. 276(23): 43850-43859.
- Chaves-Bedoya, G. Ruíz-Castro, S. González-de-Leon, D. y Silva-Rosales, L. Manuscrito en preparación.
- Chen, J. Chen, J. y Adams, J. 2002. Characterisation of potyviruses from sugarcane and maize in China. *Archives of Virology*. 147:1237-1246
- Delgadillo, F. 1987. Identificación de la enfermedad de la necrosis letal del maíz en el estado de Guanajuato. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 5: 21-26.
- Dreher, T. W. y Miller, A. W. 2006. Translational control in positive strand RNA plant virus. *Virology*. 344: 185-197.

REFERENCIAS

- Espejel, E. Jeffers, D. Noa-Carrazana, J. C. Ruiz-Castro, S. y Silva-Rosales, L. 2006. Coat protein gene sequence of Mexican isolate of Sugarcane mosaic virus and its infectivity in maize and sugarcane plants. *Archives of virology*. 151: 409-412.
- FAO. 2004. Production of selected agricultural commodities, Group I (2004). http://www.fao.org/statistics/yearbook/vol_1_1/pdf/b06.pdf accesado 14.03.2009.
- Fan, Z. F. Chen, H. Y. Liang, X. M. and Li, H. F. 2003. Complete sequence of the genomic RNA of the prevalent strain of a potyvirus infecting maize in China. *Archives of Virology*. 148: 773-782.
- Filomatori, C. V. Lodeiro, M. F. Alvarez, D. E. Samsa, M. M. Pietrasanta, L. y Gamarnik, A. V. 2006. A 5' RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome. *Genes & Development*. 20: 2238-2249.
- Gallie, D. R. Sleat, D. E. Watts, J. W. Turner, P. C. y Wilson, T. M. A. 1987. A comparison of eukaryotic viral 5'-leader sequences as enhancers of mRNA expression in vivo. *Nucleic Acids Research*. 15(21): 8693-8711.
- Gallie, D. R. y Walbot, V. 1990. RNA pseudoknot domain tobacco mosaic virus can functionally substitute for a poly(A) tail in plant and animal cells. *Genes & Development*. 4: 1149-1157.
- Gaur, R. K. Singh, M. y Rao, G. P. 2003. Molecular characterization of sugarcane mosaic virus isolate from north eastern region of India. *Sugarcane*. 5(3): 149-153
- Gemechu, A. L. Chiemsombat, P. Attathom, S. Reanwarakorn, K. y Lesrutaiyotin, R. 2006. Cloning and sequence analysis of coat protein gene for characterization of sugarcane mosaic virus isolated from sugarcane and maize in Thailand. *Archives of Virology*. 2006. 151: 167-172.
- Gibbs, A. J. Mackenzie, A. M. Wei, K. J. y Gibbs, M. J. 2008. The potyvirus of Australia. *Archives of Virology*. 153: 1411-1420.
- Gropelli, E. Belsham, G. J. y Roberts, L. O. 2007. Identification of minimal sequences of the *Rhaphalosiphum padi* virus 5' untranslated region required for internal initiation of protein synthesis in mammalian, plant and insect translation systems. *Journal of General Virology*. 88: 1583-1588.

