



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

REQUERIMIENTOS TRADUCCIONALES DE mRNAs  
ALMACENDOS EN SEMILLAS DE MAÍZ

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A

NORMA ANGÉLICA MÁRQUEZ VELÁZQUEZ





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Estela Sánchez Quintanar
Vocal	Prof. Rogelio Rodríguez Sotres
Secretario	Prof. Amelia Ma. de Gpe Farres Gonzalez Saravia
1er. Suplente	Prof. Francisco Ruíz Terán
2do. Suplente	Prof. Maria Eugenia de la Torre Hernández

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 103

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas

Facultad de Química. UNAM

Asesor del tema:

\_\_\_\_\_  
Dra. Estela Sánchez Quintanar

Supervisor técnico:

\_\_\_\_\_  
M. en C. Raúl Aguilar Caballero

Sustentante:

\_\_\_\_\_  
Norma Angélica Márquez Velázquez

---

---

Dedico este trabajo a **mi hijo**, Fernando, por ser el principal motor en todo lo que hago, gracias por toda la felicidad que has traído a mi vida.

A **mis padres**, Consuelo y Nicolás, quienes han participado con mucho en mi formación profesional, gracias por ser el mas grande apoyo que tengo y por confiar siempre en mí. En cada etapa de mi vida, ustedes siempre están presentes.

Muchas gracias!!

A **mi hermano**, José Manuel, quien es para mi un ejemplo de dedicación y perseverancia, agradezco mucho tu ayuda y compañía desde siempre.

A **mis abuelos**, Gregoria y Cipriano, que siempre me brindaron su cariño y cuidados, y que son un ejemplo de fortaleza y superación;  
a mis tías y tíos que siempre me han acompañado, gracias por todo.

---

---

---

---

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Estela Sánchez Quintanar, por la oportunidad de incorporarme a su grupo de trabajo, por ser una fuente de enseñanza y por motivar mi interés en la investigación.

Al M. en C. Raúl Aguilar Caballero, por el importante apoyo otorgado en la parte experimental de este trabajo.

A la Dra. Amelia Farrés, por el tiempo dedicado a la revisión de ésta tesis, por sus consejos y su apoyo. Igualmente agradezco al Dr. Rogelio Rodríguez Sotres, por sus muy acertados comentarios.

A Hilda, Homero y Ricardo, porque siempre tuvieron una respuesta a mis preguntas, por su paciencia y por todas sus enseñanzas. A Lourdes, por su amistad, su apoyo incondicional y sus valiosos consejos. A Cesy porque siempre tiene un momento para aclarar mis dudas.

A Erika, por su invaluable apoyo cuando las cosas se ponen difíciles. A Esme y Rebe, por su compañía desde el inicio de este camino. Gracias a las tres por su amistad y por hacer tan agradable esta etapa. A la señora Andrea, por su ayuda, por sus consejos y su compañía. A Miriam por su amistad y apoyo.

A todos mis compañeros del Depto. de Bioquímica, por su amistad y toda la ayuda que me han otorgado: César, Augusto, Alex, Viri, Sara, Julissa, Valeria, Katy, Ernesto, Rodrigo, Alan, Vero, Alina, Laura, Carlos, Héctor y Luis. A Martín y a Pilo gracias especialmente por que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme. A mis compañeros de la Facultad de Química: Deyanira, Francisco, George, Larissa, Víctor (Bart), Rafa, Ligia... gracias por todos los bonitos recuerdos que dejan en mi vida.

---

---

---

A Liliana, Juan Carlos, Víctor-Víctor y Miriam, por su amistad y apoyo en los peores y en los mejores momentos que compartimos. A Paola y Víctor, por su compañía a lo largo de mi estancia en la Facultad de Química, porque siempre tienen una sonrisa y una palabra amable (o un reclamo...) que me recuerda el valor de la amistad. Muchas gracias a todos!!

A Héctor por su amistad incondicional desde hace ya algunos años, por estar presente siempre.

