



00591 4

**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

---

**FACULTAD DE QUIMICA  
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA**

**"REGULACION DE LA EXPRESION Y ACTIVIDAD DE LOS  
FACTORES DE INICIACION DE LA TRADUCCION eIF4E Y  
eIFiso4E DURANTE LA GERMINACION DE MAIZ"**

**TESIS  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUIMICAS  
P R E S E N T A**

**TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA**

**MEXICO D.F.**

279709  
2000

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

***Sería muy poco el atractivo que nos  
ofrece el conocimiento si no hubiera  
que vencer tantos obstáculos, tanto  
pudor, para alcanzarlo***

*Federico Nietzsche*

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>Agradecimientos</b>	i
<b>Jurado asignado</b>	ii
<b>Abreviaturas</b>	iii
<b>Resumen</b>	iv
<b>Abstract</b>	v
<b>Capítulo I Antecedentes</b>	
1.1 Eventos moleculares durante la germinación de semillas de maíz	2
1.2 El mecanismo de síntesis de proteínas en organismos eucariontes	4
1.3 Mecanismos de control traduccional	6
1.4 El factor de iniciación eIF-4E y su regulación	10
1.5 Regulación de la síntesis de proteínas durante la germinación de maíz	14
Justificación	16
Hipótesis	17
Objetivos	17
<b>Capítulo II Expresión de los factores eIF4E y eIFiso4E durante la germinación de maíz</b>	
2.1 Materiales y Métodos	20
2.2 Resultados	20
2.2.1 Artículo 1: "Differential Expresión and Regulation of Translation Initiation Factors -4E and -iso4E during Maize Germination"	20
<b>Capítulo III Regulación de la expresión del factor eIFiso4E de maíz a nivel traduccional</b>	
3.1 Materiales y Métodos	29
3.1.1 Inhibición de la transcripción por $\alpha$ -amanitina durante la germinación	29
3.1.2 Estímulo mediante ácido indol acético (AIA) durante la germinación	29
3.1.3 Análisis de mensajes a nivel de ARN total y ARN polisomal	29
3.2 Resultados	30
3.2.1 Artículo 2: "Expression of maize initiation factor eIFiso4E is regulated at translational level"	30

3.2.2 Otros resultados no incluidos en el Artículo 2	60
3.2.2.1 Efecto de $\alpha$ -amanitina sobre la expresión de eIF4E y eIFiso4E durante la germinación temprana	60
3.2.2.2 Efecto de la presencia de auxinas sobre la expresión de eIFiso4E	61
<b>Capítulo IV</b> Los factores eIF4E y eIFiso4E como parte de los complejos de iniciación de la traducción eIF4F y eIFiso4F son capaces de traducir de forma diferencial ARNm específicos	
4.1 Materiales y Métodos	64
4.1.1 Traducción <i>in vitro</i> de proteínas a partir de diferentes mensajes	64
4.1.2 Detección de los productos de traducción <i>in vitro</i>	65
4.1.3 Separación de los complejos eIF4F y eIFiso4F por cromatografía de intercambio iónico	66
4.2 Resultados	67
4.2.1 Actividad de los complejos eIF4F y eIFiso4F en sistemas de traducción <i>in vitro</i>	67
4.2.2 Efecto de la depleción de eIFiso4E del extracto eIF4F/eIFiso4F sobre la traducción <i>in vitro</i> de diferentes ARNm	69
4.2.2.1 Traducción <i>in vitro</i> de BMV	70
4.2.2.2 Traducción de ARNm almacenados en ejes embrionarios quiescentes de maíz	72
4.3 Resultados preliminares	75
4.3.1 Fosforilación <i>in vivo</i> de los componentes de los complejos eIF4F y eIFiso4F durante la germinación de maíz	75
4.3.2 Efecto de la fosforilación de eIF4F y eIFiso4F sobre la traducción <i>in vitro</i> de mensajes almacenados de maíz	77
<b>Capítulo V</b> Discusión General	79
<b>Conclusiones</b>	90
<b>Referencias bibliográficas</b>	91

## **AGRADECIMIENTOS**

A las siguientes instituciones por haber hecho posible la realización de este trabajo a lo largo del periodo 1995-2000:

- Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM
- Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA): Proyectos IN200793 y IN301398
- Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) por la beca otorgada desde agosto 1995 hasta junio 2000
- Programa de Apoyo a Estudios de Posgrado (PAEP): "Regulación de la expresión y actividad de los factores de iniciación de la traducción eIF4E y eIFiso4E durante la germinación de maíz" 030514/97; 202340/98 y 103315/99
- Red Latinoamericana de Botánica (RLB)

A mi asesora, Dra. Estela Sánchez de Jiménez por el importante apoyo que me ha brindado a lo largo de mi formación como investigadora y por sus valiosos consejos en todo momento

A la Dra. Blanca Ruiz Ordaz y al Dr. Alejandro García Carrancá que formaron parte de mi comité tutorial y que siempre me guiaron durante el desarrollo del proyecto.

En especial a Martín por su amistad incondicional, por escucharme y ayudarme en cada momento que necesité

A mis compañeros de laboratorio por la valiosa ayuda brindada a lo largo de la realización y discusión del proyecto

A los integrantes de los laboratorios 105 y 114 por su especial apoyo

A la Dra. Alicia González y a los integrantes del laboratorio 301-Ote del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, así como al Departamento de Biología de la Reproducción en el INNSZ, lugares en los cuales realicé parte de los experimentos durante el periodo de paro en la UNAM

A la Dra. Amelia Farrés y a Lety García por su preocupación y ayuda con los trámites dentro del posgrado de Bioquímica

**A mi madre, gracias por alentarme siempre en la vida**

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Estela Sánchez de Jiménez y aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas por el siguiente jurado:

**Presidente:** Dr. Jorge Vázquez Ramos

**Vocal:** Dr. Adolfo García Sainz

**Vocal:** Dr. Jorge Nieto Sotelo

**Vocal:** Dra. Alejandra Covarrubias

**Secretario:** Dr. Federico Sánchez

**Suplente:** Dra. Blanca Ruiz Ordaz

**Suplente:** Dr. Felipe Cruz

## ABREVIATURAS

- AIA** – ácido indol acético
- ARNm** - ácido ribonucleico mensajero
- ARNt** - ácido ribonucleico de transferencia
- ARNr** - ácido ribonucleico ribosomal
- BMV** – virus del bromomosaico
- CAP** –  $^{\gamma}$ mGpppG; nucleótido modificado en el extremo 5' de ARNm
- DICAMBA** - ácido 3,6-dicloro-*o*-anisico
- eIF** - factor de iniciación eucarionte
- eEF** - factor de elongación eucarionte
- eRF** - factor de terminación eucarionte
- FRAP-mTOR** – cinasa en la ruta de transducción de señales de insulina, que es inhibida por rapamicina
- IRES** - sitio interno de entrada del ribosoma
- IVT** – traducción *in vitro*
- PABP** - proteína que une a poliA
- PAGE** – electroforesis en gel de poliacrilamida
- pr** - proteína ribosomal
- p70<sup>S6k</sup>** – cinasa que fosforila a la proteína ribosomal S6
- rap** - rapamicina
- RRL** – lisado de reticulocito de conejo
- SDS** – dodecil sulfato de sodio
- TMV** – virus del mosaico de tabaco
- TOP** - secuencia de oligopirimidinas
- 5'UTR** - región 5' no traducible
- WGE** – extracto de germen de trigo
- wort** - wortmanina



## RESUMEN

La síntesis de proteínas en organismos eucariontes es un proceso complejo que involucra la participación de muchos factores y es altamente regulado en cada etapa de su desarrollo. En las primeras horas de germinación de maíz, este proceso es posible a partir de los mensajes almacenados en la semilla, sintetizados durante el proceso de maduración, y con la maquinaria de traducción presente en el eje embrionario quiescente.

Uno de los mecanismos de regulación de la síntesis de proteínas a nivel de iniciación de la traducción es mediado por el factor 4E que se une al CAP en el extremo 5' de los ARNm. En ejes embrionarios de maíz se encuentran 2 isoformas para el factor 4E: eIF4E y eIFiso4E, formando parte de 2 complejos diferentes: eIF4F y eIFiso4F y siendo eIFiso4E (eIFiso4F) la isoforma más abundante en el estado quiescente. Durante el proceso de germinación, eIFiso4E se sintetiza de forma activa desde las primeras horas, para mantener sus niveles de proteína constantes. La expresión de eIFiso4E es regulada a nivel de movilización del mensaje correspondiente a polisomas por una vía de transducción de señales que involucra la fosforilación de la proteína ribosomal S6 en la subunidad ribosomal 40S. La otra isoforma, eIF4E, está presente a niveles más bajos, tanto de mensaje como de proteína, en el eje embrionario quiescente y durante las primeras horas de germinación. Su expresión, que se incrementa hacia el final de la germinación, no parece seguir el mismo patrón de regulación que eIFiso4E.

Las isoformas eIF4E y eIFiso4E muestran actividad diferencial sobre la traducción *in vitro* de diferentes grupos de mensajes. Se encontró que eIFiso4E es la isoforma más importante para traducir de forma selectiva la mayoría de los mensajes almacenados en la semilla de maíz. Esto indica que la relación diferencial entre la disponibilidad de eIF4E y eIFiso4E constituye un mecanismo de regulación para la síntesis de proteínas durante la germinación de maíz. Esta relación, es regulada a su vez mediante control traduccional sobre la expresión de eIFiso4E, lo cual constituye un mecanismo de regulación novedoso y específico del sistema.

## ABSTRACT

Protein synthesis in eukaryotic organisms is a complex process, which involves the requirement of many factors and appears highly regulated during the development. During the first hours of maize germination, this process is based on the set of mRNAs synthesized during maturation and stored in the seed, and on the availability of the translation machinery in quiescent embryonic axes.

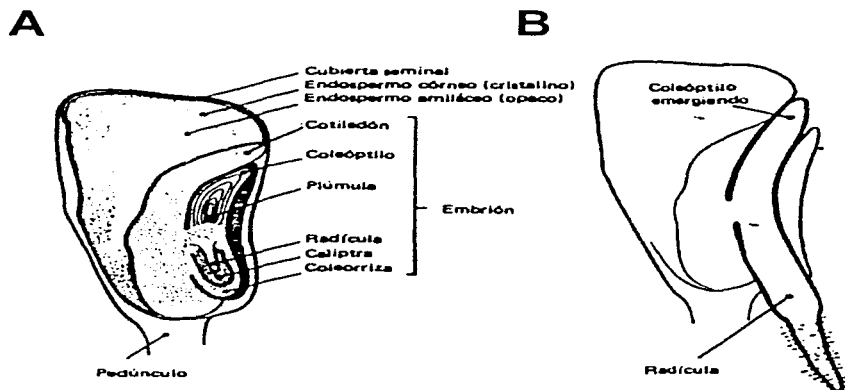
One of the mechanisms of protein synthesis regulation at the level of initiation of translation is mediated by eIF4E, that recognizes CAP at the 5' end of the mRNAs. Two isoforms of the 4E factor: eIF4E and eIFiso4E, forming part of two different complexes: eIF4F and eIFiso4F, are present in maize quiescent embryonic axes, being eIFiso4E (eIFiso4F) the most abundant isoform. During germination, eIFiso4E is actively synthesized early in germination, to keep constant its protein level. eIFiso4E transcript mobilization into polysomes is regulated by a signal transduction pathway that involves ribosomal protein S6 phosphorylation on the 40S ribosomal subunit. On the other hand, the 4E isoform is present at lower level than eIFiso4E in the quiescent embryonic axes, as well as during the first germination hours. Its expression raises toward the end of germination and seems not to follow the eIFiso4E pattern of regulation.

The eIF4E and eIFiso4E isoforms display differential activity when assayed in *in vitro* translation of different mRNA sets. It was found that eIFiso4E is the most important isoform for selective translation of most of the stored mRNAs in maize seed. These data indicate a differential relation between eIF4E and eIFiso4E levels, that represents a regulatory mechanism of protein synthesis regulation during maize germination. The fact that this relation is regulated by translational control of eIFiso4E expression, reveals a new and distinctive mechanism of regulation.

**CAPITULO I**  
**ANTECEDENTES**

## 1.1 Eventos moleculares durante la germinación de semillas de maíz

El maíz (*Zea mays* L.) es una planta que pertenece a la familia de gramíneas en el grupo de monocotiledoneas. La semilla agrícola de esta planta es un fruto, sin embargo para los fines de este trabajo se mencionará como semilla. En la semilla de maíz existe un único embrión rodeado por tejido de reserva llamado endospermo. El embrión está formado por un eje embrionario el escutelo que lo rodea. El eje embrionario puede dividirse en coleóptilo, mesocotilo (el cual está unido al escutelo) y radícula (Fig. 1). La germinación en este tipo de semillas inicia a partir de su imbibición en agua y termina con la protrusión de la radícula a través de la cubierta del embrión (Bewley, 1997).



**Figura 1.** Estructura de la semilla de maíz. (A) Semilla y embrión quiescentes; (B) Eje embrionario germinado, aproximadamente 24 h después de imbibición.

Las semillas maduras, secas, sin germinar poseen un mínimo de agua (aproximadamente 15 %) y se encuentran en un estado metabólico prácticamente inactivo. Durante la imbibición, la semilla se rehidrata rápidamente y se activa el metabolismo celular que permitirá llevar a cabo la elongación del eje embrionario, la protrusión de la radícula y el posterior establecimiento de la plántula (Bradford, 1995). En una etapa temprana de la

germinación, inmediata a la imbibición, se producen cambios estructurales como reparación de membranas celulares, abastecimiento energético, respiración mitocondrial (Bewley & Black, 1994) y se sintetizan proteínas importantes para completar el evento de germinación (Guy & Black, 1998).

Desde el punto de vista molecular, la síntesis de proteínas es uno de los eventos más importantes y de ocurrencia temprana durante la germinación de semillas, aún antes de la síntesis de ARNs mensajeros (ARNm) (Spiegel & Marcus, 1975; Sánchez de Jiménez & Aguilar, 1984, Bewley & Marcus, 1990). Hay muchos estudios donde se ha evidenciado que en embriones secos existe la presencia de muchos de los componentes requeridos para el proceso de síntesis de proteínas (Bewley & Black, 1994). Sin embargo, en esta etapa del desarrollo no hay polisomas formados, lo cual indica que no hay actividad de síntesis de proteínas (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1981). A partir de la imbibición, la cantidad de polisomas activos comienza a incrementarse rápidamente (Dommes & Walle, 1990; Pramanick *et al.*, 1992). En esta etapa temprana la traducción tiene lugar a partir de un conjunto de ARNm muy específicos producidos durante la maduración de la semilla y que son almacenados en su estado quiescente en el eje embrionario. Se ha considerado por numerosos autores que la traducción de estos mensajes ocurre de manera diferencial: algunos son traducidos en etapas muy tempranas de la germinación (indispensables), otros se traducen de manera más tardía, mientras que algunos no se traducen y son degradados (remanentes del proceso de maduración de la semilla) (Sánchez de Jiménez & Aguilar, 1984; Sánchez-Martínez *et al.*, 1986; Bewley & Marcus, 1990).

La transcripción de genes, aunque inicia de manera posterior a la traducción, es otro evento molecular temprano de la germinación (Bewley, 1997). Se considera que a medida que avanza el proceso germinativo, la síntesis de proteínas se hace más dependiente de la transcripción *de novo* de ARNm, debido a que los mensajes almacenados son degradados. Algunos de estos mensajes también pueden codificar para las mismas proteínas que los mensajes almacenados, pero muchos codificarán para productos diferentes, probablemente esenciales para la división celular y el posterior crecimiento (Guy & Black, 1998).

La síntesis de ADN de tipo replicativo y la división celular son eventos tardíos durante la germinación. La expansión de la radícula dentro de la semilla ocurre inicialmente por

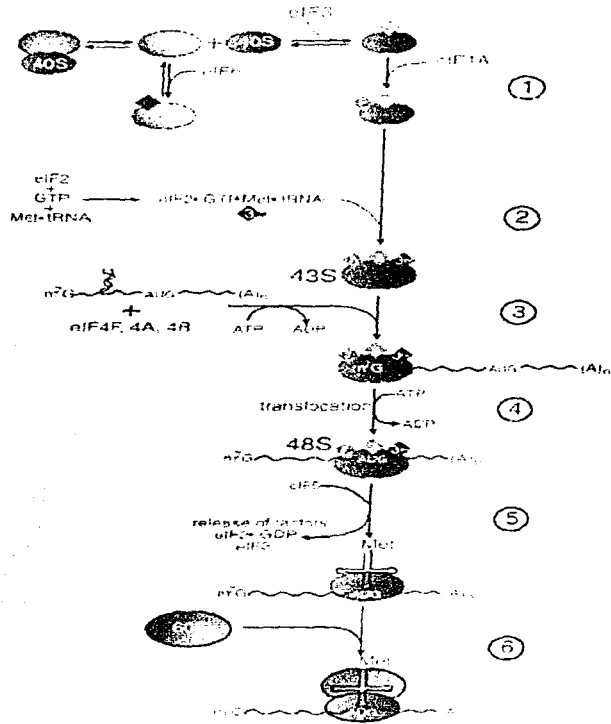
elongación celular y la emergencia puede o no estar acompañada de división celular (Baiza *et al.*, 1989; Bewley & Black, 1994). En el caso de semillas de maíz la replicación inicia alrededor de las 15 horas de germinación, precediendo la protrusión de la radícula (21-24 h después de la imbibición). Sin embargo, la germinación no es producto de la división celular, lo cual sugiere que el papel de la replicación de ADN es garantizar el crecimiento y desarrollo de tejidos en una etapa post-germinativa (Cruz-García *et al.*, 1998).

## 1.2 El mecanismo de síntesis de proteínas en organismos eucariotes

El proceso de síntesis de proteínas se divide en tres fases: iniciación, elongación y terminación. Cada una de estas fases está caracterizada por la secuencia de eventos en la traducción de un ARN mensajero específico y por la participación de diversos factores solubles llamados factores de iniciación (eIF), de elongación (eEF) y de terminación (eRF). En organismos eucariotes el número de factores involucrados en la síntesis de proteínas es mucho mayor que el que está presente en el sistema procarionte, lo cual indica una mayor complejidad tanto en la vía de traducción como en su regulación (Merrick & Hershey, 1996; Gingras *et al.*, 1999).

Durante el proceso de iniciación ocurre el reconocimiento del ARN mensajero por parte del complejo de traducción (Fig. 2). Como un primer paso se produce la interacción entre la subunidad ribosomal 40S y los factores eIF-3 y eIF1A (1); el ARNt portador del primer aminoácido (ARNt-Met) y el factor eIF-2 se unen para formar el complejo 43S (2); este complejo interactúa con el extremo 5' del ARNm previamente reconocido por los factores eIF-4 (4F, 4A y 4B) (3); con la ayuda de la actividad de helicasa de los factores 4A y 4B el complejo 43S realiza la búsqueda en la región no traducible 5'UTR del ARNm hasta encontrar el codón de iniciación AUG en el contexto apropiado (Kozak, 1991) (4); posteriormente ocurre la liberación de los factores de iniciación (5) y la unión de la subunidad ribosomal 60S (6). Recientemente se ha demostrado que durante el proceso de iniciación de la traducción en eucariotes hay un acercamiento entre el extremo 5' (7mGpppG) y el 3' (cola de poliA) del ARNm, implicando una interacción estrecha entre los factores y proteínas que reconocen estos extremos (Tarun *et al.*, 1997; Gallie, 1998).

(7mGpppG) y el 3' (cola de poliA) del ARNm, implicando una interacción estrecha entre los factores y proteínas que reconocen estos extremos (Tarun et al., 1997; Gallie, 1998).



**Figura 2.** Mecanismo de iniciación de la traducción en organismos eucariotes (Gingras et al., 1999). Para la descripción detallada, ver texto.

La fase de elongación ha sido pobremente estudiada en organismos eucariotes (Merrick & Hershey, 1996). Se considera que ocurre de manera similar a lo que se ha descrito para organismos procariones con la participación de los correspondientes factores de elongación eucarióticos eEF1A y 1B y el eEF2 (Merrick, 1992). Esta fase de elongación involucra la adición secuencial de aminoácidos con la formación de enlaces peptídicos, mediante una actividad peptidil transferasa que puede ser atribuida a una actividad catalítica del ARNr y/o a un grupo de fosfoproteínas ácidas de la subunidad 60S (Möller, 1990; Remacha *et al.*, 1995).

La fase de terminación ocurre cuando aparece un codón de terminación (UAA, UAG o UGA) que no puede ser reconocido por ningún ARNt. En bacteria, estos codones son reconocidos por los factores de terminación (RF1, RF2, RF3 y RF4) que promueven la hidrólisis del último ARNt unido y la liberación de la cadena polipeptídica. En organismos eucariotes, hasta el momento se han encontrado solo dos factores de terminación, eRF1 y eRF3, de los cuales eRF1 es capaz de reconocer los tres codones de terminación y eRF3 tiene actividad de GTPasa dependiente de la formación del complejo eRF1/eRF3 (Merkulova *et al.*, 1999).

### **1.3 Mecanismos de control traduccional**

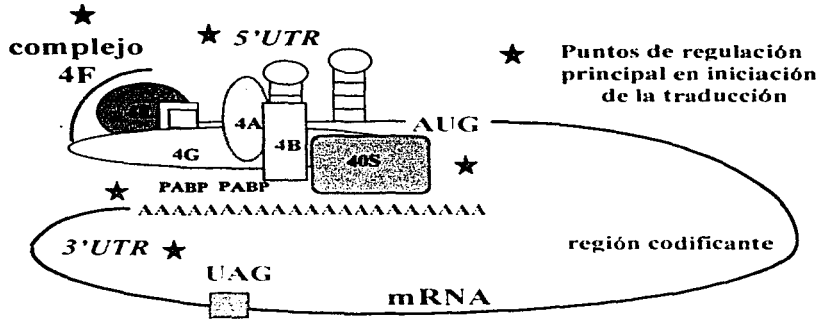
La expresión de genes se encuentra regulada tanto a nivel transcripcional (Tjian, 1995) como a nivel postranscripcional (Hershey, 1991). En los últimos diez años se ha producido una explosión en las investigaciones relacionadas con eventos de control traduccional (Mathews *et al.*, 1996; Gingras *et al.*, 1999), lo que ha permitido revelar que este tipo de regulación juega un papel fundamental en los patrones de expresión genética durante el crecimiento, desarrollo y diferenciación celular.

La regulación a nivel de traducción puede darse a través de múltiples mecanismos dirigidos a los diferentes componentes de la maquinaria de síntesis de proteínas. La eficiencia de traducción de un ARNm dado depende de los elementos estructurales propios de sus regiones no traducibles (5' y 3' UTR), incluso de su región codificante (elementos *cis*) que serán reconocidos por proteínas (factores *trans*) tanto generales como específicos (Pain, 1996). Dentro de la región 5'UTR, los elementos importantes son la estructura CAP (Sonenberg, 1996), la presencia de estructuras secundarias y la



longitud de esta región (Kozak, 1991), la presencia de codones de iniciación "río arriba" de la región codificante (Geballe, 1996) y la presencia de sitios de entrada interna del ribosoma (IRES) característicos de muchos ARN virales (Pestova *et al.*, 1996). Los sitios IRES son capaces de promover la traducción cap-independiente de los ARN mensajeros obviando la participación del factor eIF4E que une el extremo 5'CAP (Gossert *et al.*, 2000). Este mecanismo de regulación es el responsable de que durante la infección viral se traduzcan preferencialmente los ARN virales, apagando la traducción de la mayoría de los ARNm celulares que son cap-dependientes. Recientemente se ha descubierto que también algunos ARNm eucarióticos celulares poseen este tipo de estructura y por tanto pueden ser traducidos por una vía cap-independiente (Gan *et al.*, 1998; Stoneley *et al.*, 2000).

Dentro de la región 3' UTR se han encontrado múltiples elementos *cis* que participan en la estabilidad y localización citoplásmica de los ARNm como mecanismos para su control traduccional (Spirin, 1996; Gallie, 1998). En esta región otro factor importante es la poliadenilación, común a un gran número de ARNm eucarióticos, la cual juega un papel crucial en la estabilización de los mensajes (Stutz *et al.*, 1998). Además, la cola de poliA actúa de manera sinérgica con el extremo 5'cap para incrementar la eficiencia traduccional del ARNm (Sachs *et al.*, 1997; Gallie 1998). Esta interacción está determinada por la presencia de las proteínas afines a poliA (PABP) que interactúan con algunos de los factores de iniciación presentes en el extremo 5' del mensaje (Fig. 3). Existen ejemplos específicos durante el desarrollo de algunos organismos que demuestran cómo el incremento en la longitud de la cola de poliA es capaz de determinar el momento en el cual un mensaje será traducido (Stutz *et al.*, 1998).



**Figura 3.** Interacción entre factores de traducción, ARNm y la subunidad ribosomal 40S durante la fase de iniciación. La proteína 4G actúa como punto de anclaje para los factores que reconocen el extremo 5'UTR del ARNm, la subunidad ribosomal 40S y para las proteínas que unen la cola de poliA (Modelo basado en Sachs et al., 1997).

Objetos importantes en la regulación traduccional son los factores de iniciación, muchos de los cuales van a interactuar con los elementos *cis* del ARNm. El mecanismo de regulación más común es la fosforilación/desfosforilación de los factores eIF-3, eIF-4A, eIF-4E, eIF-4G que median la unión entre la subunidad 40S y el ARNm y son capaces de modular la velocidad de la síntesis de proteínas y el crecimiento celular (Gingras *et al.*, 1999). La fosforilación de estos factores se encuentra regulada por una cascada de transducción de señales característica de diferente tipo de estímulos (Proud, 1992; Kleijn *et al.*, 1998). Por ejemplo, la fosforilación de eIF-2 juega un papel central en el control traduccional, sobre todo, para la reiniciación de la traducción mediante la interacción de una de sus subunidades (eIF2 $\alpha$ ) con el factor intercambiador de GDP/GTP: eIF-2B (Yang & Hinnebusch, 1996). Asimismo, existen numerosos estudios que evidencian la regulación de la traducción por fosforilación de varios factores de iniciación, como respuesta a infección viral (Kleijn *et al.*, 1996), privación de aminoácidos (Navé *et al.*, 1999), choque

la modificación por fosforilación, los factores de iniciación pueden ser modificados por proteasas como es el caso de eIF-4G (Lamphear *et al.*, 1995), o por interacción con proteínas inhibitoras como es el caso de eIF-4E (Lawrence & Abraham, 1997). Estas modificaciones provocan que disminuya su disponibilidad para participar en la maquinaria de síntesis de proteínas. Como respuesta a diferentes estímulos, los factores de elongación también pueden ser regulados por fosforilación, especialmente el factor eEF-2 (Nairn & Palfrey, 1996) y las fosfoproteínas ácidas de la subunidad 60S (Remacha *et al.*, 1995).