REFERENCIAS

- Gruber, A. R. Lorenz, R. Bernhart, S. H. Neuböck, R. y Hofacker, I. L. 2008. The Vienna RNA Websuite. *Nucleic Acids Research*. 36 (Supplement 2): W70-W74.
- Gutiérrez-Escolano, A. L. Vázquez-Ochoa, M. Escobar-Herrera, J. y Hernández-Acosta, J. 2003. La, PTB, and PAB proteins bind to the 3' untranslated region of Norwalk virus genomic RNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 311: 759-766.
- Handley, J. A. Smith, G. R. Dale, J. R. y Harding, R. M. 1998. Sequence diversity in the coat protein coding region of twelve sugarcane mosaic virus potyvirus isolates from Australia, USA and South Africa. *Archives of Virology*. 143: 1145-1153.
- Hellen, C. U. T. y Sarnow, P. 2001. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes & Development*. 15: 1593-1612.
- Hook, B. Bernstein, D. Zhang, B. y Wickens, M. 2005. RNA - protein interactions in the yeast three-hybrid system: Affinity, sensitivity, and enhanced library screening. *RNA*. 11: 227-233.
- ICTV. 2002. Virus Taxonomy. ICTVdb Index of viruses. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>. Accesado 31.10.07.
- ICTV. 2005. Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses. The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy. San Diego.
- Jiang, J. X. y Zhou, X. P. 2002. Maize dwarf mosaic disease in different regions of China is caused by *Sugarcane mosaic virus*. *Archives of Virology*. 147: 2437-2443.
- Karlok, M. A. Jang, S. H. y Jaehning, J. A. 2002. Mutations in the yeast mitochondrial RNA polymerase specificity factor, Mtf1, verify an essential role in promoter utilization. *Journal of Biological Chemistry*. 277(31): 28143-18149.
- Kasschau, K. D. y Carrington, J. C. 1998. A counterdefensive strategy of plant viruses: Supressing of posttranscriptional gene silencing. *Cell*. 95: 461-470.
- Kawaguchi, R. y Bailey-Serres, J. 2002. Regulation of translational initiation in plants. *Plant Biology*. 5: 460-465.

- Khan, M. A. Yumak, H. Gallie, D. R. y Goss, D. J. 2008. Effects of poly(A)-binding protein on the interactions of translation initiation factor eIF4F and eIF4F-4B with internal ribosome entry site (IRES) of tobacco etch virus RNA. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1779: 622-627.
- Mokrejs, M. Vopálensky, V. Masek, T. y Poseisek, M. New Messenger RNA Research Communicactions: Kwang, L. B. 2007. Cap. X. A bioinformatical Approach to the Analysis of Viral and Cellular Internal Ribosome Entry Sites. Nova Publishers. New York. p.p. 133-166.
- Martínez-Salas, E. Pacheco, A. Serrano, P. y Fernandez, N. 2008. New insights into internal ribosome entry site elements relevant for viral gene expression. *Journal of General Virology*. 89: 611-626.
- Michon, T. Estevez, Y. Walter, J. German-Retana, S. y Le Gall, O. 2005. The potyviral virus genome-linked VPg forms a ternary complex with the eukaryotic initiation factors eIF4E and 3IF4G and reduces eIF4E affinity for a mRNA cap analogue. *FEBS Journal*. 273: 1312-1322.
- Noa-Carrazana, J. C. 2003. Estudio molecular de enfermedades virales en el cultivo de papayo en México. Centro de Investigación de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Unidad Irapuato, México.
- Nyvall, R. F. 1999. Field crop diseases. 3 Edn. Blackwell Publisher. U.K.
- Pain, V. M. 1996. Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells. *European Journal of Biochemystri*. 236: 747-711.
- Patel, G. P. Ma, S. y Bag, J. 2005. The autoregulatory translational control elements of poly(A)-binding protein mRNA forms a heteromeric ribonucleoprotein complex. *Nucleic Acids Research*. 33(22): 7074-7089.
- Perrière, G. y Gouy, M. 1996. WWW-query: An on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie*. 78(5): 364-369.
- Perkins, D. N. Pappin, D. J. C. Creasy, D. M. y Cottrell, J. S. 1999. Probability-based protein identification by searching sequences databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*. 20(18): 3551-3567.
- Pettit-Kneller, E. L. Rakotondrafara, A. M. y Miller, W. A. 2006. Cap-independent translation of plant viral RNAs. *Virus Research*. 119(1): 63-75.