A Fernando por compartir conmigo gran parte de mi estancia en la Facultad de Química y la etapa más importante de mi vida.

Agradezco también al Sistema Nacional de Investigadores y a DGAPA por el apoyo otorgado.

A la UNAM por abrirme las puertas a un mundo de aprendizaje que no termina.

A Dios.

---

---

---

## CONTENIDO

Abreviaturas .....	1
Resumen .....	3
Introducción .....	5
Antecedentes	
Germinación .....	7
Síntesis de proteínas .....	9
Factor eucariótico de iniciación 4F (eIF-4F) .....	13
Control traduccional .....	16
Hipótesis .....	19
Objetivos .....	19
Materiales y Métodos	
Material biológico .....	20
Extracción de proteínas citoplásmicas de maíz para la obtención de los factores de iniciación .....	20
Cromatografía de afinidad con <sup>7</sup> mGTP-sefarosa .....	20
Obtención de los factores de iniciación 4E e iso4E recombinantes .....	21
Determinación de proteína soluble .....	23
SDS-PAGE .....	24
Western blot .....	25
Extracción de RNA total .....	25
Electroforesis para RNA .....	26

---

Purificación de RNA mensajero .....	26
Sistema de síntesis de proteínas <i>in vitro</i> .....	27
Cuantificación de la incorporación de [ <sup>35</sup> S]-met a las reacciones de síntesis de proteínas <i>in vitro</i> .....	27
Inducción de fosforilación de los factores de iniciación por estímulo con Insulina .....	27
<b>Resultados</b>	
Obtención de factores eIF-4E y eIF-iso4E nativos .....	29
Obtención de factores eIF-4E y eIF-iso4E recombinantes .....	30
Síntesis de proteínas <i>in vitro</i> .....	33
Preparación de anticuerpos contra eIF-4E y eIF-iso4E recombinantes .....	40
Efecto de Insulina sobre la fosforilación de los factores de iniciación eIF-4E y eIF-iso4E de maíz .....	42
<b>Discusión</b>	
Purificación de los factores eIF-4E y eIF-iso4E .....	45
Síntesis de proteínas <i>in vitro</i> .....	46
Producción de anti-suero policlonal contra eIF-4E y eIF-iso4E de maíz .....	49
Fosforilación de eIF-4E .....	50
Conclusiones .....	52
Bibliografía .....	53



---

## ABREVIATURAS

BSA	Albúmina sérica bovina
cm <sup>2</sup>	Centímetro cuadrado
cpm	Cuentas por minuto
DEPC	Dietil pirocarbonato
DTT	1,4-Ditio-DL-trietol
O.D.	Densidad óptica
eIF-4E	Factor eucariótico de iniciación 4E
eIF-iso4E	Factor eucariótico de iniciación iso4E
eIF-4E+GST	Factor eucariótico de iniciación 4E recombinante unido a la proteína de fusión GST
eIF-Iso4E+GST	Factor eucariótico de iniciación iso4E recombinante unido a la proteína de fusión GST
eIF-4E-GST	Factor eucariótico de iniciación 4E recombinante al que se cortó la proteína de fusión GST
eIF-Iso4E-GST	Factor eucariótico de iniciación iso4E recombinante al que se cortó la proteína de fusión GST
EtBr	Bromuro de etidio
g	Gramos
°C	Grados Celsius
GST	Glutación sulfhidril transferasa
<sup>7</sup> mGTP	7-metil-guanosina trifosfato
h	Hora
IPTG	Isopropil-β,D-tiogalactósido
IVT	Traducción <i>in vitro</i>
KCl	Cloruro de potasio
KDa	Kilodaltones
kH	Kilohertz

---

LiCl	Cloruro de litio
M	Molar
mA	Miliamper
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucléico mensajero
[ <sup>35</sup> S]-met	Metionina marcada radiactivamente con azufre-35
μL	Microlitros
NaCl	Cloruro de sodio
NaF	Fluoruro de sodio
NH <sub>4</sub> Ac	Acetato de amonio
nm	Nanómetros
pH	Potencial de hidrogeno
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
poliA+	Poli adenina
PVDF	Difluoruro de polivinildieno
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida
UTR	Región no traducible
UV	Luz ultravioleta
v/v	Relación volumen-volumen