Otro mecanismo de control traduccional es la fosforilación de proteínas ribosomales (pr), particularmente la fosforilación de la pr S6 en la subunidad 40S. La fosforilación de S6 estimula la traducción de mensajes que contienen una secuencia específica de polipirimidinas en su región 5'UTR (mensajes 5'TOP), incluyendo fundamentalmente a los ARNm correspondientes a proteínas ribosomales y factores de elongación (Jefferies & Thomas, 1996). Estudios recientes han demostrado que estos mensajes se traducen normalmente a bajos niveles y que su expresión a nivel de síntesis de proteínas aumenta durante la estimulación del crecimiento celular debido a la fosforilación de la proteína ribosomal (pr) S6 (Meyuhas *et al.*, 1996).

La mayoría de estos mecanismos de control traduccional fueron descritos inicialmente para células animales, principalmente de mamíferos. Sin embargo, actualmente numerosos estudios se están realizando en otros sistemas eucariotes, desde levaduras (Altmann *et al.*, 1997) hasta plantas (Bailey-Serres, 1999), encontrando que muchos de estos mecanismos se han conservado a lo largo de la evolución. Gracias al conocimiento de las secuencias de aminoácidos de los factores de traducción en diferentes especies se han podido hacer comparaciones en cuanto a su actividad y regulación (Browning *et al.*, 1998). Así, se ha encontrado que a pesar de una alta homología en los dominios correspondientes a la actividad, la regulación de estos factores no es siempre la misma.

En el caso específico de plantas, la investigación en estos temas se ha incrementado durante los últimos 5 años (Browning, 1996; Gallie, 1996; Bailey-Serres, 1999). Se han realizado múltiples estudios sobre la actividad de los factores eIF-4F, -4A, -4G, -2 $\alpha$ , algunos también relacionados con su modificación por fosforilación (Browning *et al.*, 1990; Webster *et al.*, 1991; Le *et al.*, 1997). Se ha encontrado que el mecanismo de regulación

para la traducción de mensajes 5'TOP por fosforilación de la pr S6 existe en el extracto de germen de trigo (Shama & Meyuhas, 1996). También se han aislado algunas cinasas de plantas similares a las que participan en la cascada de fosforilación que activa la síntesis de proteínas en mamíferos (Mizoguchi *et al.*, 1996; Turck *et al.*, 1998; Hirt, 2000). Sin embargo, una de las características más importantes en plantas, respecto a mamíferos, ha sido el descubrimiento de dos isoformas antigénicamente distintas, pero funcionalmente similares para el complejo eIF4F denominadas eIF4F y eIF4F (Browning *et al.*, 1992). Cada uno de estos complejos tiene componentes eIF4E y eIF4G diferentes, por lo cual en plantas hay dos isoformas eIF4E/eIF4E y dos isoformas eIF4G/eIF4G (Browning *et al.*, 1998).

A pesar de los avances mencionados, en plantas no hay muchos reportes en cuanto a mecanismos de regulación para los factores de iniciación (Webster *et al.*, 1991; Le *et al.*, 1997), por lo cual se necesita de mayor investigación para comprender el control de la expresión de genes a nivel traduccional en estos organismos.

#### **1.4 El factor de iniciación eIF-4E y su regulación**

A partir de estudios realizados en mamíferos se ha encontrado que el factor limitante para la unión del ARNm a la subunidad 40S del ribosoma es el polipéptido eIF4E. Este factor reconoce el extremo 5' de los ARNm eucariotes por su afinidad a la estructura CAP, presente en la mayoría de éstos (Hershey, 1991; Sonenberg, 1996; Gingras *et al.*, 1999). Debido a la baja disponibilidad de eIF4E para formar el complejo 4F con actividad de helicasa, muchos mensajes con estructuras complejas en su región cercana al CAP son traducidos de forma poco eficiente en condiciones celulares normales. Este grupo de mensajes incluye muchas proteínas importantes para el control del ciclo celular (Rosenwald *et al.*, 1993; Schantz & Pegg, 1994), por lo cual la sobreexpresión de 4E provoca una transformación oncogénica de las células (Lazaris-Karatzas & Sonenberg, 1990).

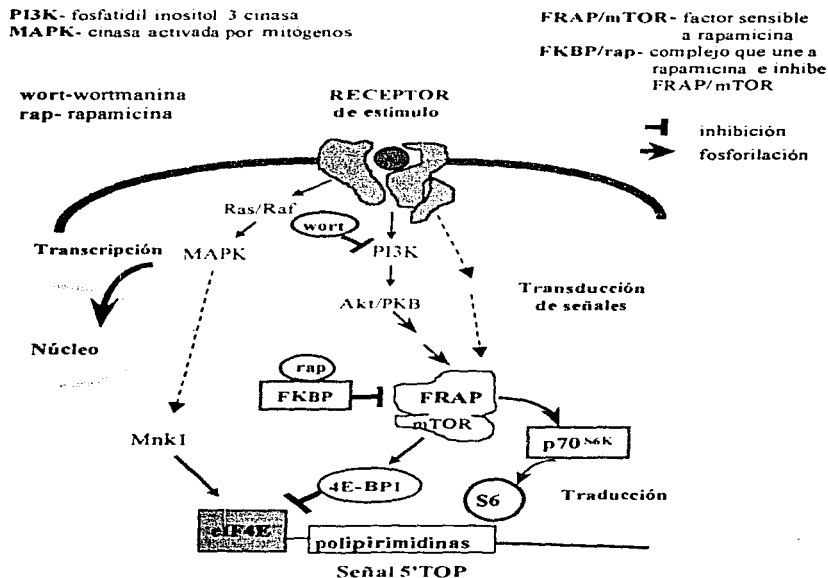
Los estudios realizados durante los últimos años han demostrado que el factor eIF4E puede ser muy variable de un tipo de organismo a otro, aunque su función resulta esencialmente la misma. El gen que codifica para la proteína eIF4E ha sido clonado en tres especies de mamíferos y su secuencia muestra un alto grado de similitud entre sí

(Pain, 1996). No obstante, la secuencia reportada para *Saccharomyces cerevisiae* posee solamente 35% de identidad con sus homólogos de mamíferos (Altmann *et al.*, 1984). En otros organismos como *Drosophila* (Lavoie *et al.*, 1996) y *C. elegans* (Keiper *et al.*, 2000) se reporta la existencia de más de una proteína homóloga a eIF4E, sin embargo, solo en plantas se ha determinado la formación de diferentes complejos eIF4F de unión a la estructura CAP (Browning, 1996).

Recientemente, se ha dilucidado la estructura terciaria de eIF4E de ratón, mostrando el sitio exacto de interacción con el CAP ó <sup>7</sup>mGpppG (Marcotrigiano *et al.*, 1997; Gingras *et al.*, 1999). Así mismo, se ha determinado que los residuos de aminoácidos involucrados en este sitio se encuentran altamente conservados en todas las especies. La regulación de la actividad del factor eIF4E y por ende su participación en los mecanismos de control traduccional, está sujeta a su disponibilidad y grado de fosforilación. Se ha encontrado que la fosforilación de eIF4E correlaciona de forma positiva con la velocidad de traducción en varios sistemas (Rhoads, 1993) y con un incremento en su afinidad por el CAP (Minich *et al.*, 1994).

La disponibilidad de eIF4E está regulada por proteínas inhibitoras (4E-BPs), cuya unión con el factor impide su interacción con eIF4G para formar el complejo eIF4F (Pause *et al.*, 1994). Otros estudios demuestran que existe una regulación a nivel transcripcional para la expresión de eIF4E (Rosenwald *et al.*, 1993; Johnston *et al.*, 1998). En relación a esto se ha demostrado que los cambios en los niveles intracelulares de eIF4E tienen un efecto muy importante en el control del crecimiento celular (Sonenberg & Gingras, 1998) y la diferenciación celular (Klein & Melton, 1994). En mamíferos la disponibilidad de eIF4E aumenta a partir de estímulos que activan el crecimiento celular (Fig. 4). El mecanismo por el cual se propagan estos estímulos se basa en una cascada de transducción de señales específica que termina con la fosforilación de 4E-BP, lo que ocasiona una disminución en su afinidad por eIF4E y lo libera para unirse a eIF4G (Lawrence & Abraham, 1997; Gingras *et al.*, 1999). Es interesante mencionar que esta cascada de señales se coordina con la activación de otros mecanismos de regulación como es la fosforilación de la pr S6 (Burnett *et al.*, 1998) y, en general con el estímulo sobre la expresión de genes específicos tanto a nivel de transcripción, como de traducción (Kleijn *et al.*, 1998).

señales se coordina con la activación de otros mecanismos de regulación como es la fosforilación de la pr S6 (Burnett et al., 1998) y, en general con el estímulo sobre la expresión de genes específicos tanto a nivel de transcripción, como de traducción (Kleijn et al., 1998).



**Figura 4.** Transducción de señales por factores de crecimiento en mamíferos. Conexión entre las vías de regulación de p70<sup>S6K</sup> y de eIF4E. La unión del ligando con su receptor transduce la señal en la célula mediante una cascada de activación de cinasas para inducir la transcripción o traducción de genes específicos. En esta cascada interviene la cinasa FRAP/mTOR que transmite (1) estímulo para la fosforilación de 4E-BP1, lo cual libera a eIF-4E y aumenta su disponibilidad para la traducción y (2) estímulo sobre la fosforilación de la pr S6 que aumenta selectivamente la traducción de ciertos mensajes (5'TOP).

eIF4G para formar dos complejos eIF4F con actividad independiente (Browning *et al.*, 1992). Ambas isoformas presentan un 50 % de homología entre sí y las diferencias están distribuidas a lo largo de toda la secuencia de las proteínas. Cada isoforma tiene 9 triptofanos, 8 de ellos conservados respecto a otros organismos y uno adicional hacia el extremo carboxilo-terminal (Allen *et al.*, 1992; Metz *et al.*, 1992). Recientemente se han encontrado nuevas isoformas para las proteínas que se unen al CAP, tanto en plantas (Ruud *et al.*, 1998) como en mamíferos (Rom *et al.*, 1998). Estas proteínas difieren de los factores eIF4E en la ausencia de dos de los triptofanos conservados. Hasta el momento se desconoce la función de este tipo de proteínas.

Algunos estudios en plantas han demostrado que existen diferencias entre eIF4E e eIFiso4E las dos isoformas en cuanto a la afinidad por el CAP (Carbery *et al.*, 1991) y por estructuras secundarias en la región 5'UTR de los mensajes (Carberry & Goss, 1991, Sha *et al.*, 1995), indicando que eIFiso4E prefiere CAPs hipermetilados y mensajes con menos estructura secundaria. Estos resultados han sugerido que la presencia de 2 isoformas puede ser un mecanismo de selección entre diferentes tipos de ARNm para su traducción. En relación a esto, en *Arabidopsis* se ha reportado expresión diferencial para los mensajes correspondientes a eIF4E y eIFiso4E en diferentes tejidos y durante el desarrollo de la planta (Rodríguez *et al.*, 1998). Otros trabajos en cereales señalan que los patrones de expresión de varios de los factores de iniciación de la traducción muestran cambios importantes durante el desarrollo, la germinación y después de choque térmico (Gallie *et al.*, 1998). Sin embargo, no se conoce a qué nivel está regulada esta expresión, ni tampoco qué mecanismo está operando sobre la regulación de la actividad de eIF4E y/o eIFiso4E. Reportes en trigo indican la posibilidad de existencia de formas fosforiladas tanto de eIF4E como de eIFiso4E (Le *et al.*, 1997). No obstante, el papel de esta modificación en la actividad de estos factores ha sido poco estudiada en plantas. Recientemente, se ha propuesto que en condiciones de hipoxia en maíz, ocurre fosforilación selectiva de eIF4E (Manjunath *et al.*, 1999). Estos datos, aunque escasos, indican que la regulación del factor eIF4E en plantas puede seguir mecanismos diferentes a los descritos en mamíferos.

## 1.5 Regulación de la síntesis de proteínas durante la germinación de maíz

La síntesis de proteínas es un evento temprano en la germinación de semillas de maíz, al igual que en otros cereales. La evidencia de traducción selectiva en el grupo de mensajes almacenados, así como entre los sintetizados *de novo* ofrece un modelo atractivo para el estudio de los diferentes mecanismos de regulación que operan a este nivel de la expresión génica. De la gran diversidad de mecanismos de control traduccional estudiados en sistemas animales, algunos han sido demostrados para el sistema de germinación. Así, se ha determinado que algunos de los ARNm almacenados en ejes embrionarios de maíz codifican para proteínas ribosomales (Beltrán-Peña *et al.*, 1995). Su expresión parece estar regulada por un mecanismo traduccional similar al descrito para las proteínas ribosomales de otros eucariotes, donde se involucra la fosforilación de la pr S6 (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1997a). También, la secuencia 5'TOP parece estar presente en varias proteínas ribosomales de plantas, aunque no ha sido encontrada en todas (Zhao *et al.*, 1995; Shama & Meyuhas, 1996). Por otro lado, la fosforilación *de novo* de la pr S6 ocurre a partir de 10-12 h de germinación (Pérez-Méndez *et al.*, 1993) y coincide con un incremento en la síntesis *de novo* de proteínas ribosomales (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1997a). Estos datos indican que la fosforilación de S6 es un mecanismo de regulación importante para la expresión selectiva de mensajes durante la germinación de maíz.

La cascada de señales celulares que opera sobre la fosforilación de la pr S6 en animales involucra la actividad de una cinasa específica, la de la proteína pp70<sup>S6K</sup>, y aunque hay diversos estímulos que activan esta vía, uno de los más importantes es el efecto de insulina y de factores "similares a insulina" (Fig. 4). En plantas, recientemente se demostró la existencia de una cinasa homóloga a pp70<sup>S6K</sup> que además de encargarse de fosforilar a la pr S6, tiene un comportamiento similar frente a este tipo de estímulos (Turck *et al.*, 1998). Desde hace varios años se ha reportado la presencia de proteínas "similares a insulina" en plantas (Collier *et al.*, 1987). Por otra parte, se ha demostrado en estos organismos la existencia de receptores membranales similares a los correspondientes a factores de crecimiento en animales (Walker, 1994; Braun & Walker, 1996), lo cual apoya la idea de que las vías de transducción de señales pudieran ser también similares y mediadas por fosforilación de varios sustratos (Trojanek *et al.*, 1997; Hirt, 2000). Recientemente, en nuestro laboratorio se demostró que el estímulo con insulina a ejes embrionarios de maíz durante la germinación produce efectos sobre el desarrollo y



crecimiento celular, así como incrementos en la fosforilación de la pr S6 y en la expresión de proteínas ribosomales (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1999).

Como se ha mencionado, se conoce que los estímulos que aumentan la fosforilación de la pr S6 actúan al mismo tiempo sobre otros mecanismos de control traduccional, como es la actividad de eIF4E para traducir mensajes cap-dependientes (Fig. 4). La fosforilación de la pr S6 de maíz se incrementa durante el proceso de germinación (Pérez-Méndez *et al.*, 1993). Esta fosforilación se ha correlacionado con la traducción *in vitro* de mensajes cap-dependientes; mientras que, entre los mensajes almacenados de maíz se ha demostrado la existencia de un grupo que traduce *in vitro* en forma independiente de la fosforilación de S6, y de la presencia de factores que se unen al CAP (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1997b). Esto sugiere que durante la germinación de maíz, un posible mecanismo que regula la traducción de mensajes almacenados puede estar mediado por las isoformas eIF4E y eIFiso4E.

Estos antecedentes inducen a investigar sobre los factores eIF4E y eIFiso4E y su participación en el control traduccional, durante el proceso de germinación de maíz. La presente investigación se plantea tres preguntas principales:

- ¿Cómo es la expresión de ambas isoformas de 4E y cuál es su disponibilidad durante las diferentes etapas de germinación, dividiendo ésta en temprana (0-12 h después de imbibición) y tardía (12-24 h; finalizando con protrusión de radícula)?
- ¿La regulación de la expresión de los factores eIF4E y eIFiso4E, está relacionada con la fosforilación de la pr S6 y con el sistema de transducción de señales que opera sobre proteínas ribosomales?
- ¿Los factores eIF4E y eIFiso4E, regulan en forma selectiva la traducción de mensajes durante el período de germinación?

## JUSTIFICACIÓN

La germinación de semillas de maíz es un sistema biológico donde se ponen de manifiesto varios de los mecanismos de regulación de la expresión genética a nivel de traducción (Sánchez de Jiménez, 1999). Dos de los mecanismos más estudiados en otros sistemas son: (1) la fosforilación de la proteína ribosomal S6 en la subunidad 40S que controla la expresión selectiva de algunos mensajes (5'TOP), requeridos en determinadas etapas de crecimiento celular (Meyuhas *et al.*, 1996) y (2) el factor de iniciación de la traducción eIF4E que une el extremo CAP de los mensajes eucarióticos, cuya regulación a varios niveles, permite incrementos y decrementos en la traducción tanto global como selectiva de los mensajes celulares, dependiendo de las condiciones metabólicas de la célula (Sonenberg, 1996).

Se ha demostrado que el mecanismo de regulación por fosforilación de la pr S6 opera durante la germinación de maíz (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1997a; 1997b) y responde a estímulos similares a los descritos en mamíferos (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1999). Reportes recientes sobre los factores eIF4E y eIFiso4E de plantas, sugieren que la regulación de su actividad puede ser diferente a la que se describe para mamíferos. Este hecho se basa en que las isoformas forman dos complejos moleculares eIF4F diferentes, con afinidades distintas por estructuras CAP y secuencias UTR de los ARNm (Carbery & Goss, 1991; Rodríguez *et al.*, 1998), y a la aparente ausencia de proteínas inhibitoras del factor 4E (Pause *et al.*, 1994). A pesar de la intensa investigación realizada sobre estos factores en diversas condiciones celulares (Le *et al.*, 1997; Gallie *et al.*, 1998), la demostración de los mecanismos que regulen su expresión y actividad en plantas no ha sido esclarecida.

Conociendo los antecedentes de control traduccional en el sistema de germinación de maíz y la importancia de este evento para el futuro desarrollo de la planta, se decidió iniciar el estudio de la expresión y actividad de las isoformas del factor eIF4E y así lograr el esclarecimiento de otro posible mecanismo selectivo de regulación de la traducción.

## HIPOTESIS

Dado que en plantas existen dos isoformas diferentes para la proteína que reconoce a la estructura CAP de los ARNm (eIF4E), si su expresión es diferencial durante la germinación de maíz, se espera que esta diferencia contribuya en la regulación de la traducción selectiva de mensajes en el eje embrionario durante el proceso de germinación.

## OBJETIVOS

- 1) Determinar el número y los niveles de transcritos y de proteínas para el factor eIF4E en ejes embrionarios de maíz.
- 2) Estudiar la expresión de los factores eIF4E y eIFiso4E a nivel de ARNm y de proteínas en ejes embrionarios de maíz durante la germinación.
- 3) Analizar la regulación de la expresión de los factores eIF4E e eIFiso4E durante la germinación.
- 4) Determinar el papel de cada una de las dos isoformas de eIF4E en la síntesis de proteínas durante la germinación.

Para cumplir con estos objetivos y probar la hipótesis inicial de trabajo se utilizó la siguiente estrategia experimental:

- a) Purificar las isoformas eIF4E y eIFiso4E de ejes embrionarios de maíz como parte de los complejos eIF4F/eIFiso4F, mediante cromatografía de afinidad ( $\gamma$ mGTP-Sepharosa). Identificar cada isoforma por Western blot con anticuerpos vs. eIF4E y eIFiso4E de trigo, durante diferentes etapas de la germinación. Obtener el patrón de síntesis *de novo* de cada factor durante la germinación.
- b) Identificar los mensajes que codifican para las proteínas correspondientes al factor eIF4E y eIFiso4E mediante análisis por Northern blot utilizando sondas de cDNA provenientes de arroz. Analizar la presencia de los mensajes para eIF4E y eIFiso4E en el grupo de mensajes almacenados en ejes embrionarios quiescentes de maíz.
- c) Estudiar la expresión de los mensajes de eIF4E y eIFiso4E durante diferentes etapas de la germinación (0-12 h y 12-24 h) a nivel de transcripción (efecto de  $\alpha$ -amanitina) y

a nivel de movilización de los mensajes a polisomas (análisis de ARN polisomal) mediante técnicas de Northern blot.

- d) En base al estudio anterior, analizar la posible regulación de estos factores a nivel traduccional en relación con las vías de transducción de señales conocidas en ejes embrionarios de maíz, utilizando el estímulo con insulina y la fosforilación de la pr S6 durante la germinación.
- e) Demostrar si eIF4E y eIFiso4E tienen actividad diferencial y específica sobre la traducción de diferentes ARNm (sistemas de traducción *in vitro*). Analizar si ocurre traducción selectiva de los ARNm almacenados debido a la actividad de los factores eIF4E y eIFiso4E (sistemas de traducción *in vitro*).

El cumplimiento de las metas implícitas en esta estrategia fue abordado con el uso de anticuerpos policlonales dirigidos contra las proteínas recombinantes de eIF4E y eIFiso4E de trigo, generosamente donadas por KS Browning, Univ. of Texas. Como sondas en el estudio de ARN se utilizaron los cDNAs correspondientes a eIF4E (*R0456*) y eIFiso4E (*S4954*) de arroz, suministrados por MAFF Bank, Japan y el cDNA de la proteína ribosomal S6 de maíz (*5C01A12*) suministrado por UMC, Stock Center, Univ. of Missouri-Columbia.

Para el estudio de los requerimientos para la actividad de eIF4E y eIFiso4E se utilizaron los siguientes ARN virales: el virus del bromomosaico (BMV) y el virus del mosaico de tabaco (TMV), como parte del sistema de traducción *in vitro* de extracto de germen de trigo WGE (Promega, Corp.).

Las metodologías utilizadas para el cumplimiento de los objetivos y metas de este trabajo se describen en detalle en los artículos que siguen.

**CAPITULO II**  
**EXPRESIÓN DE LOS FACTORES eIF4E Y eIFiso4E DURANTE LA GERMINACIÓN DE**  
**MAÍZ**

## 2.1 MATERIALES Y METODOS

Los materiales y métodos utilizados en este capítulo se describen en el artículo que se presenta a continuación (artículo 1).

## 2.2 RESULTADOS

Los resultados que se presentan en este capítulo indican que las dos isoformas activas para el factor de iniciación de la traducción eIF4E se encuentran presentes en los ejes embrionarios quiescentes y durante el proceso de germinación de maíz. Los patrones de expresión de los factores eIF4E y eIFiso4E son diferentes a nivel de proteína y de ARN mensajero durante este período. La isoforma eIFiso4E es más abundante que eIF4E durante la germinación temprana. Esta isoforma presenta niveles constantes de proteína durante todo el proceso de germinación, aunque su síntesis *de novo* es muy activa desde las primeras horas. La isoforma eIF4E mantiene niveles bajos durante la germinación temprana, sin embargo, hacia el final del proceso, su síntesis se incrementa debido probablemente a un aumento en la transcripción de su gen.

### 2.2.1 Artículo 1: "Differential Expression and Regulation of Translation Initiation Factors -4E and -iso4E during Maize Germination"

## Differential expression and regulation of translation initiation factors -4E and -iso4E during maize germination

Tzvetanka D. Dinkova and Estela Sánchez de Jiménez\*

Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), 04510 México D.F., México

\*Corresponding author, e-mail: estelas@servidor.unam.mx

Received 17 May 1999; revised 30 August 1999

Messenger RNA translation is a tightly regulated event in maize axes during germination. To obtain a deeper understanding of this process, the present research was centered on the expression regulation of the translation initiation factor eIF-4E within this period. Two maize eIF-4E isoforms were isolated by <sup>3</sup>mGTP-Sepharose affinity chromatography. The eIF-iso4E protein content remained at a constant level in the axes during the first 24 h of maize germination, whereas the eIF-4E level increased after 12 h of germination as indicated by western blot analysis. Fast *in vivo* eIF-iso4E, but not eIF-4E, *de novo* synthesis was found within 6–12 h of germination. Northern blot analysis of total RNA from ungerminated axes with cDNAs encoding either -iso4E or -4E

indicated that both transcripts were present in the stored mRNA pool of maize axes. Transcription for any of these mRNAs was not detected before 12 h of germination. Northern blots of polysomal RNAs indicated that the eIF-iso4E stored transcript is selectively recruited into polysomes for translation as early as 6 h of germination, whereas this does not occur for the eIF-4E transcript. The above data demonstrate differential 4E isoform expression regulation during maize germination. Expression of the eIF-iso4E protein appears to be translationally controlled, whereas the expression of the eIF-4E protein might be regulated at the transcriptional level.

### Introduction

Regulation of gene expression in eukaryotes might be exerted at transcriptional, as well as posttranscriptional levels (Mathews 1996). Translational control of gene expression is, at present, recognized as the most relevant step in regulating growth and differentiation in eukaryotic organisms (Pain 1996). Important mechanisms of translational control occur within the protein synthesis initiation steps, some of which involve the eIF-4E cap-binding protein (Gingras et al. 1998). Two features of this protein make it a key regulatory point in eukaryotic translation initiation: (1) its relatively limited amount in cells, and (2) the correlation found between its expression level and the *in vivo* translation rates (Sonenberg 1996). It has been further demonstrated that 4E overexpression contributes to the efficient translation of growth-related mRNAs with extensive secondary structure in their 5' non-translated region (Sonenberg 1996). In plants, translation initiation factor eIF-4F is composed of eIF-4E and

eIF-4G proteins, similar to other eukaryotes (Browning 1996). However, important differences between mammalian and plant translation initiation factors have been found. One of them is a mammalian -4E binding protein termed 4E-BP or PHAS I that complexes to 4E inactivating it (Pause et al. 1994), which has not been found in plants. On the other hand, an isoform of the eIF-4F complex, called eIF-iso4F (composed of -iso4E and -iso4G) predominates in several plant tissues (Browning et al. 1992), and does not seem to have a homologue in mammals.