REFERENCIAS

- Robaglia, C. y Caranta, C. 2006. Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *TRENDS in Plant Science*. 11: 1360-1385.
- Sambrook, J. Fritsch, E. F. y Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Scheets, K. 1998. Maize chlorotic mottle machlomovirus and wheat streak mosaic rymovirus concentrations increase in the synergistic disease corn lethal necrosis. *Virology*. 242(1): 28-38.
- SenGupta, D. J. Zhang, B. Kraemer, B. Pochart, P. Fields, S. y Wickens, M. 1996. A three-hybrid system to detect RNA - protein interactions *in vivo*. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. 93: 8496-8501.
- Shaw-Jackson, C. y Michiels, T. 1999. Absence of internal ribosome entry site-mediated tissue specificity in the translation of a bicistronic transgene. *Journal of Virology*. 73(4): 2729-2738.
- Siehl, D. L. Subramanian, M. V. Walters, E. W. Lee, S. F. Anderson, R. J. y Toschi, A. G. 1996. Adenylsuccinate synthetase: site of action of hydantocidin, a microbial phytotoxin. *Plant Physiology*. 110(3): 753-758.
- Silva-Rosales, L. y González-de-León, D. 2005. Presente y futuro de la resistencia al virus de la mancha anular de la papaya (PRSV) en México. ¿Estrategias biotecnológicas o interdisciplinarias?. *Claridades Agropecuarias*. 114: 37-45.
- Spetz, C. 2003. Molecular studies on a complex of potyvirus infecting solanaceous crops, and some specific virus-host interactions. Department of Plant Biology and Forest Genetics. Sweedish University of Agricultural Sciences. Swedish.
- Thivierge, K. Nicaise, V. Dufresne, P. J. Cotton, S. Laliberté, J-F. Le Gall, O y Fortin, M. C. 2005. Plant virus RNAs. Coordinated recruitment of conserved host functions by (+) ssRNA viruses during early infection events. *Plant Physiology*. 138: 1822-1827.
- Thompson, J. D. Gibson, T. J. Plewniak, F. Jeanmougin, F. y Higgins, D. G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tool. *Nucleic Acids Research*. 24: 4876-48882.

REFERENCIAS

- Walters, E. W. Lee, S. F. Niderman, T. Bernasconi, P. Subramanian, M. V. y Siehl, D. L. 1997. Adenylosuccinate synthetase from maize. Purification, properties, and mechanism of inhibition by 5'-phosphohydantocidin. *Plant Physiology*. 114(2): 549-555.
- Wilkie, G. S. Dickson, K. S. y Gray, N. K. 2003. Regulation of mRNA translation by 5' - and 3' -UTR-binding factors. *TRENDS in Biochemical Sciences*. 28(4):182-189.
- Zhong, Y. Guo, A. Li, C. Zhuang, B. Lai, M. Wei, C. Luo, J. y Li, Y. 2005. Identification of a naturally occurring recombinant isolate of sugarcane mosaic virus causing maize dwarf mosaic disease. *Virus Genes*. 30(1): 75-83.

15. Apéndice 1

Transformación genética de bacterias

Reactivos

- Células competentes JM109 o BL21
- Medio SOC
- Cajas de Petri, medio LB/Cb₁₀₀ o Km₅₀

1. Preparar medio LB con Carbenicilina₁₀₀ (Cb) o Kanamicina₅₀ (Km) para cada ligación a preparar.
2. Tomar un tubo con células competentes, colocar en hielo 5 min y mezclar gentilmente por inversión.
3. Agregar 1 µl de plásmido a un tubo con células competentes (80-100 µl).
'Agregar un 0.1 ng/µl de plásmido sin linearizar para determinar la eficiencia de transformación de las células.'
4. Mezclar gentilmente por inversión e incubar en hielo 15 min.
5. Incubar a 42 °C por 50 s (sin agitación).
6. Regresar inmediatamente a hielo por 15 min.
7. Agregar 1 mL de medio SOC a temperatura ambiente y mezclar gentilmente.
8. Incubar a 37 °C por 1 h en agitación.
9. Plaquear en cajas de Petri Medio LB/Cb₁₀₀ o Km₅₀.
10. Incubar a 37 °C toda la noche.
11. Seleccionar colonias de color blanco, para realizar minipreps.

Protocolo de extracción de DNA plasmídico.

The GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas).

- Crecer el cultivo en 1 - 5 ml de medio LB con su respectivo antibiótico.
- Incubar de 12 - 16 h a 37 °C con agitación 200-250 rpm.
- Centrifugar el cultivo a 3,500 g durante 2 min.
- Decantar el sobrenadante y remover la pastilla.

