



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LA SAVIA DE PEPINO EXPRESANDO AL INHIBIDOR DE LA RNasa L.

Leonardo Flores Elenes, Roberto Ruíz Medrano, Cecilia Silva Sánchez y Beatriz Xoconostle Cázares, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN. Departamento de Biotecnología, México, D.F. 07360, bxoconos@cinvestav.mx

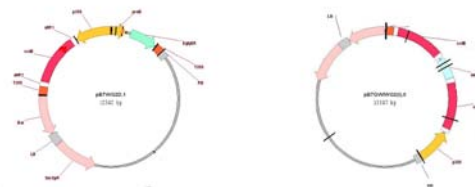
Palabras clave: inhibidor de la RNasa L, proteoma de la savia de floema, cuantificación relativa de proteínas vía iTRAQ

Introducción. En las plantas, el floema transporta no solo fotoasimilados, sino también macromoléculas como RNAs y proteínas con diversas funciones celulares(1,2,3). Nuestro grupo de trabajo está interesado en proteínas con dominios de unión a RNA, como el inhibidor de la RNasa L (RLI). Esta proteína es esencial para todos los organismos donde se ha estudiado (4). Recientemente se descubrió que en levaduras está involucrada en la síntesis de proteínas a nivel de terminación y en el reciclaje ribosomal (5). Resultados de nuestro grupo de trabajo demuestran que en *A. thaliana*, RLI se expresa en tejido vascular. Ya que RLI se halla íntimamente relacionada con la síntesis de proteínas y que ésta se expresa en floema, es de interés saber cuál es su influencia en el proteoma allí presente. El objetivo de este trabajo es analizar el cambio en la población de proteínas de la savia de pepino que resulta de sobre-expresar o silenciar a RLI.

Metodología. Para sobre-expresar a RLI, se extrae RNA y se amplifica el marco abierto de lectura (ORF) de RLI con oligos específicos. Éste se liga al vector de clonación PCR8/GW/TOPO y después se subclona en el vector de expresión binario pB7WG2D.1. El vector de silenciamiento pB7GWIWG2(I).0 (Fig 1) junto con el vector anterior se usan para transformar *A. tumefaciens*. Se crecen plantas de pepino y a las 8 semanas se infectan con estas bacterias transformadas. Dos semanas post-infección, se extrae savia de las plantas control y de aquellas con las construcciones que sobre-expresan y silencian RLI. La muestra de proteínas obtenida se concentra por filtración y se envía a un servicio de proteómica por duplicado para su cuantificación según el protocolo de iTRAQ® por MS. Se lleva a cabo una prueba de hipótesis múltiple para validar aquellas proteínas sobre-expresadas y aquellas reprimidas.

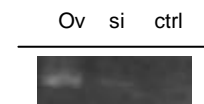
Resultados. A partir de la extracción de RNA y la amplificación del transcriptoma por LD-PCR, se logró clonar el ORF de RLI (1.81 kb) por un PCR de gradiente. El ORF se clonó en un vector de expresión, y se verificó su presencia por la amplificación del inserto, del cual se obtuvo su secuencia. Ésta se alineó con BLASTN y se obtuvo una identidad del 100% con RLI de pepino. Se obtuvieron las plantas transformadas al demostrar su

inserción en el genoma (Fig 2), se extrajo su savia, y se envió a una instalación de proteómica para su identificación y cuantificación relativa. El fenotipo de las plantas varió con respecto al de la planta silvestre.



VECTORES DE SOBRE-EXPRESIÓN Y SILENCIAMIENTO

Fig. 1. Ambos vectores tienen en común la región p35s: un promotor fuerte constitutivo aislado del virus del mosaico de la coliflor.



COMPROBACIÓN DE LA TRANSFORMACION DE LAS PLANTAS DE PEPINO

Fig. 2 PCR con el promotor 35s. Los carriles corresponden a plantas con construcciones que sobre-expresan RLI (Ov), que silencian a RLI (si) y el control, ausente del promotor.

Conclusiones. El marco abierto de lectura de RLI de pepino se logró clonar, construyéndose con éxito el vector de sobre-expresión. También se logró transformar pepino tanto con el vector de sobre-expresión como con el de silenciamiento. Se presentarán los perfiles de proteínas que modificaron su expresión en las diferentes mutantes y un modelo operativo del papel de RLI en el tejido vascular de plantas.

Agradecimiento. Proyecto financiado por ICyTDF P08-147 y CONACyT 105985 a BXC. Leonardo Flores Elenes es becario de CONACyT no. 165283

Bibliografía.

1. Ruiz-Medrano R, Xoconostle-Cázares B, Lucas W (1999) *Development* 126: 4405-4419.
2. Tamaki S, Matsuo S, Wong H, Yokoi S, Shimamoto K. (2007) *Science*. 316: 033-1036
3. Lin M, Lee Y, Lough T, Phinney B, Lucas W. (2009) *Mol & Cell Proteom.* 8.2: 343-356.
4. Rodnina M (2010) *EMBO Rep.* 11 (3): 143-144.
5. Koshnevis S, Gross T, Rotte C, Baierlein C, Ficner R, Krebber H. (2010) *EMBO Rep.* 11: 214 – 219.