Recently, different levels of eIF-4E and -iso4E expression have been found in different tissues of *Arabidopsis thaliana*, suggesting developmental regulation (Rodríguez et al. 1998). In addition, several differences detected in the isoform abundance (Browning et al. 1990), <sup>3</sup>m-GTP affinity, and preference for secondary mRNA structure (Carberry and Goss 1991, Sha et al. 1995), suggest that the two -4E isoforms

**Abbreviations** – eIF, eukaryotic initiation factor; <sup>3</sup>mGTP, 7-methyl guanosine triphosphate; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; PVDF, polyvinylidene difluoride; RRL, rabbit reticulocyte lysate; TMV, tobacco mosaic virus; WGE, wheat germ extract.

might have discriminatory activity for mRNA recognition. However, there is not enough information on the translational control mechanisms involving eIF-4E and eIF-iso4E, nor on the mechanisms of expression regulation for these factors (reviewed in: Browning 1996, Fütterer and Hohn 1996, Gallie 1996).

In maize embryos, protein synthesis is known to reinitiate during germination after a period of deep cell quiescence. During this process, tightly regulated translation of stored, as well as newly synthesized mRNAs has been demonstrated to take place (Sánchez de Jiménez and Aguilar 1984). Taking into account a possible key role of 4E and -iso4E in regulating translation during maize germination, it was considered relevant to analyze the unknown mechanism(s) controlling 4E isoform expression within this period. To this end, the two maize 4E isoforms were characterized, their expression patterns during germination were determined, and the regulatory level at which such expression is controlled was analyzed.

## Materials and methods

### Biological system

Maize (*Zea mays* L.) seeds of the Mexican cv. Chalqueño were used for all the experiments. The seeds were germinated by water imbibition on moisturized cotton in the dark at 25°C. After the incubation period, the embryonic axes were manually excised and processed for protein or RNA extraction. For some experiments, transcription was inhibited by imbibing 750 mg of embryonic axes in 1 ml of  $\alpha$ -amanitin solution (12  $\mu\text{g ml}^{-1}$   $\alpha$ -amanitin, Sigma, St Louis, MO, USA). The axes were further germinated on basal MS nutrient medium (Murashige and Skoog 1962) without hormones.

### Purification of eIF-4F from maize embryonic axes

Embryonic axes reduced to a fine powder with liquid nitrogen were mixed with 3 volumes of cold (4°C) extraction buffer A (20 mM HEPES, pH 7.6, 0.1% [v/v] Triton X-100, 100 mM KCl, 10% [v/v] glycerol, 0.2 mM EDTA, 2.0 mM DTT, 2.0 mM PMSF, 80 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 5 mM NaF; all from Sigma), and one tablet of protease inhibitors (Complete TM, Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany) per 50 ml solution. The extract was clarified by centrifugation for 30 min at 20000 g in a Sorvall type 20 rotor at 4°C. The postribosomal supernatant was fractionated by affinity chromatography with <sup>32</sup>mGTP-Sepharose (Sigma) according to the method of Zapata et al. (1991). The eIF-4F eluate was concentrated in Amicon-Centricron 10 filters (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) and proteins were quantified by the Bradford method (Bradford 1976). The proteins were analyzed by one-dimensional SDS-PAGE and Coomassie staining.

### Maize eIF-4F activity test

Kits for in vitro translation (Roche Diagnostics) based on

wheat germ extract (WGE) or rabbit reticulocyte lysate (RRL) were used. The translation mixture contained the standard components recommended by the manufacturer, including [<sup>35</sup>S]-methionine (3.7 MBq ml<sup>-1</sup>, New England, Boston, MA, USA) and 5  $\mu\text{g}$  of tobacco mosaic virus (TMV) mRNA. Depletion of eIF-4F was achieved in batch by the addition of 2 volumes of either WGE or RRL, onto 1 volume of <sup>32</sup>mGTP-Sepharose, gently agitated on ice for 30 min. The unbound fraction was recovered by a brief centrifugation in a microfuge. The eIF-4F-depleted system was reconstituted with maize eIF-4F by adding a quantity corresponding to that of depleted eIF-4F to the translation mixture. The translation activity was determined in 1- $\mu\text{l}$  aliquots of the translation mix taken at the indicated times, by measuring TCA-precipitable radioactivity in a liquid scintillation counter (LS 6000 IC, Beckman, Palo Alto, CA, USA).

### Gel electrophoresis and western blot analysis

Either 10  $\mu\text{g}$  of total protein from the eIF-4F eluate (isoform identification) or the total eIF-4F eluate from 100 embryonic axes (different germination periods) was loaded onto a 13% SDS acrylamide gel. After electrophoresis the protein was transferred to Immobilon polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore) using the semi-dry transfer system for 1.5 h at 1.5 mA cm<sup>-2</sup> (Mansfield 1994). Following transfer, the blots were blocked for 1 h with 5% [w/v] milk in TBS (0.1% [v/v] Tween 20, 0.15 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4) and incubated at 4°C overnight with the primary antibody at 1:1000 dilution. The blots were washed once with TBS and once with TBS plus 1 M NaCl, and then incubated with goat anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated antibodies (Bio-Rad Lab, Hercules, CA, USA) for 2 h. The signal was detected by chemiluminescence (ECL system, RPI Biotech, Uppsala, Sweden). Polyclonal antibodies raised against wheat germ recombinant p26 and p28 4E isoforms were kindly supplied by Dr K. S. Browning, University of Texas, Austin. The blots used once (i.e. p26 antiserum) were washed with a solution containing 2% SDS, 100 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 62.7 mM Tris-HCl, pH 6.7, for 1 h at 55°C, for probing against a different primary antibody (i.e. p28 antiserum).

### In vivo [<sup>35</sup>S]-methionine pulse labeling of eIF-4E proteins

Maize seeds were germinated for 3, 6, 9 and 21 h. At the end of each period, 100 embryonic axes were excised and incubated in the presence of 11.1 MBq [<sup>35</sup>S]-methionine for 3 h. The eIF-4F complexes were isolated and electrophoresed as described previously, transferred to PVDF membranes, enhanced by fluorography with Amplify (AP Biotech), and exposed to Kodak X-ray films.

### RNA isolation and blot hybridization

Total RNA was isolated by a one-step procedure as described by Chomezynski and Sacchi (1987). Polysomal RNA was obtained from 6 to 24 h germinated embryonic axes as previously described (Beltrán-Peña et al. 1995). From each



RNA sample 30  $\mu$ g was denatured, size-fractionated on 1.3% formaldehyde-agarose gels, transferred to Hybond N membranes (APBiotect), and cross-linked by UV light. The filters were hybridized overnight at 65°C in a solution containing 7% SDS, 0.25 M phosphate buffer pH 7.0, 0.6 mM EDTA and 1% [w/v] BSA. Two cDNA probes: *R0456* and *S4954* corresponding to p26 (-4E) and p28 (-iso4E) from rice (kindly supplied by the MAFF DNA Bank, Japan) were [<sup>32</sup>P]-labeled by the Klenow reaction using random priming (NEN's Random Primer Extension Kit, Boston, MA, USA). After labeling and DNA purification, both probes showed similar specific activities. The blots were washed twice in 2  $\times$  SSC at room temperature, once in 1  $\times$  SSC at 65°C and once in 0.1  $\times$  SSC at 65°C.

## Results

### Characterization of maize eIF-4E and eIF-iso4E

The eIF-4E and -iso4E complexes purified from the postribosomal supernatant of maize extracts, were shown to be mainly composed of two doublets, the first of 102-90 kDa and the second one of 32-30 kDa proteins, plus a faint high molecular-mass band of about 220 kDa (Fig. 1a). The electrophoretic patterns shown by these complexes were essentially the same in quiescent and germinated embryonic axes. Immunological identification of the eIF-4E polypeptides was obtained with polyclonal antibodies against recombinant wheat germ p28 (-iso4E) and p26 (-4E) proteins. The data show that the 32-kDa band corresponds to maize eIF-iso4E, whereas the wheat germ anti-p26 antibody recognized two peptides from the maize extract in the region of 30 kDa, corresponding then to eIF-4E (Fig. 1b). It is

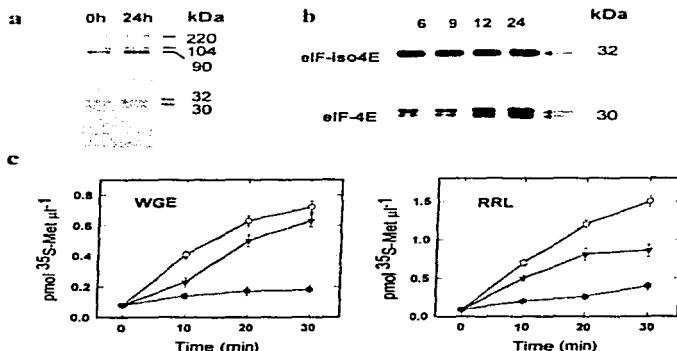
interesting to stress that after 12 h of germination the -4E level increased, whereas the -iso4E level was high and remained almost unchanged during germination. At the end of germination (approximately 24 h) both isoforms were present at high and comparable levels in the axes (Fig. 1b).

Maize eIF-4E complex mixture purified from 24 h germinated axes was tested for its ability to support protein synthesis in an *in vitro* translation system composed of eIF-4E-depleted WGE or RRL, and TMV mRNA. Translation activity decreased in the eIF-4E-depleted translation system and was restored by the addition of the maize eIF-4E factors (Fig. 1c). Maize eIF-4E complexes restored translational activity more efficiently in depleted WGE than in depleted RRL (90 versus 72%, as judged by the initial slopes).

### De novo synthesis of eIF-4E and -iso4E during maize germination

Restricted availability of eIF-4E to form the eIF-4F functional complex has been found to be a key point in regulating translation for many eukaryotic cells (Rhoads et al. 1994, Rau et al. 1996). Therefore, the rate of -4E and -iso4E de novo synthesis was measured by pulse labeling experiments and further monitoring [<sup>35</sup>S]-methionine incorporation into each isoform during the process of maize germination. De novo synthesis of the peptide in the 32-kDa region was detected at early stages of germination (6-12 h) and continued to increase showing a maximum after 24 h of germination (Fig. 2). In contrast, synthesis of the 30-kDa peptide was almost undetectable during early germination but increased towards 24 h of germination (Fig. 2). A labeled peptide above the 32-kDa region also appeared in the

Fig. 1. Analysis of eIF-4E proteins from maize quiescent (0 h) and germinated (24 h) embryonic axes. (a) Gel electrophoresis of mGTP-binding proteins stained with Coomassie blue, approximately 10  $\mu$ g of total protein was loaded per lane. The major components of the mGTP-eluate (p220, p102, p90, p32 and p30) are indicated. (b) Western blot at different germination stages; eIF-4E obtained from 100 embryonic axes germinated for 6, 9, 12 and 24 h was probed against eIF-iso4E (dilution 1:1000) or eIF-4E (dilution 1:500) wheat germ recombinant proteins. Arrows indicate the maize eIF-iso4E and eIF-4E peptides. Numbers refer to hours of germination. (c) eIF-4E activity during *in vitro* translation of TMV mRNA tested in WGE or RRL. Reconstitution with maize eIF-4E complexes was performed by addition of 0.8  $\mu$ g of the mGTP eluate. (○) eIF-4E-undepleted system; (●) eIF-4E-depleted system; (▼) maize eIF-4E-restored system. The translation rates were calculated from the slopes of the corresponding curves. For comparison, the undepleted system was taken as 100%. Vertical bars represent s.d. calculated from three independent experiments.



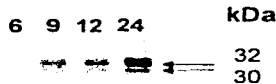


Fig. 2. De novo synthesis of eIF-iso4E and eIF-4E peptides during germination. Maize seeds were germinated for 6, 9, 12 and 24 h. The embryonic axes were excised and incubated with 11.1 MBq of [<sup>35</sup>S]-methionine during the last 3 h. The eIF-4E complexes were purified by NiGTP-affinity chromatography, resolved by SDS-PAGE, blotted onto PVDF membrane, and analyzed by fluorography. Arrows indicate the eIF-iso4E and eIF-4E peptides. Numbers refer to hours of germination. Essentially the same results were obtained from two independent experiments.

fluorography, which was not evident in Coomassie stained gels or western blots (Fig. 1a,b). This peptide might correspond to another cap-binding protein (mCBP) described for *Arabidopsis* in small amounts, which however, does not cross-react with the antiserum against eIF-4E or eIF-iso4E (Ruud et al. 1998; Fig. 1b). At the end of the germination period, [<sup>35</sup>S]-methionine incorporation into the 32-kDa band was much larger than the one observed in the 30-kDa protein (p32/p30 ratio: approximately 6.5) as demonstrated by the densitometric analysis of the film (results not shown). These data indicate that synthesis and accumulation of the two 4E isoforms occur at different rates during germination.

#### Maize eIF-4E and eIF-iso4E transcripts during germination

cDNAs for wheat germ and rice -4E and -iso4E proteins have been previously cloned and sequenced (Allen et al. 1992, Metz et al. 1992). The amino acid sequence similarity between rice and wheat p26, or p28 proteins is about 80% (Browning 1996). Based on these data, the cDNA clones from rice p26 (-4E) and p28 (-iso4E) proteins, kindly supplied by the MAFF DNA Bank of Japan, were used to detect the transcripts of the corresponding maize isoforms by northern blot analysis in total RNA from quiescent and germinating axes. An mRNA of about 1.1 kb was recognized by the -iso4E probe in quiescent axes (Fig. 3a). Hybridization of the same membrane with the -4E probe, showed a single band of approximately 1.0 kb (Fig. 3b, lane 1). Thus, both transcripts are present as stored mRNAs in maize axes, -iso4E being more abundant than -4E, as judged by their band intensities. Each mRNA isoform level was analyzed in total RNA during different germination periods (Fig. 3a). The amount of the eIF-iso4E transcript decreased at 6 and 12 h of germination with respect to the level found in quiescent axes (0 h). Later (by 24 h), it increased above the original level of germination (Fig. 3a). The -4E transcript showed a similar pattern, although at reduced levels (Fig. 3b). To determine whether transcription of these mRNAs is relevant during the first 12 h of germination, a similar experiment was performed in the presence of  $\alpha$ -amanitin at a concentration which inhibits more than 95% of RNA synthesis in germinating maize axes (Beltrán-Peña et al. 1995). Under these conditions, both transcript levels were practically unaffected at 6 and 12 h of germination

(Fig. 3). Thus, de novo transcription of -iso4E and -4E most probably does not occur early in germination (from 6 to 12 h), or if it does occur, it does so at negligible rates. The increment in eIF-iso4E and eIF-4E transcripts at 24 h of germination is most probably due to de novo transcription of the corresponding genes. It should be pointed out that transcript analysis with  $\alpha$ -amanitin treatment after the first half of imbibition (12-24 h) is meaningless, since maize germination becomes dependent on newly synthesized transcripts and is severely impaired by the inhibitor.

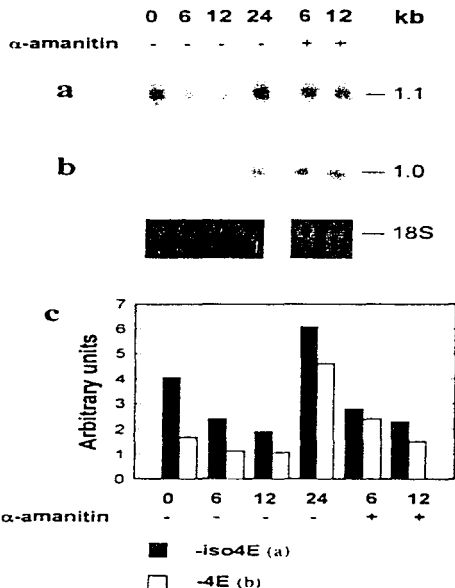
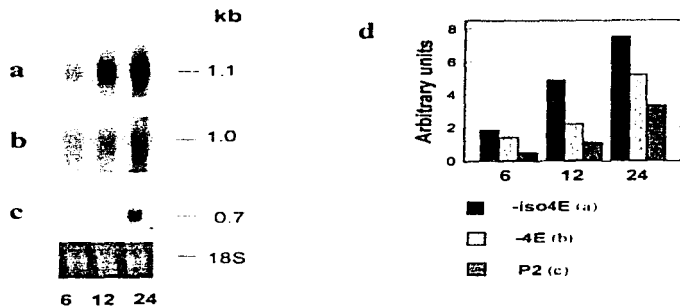


Fig. 3. Northern blot analysis of eIF-iso4E and eIF-4E transcripts in the total RNA pool from maize axes during germination. Total RNA obtained from maize embryonic axes germinated for 0, 6, 12 or 24 h was resolved on 1.3% formaldehyde-agarose gel, blotted onto Nylon membrane and hybridized with rice p28 (-iso4E) cDNA (a), or p26 (-4E) cDNA (b).  $\alpha$ -Amanitin treatment at 6 and 12 h of germination was performed as described in Materials and methods. The lowest panel corresponds to a digitalized photograph of 18S ribosomal RNA in the membrane before hybridization, as control. Numbers refer to hours of germination. Densitometric analysis (c) was performed with Ultrascan XL (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden), corrected for RNA loading variation between samples and expressed in the graph as arbitrary units.

**Fig. 4. Recruitment of the eIF-iso4E and eIF-4E transcripts to polysomes during germination.** Polysomes were obtained from 6, 12 and 24 h germinated axes and polysomal RNA was obtained from this fraction. Northern blot analysis was performed as previously described for total RNA samples. Hybridization with either rice p28 (-iso4E) cDNA (a), rice p26 (-4E) cDNA (b), or maize acid ribosomal protein P2 cDNA (c) was performed. The lowest panel corresponds to 18S ribosomal RNA loading as control. Densitometric analysis (d) was performed and expressed in the graph as described in Fig. 3.



#### Recruitment of -iso4E and -4E transcripts into polysomes during maize germination

Recruitment of -iso4E and -4E mRNAs into the polysomal fraction was tested by northern blot analysis of polysomal RNA samples taken at 6, 12 and 24 h of germination. It should be pointed out that quiescent axes do not contain polysomes and the polysomal fraction formed during germination represents only up to 3-5% of total ribosome population (Sánchez de Jiménez et al. 1981). Therefore, transcripts recruited into the polysomal fraction represent a small concentrated fraction of the cellular mRNAs. The -iso4E transcript present in polysomal RNA was low in 6 h germinated axes and increased rapidly to reach high levels at 12 and even higher at 24 h of germination (Fig. 4a). In contrast, the -4E transcript level was low during the first 12 h of germination, as shown by overexposure of the film, but increased by 24 h of germination when newly synthesized transcripts were available (Fig. 4b). Densitometric analysis of the corresponding bands indicated about a 3-fold increment from 6 to 12 h for -iso4E transcript into polysomes, whereas the increment for -4E was about 0.5-fold (Fig. 4d). The recruitment pattern of another stored transcript, encoding the P2 acidic ribosomal protein (L. Montoya, R. Aguilar and E. Sánchez de Jiménez, unpublished results), was tested as control. Negligible P2 mRNA polysomal recruitment was observed early in germination, but clearly detected in the 24-h sample (Fig. 4c). This pattern, similar to the -4E transcript recruitment, but different from the -iso4E one, indicates two different expression patterns for the stored -4E and -iso4E transcripts during maize germination. Whereas no substantial changes in -4E transcript recruitment occur early in germination (at least until 12 h), the -iso4E transcript shows specific polysomal recruitment during this period. Such a distinctive pattern of mRNA mobilization into polysomes strongly suggests that expression of the stored -iso4E transcript is up-regulated at translational level early in germination.

#### Discussion

##### Expression patterns of maize -iso4E and -4E during germination

Two different translationally active isoforms for the initiation factor 4E were found in maize axes from quiescent and germinating seeds (Fig. 1), as similarly reported for other plant species (Browning et al. 1992). Unlike the peptide identification for the eIF-4E isoform that showed two peptides, only one message for this isoform was detected in the axes from 0 to 24 h of germination (Fig. 3). This suggests that the second peptide observed by western blot probably corresponds to a post-translationally modified sub-population (i.e. by phosphorylation) of the same 30-kDa isoform (Gallie et al. 1997; Manjunath et al. 1999). Related to this, many reports refer to post-translational modifications of the 4E factor, mainly by phosphorylation (Waskiewicz et al. 1999).

De novo synthesis patterns for the two 4E isoforms showed interesting differences: eIF-iso4E synthesis is fast from early germination (6-12 h), whereas eIF-4E synthesis hardly labeled within this period, as indicated by *in vivo* protein synthesis (Fig. 2), and corroborated by *in vitro* experiments (results not shown). This was in correlation with the different -4E and -iso4E transcript levels found in maize axes (Fig. 3). However, the protein accumulation patterns do not match these results (Fig. 1b). Whereas the eIF-iso4E factor stays constant during germination, its translation increases continuously, suggesting a high turnover for this protein. In contrast, the eIF-4E factor seems to be stabilized early in germination before its mRNA is significantly recruited into polysomes, and might be accumulated by transcription-translation toward the end of germination (Fig. 1b).

##### Differential regulation of maize eIF-iso4E and -4E transcripts

Transcription of -iso4E and -4E does not seem to be a main

event during the first 12 h of germination, since the mRNA levels for both isoforms are not considerably altered by  $\alpha$ -amanitin addition and they remained steady between 6 and 12 h of germination (Fig. 3). However, specific recruitment of the *iso4E* mRNA into the polysomal fraction was observed during this period (Fig. 4a), and this was not evident for the *-4E* transcript (Fig. 4b). These data suggest that maize *eIF-iso4E*, but not *eIF-4E*, expression is translationally regulated early during germination (0–12 h). On the other hand, although translational post-translational control for the *eIF-4E* isoform cannot be excluded, its expression seems most likely to be late under transcriptional regulation during germination. This interpretation is supported by the large increase in *eIF-4E* transcript at 24 h (Fig. 3b) that correlates with the *de novo* protein synthesis pattern observed for this isoform (Fig. 2).

Recent reports on *Arabidopsis* and cereals have demonstrated differential *4E* isoform expression in different plant tissues and developmental stages (Gallie et al. 1998, Rodríguez et al. 1998). The *eIF-iso4E* and *-4E* distinctive expression patterns found in maize axes might be of particular relevance in germination, since it has been demonstrated that stored mRNAs contain cap-dependent as well as less or non cap-dependent mRNA subpopulations (Sánchez de Jiménez et al. 1997). Therefore, differential expression for the two isoforms of the *4E* translation factor might provide a means for selective mRNA translation during germination. The finding that these isoforms differ in mRNA structure preference and methylated cap-recognition (Carberry and Goss 1991) also supports this suggestion.

In conclusion, the data presented here, indicate different means for *eIF-4E* and *eIF-iso4E* expression regulation in maize axes during germination. It is proposed that a translation regulation mechanism based on a selective recruitment of the *iso4E* transcript into polysomes accounts for the *eIF-iso4E* expression early in germination. The *eIF-4E* mRNA expression, however, seems to be under transcriptional regulation, particularly toward the end of the germination period.

**Acknowledgements** – The authors are grateful to Dr K. S. Browning for providing antibodies against the wheat p26 (*eIF-4E*) and p28 (*eIF-iso4E*) proteins, and to the MAFF Bank at Japan for supplying the cDNA clones from rice p26 and p28 proteins. They also wish to thank Dr Javier Plasencia and Dr Jorge Vázquez Ramos for critical reviews of the manuscript. This research was supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), UNAM, grants no. IN217496 and IN 201398. T. D. D. was the recipient of a fellowship from the Latin American Botany Network, UNAM grants PADEP, 030514 and 202340 and currently receives a PhD fellowship from DGAPA.

## References

- Allen ML, Metz AM, Timmer RT, Rhoads RE, Browning KS (1992) Isolation and sequence of the cDNAs encoding the subunits of the isozyme form wheat protein synthesis initiation factor 4F. *J Biol Chem* 267: 23232–23236.
- Beltrán-Peña E, Ortiz-López A, Sánchez de Jiménez E (1995) Synthesis of ribosomal proteins from stored mRNAs early in seed germination. *Plant Mol Biol* 28: 327–336.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254.
- Browning KS (1996) The plant translational apparatus. *Plant Mol Biol* 32: 107–144.
- Browning KS, Humphreys J, Hobbs W, Smith GR, Ravel JM (1990) Determination of the amounts of the protein synthesis initiation and elongation factors in wheat germ. *J Biol Chem* 265: 17967–17973.
- Browning KS, Webster C, Roberts JKM, Ravel JM (1992) Identification of an isoform of protein synthesis initiation factor 4E in plants. *J Biol Chem* 267: 10096–10100.
- Carberry SE, Goss DJ (1991) Wheat germ initiation factors 4E and *iso4E* interact differently with oligoribonucleotide analogues of rabbit  $\alpha$ -globin mRNA. *Biochemistry* 30: 4542–4545.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Singlestep method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156.
- Futterer J, Hohm T (1996) Translation in plants – rules and exceptions. *Plant Mol Biol* 32: 189–189.
- Gallie DR (1996) Translational control of cellular and viral mRNAs. *Plant Mol Biol* 32: 145–158.
- Gallie DR, Le H, Caldwell C, Tangiary RL, Hoang NX, Browning KS (1997) The phosphorylation state of translation initiation factors is regulated developmentally and following heat shock in wheat. *J Biol Chem* 272: 1046–1053.
- Gallie DR, Le H, Tangiary RL, Browning KS (1998) Translation initiation factors are differentially regulated in cereals during development and following heat shock. *Plant J* 14: 715–722.
- Gingras AC, Kennedy SG, O'Leary MA, Sonenberg N, Hay N (1998) *4E-BP1*, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by Akt (PKB) signaling pathway. *Genes Dev* 12: 502–513.
- Manjunath S, Williams AJ, Bailey-Serres J (1999) Oxygen deprivation stimulates  $Ca^{2+}$  mediated phosphorylation of mRNA cap-binding protein *eIF-4E* in maize roots. *Plant J* 19: 21–30.
- Manfield A (1991) Protein blotting using polysaccharide fluoride membranes. In: *Dunbar HS (ed) Protein Blotting: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, NY, pp 33–52. ISBN 0-19-963437-8.
- Mathews MB (1996) Origins and targets of translational control. In: Hershey JWR, Mathews MB, Sonenberg N (eds) *Translational Control*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp 1–29. ISBN 0-87969-458-0.
- Metz AM, Timmer RT, Browning KS (1992) Isolation and sequence of a cDNA encoding the cap binding protein of wheat eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E. *Nucleic Acids Res* 20: 4096.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473–497.
- Pain VM (1996) Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells. *Eur J Biochem* 236: 747–771.
- Pause A, Belsham GJ, Gingras AC, Donze O, Lin TA, Lawrence JC, Sonenberg N (1994) Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5-cap function. *Nature* 371: 762–767.
- Rau M, Ohlmann T, Morley SJ, Pain VM (1996) A reevaluation of the cap-binding protein *eIF-4E* as a rate limiting factor for initiation of translation in reticulocyte lysate. *J Biol Chem* 271: 8983–8990.
- Rhoads RC, Joshi B, Minich WB (1994) Participation of initiation factors in the recruitment of mRNA to ribosomes. *Biochimie* 76: 831–838.
- Rodríguez CM, Friere MA, Camilleri C, Robaglia C (1998) The *Arabidopsis thaliana* cDNAs coding for *eIF4E* and *eIF(iso)4E* are not functionally equivalent for yeast complementation and are differentially expressed during plant development. *Plant J* 13: 465–473.
- Rtud KA, Kuhlow C, Goss DJ, Browning KS (1998) Identification and characterization of a novel cap-binding protein from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 273: 10325–10330.
- Sánchez de Jiménez E, Aguilar R (1984) Protein synthesis patterns: Relevance of old and new messenger RNA in germinating maize embryos. *Plant Physiol* 75: 231–234.
- Sánchez de Jiménez E, Aguilar R, López S (1981) Distinctive characteristics of protein synthesis in maize embryos during the early stages of germination. *Biochem Biophys Res Commun* 99: 445–450.