1. Resuspender las células (pastilla) en 250 μ l de Solución de Resuspensión, mezclar perfectamente en vórtex.
2. Añadir 250 μ l de Solución de Lisis y mezclar por inversión el tubo de 4 - 6 veces, hasta que la solución se ponga viscosa y clara. (No mezclar en vórtex).
3. Añadir 350 μ l de solución neutralizante y mezclar inmediatamente, agitar por inversión el tubo 4 - 6 veces.
4. Centrifugar por 5 min.
5. Transferir el sobrenadante a la columna por decantación o pipeteo (evitar transferir el precipitado blanco).
6. Centrifugar por 1 min y descartar el sobrenadante.
7. Añadir 500 μ l de solución de lavado a la columna. Centrifugar de 30 - 60 s y descartar el líquido del fondo del tubo.
8. Repetir el proceso de lavado (paso 7) usando la misma cantidad de Solución de Lavado.
9. Descartar el líquido del fondo del tubo y centrifugar por 1 minuto adicional para remover los residuos de la solución de lavado. Este paso es esencial para evitar residuos de etanol.
10. Transferir la columna a un tubo Eppendorf nuevo y limpio de 1.5 ml. Añadir 50 μ l del buffer de elución. Cuidar de no tocar la membrana con la pipeta. Incubar 2 min a temperatura ambiente. Centrifugar 2 min.
11. Descartar la columna y guardar el plásmido de DNA purificado (aprox 20 μ g) a -20 °C.

Protocolo para purificación de DNA de soluciones o de reacciones enzimáticas.

Illustra GFX DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare)

1. Agregar 500 μ l de buffer de captura tipo 2 a un volumen de \pm 100 μ l de muestra.
2. Centrifugar un pulso la mezcla de la muestra/buffer de captura.
3. Cargar la mezcla de la muestra/buffer de captura a una columna GFX MicroSpin sobre un tubo colector.
4. Centrifugar a 9,000 g durante 1 min.
5. Desechar el líquido del tubo colector.
6. Agregar 500 μ l de buffer de lavado tipo 1 a la columna.
7. Centrifugar a 5,500 g durante 1 min.
8. Repetir el paso número 6 y 7 para eliminar los desechos de etanol.
9. Desechar el líquido y transferir la columna a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 mL.
10. Agregar 25 μ l de buffer de elución tipo 4 al centro de la membrana, precalentado a 50 °C. Incubar durante 2 min. a temperatura ambiente.
11. Centrifugar a 5,500 g durante 1.5 min. Cuantificar por Nanodrop TM y almacenar a -20 °C.

Transcripción *in Vitro Large*

Riboprobe systems (Promega)

Reactivos:

- Buffer 5X
- DTT 100 mM
- RNasin Ribonuclease inhibitor
- rNTPs Mix (2.5 mM c/u)
- T7 RNA pol (5000 u).
- Agua libre de RNase

Agregar los siguientes componentes en el orden listado a temperatura ambiente.

• Buffer 5X	12 μ l
• DTT 100 mM	6 μ l
• RNasin (40 U)	3 μ l
• rNTPs Mix (2.5 mM)	12 μ l
• Templado (1 μ g)	5 μ l
• T7 RNA pol. (15-20 U)	1 μ l
• <u>H2O libre RNase</u>	<u>x μl</u>
Vol. Final	60 μ l

- Incubar a 37 °C durante dos h.
- Añadir RQ1 RNas-free DNase a una concentración de 1 u/ μ g de templado.
- Incubar a 37 °C durante 15 min.

Purificación

RNeasy MinElute Cleanup *Qiagen*.

1. Ajustar la muestra a 100 μ l con agua libre de RNAsa. Agregar 350 μ l de buffer RLT y mezclar bien.
2. Agregar 250 μ l de EtOH absoluto (abs) al RNA diluido y mezclar bien por pipeteo. No centrifugar y pasar de inmediato al paso 3.
3. Transferir la muestra a una columna MiniElute spin en un tubo colector. Cerrar la tapa gentilmente y centrifugar por 15 s a 5,500 g. Desechar el sobrenadante.
4. Colocar la columna MiniElute spin en un nuevo tubo colector. Agregar 500 μ l de buffer RPE a la columna. Cerrar la tapa gentilmente y centrifugar durante 15 s a 5,500 g. Desechar el sobrenadante.
5. Agregar 500 μ l de EtOH al 80 % a la columna. Cerrar la tapa gentilmente y centrifugar 5,500 g durante 2 min para lavar la columna. Desechar el sobrenadante y tubo colector.
6. Colocar la columna RNeasy MiniElute en un nuevo tubo colector . Abrir la tapa de la columna y centrifugar a velocidad máxima durante 5 min. Desechar el sobrenadante y el tubo colector.
7. Colocar la columna RNeasy MiniElute en un nuevo tubo colector de 1.5 mL. Agregar 14 μ l de Agua libre de RNase directamente al centro de la membrana de la columna. Cierra gentilmente la tapa y centrifuga por 1 min a velocidad máxima para eluir el RNA.