Sánchez de Jiménez E, Aguilar R, Dinkova TD (1997) S6 ribosomal protein phosphorylation and translation of stored mRNA in maize. *Biochimie* 79: 187-194

Sha M, Wang Y, Xiang T, van Heerden A, Browning KS, Goss DJ (1995) Interaction of wheat germ protein synthesis initiation factor eIF(iso)4F and its subunits p28 and p36 with m<sup>7</sup>GTP and mRNA analogues. *J Biol Chem* 270: 29904-29909

Sonenberg N (1996) mRNA 5' Cap-binding protein eIF-4E and control of cell growth. In: Hershey JWB, Mathews MB, Sonenberg N (eds) *Translational Control*. Cold Spring Harbor Labo-

ratory Press, Cold Spring Harbor, NY. pp 245-269. ISBN 0-87969-458-0

Waskiewicz AJ, Johnson JC, Penn B, Mashlingam M, Kimball SR, Cooper JA (1999) Phosphorylation of the Cap-binding protein eukaryotic translation initiation factor 4E by protein kinase Mnk1 in vivo. *Mol Cell Biol* 19: 1871-1880

Zapata JM, Maroto F.G, Sierra JM (1991) Purification and characterization of eukaryotic polypeptide chain initiation factor 4F from *Drosophila melanogaster* embryos. *J Biol Chem* 266: 16007-16014

**CAPITULO III**  
**REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL FACTOR  $\alpha$ FIS04E DE MAIZ A NIVEL**  
**TRADUCCIONAL**

### **3.1 MATERIALES Y METODOS**

Los materiales y métodos utilizados en este capítulo están descritos con detalle en el artículo que se anexa a continuación (artículo 2). Las metodologías adicionales que no están incluidas en este artículo se describen a continuación.

#### **3.1.1 Inhibición de la transcripción por $\alpha$ -amanitina durante la germinación.**

Se tomaron 750 mg de ejes embrionarios procedentes de semillas de maíz, variedad "Chalqueño", y se imbibieron por 5 min en una solución de  $\alpha$ -amanitina ( $12 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) mediante aplicación de vacío. Posteriormente, los ejes se sembraron en medio MS (Murashige & Skoog, 1962) libre de hormonas y se dejaron germinar por 6, 12 y 24 horas.

#### **3.1.2. Estimulo mediante ácido indol acético (AIA) durante la germinación.**

Se germinaron aproximadamente 100 semillas de maíz por 24 horas. A las 22 h de germinación se extrajeron los ejes embrionarios y se incubaron en presencia de medio MS (Murashige & Skoog, 1962) solo (control); medio MS con  $200 \mu\text{M}$  de AIA o medio MS con  $200 \mu\text{M}$  de Dicamba (una auxina sintética), por las restantes 2 h.

#### **3.1.3. Análisis de mensajes a nivel de ARN total y ARN polisomal.**

Este análisis se realizó según las metodologías descritas en el Artículo 1; Capítulo 1.

## 3.2 RESULTADOS

Los resultados descritos en esta sección indican que la isoforma eIFiso4E, a diferencia de la isoforma eIF4E está sujeta a control traduccional durante la germinación temprana de maíz. Los niveles del factor eIFiso4E dependen de una activa síntesis *de novo* de su proteína, la cual está regulada a nivel de reclutamiento de su ARNm a polisomas para su traducción. En este mecanismo de regulación participa una vía de transducción de señales similar a la descrita para insulina en mamíferos. Sin embargo, a diferencia de los mamíferos, en plantas el mecanismo de regulación no parece operar a través de proteínas inhibitorias que se unen a eIF4E (4E-BPs; Figura 4, Capítulo I), sino a través de un control traduccional sobre la expresión de eIFiso4E que involucra la fosforilación de la pr S6 (Figura 4, Capítulo I) y/o de otros factores que pueden estar participando a nivel de movilización de mensajes a polisomas. De manera adicional se encontró que el estímulo con auxinas durante la germinación de maíz también incrementa la movilización del ARNm de eIFiso4E a polisomas. Estos datos señalan la posibilidad de comunicación entre diferentes vías de transducción de señales en plantas que podrían tener como blanco común la fosforilación de la pr S6.

### 3.2.1 Artículo 2: "Expression of maize initiation factor eIFiso4E is regulated at translational level"



**EXPRESSION OF MAIZE INITIATION FACTOR *elFiso4E* IS REGULATED AT  
TRANSLATIONAL LEVEL**

**Tzvetanka D. Dinkova, Raul Aguilar and Estela Sánchez de Jiménez<sup>1</sup>**

*Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de  
México (UNAM), 04510, México, D.F.*

**<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed:**

Dr. Estela Sánchez de Jiménez  
Depto. de Bioquímica, Fac. de Química  
UNAM, 04510, México, D.F.  
Tel: 52-5-6225278  
Fax: 52-5-6225329  
e-mail: [estelas@servidor.unam.mx](mailto:estelas@servidor.unam.mx)

submitted to: *The Biochemical Journal*

*Translational regulation of maize eIFiso4E*

Abbreviations used: CHX, cycloheximide; DTT, dithiothreitol; 4E-BP, 4E binding protein; RRL, rabbit reticulocyte lysate; rp, ribosomal protein; TOP, tract of oligopyrimidines; 5'UTR, 5' untranslated region; WGE, wheat germ extract

**Key words:** *S6 rp phosphorylation, 5' TOP transcript, transcript recruitment into polysomes*

## Abstract

Mechanisms for gene expression regulation at the translational level have been reported at specific developmental stages in eukaryotes. Control of translation initiation 4E factor availability by insulin/growth factors constitutes a main point of translational regulation. The aim of the present research is to understand the regulatory mechanism(s) behind the differential expression of two main 4E factors present in maize embryonic axes during germination. *De novo* synthesis of eIFiso4E initiates earlier and is faster than that of eIF4E in maize axes. Insulin addition to maize axes stimulated *de novo* synthesis for the eIFiso4E protein, but not that of eIF4E. Specific recruitment of the eIFiso4E transcript into polysomes was observed in these axes after insulin stimulation. Inhibitors of the insulin signal transduction pathway, wortmannin and rapamycin, reverted the insulin effect. *In vitro* translation of maize poly A<sup>+</sup> RNAs by S6 ribosomal protein (rp) phosphorylated ribosomes demonstrated a strong increase in eIFiso4E synthesis, as compared with its translation by S6 rp non-phosphorylated ribosomes. Other mRNAs from the poly A<sup>+</sup> RNA set, including the eIF4E mRNA, did not show differential translation in regard to the S6 phosphorylated status of the ribosomes. The overall results indicate that eIFiso4E, but not eIF4E cell content, is regulated by *de novo* synthesis in maize axes during germination, most probably by specific mRNA recruitment into polysomes via a signal transduction pathway involving S6 rp phosphorylation.

## INTRODUCTION

One of the most important targets of protein synthesis regulation in eukaryotes is the translation initiation factor 4E, known as cap-binding protein [1]. Plants have shown to contain two main different isoforms of this protein, named eIF4E and eIFiso4E [2]. Differential expression patterns at protein level have been found for these factors at specific developmental stages [3]. The eIFiso4E protein is present at higher levels with respect to eIF4E in wheat germ extract [4] and maize embryonic axes [5], both representing quiescent tissues. In *Arabidopsis thaliana*, it was demonstrated that the corresponding mRNA isoforms display differential tissular distribution: eIFiso4E is expressed only in floral organs and developing tissues, whereas eIF4E is in most mature plant tissues [6].

In several eukaryotes, others than plants, the eIF4E free level is regulated by binding proteins (4E-BPs), which form inactive complexes with this factor. Phosphorylation of the binding proteins releases the active 4E factor [7]. In mammals, the presence of at least three different isoforms for 4E-BP has been reported [8,9]. Furthermore, in these organisms the enhancement or inhibition of eIF4E activity via 4E-BP interaction is regulated by hormonal stimuli, particularly insulin [10,11].

In plants, the mechanism regulating eIF4E isoform activity is especially intriguing, since no 4E-BPs seem to be present in these organisms. It has been proposed that regulation of the relative abundance of the two eIF4E isoforms would account for differential protein synthesis patterns associated to a specific developmental stage or environmental conditions [3,6]. However, at present there is no information on the regulatory mechanism of eIF4E and eIFiso4E activity [12].

During early maize germination, significant *de novo* synthesis of the eIFiso4E, but not of the eIF4E protein has been demonstrated, suggesting differential mechanisms regulating the expression of these isoforms at this developmental stage [5]. Previous work in our laboratory has shown that a mechanism of translational control regulates ribosomal protein synthesis in maize axes. This pathway, which involves the enhancement of S6 rp phosphorylation on the 40S ribosomal subunit, was demonstrated to be insulin-stimulated [13] in a similar manner as reported for other eukaryotes [10]. Indeed, in animal cells, insulin and several growth factors/mitogens are known to stimulate this signal transduction pathway that also induces preferential translation of the so-called 5'TOP mRNAs, with a specific tract of oligopyrimidines (TOP) at their 5'untranslated region (5'UTR). Transcripts encoding proteins of the translational apparatus, such as eEF1 $\alpha$  and rp mRNAs have been found among the 5'TOP mRNAs [14-16].

Taking into account the apparent absence of 4E-BPs and the differential expression patterns of the two 4E isoforms in plants, it was considered relevant to test whether maize eIFiso4E and/or eIF4E cell content is regulated at the translational level, by the signal transduction mechanism mentioned above.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Biological system

Maize (*Zea mays* L.) seeds of a Mexican land race variety (Chalqueño) were used for all experiments. The seeds were germinated for 3, 6, 9 or 21 h by water imbibition on moisturised cotton, in the dark at 25 °C, in an incubator (Griffin). The embryonic axes were manually excised and incubated for 3 h in sterile MS [17] liquid medium (1.5 mL g<sup>-1</sup> axes) for each treatment [13].

### *De novo* protein synthesis system

*De novo* synthesis of eIF4E and eIFiso4E proteins was analysed by addition of [<sup>35</sup>S]-methionine (11.1 × 10<sup>6</sup> Bq mL<sup>-1</sup>) to the axes in the incubation medium (MS), supplemented or not with insulin (200 μU mL<sup>-1</sup>) for the last 2 h of incubation. To inhibit *de novo* protein synthesis, 70 μM CHX was added to the medium during the same period, a dose sufficient to block 95 % of protein synthesis in maize axes [18]. For some experiments, the excised axes were preincubated for 1 h with 0.01 μM of either wortmannin or rapamycin prior to insulin addition. At the end of the incubation period, axes were washed and the eIF4F complexes (eIF4E and eIF4G) were purified by <sup>7</sup>mGTP-Sepharose affinity chromatography as described previously [5] and resolved by SDS-PAGE. The patterns of *de novo* synthesised proteins produced under labelling conditions were analysed by fluorography of the dried SDS-gels.

### Identification of proteins by SDS-PAGE and Western blot

The <sup>7</sup>mGTP-bound proteins specifically eluted from the affinity column were concentrated in Amicon Centricon 10 concentrators (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) and resolved by 13 % SDS-PAGE. The proteins were blotted onto PVDF membrane

(Millipore), which was blocked with 5% milk for 1 h, followed by overnight incubation at 4 °C with mouse polyclonal antiserum against wheat eIF4E or eIFiso4E, kindly donated by Dr. K.S. Browning (University of Texas, Austin), at a 1:1000 dilution. The membrane was then incubated for 2 h with anti-mouse horseradish peroxidase-labelled conjugate antibody at a 1:3000 dilution. Immunodetection was performed by enhanced chemoluminescence (ECL) reagents (APBiotech, Uppsala, Sweden) and autoradiography. The <sup>7</sup>mGTP-eluted proteins, as well as the total cytoplasmic proteins from maize extracts, were also blotted to PVDF membrane and tested against human 4E-BP1 and 4E-BP2 antiserum (a gift from Dr. N. Sonenberg, University of Quebec, Montreal), at a 1:1000 dilution similarly as described above.

#### **Polysomal and total RNA analysis by Northern blots**

Total RNA was isolated from 0.4 g embryonic axes by a procedure modified for tissues enriched in polysaccharides [19]. The method was essentially the same as described previously by Chomczynski and Sacchi [20], except for an additional step after the phenol extraction. The last consisted of 1 h polysaccharide precipitation on ice by addition of an equal volume of 2 M KAc, followed by centrifugation at 44 000 g. Polysomal fractionation and further RNA isolation were achieved by the method previously described [21]. Polysomal and total RNAs were resolved on 1.2 % agarose, 6% formaldehyde gels. Twenty micrograms of denatured polysomal RNA or 30 µg of total RNA were used per lane. The RNAs were blotted onto a nylon membrane (APBiotech), UV-crosslinked (UV Stratalinker, Stratagene, La Jolla, CA, USA) and hybridised with specific [<sup>32</sup>P]-labelled cDNAs.

### **Molecular probes**

The cDNA probes used in the Northern blot analysis were purified as fragments from the correspondent plasmids as follows: from *S4954*, a 1.04 kb *Sal I* - *Not I* fragment containing rice eIF4E cDNA and from *R0456* a 1.10 kb *Sal I* - *Not I* fragment containing rice eIFiso4E cDNA, donated by the MAFF DNA Bank; from *O1A12* a 0.55 kb *Xba I* - *Sal I* fragment containing maize S6 rp cDNA [22], donated by Theresa Musket (University of Missouri-Columbia). The cDNA inserts were labelled with [<sup>32</sup>P]dCTP by random priming (NEN's Random Primer Extension Kit, Boston, MA, USA) according to manufacturer's instructions.

### ***In vitro* translation experiments**

Rabbit reticulocyte lysate (RRL) from the *in vitro* translation system (Roche Diagnostics) was ribosome-depleted by 1 h centrifugation at 250 000 g. Translation reactions were set with this lysate (40 % of total volume) supplemented with maize ribosome at 400 µg mL<sup>-1</sup> (measured by OD<sub>260</sub>). The ribosomes were obtained from either 3 h-germinated embryonic axes (non-phosphorylated ribosomes, at the S6 rp), 24 h-germinated axes (phosphorylated ribosomes) or insulin-stimulated 24 h-germinated axes (highly-phosphorylated ribosomes) [13,23,24]. The translation system was also supplemented with [<sup>35</sup>S]-methionine (3.7 x 10<sup>6</sup> Bq mL<sup>-1</sup>) and 8 µg of poly A<sup>+</sup> RNA obtained from the total RNA pool of 24 h-germinated axes, in a total volume of 100 µL. The translation reaction was allowed to proceed at 30 °C for 1 h. At the end of incubation, eIFiso4E or eIF4E proteins were purified from the *in vitro* translated mixture by <sup>7</sup>mGTP-affinity chromatography and detected by immunoblotting as described above. The label incorporated into each 4E isoform was determined by liquid



scintillation counting of the corresponding band. Results were corrected with the value of [<sup>35</sup>S]-methionine incorporated into total proteins per each reaction. An *in vitro* translation control reaction for each maize ribosome set was performed with 2 μg of β-globin mRNA and incubated for 1 h under the stated conditions.

## RESULTS

### Maize initiation factor iso4E, but not 4E, is dependent on *de novo* synthesis early during germination

The eIF4E and eIFiso4E mRNAs and proteins were already demonstrated to be present in quiescent mature maize axes [5]. To undertake the investigation of the mechanism regulating the expression of these factors during germination, the levels of eIF4E and eIFiso4E proteins were tested at 6, 9, 12 and 24 h of germination in the absence or the presence of CHX, an inhibitor of translation. The protein levels of these factors were estimated in the <sup>7</sup>mGTP-bound fraction of total cytoplasmic proteins obtained from 100 embryonic axes. The eIFiso4E protein progressively declined at 12 and 24 h until depletion, when the translation inhibitor was present, in contrast to the steady protein level found under control conditions (Fig. 1). The accumulation of the eIF4E protein was affected by the presence of CHX, however, its level remain constant under the condition of translation inhibition at 9, 12 and 24 h. These results suggest high eIFiso4E turnover during germination, and need of active translation to keep up the eIFiso4E protein level. In contrast, the eIF4E isoform displays higher stability and lower dependence on translation than eIFiso4E during the same period.

*De novo* synthesis of the two eIF4E isoforms was analysed in axes at early (6 h) and late (24 h) germination periods. After three hours axes exposure to [<sup>35</sup>S]-methionine, the translation initiation factors were purified and resolved by SDS-PAGE. The correspondent fluorography showed that eIFiso4E is actively *de novo* synthesised since early germination (6 h) and this synthesis increased toward the end of the period (24 h) (upper arrow; Fig. 2a). The eIF4E protein incorporated the labelled precursor at 24 h of germination and at lower

levels than eIFiso4E. It shall be pointed out that both isoforms contain equal number of methionines per molecule [25].

#### **Negative immunodetection of 4E-binding proteins in maize tissue extracts**

To analyse whether 4E-BPs are present or not in maize extracts, immunoblot of total cytoplasmic and <sup>7</sup>mGTP-specifically eluted proteins from maize axes was performed against human 4E-BP antibodies (Fig. 3). Wheat germ extract and RRL were also used as negative and positive controls, respectively. Results revealed the presence of two main cross-reacting peptides for 4E-BP1 in the RRL, as well as in its <sup>7</sup>mGTP-bound fraction (Fig. 3; lanes 5,6), in accordance with results in the literature [7,9]. However, cross-reacting peptides with 4E-BP1 antibody in both, the <sup>7</sup>mGTP-bound fraction and the total cytoplasmic proteins were not found for either maize or wheat germ (Fig. 3; lanes 1-4). Similar results were obtained with the 4E-BP2 antibody (data not shown). These data most probably indicate the absence of eIF4E or eIFiso4E binding protein homologues to mammalian 4E-BPs in maize or wheat tissues as previously reported [7].

#### **eIFiso4E *de novo* synthesis is regulated by selective mRNA recruitment into polysomes**

Insulin and insulin-like growth factors are known to stimulate 5'TOP mRNA translation in several eukaryotes by transcript selective recruitment into polysomes [16]. A similar effect has been documented in maize germinating axes [13]. Here, it was addressed whether insulin has any effect on either eIFiso4E or eIF4E transcript recruitment into polysomes for *de novo* synthesis of these proteins in maize axes.

Insulin addition to the germinating axes at two stages (6 h and 24 h) induced a large increase in eIFiso4E [<sup>35</sup>S]-methionine incorporation, particularly at 24 h of germination (Fig. 2a; lane 4). For eIF4E synthesis, however, the insulin-stimulation could be considered

as low (Fig. 2a; lane 3). The densitometric analysis of the insulin-stimulated label incorporation at 24 h showed a significant increment, of almost 4x for [<sup>35</sup>S]-methionine incorporation above the control, in the eIFiso4E protein, whereas the label incorporated into eIF4E was incremented at lower extent (1.5x), considered as non-significant from the standard deviation of three replicates (Fig. 2b).

The insulin-stimulated [<sup>35</sup>S]-methionine incorporation into eIFiso4E could be either the result of increased translation by selective transcript mobilisation into polysomes or due to an increase in the total amount of the correspondent mRNA in tissues. To discriminate between these possibilities, Northern blots were performed for both factors in polysomal and total axes RNAs. S6 rp mRNA was used as positive control for mRNA mobilisation into polysomes, since specific recruitment of this transcript into polysomes has been demonstrated in insulin-stimulated axes [13]. The amount of 18S rRNA was used as loading control. Results indicate increased eIFiso4E transcript in the polysomal RNA fraction in insulin-stimulated axes at 24 h of germination (Fig. 4a; lanes C, I), similar to the S6 rp transcript. Interestingly, addition of either wortmannin or rapamycin (inhibitors of the insulin signal transduction pathway [10]) to the axes, previous to insulin, decreased the amount of both eIFiso4E and S6 rp transcripts in the polysomal RNA fraction to levels even below the control (Fig. 4a, lanes I+W, I+R). In contrast to these observations, neither insulin nor the inhibitors affected eIF4E transcript recruitment into polysomes (Fig. 4a).

To test whether the insulin effect on eIFiso4E was specifically exerted at the level of polysomal recruitment and not due to mRNA accumulation, a Northern blot analysis was also performed with total RNA extracts. eIFiso4E, as well as S6 rp, total transcript levels did not show increase after insulin addition to the 24-h germinating axes (Fig. 4b). On the

contrary, a slight decrease in total mRNA levels for these transcripts could be detected under insulin presence. The addition of wortmannin or rapamycin restored the control transcript levels (Fig. 4b). These data allow to propose that the main insulin effect in the axes is to up-regulate the recruitment of specific mRNAs, such as the eIFiso4E and S6 rp transcripts, into polysomes. One possible explanation for the changes observed in the steady state total mRNA level could be an accelerated transcript degradation occurring concomitantly with the translation process.

### **S6 rp phosphorylation and eIFiso4E *in vitro* translation**

Insulin stimulation of 5'TOP transcript recruitment into polysomes is known to correlate with S6 rp phosphorylation increment on the 40S ribosomal subunit [14,15]. This mechanism is also known to work in plants, as demonstrated in embryonic axes during maize germination [13]. To learn if S6 rp phosphorylation is part of the mechanism regulating eIFiso4E mRNA recruitment into polysomes by insulin stimulation, the following experiment was performed. Poly A<sup>+</sup> mRNAs obtained from 24 h-germinated axes were *in vitro* translated in ribosome-depleted RRL system supplemented with different sets of maize ribosomes. The endogenous ribosomes of the RRL system were substituted by S6 rp non-phosphorylated (np), phosphorylated (p) or highly-phosphorylated (hp) maize ribosomes (see Experimental Procedures). After 30 minutes of synthesis, eIF4E and eIFiso4E proteins were purified by affinity chromatography from the translation mixture and identified by Western blot analysis among the translation products (Fig. 5a). The [<sup>35</sup>S]-methionine incorporation into each 4E isoform was quantified by liquid scintillation counting. The results showed that the synthesis of eIF4E and eIFiso4E have distinctive dependence on S6 rp phosphorylation in the ribosome (Fig. 5b). The eIF4E isoform was

similarly translated by either of the translation systems tested, regardless of the phosphorylation status of their ribosomes. On the other hand, a clear difference was found for eIFiso4E synthesis, depending on the phosphorylation status of the ribosomes. The system with maize (np) ribosomes poorly translated eIFiso4E, whereas the best translation of this protein was obtained in the system with the (hp) ribosomes (Fig. 5b). As control for the translation specific efficiency of the maize ribosome sets, alternate mRNAs were tested in the same translation systems:  $\beta$ -globin mRNA or whole maize poly A<sup>+</sup> RNAs (Table 1). Each of the mRNA sources was almost equally well translated by the reconstituted systems with any of the maize ribosomes, although maize (np) ribosome set showed a general slightly less *in vitro* translation efficiency than the other two (Table 1). Thus, the phosphorylated status of the ribosomes showed no distinctive difference on translation efficiency when tested either with  $\beta$ -globin, eIF4E mRNA, or total maize poly A<sup>+</sup> mRNAs. However, a clear positive correlation can be established between the level of S6 rp phosphorylation and the amount of [<sup>35</sup>S]-methionine incorporated into the eIFiso4E protein, indicating a selective recognition of this mRNA by S6 rp phosphorylated ribosomes (Fig. 5b; Table 1). Notice that, in these experiments, only one product was found for the maize eIF4E, in contrast to the doublet observed by Western blot in the native maize extracts (Fig. 1). This finding strongly suggests that the doublet corresponds to only one peptide, the eIF4E and its post-translationally phosphorylated form, as previously described [25].

## DISCUSSION

During the first hours of germination a switch from negligible to very active metabolism has been observed in embryonic axes [26]. Particularly, the translation process is reinitiated and synthesis of new proteins based on stored and later on newly synthesised transcripts is detected [27]. Thus, mechanisms of translational control are expected to be at least partially responsible for producing the precise types and amounts of the proteins required in the axes to reach successful germination.

Distinctive expression patterns for the two translation initiation factors, eIF4E and eIFiso4E, have been previously reported in maize axes during germination [5]. The levels of these factors are determinant for translation of cap-dependent transcripts [23], probably by discriminating among different mRNA cap structures, based on different affinity constants [28]. Hence, regulation of maize eIF4E and eIFiso4E expression must be relevant for the production of the precise newly synthesised proteins required for seed germination. Considering the apparent lack of 4E-BP proteins in plants (Fig. 3; and [7]), regulation of eIF4E free levels in maize most probably does not follow the mechanism reported for other non-plant organisms [1]. It is likely that here the mechanism would greatly rely on *de novo* synthesis regulation of each 4E isoform. Indeed, eIFiso4E level in axes largely depends on its synthesis during germination, whereas eIF4E does not (Fig. 1). Also, eIFiso4E, but not eIF4E, synthesis is selectively enhanced under insulin stimulation (Fig. 2).

Insulin-mediated mRNA mobilisation into polysomes has been reported for specific mRNAs carrying the 5'TOP sequence [16], among which rp and elongation translation factor mRNAs have been found [14-16]. A similar regulatory mechanism has also been proposed to exist in plants [29,30] and demonstrated particularly in maize for rp mRNA

translation [13]. Further support for the presence of this mechanism in maize axes is provided by the effect of the insulin signal transduction pathway inhibitors, wortmannin and rapamycin, which inhibited recruitment-stimulation into polysomes of both, the eIFiso4E and S6 rp mRNAs (Fig. 4a, lanes I+W, I+R). Thus, the selective mobilisation of eIFiso4E mRNA into polysomes, after insulin addition, is most probably due, at least in part, to the activation, in maize, of a signal transduction pathway similar to the one reported to be activated by insulin in other eukaryotes [10,31]. An important component of this transduction pathway is the phosphorylation status of the S6 rp on the 40S ribosomal subunit [14,32]. Indeed, insulin-stimulation causes increased S6 rp phosphorylation in maize ribosomes of the target tissues [13]. For eIFiso4E mRNA, a consistent correlation was observed between its translation efficiency and the phosphorylation level of S6 rp in ribosomes (Fig. 5b). This correlation, however, was not observed for eIF4E mRNA translation or for other mRNAs in the same systems (Fig. 5a; Table 1).

It is proposed that the expression of the eIFiso4E isoform is regulated at the translational level by a mechanism similar to the one described for translation of 5'TOP mRNAs in other eukaryotes. In this mechanism, the S6 rp phosphorylation status contributes for the enhanced eIFiso4E synthesis observed under insulin-stimulated conditions [14]. These findings suggest that maize eIFiso4E transcript might be a member of the 5'TOP mRNA family and encourage further analysis of the 5'UTR nucleotide region of this mRNA, in search for the consensus oligopyrimidine tract.



**Acknowledgements:** We thank Dr. N. Sonenberg and Dr. K.S. Browning for the gift of human 4EBP1, 4EBP2 antisera and wheat eIF4E, eIFiso4E antisera, respectively. We are also grateful to the MAFF Bank in Japan and to the Maize Stock Centre in Missouri for the eIF4E, eIFiso4E rice clones and the S6 rp maize clones, respectively. We appreciate the helpful comments to the manuscript from Dr. Irma Bernal Lugo. This research was supported by Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA), UNAM, Grant No. IN201398. TDD had a PhD fellowship from DGEP and UNAM grants PAEP 030514 and 202340.

## REFERENCES

1. Sonenberg, N. (1996) In: *Translational Control* (Hershey, J.W.B., Mathews M.B. and Sonenberg, N., eds), pp. 245-269, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
2. Browning K.S. (1996) *Plant Mol. Biol.* **32**: 107-144.
3. Gallie, D.R., Le H., Tanguay R.L. and Browning K.S. (1998) *The Plant J.* **14**: 715-722.
4. Browning, K.S., Humphreys, J., Hobbs, W., Smith, G.B. and Ravel, J.M. (1990): *J. Biol. Chem.* **265**: 17967-17973.
5. Dinkova, T.D. and Sánchez de Jiménez E. (1999) *Physiol. Plant.* **107**: 419-425.
6. Rodríguez, C.M., Freire, M.A., Camilleri, C. and Robaglia, C. (1998) *The Plant J.* **13**: 465-473.
7. Pause, A., Belsham, G.J., Gingras, A.C., Donze, O., Lin, T.A., Lawrence, J.C. Jr. and Sonenberg, N. (1994) *Nature* **371**: 762-767.
8. Poulin, F., Gingras A.C., Olsen H., Chevalier S. and Sonenberg N. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**: 14002-14007.
9. Grolleau, A., Sonenberg N., Weitzerbin J. and Beretta L. (1999) *The J. of Immunol.* **162**: 3491-3497.
10. Kleijn, M., Scheper G.C., Voorma H.O. and Thomas A.A.M. (1998) *Eur. J. Biochem.* **253**: 531-544.
11. Sonenberg, N. and Gingras A.C. (1998) *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**: 268-275.
12. Bailey-Serres J. (1999) *Trends in Plant Science* **4**: 142-148.
13. Sánchez de Jiménez, E., Beltrán-Peña, E. and Ortiz-López, A. (1999) *Physiol. Plant.* **105**: 148-155

14. Jefferies, H.B.J., Reinhard, C., Kozma, S.C. and Thomas, G. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 4441-4445.
15. Terada, N., Patel H.R., Takase K., Kohno K., Nairn A.C. and Gelfand E.W. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 11477-11481.
16. Meyuhas, O., Avni, D. and Sharma, S. (1996) In: *Translational Control* (Hershey, J.W.B., Mathews M.B. and Sonenberg, N., eds), pp. 363-388, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
17. Murashige, T. and Skoog, F. (1962) *Physiol. Plant* **15**: 472-497.
18. Cruz-García, F., Zúñiga-Aguilar J.J and Vázquez-Ramos J. (1998) *Physiol. Plant* **102**: 573-581.
19. Cheng, S.-H. and Seemann J.R. (1998) In: *RNA isolation and characterization protocols* (Rapley, R. and Manning D.L., eds.), pp. 27-32, New Jersey, Humana Press.
20. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) *Anal. Biochem.* **162**: 156.
21. Beltrán-Peña, E., Ortíz-López, A. and Sánchez de Jiménez, E. (1995) *Plant Mol. Biol.* **28**: 327-336.
22. Schen, B., Carneiro N., Torres-Jerez I., Stevenson B., McCreery T., Helentjaris T., Baysdorfer C., Almira E., Ferl R.J., Habben J.E. and Larkins B. (1994) *Plant Mol. Biol.* **26**: 1085-1101.
23. Pérez-Méndez, A., Aguilar-Caballero, R. and Sánchez de Jiménez, E. (1993) *Plant Sci.* **94**: 71-79.
24. Sánchez de Jiménez, E., Aguilar, R. and Dinkova, T.D. (1997) *Biochimie* **79**: 187-194.
25. Manjunath, S., Williams, A.J. and Bailey-Serres, J. (1999) *The Plant J.* **19**: 21-30.

26. Bewley, J.D. and Black, M. (1994) In: *Seeds: Physiology of development and germination.*, Sd. edition (1994), pp. 147-196, New York, Plenum Press.
27. Sánchez de Jiménez, E. and Aguilar, R. (1984) *Plant. Physiol.* **75**: 231-234.
28. Carberry, S.E. and Goss, D.J. (1991) *Biochemistry* **30**: 4542-4545.
29. Shama, S. and Meyuhas O. (1996) *Eur. J. Biochem.* **236**: 383-388.
30. Turck, F., Kozma S.C., Thomas G. and Nagy F. (1998) *Mol. Cell Biol.* **18**: 2038-2044.
31. VonManteuffel, S.R., Dennis P.B., Pullen N., Gingras A.C., Sonenberg N. And Thomas G. (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17**: 5426-5436.
32. Bandi, H.R., Ferrari S., Krieg J., Meyer H. and Thomas G. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**: 4530-4533.

## Legend of Figures

**Figure 1. Translation inhibition effect on eIF4E and eIFiso4E protein levels during maize germination.** One hundred maize seeds were germinated for 6, 9, 12, and 24 hours. During the last 3 h the embryonic axes were excised and incubated in MS medium in the presence or not of 70  $\mu\text{M}$  CHX. Protein extracts were obtained from the axes at each germination period, the  $^7\text{mGTP}$ -binding proteins were purified, quantified (approximately 2.5  $\mu\text{g}$  each), electrophoresed and the levels of eIF4E and eIFiso4E factors were assessed by Western blot analysis with antibodies against the corresponding wheat proteins. Numbers refer to germination hours.

**Figure 2. Insulin stimulation of eIFiso4E *de novo* protein synthesis during maize germination.** (a) Maize seeds were germinated for 6 or 24 hours. Embryonic axes were excised and during the last 3 h incubated with  $11.1 \times 10^6$  Bq of [ $^{35}\text{S}$ ]-methionine and exposed (lanes 3 and 4) or not (lanes 1 and 2) to  $200 \mu\text{U mL}^{-1}$  insulin during the last 2 h. At the end of the period the axes were washed with water, the eIF4E and eIFiso4E factors were purified and analysed by electrophoresis and fluorography. (b) Evaluation of insulin stimulation was performed by densitometric analysis of the corresponding bands of either eIF4E or eIFiso4E from 100, 24 h-germinated axes in three replicates. Label incorporated into controls was considered as 100 % for each isoform. C: Control seeds. I: Insulin treated seeds. Vertical lines stand for standard deviation.

**Figure 3. Western blot analysis of 4E-BPs.** Total cytoplasmic proteins (T) and specifically <sup>7</sup>mGTP-Sepharose eluted proteins (E) obtained from maize embryonic axes, wheat germ, or rabbit reticulocyte were resolved on 13 % acrylamide-SDS gels, transferred to nitro-cellulose and assayed by immunoblotting against human 4E-BP antibodies (1:1000 dilution). Arrows indicate the 4E-BP1 peptides recognised in RRL as control.

**Figure 4. Insulin-induced enhancement of eIFiso4E expression by transcript recruitment into polysomes. Effect of insulin signal transduction pathway inhibitors.** Maize axes were germinated for 24 h under control conditions (C) or insulin (200  $\mu$ U mL<sup>-1</sup>) stimulated for the last 2 h (I). To test the effect of insulin inhibitors, the axes were exposed either to 0.1  $\mu$ M wortmannin (I+W) or to 0.1  $\mu$ M rapamycin (I+R) for 1 h previous to insulin addition. (a) Polysomal RNA was isolated from the indicated axes and analysed by Northern blot with cDNA probes for eIFiso4E, eIF4E, and S6 rp. (b) Total RNA was extracted from the same sets of maize axes and analysed by Northern blot with the correspondent probes as in (a). The densitometric analysis of the bands was corrected by loading control (shown at the bottom) and is represented at right for each blot.

**Figure 5. *In vitro* translation dependence on phosphorylated S6 rp ribosome.** An *in vitro* protein synthesising system was set with ribosome-depleted rabbit reticulocyte lysate supplemented with S6 rp non-phosphorylated (np), phosphorylated (p) or highly-phosphorylated (hp) maize ribosome. Poly A<sup>+</sup> mRNA from 24 h-germinated axes was used as a source of eIFiso4E and eIF4E mRNAs for translation in each system. Other translation conditions were as recommended by the manufacturer, including 3.7 x 10<sup>6</sup> Bq mL<sup>-1</sup> of

[<sup>35</sup>S]-methionine (Roche, Molecular Diagnostics, GmbH). Translation was allowed to proceed for 1 h at 30 °C. (a) The products of the reaction mixture were purified by <sup>7</sup>mGTP-affinity chromatography and analysed by electrophoresis/Western blot with eIFiso4E and eIF4E antibodies. (b) The bands corresponding to eIFiso4E and eIF4E were excised, counted for label incorporation by liquid scintillation counting (Packard scintillator) and the values are graphically represented after correction by total label incorporation in each reaction mixture bars. The results are the average of three independent *in vitro* translation reactions. Vertical lines stand for standard deviation.

**Table 1** *In vitro* translation of different mRNA sets by maize ribosome with different S6 rp phosphorylation level

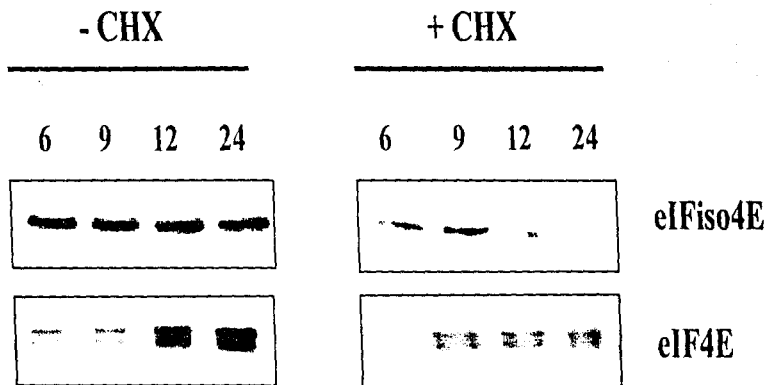
Type of ribosome*	mRNA source		eIF4E ‡	eIFiso4E ‡
	β-globin †	Maize poly A <sup>+</sup> RNA † (24 h of germination)	(% of total)	(% of total)
np	8.5	5.2	0.05	0.03
p	9.7	7.4	0.08	0.17
hp	10.6	7.2	0.08	0.26

† Protein synthesis values were calculated as the ratio between trichloroacetic acid precipitable radioactivity in ribosome supplemented and ribosome depleted RRL, after the translation reaction was allowed to proceed for 60 min (see Experimental procedures)

‡ The percent of radioactivity incorporated into either eIF4E or eIFiso4E protein was calculated from total cpm incorporated into trichloroacetic precipitable material of 100 μL translation reaction. Results are representative of three independent experiments

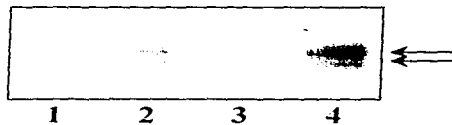
\* Ribosomes from maize embryonic axes obtained under different germination conditions (see experimental procedures)





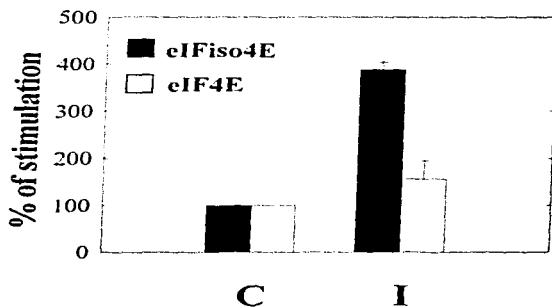
**a**

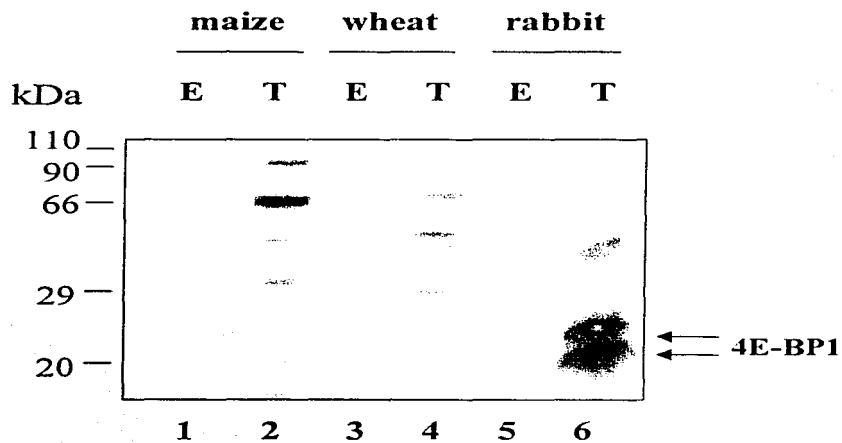
<b>h of germination</b>	<b>6</b>	<b>24</b>	<b>6</b>	<b>24</b>
<b>insulin</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>+</b>

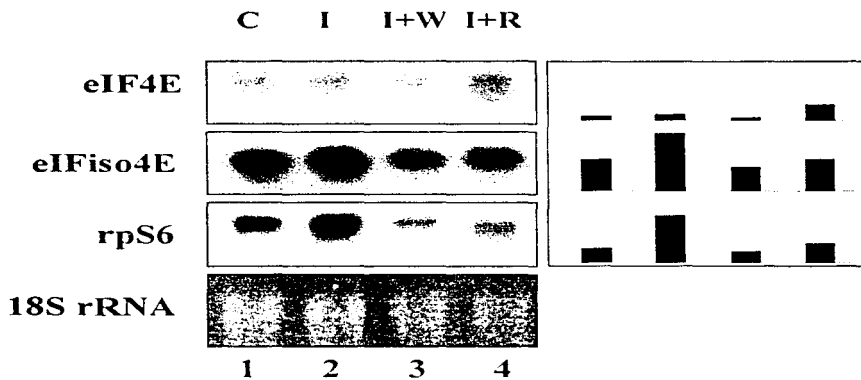
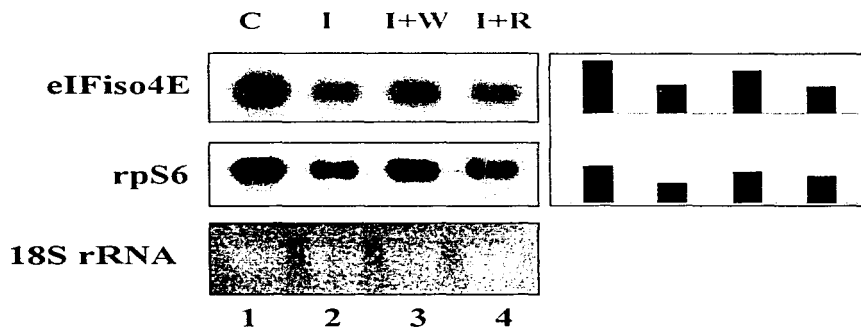


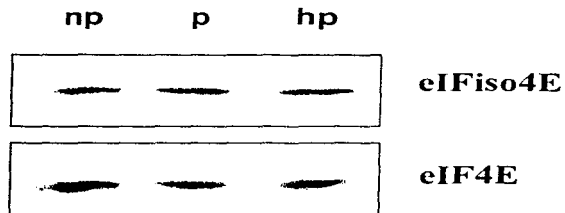
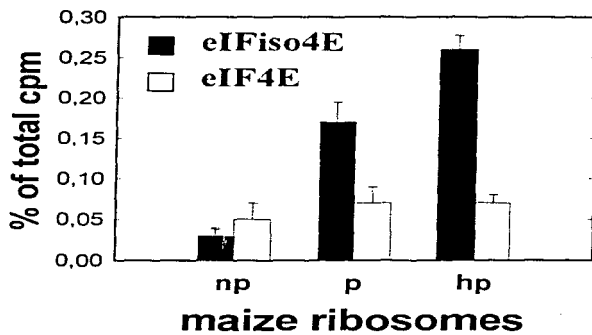
**eIFiso4E**  
**eIF4E**

**b**





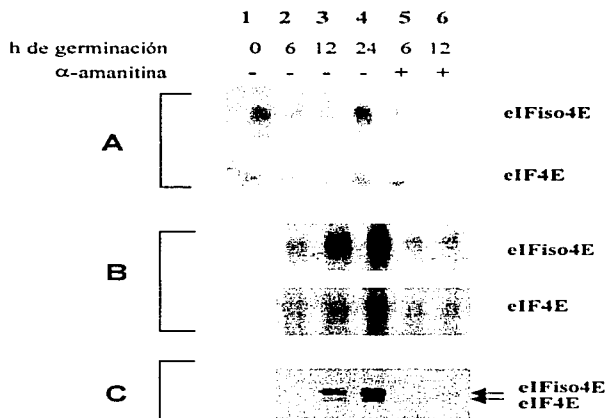
**a****b**

**a****b**

### 3.2.2 Otros resultados no incluidos en el artículo 2

#### 3.2.2.1 Efecto de $\alpha$ -amanitina sobre la expresión de eIF4E y eIFiso4E durante germinación temprana.

La  $\alpha$ -amanitina es un inhibidor potente de la transcripción mediada por RNA polimerasa tipo II. En el caso de maíz, se ha establecido que la concentración de  $12 \mu\text{g mL}^{-1}$  en la incubación de ejes embrionarios durante la germinación es capaz de inhibir el 95 % de la transcripción de genes (Beltrán-Peña *et al.*, 1995). El efecto de este inhibidor sobre los niveles de ARNm de los factores eIF4E y eIFiso4E en las fracciones de ARN total y de ARN polisomal se muestra en las Figuras 3.6a y 3.6b, respectivamente.



**Fig. 3.6 Efecto de  $\alpha$ -amanitina sobre la expresión de las isoformas eIFiso4E y eIF4E.** (A) Northern blot de ARN total obtenido de ejes embrionarios germinados por 0, 6, 12 y 24 h en presencia o ausencia de  $\alpha$ -amanitina. (B) Northern blot de ARN polisomal obtenido de los mismo ejes embrionarios de maíz que en A. (C) fluorografía de proteínas marcadas con [ $^{35}\text{S}$ ] – metionina *in vivo* por 3 horas durante los mismos periodos de germinación que en A y B.

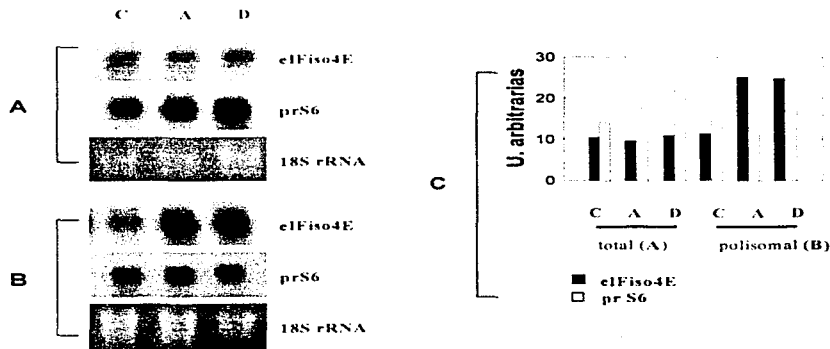
Se observa que durante las primeras 12 horas de germinación no hay transcripción *de novo* para los mensajes de ambas isoformas del factor eIF4E, ya que los niveles de transcritos no fueron afectados por la presencia del inhibidor de la transcripción e incluso se observa cierto incremento en su acumulación (Fig. 3.6a). Sin embargo, a nivel de mensajes movilizados a polisomas para su traducción, a 12 h de germinación, se observa una disminución significativa para eIFiso4E cuando se encuentra presente  $\alpha$ -amanitina, respecto a las condiciones control (Fig. 3.6b, carriles 3 y 6). Para el mensaje de eIF4E el efecto de  $\alpha$ -amanitina es menos significativo a nivel de ARN polisomal, aunque se puede observar una disminución ligera a 12 h de germinación (Fig. 3.6b, carril 6). Aunque  $\alpha$ -amanitina es un inhibidor de transcripción y no de traducción, su presencia pudiera afectar la síntesis de algún factor dependiente de transcripción involucrado como elemento *trans* en la movilización selectiva de eIFiso4E a polisomas y de esta manera afectar de manera indirectamente la traducción de su mensaje. Estos resultados de inhibición sobre la expresión de eIFiso4E por  $\alpha$ -amanitina se confirmaron con una menor incorporación de metionina marcada con [ $^{35}$ S] durante los mismos periodos de germinación (Fig. 3.6c).

### 3.2.2.2 Efecto de la presencia de auxinas sobre la expresión de eIFiso4E.

Es conocido el efecto de las auxinas sobre múltiples procesos fisiológicos en las plantas (Abel & Theologies, 1996). Sin embargo, el mecanismo de transducción de señales mediado por estas hormonas vegetales no se conoce completamente (Venis & Napier, 1997). Durante la germinación de maíz, en particular, se ha observado que las auxinas inducen la fosforilación selectiva de proteínas por la vía de liberación de  $Ca^{2+}$ , incluyendo a la pr S6 en la subunidad 40S del ribosoma (Pérez *et al.*, 1990; Beltrán-Peña *et al.*, en prep.).

Los resultados descritos en el Artículo 2, Fig. 5, muestran que la traducción *in vitro* de eIFiso4E depende del estado de fosforilación de la pr S6. Para averiguar si el estímulo con auxinas tiene un efecto sobre la expresión de eIFiso4E, se analizaron los niveles de mensaje tanto a nivel de ARN total, como a nivel de ARN polisomal. En la Fig. 3.7a se puede observar que ni AIA, ni Dicamba tienen efecto sobre la cantidad de mensaje en el pool de ARN total, lo cual evidencia que las auxinas no afectan la acumulación de eIFiso4E. Sin embargo, a nivel del grupo de ARNs polisomales se observa un notable

estímulo sobre la movilización de eIFiso4E (Fig. 3.7b,c). Esto indica que la vía de señales inducida por auxinas está conectada con un estímulo sobre la traducción de eIFiso4E a nivel de movilización de su mensaje a polisomas. A diferencia de eIFiso4E, para el mensaje de la pr S6 la presencia de auxinas representa un estímulo tanto en los niveles totales del transcrito como durante la traducción en su movilización a polisomas (Fig. 3.7a,c; Beltrán-Peña *et al.*, en prep.).



**Fig 3.7 Efecto de auxinas sobre los mensajes de eIF4E y eIFiso4E.** Ejes embrionarios de maíz germinados por 24 h se incubaron durante las últimas 2 h en presencia de: C; medio MS solo, A; medio MS suplementado con 200 μM de AIA y D; 200 μM de Dicamba. Los ARNs total (A) y polisomal (B) extraídos de estos ejes se separaron por electroforesis, se transfirieron a membrana y se hibridaron con las sondas correspondientes a eIFiso4E y a la pr S6. (C) Densitometría (Egleye, Stratagene) de las bandas representadas en A y B; (■) eIFiso4E, (□) pr S6.



#### **CAPITULO IV**

**LOS FACTORES eIF4E Y eIFiso4E, COMO PARTE DE LOS COMPLEJOS DE INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN eIF4F Y eIFiso4F SON CAPACES DE TRADUCIR DE FORMA DIFERENCIAL ARNm ESPECÍFICOS**

En este capítulo se describe la actividad diferencial de las dos isoformas del factor 4E de maíz formando parte de los correspondientes complejos eIF4F y eIFiso4F. Para evaluar la actividad se utiliza un sistema de traducción *in vitro* (IVT) en extracto de germen de trigo (WGE), donde se sustituyen los factores 4E endógenos por los de maíz. Se presentan los resultados obtenidos en la traducción de diferentes grupos de mensajes, incluyendo el grupo de mensajes almacenados en ejes embrionarios de maíz.

## 4.1 MATERIALES Y METODOS

### 4.1.1 Traducción *in vitro* de proteínas a partir de diferentes mensajes.

Los ensayos de traducción *in vitro* (IVT) se realizaron utilizando el sistema de extracto de germen de trigo (WGE) proveniente de *Roche, Molecular Diagnostics, Inc.* o de *Promega*. Las condiciones de traducción fueron establecidas según las recomendaciones de cada proveedor. Las reacciones se llevaron a cabo en presencia de 0.5 mCi mL<sup>-1</sup> de [<sup>35</sup>S]-metionina. Los extractos se depletaron de los complejos 4F e iso4F endógenos mediante una incubación por 45 min con <sup>32</sup>P-GTP-sefariosa a 4 °C. El resto del extracto se recuperó por centrifugación a 3 500 g por 3 min. Para cada experimento de traducción, el WGE se reconstituyó con los complejos 4F de maíz a una concentración similar a la cantidad correspondiente de 4F depletado (3.2 µg mL<sup>-1</sup> aproximadamente). Para determinar la actividad de los complejos eIF4F y eIFiso4F de maíz en WGE se utilizaron los siguientes extractos; E1: eIF4F/eIFiso4F purificados a partir de ejes embrionarios germinados por 24 h mediante cromatografía de afinidad (Materiales y Métodos, Artículo 1); E1a: eIF4F y E1b: eIFiso4F, purificados parcialmente a partir de la mezcla mediante cromatografía de intercambio aniónico; y E2: eIF4F/eIFiso4F obtenidos a partir de ejes embrionarios germinados por 24 h en presencia de cicloheximida (CHX) donde eIFiso4E se encuentra depletado (Materiales y Métodos, Artículo 2). Los ARNm utilizados en los experimentos de traducción *in vitro* se muestran en la Tabla 4.1.