Precipitación.

Reactivos:

- Fenol saturado de citrato (ph 4.7): Cloroformo: Alcohol isoamilico (125:24:1).
- Cloroformo: Alcohol isoamilico (24:1).
- Acetato de amonio 7.5 M.
- Etanol 100 % y 70 %.

1. Agregar agua hasta tener un volumen final de 100 μ l.
2. Extraer con 1 volumen de Fenol saturado de citrato (ph 4.7); Cloroformo: Alcohol isoamilico (125:24:1). Agitar en vortex durante 1 min y centrifugar a 12,000 g durante 2 min.
3. Transferir la fase acuosa a un tubo Eppendorf nuevo.
4. Agregar un volumen de Cloroformo: Alcohol isoamilico (24:1). Agitar en vortex durante 1 min y centrifugar a 9,000 g durante 1 min.
5. Nota: En este punto se puede visualizar el RNA. Tomar una alicuota de 5 μ l de la fase acuosa. Añadir de 2-5 μ l de buffer de carga y calentar las muestras de 5 -10 min a 65-70 °C antes de cargar en el gel de agarosa estéril al 2 %.
6. Transfiere la fase acuosa a un tubo Eppendorf nuevo.
7. Agrega 0.5 volúmenes de acetato de amonio 7.5 M y 2.5 volúmenes de etanol Abs. Añadir espermidina o glicógeno (opcional). Mezclar y colocar a -70 °C por 30 min o toda la noche.
8. Centrifugar por 20 min a 9,000 g. Remover el sobrenadante y lavar la pastilla con 1ml de EtOH al 70 %. Centrifugar a 3,000 g durante 30 min. Desechar el sobrenadante y secar en campana durante 10 min.
9. Resuspender en 20 μ l de agua libre de RNase. Almacenar a -20 °C.

Electroforesis.

- Tomar de uno a 2 μ l de RNA y agregar 2 μ l de Buffer de Carga.
- Correr un gel de agarosa estéril al 2 %, en TAE 1X estéril.

Nota: Trabajar toda el procedimiento en campana de flujo laminar hasta haber precipitado y resuspendido.

Protocolo de extracción de proteína a partir de tejido liofilizado de la hoja de maíz.

1. Pesar 50 mg de tejido de maíz liofilizado.
2. Macerar con perlas de vidrio en nitrógeno líquido y recuperar el tejido en un tubo Eppendorf de 1.5 mL.
3. Agregar 400 µl de buffer de cromatografía [HEPES-KOH 10mM, (p.H. 7.9); MgCl 3 mM; NaCl 140 mM; Glicerol 5 %; DTT 1mM; Triton X-100 0.01 %.
4. Adicionar 8 µl de Inhibidor de Proteasas **COMPLETE** (ROCHE) por cada 2 mL de Buffer.
5. Agitar durante 30 min en cuarto frío (4 °C).
6. Centrifugar a 10,000 g durante 30 min en cuarto frío (4 °C).
7. Cuantificar el contenido proteico en el sobrenadante.

Cuantificación por Método de Bradford

	Conc.	BSA	H₂O	Vol.	Add. Bradford 1:5	
Estándar	(µg/µl)	(µl)	(µl)	Final	Tomar	(µl)
Blanco	0	0	500	500	10 µl	200
0.05	0.05	1.25	498.75	500	10 µl	200
0.1	0.1	2.5	497.5	500	10 µl	200
0.2	0.2	5	495	500	10 µl	200
0.3	0.3	7.5	492.5	500	10 µl	200
0.4	0.4	10	490	500	10 µl	200
0.5	0.5	12.5	478.5	500	10 µl	200

Incubar 10 min.

Leer absorbancia 595 nm-VIS.

Espectrómetro ELISA, realiza la curva estándar de manera automática y da los valores de las muestras problemas por la interpolación en la curva estándar.