**Tabla 4.1 Sistemas de traducción *in vitro* para evaluar la actividad de las isoformas eIF4E y eIFiso4E de maíz**

Fuente de ARNm	Fuente de factores eIF4E/eIFiso4E de maíz <sup>†</sup>			
	E1	E1a	E1b	E2
ARNs virales:				
- virus del mosaico de tabaco (TMV)	•	•	•	
- virus del bromo mosaico (BMV)	•			•
ARNm de levadura ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	•			
ARNm (poli A*) almacenados en ejes embrionarios de maíz	•	•	•	•

<sup>†</sup> el extracto de germen de trigo se reconstituyó con los diferentes extractos de las isoformas 4E de maíz definidos en Materiales y Métodos

• indica los extractos de las isoformas 4E que se utilizaron en el sistema de IVT para cada tipo de ARNm

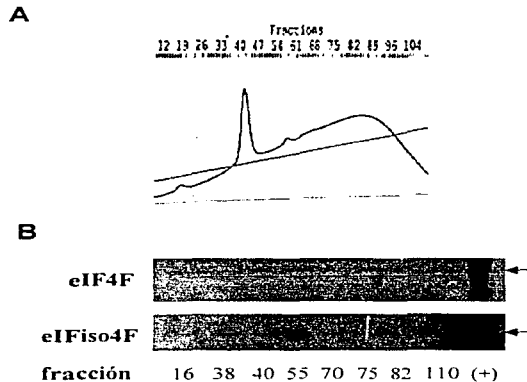
#### 4.1.2. Detección de los productos de traducción *in vitro*

La cinética de traducción se siguió mediante el análisis de incorporación de metionina marcada con [<sup>35</sup>S] a diferentes tiempos de incubación (0, 10, 20 y 30 min). A los tiempos indicados, se tomaron alícuotas de 1 µL y se depositaron sobre papel filtro 3 MM (1 cm de diámetro). Las proteínas se precipitaron sobre el papel hirviendo por 10 min en una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 10 %. Posteriormente los papeles se lavaron de manera consecutiva 2 veces con agua destilada, 2 veces con etanol y 2 veces con acetona. La radiactividad incorporada en las proteínas se determinó utilizando un contador de líquido de centelleo Packard.

En algunos experimentos los productos de la traducción *in vitro* se analizaron mediante electroforesis desnaturalizante en una dimensión (Laemmli, 1970) y en otros casos mediante electroforesis en dos dimensiones (O'Farrell, 1975). Los geles se trataron con reactivo de fluorografía Amplify (Amersham) previamente al secado y se expusieron a placas de rayos X (Kodak) entre 2-7 días.

#### 4.1.3 Separación de los complejos eIF4F y eIFiso4F por cromatografía de intercambio iónico

La mezcla de complejos eIF4F/eIFiso4F obtenida mediante cromatografía de afinidad, a partir de ejes embrionarios de maíz germinados (Materiales y Métodos; Artículo 1), se sometió a cromatografía de media presión (< 1 000 psi) en una columna de intercambio aniónico Bio-Scale MP10-Q2 (Bio-Rad) de 2 mL. La elución de la columna se realizó empleando 30 mL de un gradiente lineal desde 40 mM hasta 300 mM de KCl a velocidad de flujo de 1mL/min (Ponce, 1999). El perfil cromatográfico de la elución se muestra en la Fig. 4.1. Las fracciones correspondientes a cada pico se identificaron mediante electroforesis SDS-PAGE y Western blot (Materiales y Métodos; Artículo 1).

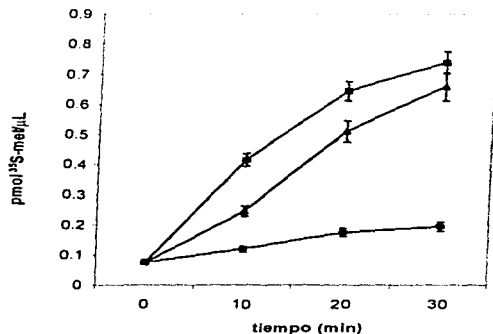


**Fig. 4.1** Separación de eIF4F y eIFiso4F de maíz. (A) Perfil cromatográfico (Abs a 280 nm) de las fracciones obtenidas por elución con gradiente de KCl (40 mM - 300 mM). (B) Identificación de las isoformas eIF4F y eIFiso4F en las fracciones mediante Western blot. Las flechas indican el factor eIF4G de 104 kDa en el complejo eIF4F y el factor eIFiso4E de 32 kDa en el complejo eIFiso4F.

## 4.2 RESULTADOS

### 4.2.1 Actividad de los complejos eIF4F y eFiso4F en sistemas de traducción *in vitro*

La actividad de las dos isoformas de los complejos eIF4F de maíz obtenidas por cromatografía de afinidad (E1) muestra una recuperación del 90 % aproximadamente respecto a la actividad inherente al sistema de germen de trigo (Fig. 4.2). Este valor de recuperación en IVT se obtuvo con la mezcla de factores aislados a partir de ejes embrionarios de maíz germinados por 24 h y utilizando el ARNm de TMV.



**Fig. 4.2 Actividad del extracto E1 de maíz en el sistema de traducción *in vitro* WGE.** (-■-) WGE nativo; (-●-) WGE depletado de factores 4F/iso4F endógenos; (-▲-) WGE reconstituido con el extracto E1 que contiene eIF4F/eFiso4F de maíz. (Dinkova & Sánchez de Jiménez, 1999). Fuente de ARNm: TMV

Valores similares se observaron en los sistemas de IVT donde se utilizaron como fuente de mensajes ARNm levadura y ARNm almacenados en ejes quiescentes de maíz (Tabla 4.2). Sin embargo, se puede observar que cada fuente de ARNm se afecta de manera

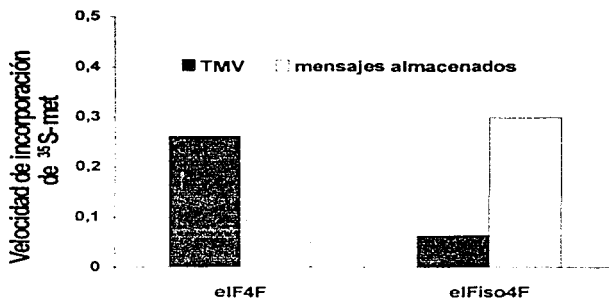
diferente por la depleción de los factores eIF4F endógenos de WGE y la sustitución por la mezcla 4F/iso4F.

**Tabla 4.2 Recuperación de la actividad de traducción en el WGE por el extracto E1 de maíz, utilizando diferentes fuentes de mensajes.**

	WGE nativo*	WGE depletado de factores 4F*	WGE reconstituido por el extracto E1 de maíz*
ARN viral TMV	52 (±5.4)	2.1 (±0.3)	48 (±2.9)
ARNm de levadura	31 (±2.6)	5.4 (±0.2)	30 (±2.4)
ARNm almacenados	27 (±4.1)	9.0 (±0.3)	29 (±3.1)

\* Cinética de traducción expresada en pmoles de [<sup>35</sup>S]-metionina 10<sup>-3</sup> min<sup>-1</sup>; los números entre paréntesis representan la desviación estándar (promedio de las pendientes obtenidas en 3 repeticiones)

Para investigar por separado la actividad de cada isoforma del complejo eIF4F en el sistema de IVT, se realizó la separación parcial de la mezcla eIF4F/eIFiso4F mediante cromatografía de intercambio iónico según reportes previos (Browning *et al.*, 1990; 1992). Aunque las isoformas no pudieron obtenerse de forma totalmente pura (Fig. 4.1), las fracciones 40 (130 mM KCl) y 55 (150 mM KCl) se seleccionaron como "enriquecidas" en eIF4F y eIFiso4F respectivamente (Fig. 4.1b). Para medir la actividad en el sistema de traducción *in vitro*, se utilizaron 4 ng de proteínas de cada fracción por cada µL de WGE depletado de factores 4F endógenos y 2 fuentes diferentes de ARNm: el TMV y los ejes quiescentes de maíz. Al comparar la velocidad de traducción, medida como la pendiente de la curva de incorporación de [<sup>35</sup>S]-metionina (cpm x 10<sup>-3</sup> min<sup>-1</sup>) en cada sistema, se observa que la fracción enriquecida en eIF4F tiene mayor actividad que la enriquecida en eIFiso4F en la traducción de TMV (Fig. 4.3). En cambio, para el grupo específico de ARNm almacenados de maíz, eIFiso4F muestra significativamente mayor actividad respecto a eIF4F.



**Fig. 4.3 Efecto de los complejos eIF4F y eIFiso4F de maíz sobre la traducción *in vitro* de los ARNm de TMV y los ARNm almacenados en semillas de maíz.** El WGE depletado de factores 4F/iso4F endógenos fue reconstituido con  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$  de proteína de las fracciones enriquecidas en eIF4F y eIFiso4F, obtenidas a partir de la separación por intercambio aniónico. Velocidad de incorporación:  $\text{cpm } 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ . El experimento fue reproducido 2 veces con resultados similares.

#### 4.2.2 Efecto de la depleción de eIFiso4E del extracto eIF4F/eIFiso4F sobre la traducción *in vitro* de diferentes ARNm

Se conoce que los virus de plantas poseen diversos mecanismos para lograr la traducción preferencial de los ARNs virales sobre los ARNm de la planta hospedera (Wang *et al.*, 1997; Hann *et al.*, 1997; Wells *et al.*, 1998). Uno de estos mecanismos involucra la mayor competitividad del ARN viral para cantidades limitantes de los componentes de la maquinaria de traducción, como los complejos eIFiso4F y eIF4F (Wang *et al.*, 1997). Paralelamente, existen secuencias reguladoras tanto en el extremo 5'UTR, como en el 3'UTR de los ARNm de plantas que modulan su expresión a nivel traduccional, dependiendo de las condiciones de desarrollo y ambientales (Bailey-Serres, 1999).

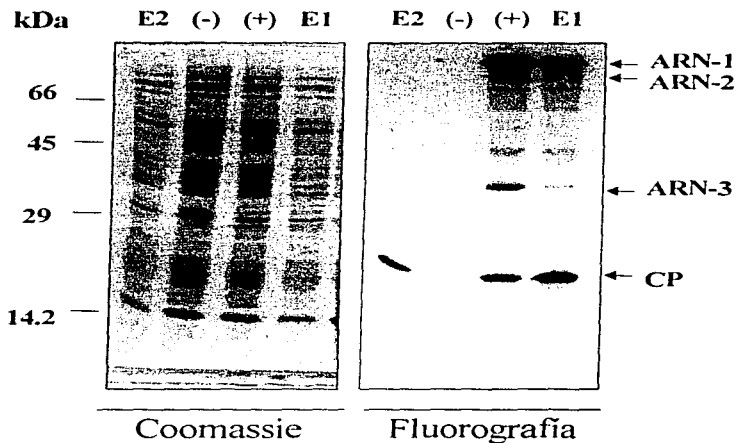
Para tratar de esclarecer el posible papel diferencial de las dos isoformas 4E de maíz en el proceso de traducción se analizaron los productos obtenidos con estos factores como

parte de los complejos eIF4F y eIFiso4F en experimentos de traducción *in vitro*. Se había comprobado previamente que diferentes grupos de ARNm poseen una dependencia distinta por la presencia da cualquiera de las dos isoformas 4E, según la eficiencia de traducción *in vitro* mostrada (Tabla 4.2). Sin embargo, para delimitar la mayor o menor dependencia de eIFiso4E o eIF4E para algunos de estos mensajes, se evaluó la traducción en WGE reconstituido con extracto eIF4F/eIFiso4F obtenido de ejes embrionarios de maíz germinados por 24 h en condiciones control o en presencia de CHX (Tabla 4.1). El extracto control (E1) contiene ambas isoformas 4E, mientras que el extracto CHX (E2) no contiene el factor eIFiso4E (Fig. 1 Artículo 2).

#### **4.2.2.1 Traducción *in vitro* de BMV**

Los productos obtenidos en la traducción del virus de bromo mosaico (BMV) bajo las diferentes condiciones de los complejos 4F indican que los diferentes ARNs virales tienen una dependencia distinta de eIFiso4E (Fig. 4.4). La proteína de envoltura (CP), que es el producto mayoritario, se traduce de manera eficiente en todas las condiciones de WGE reconstituido, incluso en ausencia de eIFiso4E, mientras que los productos de ARN-1, ARN-2 y ARN-3 no se observan cuando la traducción *in vitro* se realiza en ausencia de eIFiso4E. Cabe señalar que la proteína de 35 kDa, producto del ARN-3, se traduce pobremente en WGE depletado y reconstituido con extracto eIF4F/eIFiso4F control de maíz (Fig. 4.4, carril E1), lo cual probablemente indica mayor dependencia de los factores 4F, situación favorecida en condiciones de WGE nativo (Fig. 4.4; carril (+)).





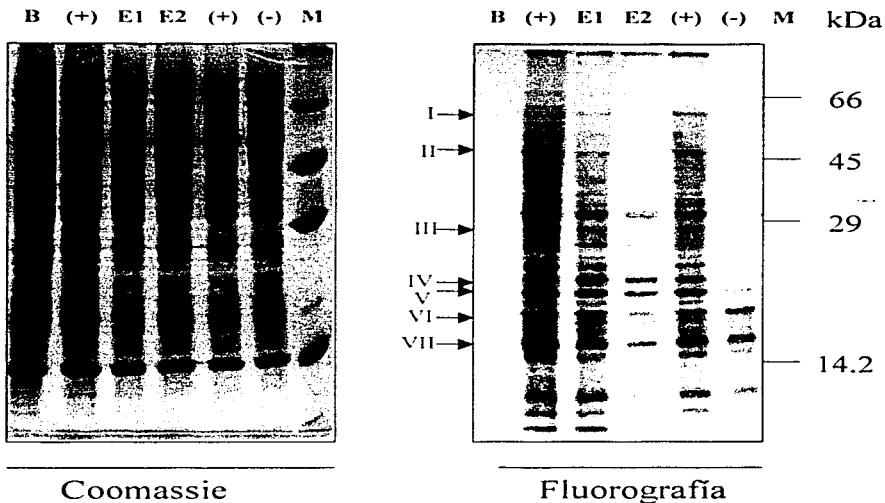
**Fig. 4.4 Traducción *in vitro* de BMV en presencia o ausencia de la isoforma eFiso4E**  
 Los ARNm de BMV fueron traducidos *in vitro* en el sistema nativo de WGE (+); en el sistema WGE depletado de factores endógenos (-) y en WGE reconstituido con los extractos E1 (contiene eFiso4E) y E2 (no contiene eFiso4E) de maíz. Cinco  $\mu\text{L}$  de cada reacción fueron separados por electroforesis (SDS-PAGE) y los productos marcados con [ $^{35}\text{S}$ ] - metionina fueron detectados por fluorografía. Las flechas señalan las principales proteínas virales; CP: proteína de cápside.

#### 4.2.2.2 Traducción de ARNm almacenados en ejes embrionarios quiescentes de maíz

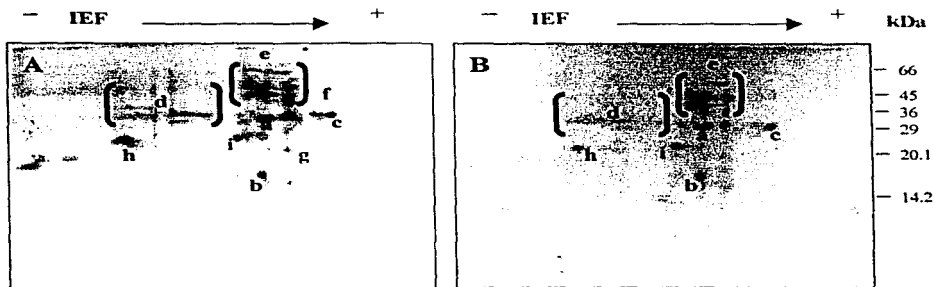
El grupo de ARNs almacenados de maíz es un modelo importante para el estudio de traducción selectiva durante la germinación (Sánchez de Jiménez & Aguilar, 1984). Existen antecedentes de que algunos de estos mensajes son menos cap-dependientes para su traducción (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1997b; Tabla 4.2). Por otra parte, se conoce que durante la germinación temprana de maíz, cuando ocurre la traducción selectiva de estos mensajes, el factor eIFiso4E es más abundante que eIF4E (Artículo 1).

Para analizar el efecto de la presencia de eIFiso4E en la traducción *in vitro* de estos mensajes se utilizaron los mismos extractos eIF4F/eIFiso4F de maíz que en la traducción de ARNm del BMV (Tabla 4.1). Los productos de la traducción *in vitro* fueron analizados por electroforesis SDS-PAGE y fluorografía (Fig. 4.5). El patrón de proteínas marcadas con [<sup>35</sup>S] difiere para la traducción realizada en presencia o ausencia de eIFiso4E (Fig. 4.5; carriles E1 y E2). La mayoría de los péptidos sintetizados *de novo* se traducen mejor en presencia de la isoforma eIFiso4E. Sin embargo, hay algunos péptidos que aparecen traducidos de manera similar en los dos sistemas, como son los péptidos IV, V y VII. Adicionalmente, y en concordancia con los experimentos previos, se observa que en el sistema de WGE depletado de factores endógenos, algunos ARNm son capaces de ser traducidos dando lugar a péptidos marcados como son VI y VII (Fig 4.5a; carril (-)).

Para distinguir mejor, de manera cualitativa, los patrones de IVT correspondientes a los carriles E1 y E2, se realizó electroforesis bidimensional para estas muestras. Las fluorografías de estos geles se muestran en la Fig. 4.6. Los perfiles obtenidos confirman que la mayoría de las proteínas se traduce mejor bajo las condiciones del extracto E1 que contiene ambas isoformas del factor 4E, aunque algunos péptidos como a, b y c son traducidos de manera similar tanto con el extracto E1, como con E2. Se realizó la comparación de los cambios más significativos en las proteínas marcadas con [<sup>35</sup>S] entre los patrones mostrados en la Fig. 4.6a y 4.6b que incluye a los péptidos d-i. Dentro de estos, los grupos de péptidos señalados con d y e, así como los péptidos f, g y h se traducen preferencialmente en presencia de eIFiso4E. En el caso del péptido i, se observa que la traducción se favorece por la ausencia de eIFiso4E (Fig. 4.6b).



**Fig. 4.5 Traducción *in vitro* de ARNm almacenados de maíz en presencia o ausencia de eIFiso4E.** Los ARNm fueron traducidos en los mismos sistemas de WGE que en la Fig. 4.4. Quince  $\mu\text{L}$  (carriles B, (+)) y 10  $\mu\text{L}$  (carriles E1(-)) de la reacción fueron separados por electroforesis (SDS-PAGE); los productos marcados con [ $^{35}\text{S}$ ] - metionina fueron detectados por fluorografía. Las flechas y los números romanos señalan algunos de los péptidos que se traducen de manera diferente en cada sistema. B: traducción en el sistema nativo (+) en ausencia de ARNm exógeno; M: marcador de masa molecular.



**Fig. 4.6 Fluorografías de geles bidimensionales de los productos de IVT en los sistemas E1 (contiene elFiso4E) y E2 (no contiene elFiso4E).** Los ARNm almacenados de maíz fueron traducidos en presencia de los extractos E1 (A) y E2 (B) según se describe en la Fig. 4.4. Para cada muestra de IVT, 50  $\mu$ g de proteína se separaron por electroforesis en dos dimensiones. Las posiciones de los pH extremos del isoelectroenfoque (IEF) fueron: izquierda, pH 10; derecha, pH 3.5 (anfollinas Pharmacia, Biotech) y se analizaron por fluorografía. Las letras indican los cambios principales entre A y B. (-), cátodo; (+), ánodo.

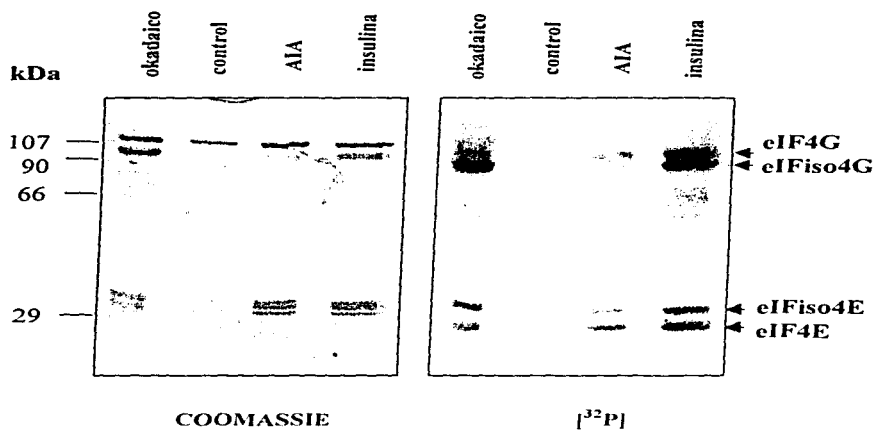
Los resultados obtenidos en los experimentos *in vitro* indican que la proporción de las isoformas del factor 4E de iniciación de la traducción debe ser importante para tener un patrón de síntesis de proteínas específico a partir del grupo de ARNm almacenados. Si existe un incremento o decremento de alguna de las isoformas, esto probablemente significará un cambio en este patrón de síntesis.

### 4.3 Resultados preliminares

Se han reportado varias sub-isoformas de la isoforma eIF4E, debido a diferentes estados de fosforilación, en trigo (Gallie *et al.*, 1997) y en maíz (Manjunath *et al.*, 1999). También se ha observado fosforilación adicional de eIF4E, pero no de eIFiso4E en presencia de anoxia y mediada por  $\text{Ca}^{2+}$  como segundo mensajero (Manjunath *et al.*, 1999). Tomando en cuenta estos antecedentes, se realizaron algunos experimentos donde se obtuvieron resultados preliminares sobre la modificación por fosforilación de los componentes de los complejos eIF4F y eIFiso4F de maíz y su efecto sobre la actividad de estos complejos en el sistema de traducción *in vitro*.

#### 4.3.1 Fosforilación *in vivo* de los componentes de los complejos eIF4F y eIFiso4F durante la germinación de maíz

Para determinar si los complejos eIF4F y eIFiso4F de maíz se fosforilan normalmente durante el proceso de germinación, se germinaron aproximadamente 100 semillas de maíz por 22 h. Se extrajeron los ejes embrionarios y se incubaron por 2 h en medio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado durante las últimas 1.5 h con  $150 \mu\text{Ci mL}^{-1}$  de [ $^{32}\text{P}$ ]-ortofosfato. Los complejos eIF4F y eIFiso4F se aislaron y separaron por electroforesis según el método descrito en Materiales y Métodos; Artículo 1. La autorradiografía de las proteínas de los complejos 4F fosforiladas *de novo* durante el pulso con [ $^{32}\text{P}$ ]-ortofosfato indica que tanto eIF4G/eIFiso4G, como eIF4E/eIFiso4E son fosfoproteínas, aunque eIF4E muestra mayor incorporación de [ $^{32}\text{P}$ ] respecto a eIFiso4E (Fig. 4.7; control). En este caso, esta incorporación no se debe a un mayor recambio de la proteína, ya que resultados previos demuestran que la isoforma eIF4E es estable durante el proceso de germinación (Fig. 2; Artículo 1 y Fig. 1; Artículo 2).



**Fig. 4.7 Fosforilación *in vivo* de los complejos eIF4F/eIFiso4F de maíz.** Fueron germinadas 100 semillas de maíz por 22 h. Se extrajeron los ejes embrionarios y se incubaron en medio MS por 2 horas mas y en presencia de ortofosfato- $^{32}\text{P}$  durante las últimas 1.5 h de germinación; en condiciones control, con ácido okadaico ( $1\mu\text{M}$ ), AIA ( $200\mu\text{M}$ ) o insulina ( $200\mu\text{U mL}^{-1}$ ). Aproximadamente  $8\mu\text{g}$  del extracto eIF4F/eIFiso4F obtenido a partir de cada grupo de ejes embrionarios, fueron separados en gel de poliacrilamida desnaturalizante al 13 % y sometidos a autorradiografía.

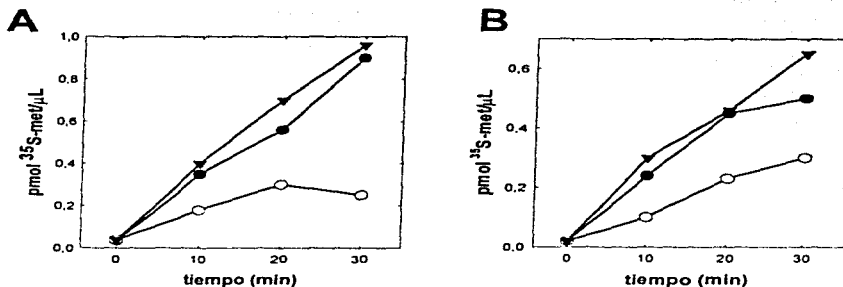
Para analizar si algunas de las vías de transducción de señales que regulan la síntesis de proteínas en maíz (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1999; Beltrán-Peña *et al.*, en prep.) tienen efecto sobre la fosforilación de los complejos eIF4F y eIFiso4F, se utilizaron estímulos con ácido okadaico ( $1\mu\text{M}$ ), insulina ( $200\mu\text{U mL}^{-1}$ ) o AIA ( $200\mu\text{M}$ ) en el medio MS durante las últimas dos horas de germinación en presencia de  $^{32}\text{P}$ -ortofosfato (Fig. 4.7). La presencia de ácido okadaico (inhibidor de fosfatasa tipo A) incrementa la incorporación de  $^{32}\text{P}$  en las proteínas de los complejos eIF4F/eIFiso4F, pero mas significativamente en eIFiso4G y eIFiso4E (Fig. 4.7; okadaico). La insulina parece incrementar el nivel de fosforilación tanto en el complejo eIF4F, como en el eIFiso4F (Fig. 4.7; insulina), mientras que AIA incrementa la incorporación de  $^{32}\text{P}$  preferencialmente en el complejo eIF4F

(eIF4E/eIF4G) (Fig. 4.7; AIA). Estos resultados indican, como se ha reportado previamente por Manjunath *et al.* (1999), que de las isoformas 4E, la eIF4E es modificada por fosforilación en condiciones normales, mientras que eIFiso4E parecería ser susceptible de fosforilación bajo ciertas condiciones de estímulo. Esto se apoya por el hecho que eIFiso4E tiene múltiples sitios potenciales de fosforilación (Manjunath *et al.*, 1999).