Protocolo Inducción de Proteínas con IPTG.

Inducción de Proteína PABP y MTFI

Reactivos:

- Medio Lb/Cb₁₀₀
- IPTG

1. Inocular 10 mL de medio LB/Cb₁₀₀.
2. Incubar a 37 °C toda la noche en agitación a 200 rpm.
3. Temprano, inocular 250 mL de Medio Lb/ Cb₁₀₀ Con 5-10 mL de preinoculo, tomar lectura cada hora en espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm, hasta tener una densidad óptica (DO) 6.0.
4. Tomar 1 mL de la muestra no inducida, centrifugar a 9,000 g durante 1 min, tirar el sobrenadante y congelar a -20 °C.
5. Agregar al medio de cultivo con la DO de 6.0, 0.4 mM de IPTG para PABP y 0.5 mM de IPTG para MTFI.
6. Incubar el medio de cultivo a 37 °C durante 4 h.
7. Tomar muestras cada hora de las muestras inducidas.
8. Centrifugar a cada una de las muestras a 3,800 g durante 10 min. Eliminar el sobrenadante y almacenar a -20 °C la pastilla bacteriana para su posterior purificación de proteínas.

Protocolo Purificación de Proteínas recombinantes de *E. coli* bajo condiciones nativas.

Materiales.

- Pastilla celular
- Buffer de lisis
- Buffer de lavado
- Buffer de elusión
- Lysozima
- Ni-NTA matriz (QIAGEN o CloneTech)
- Columnas de cromatografía.

Procedimiento de lisis:

- 1- Mantener la pastilla celular 15 min en hielo y resuspender las células en buffer de lisis a 2-5 mL por gramo de peso seco.
- 2- Agregar 100 μ l de lisozima 20 mg/mL e incubar 30 min en hielo y agregar inhibidores de proteasas PMSF y COMPLETE.
- 3- Sonicar en hielo, seis veces 10 s a 200-300 W con intervalos de 10 s en hielo en cada periodo.
- 4- Centrifugar el lisado a 5,500 g durante 20-30mi a 4 °C.
- 5- Agregar 5 μ l de 2 X SDS-PAGE buffer a 5 μ l de sobrenadante y almacenar a -20 °C hasta el análisis SDS-PAGE.

Procedimiento de purificación:

- 1- Agregar 1 mL de resina Ni-NTA a 4 mL de lisado bacteriano, mezclar gentilmente (200 rpm) por agitación a 4 °C durante 1 hora.
- 2- Cargar la mezcla del lisado-Ni NTA (QIAGEN o Clonetech) en una columna.
- 3- Remover el capuchón y colectar el sobrenadante de la columna (1 mL).
- 4- Lavar dos veces con 4 mL de buffer de lavado, colectar las fracciones de lavado (1 mL).
- 5- Eluir la proteína 4 veces con 0.5 mL de buffer de elusión con 30 min de incubación por eluido. Colectar el eluido en 3 tubos y analizar por SDS-PAGE.

Para correr el gel de poliacrilamida al 11-10 %, agregar 13 μ l de cada uno de las muestras obtenidas en el siguiente orden, +7 μ l de Solución de disociación.

NI (No inducida bacteria); I (Inducida bacteria); P (Precipitado bacteriano); L (Lisis bacteriana); NU (No unido a la resina); W (Lavados de la resina); E1 (Elución 1); E2 (Elución 2); R (Resina).

Nota: Se debe realizar todo el procedimiento de purificación de proteína a 4 °C.

Protocolo para cromatografía de afinidad rna-proteína

Reactivos Cromatografía de Afinidad.

- Periodato de Sodio 10 mM
- Buffer de Acoplado (100 mM Acetato de Sodio, pH 5.0)
- Etanol Absoluto.
- Perlas de Agarosa adípica ácida dihidrácida.
- NaCl 2 M
- NaCl 1 M
- NaCl 0.5 M
- Buffer de Cromatografía [100mM HEPES-KOH pH 7.9; MgCl₂ 3 mM; NaCl 140 mM; Glicerol 5%; DTT 1mM; Tmox N100 (0.01%)]
- Clean Up (precipitar proteína)
- NaCl 0.5 M en Buffer de Cromatografía
- NaCl 1 M en Buffer de Cromatografía

Equipo:

- Microfuga.
- Agitador vertical.
- Speed Vac,

Material:

- Tubos Falcon 15 mL.
- Pipetas 200 µL, 1000 µl y 5000 µl.
- Puntas 200 µL, 1000 µl y 5000 µl.
- Tubos Eppendorf 1.5 mL.