#### **4.3.2 Efecto de la fosforilación de eIF4F y eIFiso4F sobre la traducción *in vitro* de mensajes almacenados de maíz**

En el sistema de mamíferos, el estado de fosforilación de eIF4E correlaciona positivamente con la velocidad de síntesis de proteínas (Rhoads, 1993; Beretta *et al.*, 1998). En el caso de plantas, se ha encontrado que la anoxia, estado en el cual existe una traducción preferencial de ciertos tipos de ARNm, se incrementa la fosforilación de eIF4E (Manjunath *et al.*, 1999), mientras que en el estado de choque de calor, la fosforilación de eIFiso4E y de eIF4E no parece afectarse (Gallie *et al.*, 1997).

Para averiguar el posible papel de la fosforilación de eIF4E y eIFiso4E dentro de los complejos eIF4F y eIFiso4F en la traducción selectiva de mensajes almacenados de maíz, se evaluó la eficiencia de estos complejos con diferente grado de fosforilación en un sistema de traducción *in vitro*. Para desfosforilar los complejos eIF4F/eIFiso4F de maíz, estos se incubaron con fosfatasa alcalina ( $0.25 \text{ U } \mu\text{g}^{-1}$ ) por 30 min a  $37^\circ\text{C}$ . La fosfatasa alcalina se inactivó mediante la adición de  $20 \mu\text{M}$  EDTA. Para incrementar la fosforilación en los complejos eIF4F y eIFiso4F se utilizó el estímulo con insulina descrito previamente. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 4.8. La desfosforilación de eIF4F/eIFiso4F con fosfatasa alcalina disminuye significativamente la actividad de los complejos sobre la traducción de un grupo de ARNm control de levadura (Fig. 4.8a). Sin embargo, el incremento de la fosforilación observado en el extracto eIF4F/eIFiso4F obtenido bajo estímulo de insulina, no contribuye en aumentar la eficiencia de traducción de los mensajes control.



**Fig. 4.8 Efecto de la fosforilación de los complejos eIF4F/eIFiso4F sobre traducción *in vitro* de ARNm de levadura (A) y de ARNm almacenados de maíz (B).** El WGE depletado de los complejos 4F endógenos fue reconstituido con  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$  de eIF4F/eIFiso4F de maíz. (-▲-) eIF4F/eIFiso4F obtenidos de ejes embrionarios germinados por 24 h en condiciones control; (-●-) eIF4F/eIFiso4F obtenidos de ejes embrionarios germinados por 24 h, con estímulo de  $200 \mu\text{U mL}^{-1}$  de insulina durante las últimas 2 h de germinación; (-○-) eIF4F/eIFiso4F obtenidos de ejes embrionarios germinados por 24 h en condiciones control, defosforilados con  $0.25 \text{ U } \mu\text{g}^{-1}$  de fosfatasa alcalina por 30 min a  $37^\circ\text{C}$ .

Para el grupo de mensajes almacenados de maíz, se observa también cierta tendencia a disminuir la traducción cuando se utiliza eIF4F/eIFiso4F desfosforilado, aunque en menor grado con respecto al ARNm control de levadura (Fig. 4.8b). En este caso un incremento en la fosforilación de los factores por la presencia de insulina tampoco se acompaña de mayor actividad en la traducción de los mensajes.

La interpretación de estos resultados no puede ser todavía concluyente pues requiere de hacer repeticiones de los experimentos de IVT, así como de incluir varios controles como estímulo con ácido okadaico y otro para comprobar que la fosfatasa alcalina no afecta a la fosforilación de otros factores dentro del sistema o a otros sitios de fosforilación de la misma proteína.



**CAPITULO V**  
**DISCUSION GENERAL**

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

La regulación de la síntesis de proteínas es un evento importante para la vida celular, ya que es una de las etapas finales de la expresión genética. En particular, esta regulación es fundamental durante la germinación de maíz, ya que permite el futuro establecimiento de la plántula. En este proceso, los factores que participan en el mecanismo de selectividad para el reclutamiento de mensajes específicos en los polisomas para su traducción, constituyen el objeto de múltiples investigaciones. El presente trabajo estudia a uno de estos factores, eIF4E; el cual está involucrado en la iniciación de la traducción, particularmente en el reconocimiento del CAP de los ARNm. Este factor resulta esencial para la traducción de mensajes CAP-dependientes en los organismos eucariontes (Sonenberg, 1996). Esta afirmación se basa en resultados que muestran que la disminución de eIF4E en extractos celulares reduce drásticamente la traducción de todos los ARNm CAP-dependientes y que esta actividad es reconstituida por la adición de eIF4E nativo o recombinante (Svitkin *et al.*, 1996).

Los resultados de este trabajo revelan un mecanismo novedoso e interesante para regular los niveles de la isoforma eIFiso4E de maíz, basado en la expresión selectiva del mensaje, debido a la modulación de su movilización a polisomas. A su vez, este mecanismo da lugar a la expresión selectiva de los mensajes almacenados durante el proceso de germinación de maíz.

### **Identificación de las isoformas del factor de iniciación de la traducción 4E en ejes embrionarios de maíz**

La existencia de isoformas para eIF4E se ha reportado en *Drosophila* (Lavoie *et al.*, 1996), *Xenopus* (Wakiyama *et al.*, 1996) *Caenorhabditis elegans* (Keiper *et al.*, 2000), mamíferos (Rom *et al.*, 1998) y varias especies de plantas (Browning *et al.*, 1992; Ruud *et al.*, 1998). Las isoformas que se han identificado en estos organismos hasta el momento, muestran diversos grados de identidad, funcionalidad, afinidad por el CAP y mecanismos de regulación de su actividad. De la presencia de múltiples isoformas del factor eIF4E surge la pregunta de si éstas regulan la selectividad de la traducción de ARNm mediante su abundancia, disponibilidad o actividad en el reclutamiento de transcritos.

El factor eIF4E presenta 2 isoformas principales en plantas, eIF4E y eIFiso4E, las cuales forman parte de dos complejos eIF4F (eIF4E/eIF4G), antigénicamente distintos entre sí

(Browning *et al.*, 1992). Recientemente, se ha identificado una tercera isoforma de eIF4E en *Arabidopsis*, denominada nCBP (nueva proteína que une CAP), la cual es poco abundante pero puede formar complejos tanto con eIF4G, como con eIFiso4G (Ruud *et al.*, 1998). En el presente trabajo, mediante la utilización de técnicas de purificación basadas en cromatografía de afinidad, previamente descritas (Zapata *et al.*, 1991), encontramos que a partir de ejes embrionarios de maíz, quiescentes o germinados, se obtiene una mezcla de las dos isoformas del complejo eIF4F (Figura 1, Artículo 1). Dentro de esta mezcla se identificaron, utilizando anticuerpos contra las isoformas de trigo, las proteínas correspondientes a eIFiso4E (32 kDa) y eIF4E (30 kDa). Es interesante señalar que el anticuerpo contra eIF4E de trigo reconoce a dos péptidos en el extracto de maíz. Esto se debe probablemente a diferentes estados de fosforilación de esta isoforma, como se ha reportado recientemente (Manjunath *et al.*, 1999). Conclusión que se apoya en experimentos de traducción *in vitro* del mensaje para este factor, donde se observa la síntesis de un solo péptido (Figura 5, Artículo 2).

La relación cuantitativa de eIF4E y eIFiso4E, reportada en trigo, indica que en el estado quiescente eIFiso4E es 10 veces más abundante que eIF4E (Browning *et al.*, 1990). Recientemente, se ha encontrado que esta relación varía según la etapa de desarrollo o condiciones de estrés de la planta (Gallie *et al.*, 1998). Así mismo, se reporta para *Arabidopsis* una relación diferencial entre los mensajes eIF4E y eIFiso4E presentes en diferente tipo de tejidos en una misma plántula (Rodríguez *et al.*, 1998). Los resultados que obtuvimos a partir del análisis de ejes embrionarios quiescentes y germinados de maíz indican que la proporción de las isoformas eIFiso4E y eIF4E varía durante la germinación (Figura 1, Artículo 1). A nivel de mensajes, se encontró que ambas isoformas están presentes en el grupo de ARNs almacenados en el estado quiescente y permanecen durante el resto de la germinación (Figura 3, Artículo 1). En este caso, la abundancia de cada isoforma también varía según el estadio de germinación, lo cual coincide con las observaciones reportadas en trigo y *Arabidopsis* (Gallie *et al.*, 1998; Rodríguez *et al.*, 1998). Por otra parte, el análisis de la síntesis *de novo* de eIFiso4E y eIF4E, así como los datos obtenidos sobre estos factores, tanto a nivel de contenidos de proteínas como de ARNm, indicaron que debe existir un mecanismo(s) responsable de la expresión diferencial de las dos isoformas durante el período de germinación (Figuras 1-3, Artículo 1).

## **Mecanismo de expresión diferencial de eIFiso4E y eIF4E durante la germinación de maíz**

En animales superiores, la regulación principal de la actividad de eIF4E es mediada por proteínas de unión a 4E (4E-BPs) que secuestran al factor e impiden su unión con eIF4G, para formar el complejo eIF4F activo (Pause *et al.*, 1994). Sin embargo, en estos organismos también se han reportado otras formas de regulación para eIF4E, como son la modulación de su expresión (Lazaris-Karatzas *et al.*, 1990, Johnston *et al.*, 1998; Khaleghpour *et al.*, 1999) y la modificación del péptido por fosforilación (Rhoads, 1993). En el caso de plantas, no se han encontrado hasta el momento proteínas homólogas a 4E-BP, que presenten características de unión a alguna de las isoformas 4E (Pause *et al.*, 1994; Figura 3, Artículo 2). En cambio, se ha sugerido que es la cantidad relativa de cada una de las isoformas funcionales de 4E la determinante en una selección diferencial de los mensajes a traducir (Carberry & Goss, 1991; Bailey-Serres, 1999).

Basándonos en la relación diferencial que encontramos para eIF4E y eIFiso4E durante el proceso de germinación de maíz, decidimos averiguar si los mecanismos de regulación para estas isoformas se encontraban mediados por modulación de su expresión a nivel de traducción o de acumulación de ARNm. Nuestros resultados indican que eIFiso4E mantiene niveles altos y constantes durante todo el período de germinación debido a una traducción muy activa de su mensaje desde las primeras etapas de la germinación (Figuras 2 y 4, Artículo 1). En cambio, eIF4E incrementa su expresión de manera apreciable, tanto a niveles de mRNA como de velocidad de traducción, solo hacia el final de la germinación (Figuras 3 y 4, Artículo 1). Estas diferencias entre acumulación y expresión de cada isoforma eIF4E probablemente implican mecanismos de regulación diferentes. La proteína eIFiso4E parece estar sujeta a rápido recambio y, por ello requiere una expresión muy activa para mantener niveles altos y constantes durante la germinación. Por el contrario, la proteína eIF4E es más estable y su síntesis activa se requiere solo hacia el final de la germinación.

Reportes en la literatura señalan que la regulación sobre la expresión del factor eIF4E puede ocurrir tanto a nivel transcripcional (Rosenwald *et al.*, 1993; Johnston *et al.*, 1998) como post-transcripcional (*Drosophila*; Wakiyama *et al.*, 1996; Keiper *et al.*, 2000). En plantas, aunque se ha encontrado previamente expresión diferencial de las isoformas 4E,

no hay reportes en cuanto a algún mecanismo que regule su expresión. Debido a que durante las primeras 12 horas de germinación no parece haber transcripción *de novo* para ninguna de las dos isoformas 4E (Fig. 3; Artículo 1), podemos pensar que la expresión selectiva de eFiso4E en este período se debe (1) a la mayor abundancia de su mensaje, y/o (2) a un mecanismo de control traduccional involucrado en la movilización selectiva de estos mensajes para su traducción. Aunque en el eje embrionario quiescente el transcrito de eFiso4E parece ser más abundante que el de eIF4E y los niveles de ambos mensajes disminuyen a 6 y 12 h de germinación (Figura 3, Artículo 1), es el ARNm para eFiso4E el que se traduce preferencialmente desde las 12 h de germinación (Figuras 2 y 4, Artículo 1). Por estas razones consideramos con mayor probabilidad la presencia de un mecanismo que regulara la síntesis de eFiso4E a nivel traduccional.

### **Regulación de la expresión de eFiso4E a nivel de traducción**

Muchos de los mensajes almacenados en el eje embrionario quiescente de raíz son expresados diferencialmente durante el proceso germinativo (Sánchez de Jiménez & Aguilar, 1984). Algunos de los mecanismos involucrados en este tipo de selección ocurren a nivel de la traducción de mensajes (Bewley & Black, 1994; Sánchez de Jiménez *et al.*, 1997a; 1999) y, son mediados por regulación a nivel de movilización de mensajes a polisomas. Los mensajes para las isoformas 4E forman parte del grupo de ARNm almacenados en el eje embrionario quiescente de maíz, al igual que otros mensajes para componentes de la maquinaria de traducción como las proteínas ribosomales (Beltrán-Peña *et al.*, 1995). Al analizar los patrones de expresión de estas isoformas en condiciones normales y en presencia de cicloheximida (un inhibidor de la traducción), observamos que los niveles de eFiso4E pueden llegar a disminuir hasta niveles no apreciables por la inhibición de la traducción, mientras que la de eIF4E se afecta en menor grado (Figura 1, Artículo 2). Esto apoya la idea de que eFiso4E, y no eIF4E, está sujeto a control traduccional durante la germinación de maíz para modular sus niveles de proteína.

Durante la germinación de maíz, se ha encontrado que la presencia de efectores como insulina estimula la movilización de mensajes 5'TOP a polisomas, como se ha caracterizado que lo hace en animales (Meyuhas *et al.*, 1996). Entre estos mensajes se han identificado los de algunas proteínas ribosomales (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1999).

Utilizando este tipo de estimulación en ejes embrionarios de maíz encontramos que se incrementa significativamente la síntesis *de novo* de eIFiso4E, en comparación con la de eIF4E (Figura 2; Artículo 2). Este incremento se produce por un estímulo específico en la movilización de mensajes a polisomas y no por la inducción de acumulación de mensajes (Figura 4; Artículo 2). La especificidad de este estímulo se demuestra por el bloqueo parcial de la movilización que se observa para los mensajes de la pr S6 y del eIFiso4E en presencia de inhibidores de la vía de transducción de señales por insulina, como son wortmanina y rapamicina (Figura 4; Artículo 2). De estos datos se deduce que la regulación de la expresión de eIFiso4E durante la germinación de maíz ocurre a nivel de movilización de su mensaje a polisomas.

Existe cierta discusión sobre el mecanismo implicado en la movilización selectiva de mensajes 5'TOP a polisomas bajo el estímulo de insulina (Pellizzoni *et al.*, 1996). Una de las características que debe tener este tipo de mensajes es la presencia de una secuencia de polipirimidinas (9-11) a partir de la base +1 de transcripción (Shama & Meyuhas, 1996). Otro punto importante es el estado de fosforilación de la pr S6, que se incrementa selectivamente por la vía de transducción de señales de insulina (Jefferies *et al.*, 1994; Meyuhas *et al.*, 1996). Por último, se considera que algún factor "trans" específico es capaz de reconocer a la secuencia 5'TOP y/o a la fosforilación de la pr S6 y de esta manera favorecer la interacción del mensaje con la maquinaria de traducción y consecuentemente facilitar la traducción preferencial de los mensajes 5'TOP (Pellizzoni *et al.*, 1996).

En el caso de eIFiso4E de maíz no existe la certeza de la presencia de secuencia TOP en su mensaje, ya que no se conoce con exactitud el sitio +1 de transcripción. Sin embargo, es interesante el hecho que en el cDNA reportado para esta proteína la secuencia del extremo 5' es una serie ininterrumpida de pirimidinas (5'T<sub>26</sub>CCCCTTC...3'; AF076955), la cual no está presente en el mensaje para eIF4E (5'GCCCGCGTT...3'; AF076954). Por otra parte, al analizar el efecto de la fosforilación de pr S6 sobre la traducción del mensaje eIFiso4E en ensayos *in vitro*, se encontró que los ribosomas fosforilados en la pr S6 traducen de forma muy eficiente el mensaje de esta isoforma. Por el contrario, los ribosomas no fosforilados en la pr S6 traducen el mensaje para eIFiso4E muy poco y en forma similar a la capacidad de traducir otros mensajes como los de  $\beta$ -globina y eIF4E (Figura 5 y tabla 1; Artículo 2). La presencia de auxinas, que también inducen incremento

en la fosforilación de la pr S6 en ribosomas (Pérez-Méndez *et al.*, 1993; Beltrán-Peña *et al.*, en prep.), es capaz también de estimular la movilización de los mensajes correspondientes a elFiso4E y pr S6 a polisomas (Figura 3.7; Capítulo 3).

Un dato interesante sobre la regulación de la expresión de elFiso4E a nivel de traducción se obtuvo a partir de experimentos de germinación de maíz en presencia de  $\alpha$ -amanitina. Esta sustancia, inhibidor de la transcripción mediada por la ARN polimerasa II, no disminuye la cantidad total de mensajes de elFiso4E o elF4E durante las primeras 12 h de germinación de maíz (Figura 3; Artículo 1), indicando la ausencia de transcripción de estos mensajes durante ese periodo. Sin embargo, la presencia de  $\alpha$ -amanitina a 12 h de germinación claramente afecta la movilización del mensaje elFiso4E y en parte a elF4E a polisomas (Figura 3.6; Capítulo 3). Una explicación posible para este resultado es que  $\alpha$ -amanitina tuviera un efecto indirecto en la movilización del mensaje, mediante la inhibición de la expresión de un factor *trans* de rápido recambio que dependiera de transcripción de *novu* durante la germinación. Por otra parte, en presencia de  $\alpha$ -amanitina se observa cierta acumulación en la cantidad total de ARNm, tanto para elFiso4E como para elF4E (Figura 3, Artículo 1; Figura 3.6a, Capítulo 3). Esto pudiera ser el resultado de una estabilización de mensajes, debida a la disminución de alguna RNasa por efecto de inhibición de la transcripción por  $\alpha$ -amanitina.

#### **Las isoformas elFiso4E y elF4E tienen actividad diferencial sobre la traducción *in vitro* de algunos mensajes**

Dentro de las células de plantas, los ARNm se traducen de manera selectiva acorde con las condiciones de desarrollo, diferenciación y ambientales (Bailey-Serres, 1999). Una de las formas que tiene la célula para seleccionar los mensajes a traducir es durante la iniciación de la traducción, mediante los factores elF4 que participan en el reclutamiento del ARNm (Browning, 1996; Gingras *et al.*, 1999). El factor elF4E que une la estructura CAP, presenta características estructurales semejantes en los diferentes organismos de donde se ha aislado (Marcotrigiano *et al.*, 1997). Sin embargo, para las isoformas de elF4E que se han reportado en diversos organismos, se han encontrado características funcionales específicas como son el reconocimiento de CAPs con diferente grado de metilación (Sha *et al.*, 1995; Keiper *et al.*, 2000), el reconocimiento de diferentes 5'UTRs (Carberry & Goss, 1991) o la capacidad de unión con elF4G (Rom *et al.*, 1998).

La funcionalidad o actividad de las isoformas de eIF4E de plantas ha sido estudiada mediante ensayos *in vitro* con ARNm virales (Hann *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997). En el presente trabajo, se encontró que los factores eIF4E y eIFiso4E presentes durante la germinación de maíz son capaces de traducir *in vitro* de manera diferencial tanto ARNs virales como celulares (Figuras 4.3-4.6; Capítulo 4). En el caso de ARNs virales, estos constituyen un modelo adecuado para el estudio de la actividad de factores de traducción, ya que para muchos se conocen las estructuras presentes en los extremos 5' y 3'UTR (Bailey-Serres, 1999). En nuestro caso, se utilizaron TMV y BMV que tienen la estructura CAP en el extremo 5'UTR y una estructura similar a ARNt en el extremo 3'UTR (Goldbach, 1987). De los resultados se observó que TMV se traduce mejor en presencia de eIF4E, mientras que 3 de los 4 ARNm de BMV se traducen mejor en presencia de eIFiso4E (Figuras 4.3 y 4.4; Capítulo 4). Para TMV se ha reportado una secuencia líder en el extremo 5'UTR que funciona como estímulo para su traducción (Tanguay & Gallie, 1996). Los resultados que obtuvimos indican que además de esta característica, el ARN viral es capaz de mostrar preferencia por una de las isoformas eIF4E de maíz. En el caso de BMV, se reporta que los 4 ARNm que contiene presentan diferencias en la longitud de sus 5'UTR (Brunt *et al.*, 1996), lo cual puede implicar diferente dependencia de eIFiso4E para la traducción de cada uno de ellos (Carberry & Goss, 1991). Otras características que tienen los ARNs virales son las estructuras específicas y variadas en los extremos 5' y 3', lo que lo hace un modelo muy apropiado para estudiar la actividad diferencial de eIF4E y eIFiso4E.

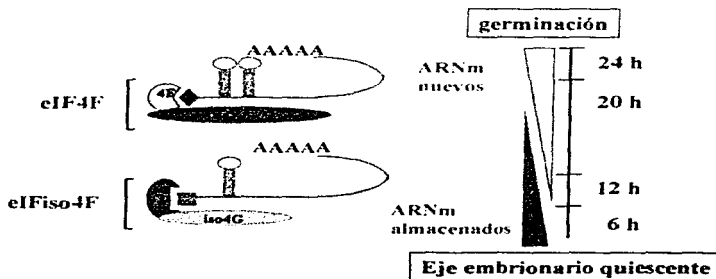
Para el grupo de ARNs celulares de plantas, varios reportes indican que algunos mensajes se traducen selectivamente en condiciones de estrés como anoxia (Fenoy *et al.*, 1995) o choque de calor (Gallie *et al.*, 1995). Para el grupo de mensajes almacenados en semillas de maíz, aunque se ha reportado selectividad en la traducción (Sánchez de Jiménez & Aguilar, 1984), no se conocen con exactitud los mecanismos que rigen este tipo de regulación. Se considera que uno de estos mecanismos pudiera ser el grado de fosforilación de la *pr* S6, que es diferencial durante la germinación (Pérez-Méndez *et al.*, 1993) y otro la dependencia de CAP de los mensajes para ser traducidos (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1997b).



De los resultados obtenidos sobre la actividad diferencial de los factores eIF4E y eIFiso4E en la traducción *in vitro* de mensajes almacenados (Figura 4.3, Capítulo 4), podemos sugerir como un posible mecanismo de control traduccional, la abundancia relativa de las isoformas eIF4E durante el periodo de germinación. Este mecanismo implicaría una competencia entre los mensajes por cada isoforma 4E, la cual estaría dada por diferentes CAPs y/o regiones 5'UTR. En efecto, la ausencia de eIFiso4E en el sistema *in vitro* inhibe la síntesis de varias proteínas a partir de los ARNm almacenados, mientras favorece la incorporación de metionina marcada en algunas proteínas específicas (Figuras 4.5 y 4.6; Capítulo 4). También es interesante el hecho de que hay mensajes cuya traducción se favorece por la ausencia de cualquiera de las dos isoformas 4E (Tabla 4.2 y Figura 4.5; Capítulo 4; Sánchez de Jiménez *et al.*, 1997b).

#### Modelo experimental que relaciona la expresión y actividad de las isoformas 4E durante la germinación de maíz

Los datos obtenidos en este trabajo indican que la proporción de eIF4E/eIFiso4E juega un papel fundamental para definir el patrón de proteínas sintetizadas *de novo* durante la germinación de maíz. En el siguiente modelo se encuentran representadas esquemáticamente las diferentes etapas de la germinación, la presencia relativa de cada isoforma 4E, como parte de los correspondientes complejos 4F, y el grupo de mensajes que se van a traducir a lo largo del proceso de germinación.



Este modelo es una propuesta que explicaría uno de los mecanismos de regulación de la síntesis de proteínas durante el proceso de germinación. En el eje embrionario quiescente observamos mayor cantidad de eIFiso4E respecto a eIF4E. Después de 12 h de germinación los niveles de eIF4E se incrementan, para alcanzar una proporción similar a eIFiso4E en el momento de protrusión de la radícula. Al inicio de la germinación, la síntesis de proteínas se produce básicamente a partir del grupo de ARNm almacenados en el eje embrionario quiescente. Muchos de estos ARNm deben estar señalados con estructuras CAP y 5'UTRs que serán reconocidas por eIFiso4E como parte del complejo eIFiso4F. A medida que transcurre la germinación son sintetizados nuevos ARNm, algunos iguales a parte de los almacenados (constitutivos) y otros diferentes (división celular y diferenciación). Dentro de este grupo de ARNm nuevos, posiblemente se incrementa la proporción de mensajes que requiere a la isoforma eIF4E para su reclutamiento a traducción, por lo cual este factor comienza a aumentar sus niveles hacia las últimas horas de germinación.

El factor eIFiso4E se traduce de manera regulada para mantener su concentración constante durante toda la germinación, ya que se requiere para la traducción de muchos de los mensajes presentes a lo largo de este proceso. Hemos visto que la inhibición de la traducción por cicloheximida durante la germinación produce disminución de eIFiso4E, sugiriendo que se trata de una proteína de vida media corta, probablemente degradada por las proteasas que se activan durante la germinación de semillas (Guy & Black, 1998). El estímulo de la expresión de eIFiso4E a nivel de la movilización selectiva de su mensaje a polisomas permite a la célula lograr una disponibilidad rápida del factor necesaria para traducir aquellos mensajes que probablemente garantizarán el desarrollo de la germinación (elongación y protrusión de la radícula).

Las evidencias experimentales que se obtuvieron a lo largo de este trabajo, han señalado a eIFiso4E como un factor importante para la regulación de la traducción de ARNm a proteínas durante la germinación de maíz. Se demostró que un mecanismo posible para la regulación de la actividad de eIFiso4E es la modulación de su expresión a nivel de traducción. Este mecanismo implica a una vía importante de regulación a través de transducción de señales reportada para animales, la cual al parecer también existe en plantas (Turck *et al.*, 1998; Sánchez de Jiménez *et al.*, 1999; Hirt, 2000). Sobre la isoforma eIF4E, los resultados sugieren que su expresión podría estar regulada a nivel de

transcripción. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en este caso la modificación por fosforilación pudiera también ser un mecanismo importante en la regulación de su actividad (Manjunath *et al.*, 1999).

Para las investigaciones futuras, sería interesante comprobar si el mensaje para eIF5A contiene la secuencia TOP a partir del sitio +1 de transcripción, así como estudiar la posibilidad del factor *trans* involucrado en la movilización de éste y otros mensajes 5'TOP. Otro objetivo sería estudiar las isoformas de eIF4G y cuál es su participación en la regulación de la traducción CAP-dependiente.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo permitieron arribar a las siguientes conclusiones:

1. En ejes embrionarios de maíz existen 2 isoformas para el factor de iniciación de la traducción eIF4E (eIF4E/eIFiso4E) formando parte de diferentes complejos eIF4F (eIF4F/eIFiso4F).
2. Hay 2 mensajes 4E diferentes presentes en el estado quiescente de los ejes embrionarios: eIF4E (1.0 kb) y eIFiso4E (1.1 kb) y su expresión sigue un patrón diferencial durante la germinación. El mensaje de la isoforma eIFiso4E presenta un mayor reclutamiento a polisomas que eIF4E.
3. Los niveles de proteína para eIF4E y eIFiso4E muestran cinéticas diferentes durante el proceso de germinación. La isoforma eIFiso4E es la más abundante durante las primeras horas de germinación y continúa manteniéndose a niveles altos durante toda la germinación.
4. La expresión de eIFiso4E es regulada en parte a nivel de traducción por una vía de transducción de señales similar a la inducida por insulina. Esta regulación es mediada probablemente por la fosforilación de la proteína ribosomal S6 en la subunidad ribosomal 40S.
5. Los complejos eIF4F y eIFiso4F de maíz muestran actividad diferencial sobre la traducción *in vitro* de los mensajes virales de TMV y BMV y del grupo de mensajes almacenados en el eje embrionario quiescente de maíz.
6. Un grupo importante de los mensajes almacenados depende de la presencia de eIFiso4E para ser traducidos en un sistema *in vitro*.

## REFERENCIAS BIBLOGRAFICAS

- Abel, S. and Theologis A.** (1996) Early genes and auxin action. *Plant Physiol.* **111:** 9-17.
- Allen, M.L., Metz A.M., Timmer R.T., Rhoads R.E. and Browning K.S.** (1992) Isolation and sequence of the cDNAs encoding the subunits of the isozyme form wheat protein synthesis initiation factor 4F. *J. Biol. Chem.* **267:** 23232-23236.
- Altmann, M., Handschin C. and Trachsel H.** (1987) mRNA cap-binding protein: Cloning of the gene encoding protein synthesis initiation factor eIF-4E from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **7:** 998-1003
- Altmann, M., Schmitz N., Berset C. and Trachsel H.** (1997) A novel inhibitor of cap-dependent translation initiation in yeast: p20 competes with eIF-4G for binding to eIF-4E. *EMBO J.* **16:** 1114-1121.
- Bailey-Serres, J.** (1999) Selective translation of cytoplasmic mRNAs in plants. *Trends in Plant Science* **4:** 142-148.
- Baiza, A.M., Vázquez-Ramos J. and Sánchez de Jiménez E.** (1989) DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *J. Plant Physiol.* **135:** 416-421.
- Beltrán-Peña, E., Ortiz-López A. and Sánchez de Jiménez E.** (1995) Synthesis of ribosomal proteins from stored mRNAs early in seed germination. *Plant Mol. Biol.* **28:** 327-336
- Beretta, L., Singer N.G., Hinderer R., Gingras A.C., Richardson B., Hanash S.M. and Sonenberg N.** (1998) Differential regulation of translation and EIF4E phosphorylation during human thymocyte maturation. *J. Immunol.* **160:** 3269-3273.
- Bewley, J.D. and Marcus A.** (1990) Gene expression in seed development. *Prog. in Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **38:** 165-193.
- Bewley, J.D. and Black M.** (1994) Cellular events during germination and seedling growth. In: *Seeds: Physiology of development and germination.*, 2d. edition (1994), Plenum Press, New York, pp. 147-196.
- Bewley, J.D.** (1997) Seed germination and dormancy. *Plant Cell* **9:** 1055-1066.
- Bradford, K.J.** (1995) Water relations in seed germination. In: *Seed development and germination* (Kigel J. and Galili G., eds.) Marcel Dekker, New York, pp. 351-396.
- Braun, D.M. and Walker J.C.** (1996) Plant transmembrane receptors: new pieces in the signaling puzzle. *TIBS* **21:** 70-73
- Browning, K.S., Humphreys J., Hobbs W., Smith G.B. and Ravel J.M.** (1990): Determination of the amounts of the protein synthesis initiation and elongation factors in wheat germ. *J. Biol. Chem.* **265:** 17967-17973.
- Browning, K.S., Webster C., Roberts J.K.M. and Ravel J.M.** (1992) Identification of an isozyme form of protein synthesis initiation factor 4F in plants. *J. Biol. Chem.* **267:** 10096-10100.
- Browning, K.S.** (1996) The plant translational apparatus. *Plant Mol. Biol.* **32:** 107-144.
- Browning, K.S., Goss D.J., Roth D.A. and Gallie D.R.** (1998) The translational machinery of plants. In: *A look beyond transcription: Mechanisms determining mRNA stability and translation in Plants* (Bailey Serres J. and Gallie D.R., eds.) American Society of plant Physiologists, Rockville, Maryland, pp. 68-84.
- Brunst, A.A., Crabtree K., Dallwitz M.J., Gibbs A.J., Watson L. and Zurcher E.J.** (eds.) (1996 onwards). 'Plant viruses online: Descriptions and lists from the VIDE Database. Version: 16<sup>th</sup> January 1997.' URL <http://biology.aun.edu.au/Groups/MES/vide/>

- Burnett, P.E., Barrow R.K., Cohen N.A., Snyder S.H. and Sabatini D.M.** (1998) RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 1432-1437.
- Carberry, S.E. Darzynkiewicz E. and Goss, D.J.** (1991) A comparison of the binding of methylated cap analogues to wheat germ protein synthesis initiation factors 4F and (iso)4F. *Biochemistry* **30**: 1624-1627.
- Carberry, S.E. and Goss D.J.** (1991) Wheat germ initiation factors 4F and (iso)4F interact differently with oligoribonucleotide analogues of rabbit  $\alpha$ -globin mRNA. *Biochemistry* **30**: 4542-4545.
- Collier, E., Watkinson A., Cleland C.F. and Roth J.** (1987) *J. Biol. Chem.* **262**: 6238-6247.
- Cruz-García, F., Zúñiga-Aguilar J.J. and Vázquez-Ramos J.** (1998) Effect of stimulating maize germination on cell cycle proteins. *Physiol. Plant.* **102**: 573-581.
- Dinkova, T.D. and Sánchez de Jiménez E.** (1999) Differential expression and regulation of translation initiation factors -4E and -iso4E during maize germination. *Physiol. Plant.* **107**: 419-425.
- Dinkova, T.D., Aguilar, R. and Sánchez de Jiménez E.** (2000) Expresión de maize initiation factor eIFiso4E is regulated at translational level. *Biochem. J.* (submitted)
- Dommes, J. and Van de Walle C.** (1990) Polysome formation and incorporation of new ribosomes into polysomes during germination of embryonic axes of maize. *Physiol. Plant.* **79**: 289-296.
- Duncan, R.F., Cavener D.R. and Qu S.** (1995) Heat shock effects on phosphorylation of protein synthesis initiation factor 4F from *Drosophila melanogaster* embryos. *Biochemistry* **34**: 2985-2997.
- Fennoy, S. and Bailey-Serres J.** (1995) Post-transcriptional regulation of gene expression in oxygen deprived roots of maize. *Plant J.* **15**: 727-735.
- Gallie, D.R., Caldwell C. and Pitto L.** (1995) Heat shock disrupts cap and poly(A) tail function during translation and increases mRNA stability of introduced reporter mRNA. *Plant Physiol.* **108**: 1703-1713.
- Gallie, D.R.** (1996) Translational control of cellular and viral mRNAs. *Plant Mol. Biol.* **32**: 145-158.
- Gallie, D.R., Le H., Tanguay R.L., and Browning K.S.** (1998) Translation initiation factors are differentially regulated in cereals during development and following heat shock. *Plant J.* **14**: 715-722.
- Gallie, D.R.** (1998) A tale of two termini: a functional interaction between the termini of an mRNA is a prerequisite for efficient translation initiation. *Gene* **216**: 1-11.
- Gan, W., La Celle M. and Rhoads R.E.** (1998) Functional characterization of the internal ribosome entry site of eIF-4G mRNA. *J. Biol. Chem.* **273**: 5006-5012.
- Geballe, A.P.** (1996) Translational control mediated by upstream AUG codons. In: *Translational Control* (Hershey, J.W.B., Mathews M.B. and Sonenberg, N., eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 173-197.
- Gingras, A.C., Kennedy S.G., O'Leary M.A., Sonenberg N. and Hay N.** (1998) 4E-BP1, a repressor of mRNA translation is phosphorylated and inactivated by Akt (PKB) signaling pathway. *Genes and Development* **12**: 502-513.
- Gingras, A.C., Raught B. and Sonenberg N.** (1999) eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* **68**: 913-963.
- Goldbach, R.** (1987) Genome similarities between plant and animal RNA viruses. *Microbiological Sciences* **4**: 197-205.

- Gossert, R., Chang K.H., Rijnbrand R., Yi M., Sangar D.V. and Lemon S.M.** (2000) Transient expression of cellular polypyrimidine-tract binding protein stimulates cap-independent translation directed by both picornaviral and flaviviral internal ribosome entry sites *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 1583-1595.
- Guy, P.A. and Black M.** (1998) Germination-related proteins in wheat revealed by differences in seed vigour. *Seed Sci. Res.* **8**: 99-111
- Hann, L.E., Webb A.C., Cai J.M. and Gehrke L.** (1997) Identification of a competitive translation determinant in the 3' untranslated region of alfalfa mosaic virus coat protein mRNA. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 2005-2013.
- Hara, K., Yonezawa K., Wang Q.P., Kozlowski M.T., Belham C. and Avruch J.** (1998) Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *J. Biol. Chem.* **273**: 14484-14494.
- Hershey, J.W.B.** (1991) Translational control in mammalian cells. *Annu. Rev. Biochem.* **60**: 715-755.
- Hirt, H.** (2000) Connecting oxidative stress, auxin, and cell cycle regulation through a plant mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **97**: 2405-2407.
- Jefferies, H.B.J., Reinhard, C., Kozma, S.C. and Thomas, G.** (1994) Rapamycin selectively represses translation of the "polypyrimidine tract" mRNA family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **91**: 4441-4445.
- Jefferies, H.B.J. and Thomas G.** (1996) Ribosomal protein S6 phosphorylation and signal transduction. In: *Translational Control* (Hershey, J.W.B., Mathews M.B. and Sonenberg, N., eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 389-410.
- Johnston, K.A., Polymenis M., Wang S, Branda J. and Schmidt E.V.** (1998) Novel regulatory factors interacting with the promoter of the gene encoding the mRNA cap binding protein (eIF4E) and their function in growth regulation. *Mol. Cell Biol.* **18**: 5621-5633.
- Keiper, B.D., Lamphear B.J., Deshpande A.M., Jankowska-Anyszka M., Aamodt E.J., Blumenthal T. and Rhoads R.E.** (2000) Functional characterization of five eIF4E isoforms in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* **275**: 10590-10596.
- Khaleghpour, K., Pyronnet S., Gingras A.C. and Sonenberg N.** (1999) Translational homeostasis: eukaryotic translation initiation factor 4E control of 4E-binding protein 1 and p70 S6 kinase activities. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 4302-4310.
- Kleijn, M., Vrins C.L.J., Voorma H.O. and Thomas A.A.M.** (1996) Phosphorylation state of the cap binding protein eIF4E during viral infection. *Virology* **217**: 486-494.
- Kleijn, M., Schepper G.C., Voorma H.O. and Thomas A.A.M.** (1998) Regulation of translation initiation factors by signal transduction. *Eur. J. Biochem.* **253**: 531-544.
- Klein, P.S. and Melton, D.A.** (1994) Induction of mesoderm in *Xenopus laevis* embryos by translation initiation factor 4E. *Science* **265**: 803-806.
- Kozak, M.** (1991) Effects of long 5' leader sequences on initiation by eukaryotic ribosomes *in vitro*. *Gene Expr.* **1**: 117-125.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* **227**: 231-234.
- Lamphear, B.J., Kirchweger R., Skern T. and Rhoads R.E.** (1995) Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. *J. Biol. Chem.* **270**: 21975-21983.

- Lavoie, C.A., Lachance P.E.D., Sonenberg N. and Lasko P.** (1996) Alternatively spliced transcripts from the *Drosophila* eIF-4E gene produce two different cap-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **271**: 16393-16398.
- Lawrence, J.C.Jr and Abraham R.T.** (1997) PHAS/4E-BPs as regulators of mRNA translation and cell proliferation. *Trends Biochem. Sci.* **22**: 345-349.
- Lazaris-Karatzas, A., Montine K.S. and Sonenberg N.** (1990) Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5' cap. *Nature* **345**: 544-547.
- Le, H., Browning K.S. and Gallie D.R.** (1997) The phosphorylation state of wheat translation initiation factors eIF4B, eIF4A and eIF2 is differentially regulated during seed development and germination. *J. Biol. Chem.* **273**: 20084-20089.
- Manjunath, S., Williams A.J. and Bailey-Serres J.** (1999) Oxygen deprivation stimulates Ca<sup>2+</sup> mediated phosphorylation of mRNA cap-binding protein eIF4E in maize roots. *Plant J.* **19**: 21-30
- Marcotrigiano, J., Gingras A.C., Sonenberg N. and Burley S.K.** (1997) Cocystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF-4E) bound to 7-methyl-GDP. *Cell* **89**: 951-961.
- Mathews, M.B., Sonenberg, N. and Hershey J.W.B.** (1996) Origins and targets of translational control. In *translational Control* (Hershey, J.W.B., Mathews M.B. and Sonenberg, N., eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 1-29.
- Merkulova, T.I., Frolova L.Y., Lazar M, Camonis J. and Kisselev L.L.** (1999) C-terminal domains of human translation termination factors eRF1 and eRF3 mediate their *in vivo* interaction. *FEBS Lett.* **443**: 41-47.
- Merrick, W.C.** (1992) Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiol. Reviews* **56**: 291-315
- Merrick, W.C. and Hershey J.W.B.** (1996) The pathway and mechanism of eukaryotic protein synthesis. In *Translational Control* (Hershey, J.W.B., Mathews M.B. and Sonenberg, N., eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York pp. 31-69.
- Metz, A.M., Timmer R.T. and Browning K.S.** (1992) Isolation and sequence of a cDNA encoding the cap binding protein of wheat eukaryotic protein synthesis initiation factor 4F. *Nucl. Acids Res.* **20**: 4096.
- Meyuhas, O., Avni D. and Shama S.** (1996) Translational control of ribosomal protein mRNAs in eukaryotes. In *Translational Control* (Hershey, J.W.B., Mathews M.B. and Sonenberg, N., eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 363-388.
- Minich, W.B., Balasta M.L., Goss D.J. and Rhoads R.E.** (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 7668-7672.
- Mizoguchi, T., Hayashida N., Yamaguchi-Shinozaki K., Kamada H. and Shinozaki K.** (1995) Two genes that encode ribosomal-protein S6 kinase homologs are induced by cold or salinity stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **358**: 199-204.
- Möller, W.** (1990) Hypothesis: ribosomal protein L12 drives movement of tRNA. In: *The Ribosome: Structure, Function and Evolution* (Hill W.E., Dohlberg A., Garret R.A., Moore P.B., Schlessinger D. and Warner J.D., eds.) American Society of Microbiologists, Washington, D.C., pp. 380-389.
- Murashige, T. and Skoog C.** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473-479.
- Nairn and Palfrey** (1996) Regulation of protein synthesis by calcium. In: *Translational Control* (Hershey, J.W.B., Mathews M.B. and Sonenberg, N., eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 295-319.



- Nave, B.T., Ouwens M., Withers D.J., Alessi D.R. and Shepherd P.R.** (1999) Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochem J.* **344**: 27-31.
- O'Farrell, P.H.** (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**:4007-4021.
- Pain, V.M.** (1996) Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells. *Eur. J. Biochem.* **236**: 747-771.
- Pause, A., Belsham G.J., Gingras A.C., Donze O., Lin T.A., Lawrence J.C. Jr. and Sonenberg N.** (1994) Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature* **371**: 762-767.
- Pellizzoni L., Cardinali B., Lin-Marq N., Mercanti D and Pierandrei-Amaldi P.** (1996) A *Xenopus laevis* homologue of the La autoantigen binds the pyrimidine tract of the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs *in vitro*: implication of a protein factor in complex formation. *J. Mol. Biol.* **259**: 904-915.
- Pérez, L., Aguilar R. and Sánchez de Jiménez E.** (1990) Phosphorylation of ribosomal proteins induced by auxins in maize axes during germination. *Plant Physiol.* **94**: 1270- 1275.
- Pérez-Méndez, A., Aguilar-Caballero R. and Sánchez de Jiménez E.** (1993) Characterization of ribosomal protein phosphorylation in maize axes during germination. *Plant Sci.* **94**: 71-79.
- Pestova, T., Shatsky I.N. and Hellen C.U.T.** (1996) Functional dissection of eukaryotic initiation factor 4F: the 4A subunit and the central domain of the 4G subunit are sufficient to mediate internal entry of 43S preinitiation complexes. *Mol. and Cell. Biology* **16**: 6870-6878.
- Ponce, M.** (1999) Purificación y caracterización de la expresión del factor eIF4G durante la germinación de semillas de maíz *Zea mays* L. (Tesis de Licenciatura). Fac. de Química, UNAM.
- Pramanik, S.K., Krochko J.E. and Bewley J.D.** (1992) Distribution of cytosolic mRNAs between polysomal and ribonucleoprotein complex fractions in alfalfa embryos. *Plant Physiol.* **99**: 1590-1596
- Proud, C.G.** (1992) Protein phosphorylation in translational control. *Curr. Top. Cell. Reg.* **32**: 243-369.
- Remacha, M., Jiménez-Díaz A., Santos C., Briones E., Zambrano R., Rodríguez-Gabriel M.A., Guarinos E. and Ballesta J.P.G.** (1995) Proteins P1, P2 and P0, components of the eukaryotic ribosome stalk. New structural and functional aspects. *Biochem. Cell Biol.* **73**: 959-968.
- Rhoads, R.E.** (1993) Regulation of eukaryotic protein synthesis by initiation factors *J. Biol. Chem.* **268**: 3017-3020.
- Rodríguez, C.M., Freire M.A., Camilleri C. and Robaglia C.** (1998) The *Arabidopsis thaliana* cDNAs coding for eIF4E and eIF(iso)4E are not functionally equivalent for yeast complementation and are differentially expressed during plant development. *Plant J.* **13**: 465-473.
- Rom, E., Kim H.G., Gingras A.C., Marcotrigiano J., Favre D., Olsen H., Burley S. and Sonenberg N.** (1998) Cloning and characterization of 4EHP, a novel mammalian eIF4E-related cap-binding protein. *J. Biol. Chem.* **273**: 13104-13109.
- Rosenwald, I.B., Rhoads D.B., Callanan L.D., Isselbacher K.J. and Schmidt E.V.** (1993) Increased expression of eukaryotic translation initiation factors eIF-4E and

- eIF-2 $\alpha$  in response to growth induction by c-myc. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 6175-6178.
- Ruud, K.A., Kuhlwe C., Goss D.J. and Browning K.S.** (1998) Identification and characterization of a novel cap-binding protein from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **273**: 10325-10330.
- Sachs, A.B., Sarnow P. and Hentze M.** (1997) Starting at the beginning, middle and end: Translation initiation in eukaryotes. *Cell* **89**: 831-838.
- Sánchez de Jiménez, E., Aguilar R. and López S.** (1981) Distinctive characteristics of protein synthesis in maize embryos during the early stages of germination. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **99**: 445-450.
- Sánchez de Jiménez, E. and Aguilar R.** (1984) Protein synthesis patterns: relevance of old and new messenger RNA in germinating maize embryos. *Plant. Physiol.* **75**: 231-234.
- Sánchez de Jiménez, E., Beltrán E. and Ortiz-López A.** (1997a) Translation of ribosomal protein mRNAs in maize axes. In *Basic and Applied Aspects of Seed Biology* (Ellis, R.H., Black, M., Murdoch, A.J. and Hong, T.D., eds.) CABI Publishing, Oxon, pp. 385-394.
- Sánchez de Jiménez, E., Aguilar, R. and Dinkova, T.D.** (1997b) S6 ribosomal protein phosphorylation and translation of stored mRNA in maize. *Biochimie* **79**: 187-194.
- Sánchez de Jiménez, E., Beltrán-Peña E. and Ortiz-López A.** (1999) Insulin-stimulated ribosomal protein synthesis in maize embryonic axes during germination. *Physiol. Plant.* **105**: 148-155.
- Sánchez-Martínez, D., Puigdomenech P. and Pagés M.** (1986) Regulation of gene expression in developing *Zea mays* embryos. Protein synthesis during embryogenesis and early germination in maize. *Plant Physiol.* **82**: 543-549.
- Schantz, L.M. and Pegg A.E.** (1994) Overproduction of ornithine decarboxylase caused by relief of translational repression is associated with neoplastic transformation. *Cancer Res.* **54**: 2313-2316.
- Sha, M., Wang Y., Xiang T., van Heerden A., Browning K.S. and Goss D.J.** (1995) Interaction of wheat germ protein synthesis initiation factor eIF-(iso)4F and its subunits p28 and p86 with m<sup>7</sup>GTP and mRNA analogues. *J. Biol. Chem.* **270**: 29904-29909.
- Shama, S. and Meyuhas O.** (1996) The translational cis-regulatory element of mammalian ribosomal protein mRNAs is recognized by the plant translational apparatus. *Eur. J. Biochem.* **236**: 383-388.
- Sonenberg, N.** (1996) mRNA 5' Cap-binding protein eIF-4E and control of cell growth. In *Translational Control* (Hershey, J.W.B., Mathews M.B. and Sonenberg, N., eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 245-269.
- Sonenberg, N. and Gingras A.C.** (1998) The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**: 268-275.
- Spiegel, S. and Marcus A.** (1975) Protein synthesis without mRNA synthesis. *Nature* **256**: 228-230
- Spirin, A.** (1996) Masked and translatable messenger ribonucleoproteins in higher eukaryotes In: *Translational Control* (Hershey, J.W.B., Mathews M.B. and Sonenberg, N., eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 319-335.
- Stoneley, M., Chappell S.A., Jopling C.L., Dickens M., MacFarlane M. and Willis A.E.** (2000) cMyc protein synthesis is initiated from the internal ribosome entry segment during apoptosis. *Mol Cell. Biol.* **20**: 1162-1169.

- Stutz, A., Conne B., Huarte J., Gubler P., Völkel V, Flandin P. and Vassalli J.** (1998) Masking, unmasking, and regulated polyadenylation cooperate in the translational control of a dormant mRNA in mouse oocytes. *Genes & Dev.* **12**: 2535-2548.
- Svitkin, Y.V., Ovchinnikov L.P., Dreyfuss G. and Sonenberg N.** (1996) General cap binding proteins render translation cap dependent. *EMBO J.* **15**: 7147-7155.
- Tanguay, R.L. and Gallie D.R.** (1996) Isolation and characterization of the 102-kilodalton RNA-binding protein that binds to the 5' and 3' translational enhancers of tobacco mosaic virus RNA. *J. Biol. Chem.* **271**: 14316-14322.
- Tarun, S.Z., Wells S.E., Deardorff J.A. and Sachs A.B.** (1997) Translation initiation factor eIF4G mediates in vitro poly(A) tail dependent translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 9046-9051.
- Tjian, R.** (1995) Molecular machines that control genes. *Sci. Am.* **272**: 54-61
- Trojanek, J, Ek P., Scoble J., Muszynska G. and Engström L.** (1996) Phosphorylation of plant proteins and the identification of protein-tyrosine kinase activity in maize seedlings. *Eur. J. Biochem.* **235**: 338-344.
- Turck, F., Kozma S.C., Thomas G. and Nagy F.** (1998) A heat-sensitive *Arabidopsis thaliana* kinase substitutes for human p70<sup>S6k</sup> function *in vivo*. *Mol. Cell Biol.* **18**: 2038-2044.
- Vayda, M.E. and Webster C.** (1998) Translational regulation during periods of environmental stress. In: A look beyond transcription: Mechanisms determining mRNA stability and translation in Plants (Bailey Serres J. and Gallie D.R., eds.) American Society of plant Physiologists, Rockville, Maryland, pp.
- Venis, M.A. and Napier R.M.** (1997) Auxin perception and signal transduction. In: *Signal Transduction in plants. Molecular and Cell Biology Updates* (Aducci, P., ed.) Birkhauser Verlag Basel, Switzerland, pp. 45-63.
- Wakiyama, M., Saigoh M., Shiokawa K. and Miura K.** (1995) mRNA encoding the translation initiation factor eIF-4E is expressed early in *Xenopus* embryogenesis. *FEBS Lett.* **360**: 191-193.
- Walker, J.C.** (1994) Structure and function of the receptor-like protein kinases of higher plants. *Plant Mol. Biol.* **26**: 1599-1609
- Wang S., Browning K.S. and Miller W.A.** (1997) A viral sequence in the 3'-untranslated region mimics a 5' cap in facilitating translation of uncapped mRNA. *EMBO J.* **16**: 4107-4116.
- Webster, C., Gaut R.L., Browning K.S., Ravel J.M. and Roberts J.K.M.** (1991) Hypoxia enhances phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4A in maize root tips. *J. Biol. Chem.* **266**: 23341-23346.
- Wells, D.R., Tanguay R.L., Le H. and Gallie D.R.** (1998) HSP101 functions as a specific translational regulatory protein whose activity is regulated by nutrient status. *Genes & Dev.* **12**: 3236-3251
- Yang, W. and Hinnebusch A.G.** (1996) Identification of a regulatory subcomplex in the guanine nucleotide exchange factor eIF2B that mediates inhibition by phosphorylated eIF2. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 6603-6616.
- Zapata, J.M., Maroto F.G. and Sierra J.M.** (1991) Inactivation of mRNA cap-binding protein complex in *Drosophila melanogaster* embryos under heat shock. *J. Biol. Chem.* **266**: 16007-16014.
- Zhao, Y., Watson J.C., Kung S. and Bottino P.J.** (1995) Characterization of a cDNA encoding ribosomal protein S16 in rice. *Plant Physiol.* **107**: 1471-1472.