Procedimiento:

1. **Oxidar 50 µg de RNA** sintetizado *in vitro* con **Periodato de Sodio 10 mM** en 200 µl de **Buffer de Acoplado** (100 mM de acetato de sodio, pH 5.0) 2 h a 4 °C, en oscuridad.
2. **Precipitar el RNA oxidado** (una Vez) con 2,5 vol de **Etanol absoluto** (dos horas a -20 °C). Centrifugar 30 min a 5,500 g. Resuspender en **Buffer de Acoplado**.
3. Lavar 500 µl de **Perlas de Agarosa Adípica Ácida Dihidrácida*** cuatro veces en 10 mL de **Buffer de Acoplado** y “*precipitar bien las perlas*” después de cada lavado a 40 g 3 min (para equilibrar perlas) usar tubos Falcon de 15 mL, después de haber equilibrado las perlas pasar a tubos Eppendorf de 1.5 mL.
*Recuerde agitar suavemente el frasco para resuspender bien las perlas. Se debe tomar la suspensión y no solo las perlas.
4. Después del lavado final del punto anterior, adicionar 500 µl de **Buffer de Acoplado** y mezclar con el RNA tratado con Periodato de Sodio 10 mM (punto 1-2) y agitar suavemente toda la noche a 4 °C (en tubos Eppendorf de 1.5 mL) en oscuridad.
5. Las perlas con el RNA unido se “*precipitan*” a 50 g por 2 min (Verificar que las perlas queden bien “*precipitadas*” para evitar perdidas) y lavar dos veces con 1 mL **NaCl 2 M** (resuspender las perlas con mucho cuidado por inversión; 1 min cada vez). centrifugar a 50g durante 1 minuto. Lavar tres veces con 1 ml de **Buffer de Cromatografía [10 mM HEPES-KOH (pH 7,9), MgCl₂ 3 mM, NaCl 140 mM, Glicerol 5 %, DTT 1 mM; Triton X-100 0.01 %]**. Resuspender bien las perlas con mucho cuidado por inversión, 1 min cada vez, centrifugar a 50g durante 1 min.
6. Las perlas con el RNA inmovilizado se incuban con el extracto proteico (2 mg) en **Buffer de Cromatografía** (1 volumen con respecto a las perlas iniciales, es decir 500 µl) a 4 °C durante 1 h en agitación.

7. “*Precipitar bien*” las perlas a 50 g durante 3 min. (si puede “*precipitarlas*” a menos revoluciones mejor, fíjese que la solución no este turbia que las perlas no estén nadando, trate de recuperar el máximo pero recuerde que a mayor velocidad de centrifugación se truenan las perlas)

8. Lavar 4 veces con **Buffer de Cromatografía** (esto quita proteínas inespecíficas y no unidas al RNA). Después de cada lavado centrifugar 1 min a 50 g. Tomar con una pipeta el sobrenadante con mucho cuidado de no llevarse las perlas ni de “maltratarlas”, quedarse con el mayor número de perlas

9. Las proteínas unidas por afinidad se lavan con soluciones salinas crecientes (NaCl 0.5 M y 1.0 M) en **Buffer de Cromatografía** (1 volumen= 500 µl). Las perlas se lavan dos veces con cada una de las concentraciones de sal anteriores y se toman los sobrenadantes por separado. Se cuantifica la proteína por el método de Bradford. Los lavados se concentran al vacío en el speed vac hasta que quede un volumen de 100 µl. La proteína se precipita con **CLEAN UP**. Se rehidrata la pastilla en buffer de Laemli para proteínas de alto peso molecular y se corre una electroforesis en gel **SDS PAGE** 10%.

Referencias:

- Caputi, M. & Zahler, A. 2001. Determination of the RNA binding specificity of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) H/H'/F/2H9 Family. *The Journal of Biological Chemistry*. 276(47): 43850-43859.
- Patel, G. P. Ma, S. y Bag, j. 2005. The autoregulatory translational control element of poly(A)-binding protein mRNA forms a heteromeric ribonucleoprotein complex. *Nucleic Acid Research*. 33(22): 7074-7089.

Precipitación de proteínas.

2-D Clean-Up Kit. (Amersham biosciences) Procedimiento A

1. Agregar 300 μ l de precipitante a una muestra de 1 a 100 μ l (1-100 μ g de proteína). Agitar en Vortex. Incubar en hielo durante 15 min.
2. Agregar 300 μ l de co-precipitante.
3. Centrifugar a 9,000 g a 4 °C durante 5 min. Cuidado de colocar la oreja del tubo hacia afuera.
Remover el sobrenadante con mucho cuidado con una micropipeta, dar un pulso de centrifuga y retirar el excedente con una punta mas fina, cuidado de no tocar la pastilla.
4. Sin disgregar la pastilla, adicionar sobre ésta 40 μ l de co-precipitante. Dejar en hielo durante 5 min.
5. Centrifugar a 9,000 g durante 5 min a 4 °C.
Colocar la oreja del tubo hacia fuera. Remover el sobrenadante con mucho cuidado.
6. Agregar 25 μ l de agua desionizada estéril sobre la pastilla. Agitar en vortex para disgregar 10-20 s. No disolver la pastilla.
 - Agregar 1 mL de buffer de lavado (previamente enfriado a - 20 °C) y 5 μ l de aditivo de lavado. Agitar en vortex durante 20-30 s cada 10 min durante 30 min a - 20 °C. Se puede dejar precipitando mas tiempo, para obtener mejor rendimiento.
 - Centrifugar a 9,000 g durante 5 min a 4 °C. Colocar la oreja del tubo hacia fuera.
 - Remover y desechar el sobrenadante. Permitir secar la pastilla. No más de 5 min. No sobresecar la pastilla.
 - Resuspender la pastilla en solución rehidratadora. Nosotros disolvemos en Buffer de carga Laemli 1 X para proteínas de alto peso.

Método de tinción de Bradford.

1. Fijar con EtOH 40 % durante 10 min en agitación a temperatura ambiente.
2. Agregar azul de Commassie Brilliant Blue R-250 (Sigma) y agitar durante 2 h.
3. Desteñir con 1:1 MetOH absoluto: Agua; ácido acético al 10 % durante 2 h.
4. Dejar secar en una bolsa sellada.

Blom Silver Staining Protocol (Modificado)

Tinción con Plata.

- 1- Fijar con EtOH 40 % : Ac. Acético 10 % por 1 h, en agitación a temperatura ambiente.
- 2- Lavar 2 veces con EtOH 30 % durante 20 min. en agitación de cada lavado.
- 3- Lavar el gel con agua desionizada estéril durante 20 min en agitación.
- 4- Sensibilizar el gel con Tiosulfato de Sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) al 0.002 % durante 1 minuto en agitación.
- 5- Lavar con agua desionizada estéril 3 veces por 20 s cada lavado.
- 6- Incubar el gel en 40mL de Nitrato de plata al 0.1 % a 4 °C durante 20 min (sin agitación).
- 7- Cambiar los geles de recipiente.
- 8- Revelar el gel en NaCO_3 al 3 % + 0.05 % de formaldehído.
- 9- Agitar y cuando la solución se tome color amarillo, inmediatamente retirar la solución y agregar solución nueva, agitar y terminar de revelar el gel cuando aparezcan bandas de proteína (aprox. 1 min).
- 10- Lavar con agua desionizada estéril por 20 s.
- 11- Detener la tinción con Ac. Acético al 5 % por 5 min.
- 12- Lavar con agua desionizada estéril 3 veces por 10 min.
- 13- Dejar el gel a 4 °C en Ac. Acético al 1 % toda la noche.
- 14- Dejar secar en bolsa sellada o de celofán dulce.

Referencias:

- Blum, H. B. Beier, H. y Gross, H. J. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. *Electrophoresis*. 8 (2): 93-99.
- Mortz, E. Krogh, T. M. Vorum, H. y Görg, A. 2001. Improved silver staining protocols for high sensivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. *Electrophoresis*. 1(11): 1359-1363.