## RESUMEN

Con la finalidad de determinar la existencia de diferencias en los requerimientos traduccionales de mRNAs almacenados en semillas de maíz respecto de los factores de iniciación de la traducción eIF-4E y eIF-iso4E, se planteó establecer sistemas de traducción carentes de dichos factores. Los factores fueron después reconstituídos con los correspondientes factores recombinantes, los cuales fueron producidos en células de *E. coli* y purificados.

La producción de factores recombinantes resultó ser una buena opción para este estudio. La principal ventaja es que se pueden obtener en mayor cantidad, además de que se purifican de forma independiente uno de otro, lo cual resultó difícil de lograr en la purificación de los correspondientes factores endógenos de maíz.

En experimentos de traducción *in vitro* de los mRNAs almacenados, se observó que hay mayor síntesis de proteínas cuando se adiciona el factor eIF-iso4E recombinante al sistema carente de factores 4E, en relación a cuando se agrega el factor eIF-4E recombinante a dicho sistema. Estos resultados son congruentes con el hecho ya conocido de que al inicio de la germinación el factor eIF-iso4E se encuentra presente en mayor cantidad que el factor eIF-4E. Lo anterior apoya la idea de que cada isoforma es requerida en etapas específicas del desarrollo de la planta, específicamente en la etapa de germinación.

Se utilizaron también los factores recombinantes para realizar una inmunización en conejos y obtener los anticuerpos correspondientes. En este trabajo se obtuvieron los anticuerpos con un buen título. Sin embargo, éstos tuvieron un reconocimiento cruzado entre ambas isoformas a diluciones bajas, debido probablemente a la similitud en su secuencia de aminoácidos la cual es del 47%. Dicho reconocimiento se hace un poco más selectivo al aumentar la dilución hasta aproximadamente 1:15000 en el caso del anti-eIFiso4E.

Por otro lado y tomando en cuenta que el control traduccional en diversos organismos a menudo implica eventos de fosforilación como respuesta a diferentes estímulos, entre ellos insulina, se analizó el efecto que causa éste factor en la fosforilación de los factores de maíz. Los resultados preliminares indican que ambas isoformas se fosforilan *in vivo*, aunque el estímulo con insulina parece aumentar la fosforilación de 4E más que la de iso4E.

## INTRODUCCIÓN

La abundancia de RNA mensajero (mRNA) citosólico no necesariamente corresponde con la cantidad de polipéptido sintetizado en células vegetales (Kawaguchi, 2002), esta es una afirmación que permite visualizar el concepto de control traduccional. En mamíferos este proceso ha sido muy estudiado y se conocen diferentes mecanismos involucrados. En plantas existen aún muchos aspectos que no están del todo esclarecidos, principalmente por las diferencias que existen entre los mecanismos traduccionales de plantas y animales. Un claro ejemplo de ello lo representa el complejo eIF-4F (factor eucariótico de iniciación 4F), que ejerce un control determinante en la traducción de los mRNAs cap-dependientes. En mamíferos y levaduras, eIF-4F se ha caracterizado como un complejo que contiene una subunidad de 220 kDa (4G) y otra de 26 kDa (4E), la cual se une a  $7^m$ GTP (Browning, 1996). Sin embargo, en germen de trigo, al igual que en otros tejidos vegetales estudiados (maíz, coliflor, *Arabidopsis*, cebada) se ha encontrado una isoforma de eIF-4F (eIF-iso4F), conteniendo también dos subunidades: una de 86 kDa (iso4G) y otra de 28 kDa (iso4E), ésta última con capacidad de unión a  $7^m$ GTP (Browning, 1996).

En mamíferos eIF-4E forma un complejo con las proteínas de unión a 4E (4EBPs) (Bayley-Serres, 1999). El control ejercido a nivel de este factor, se realiza de tal forma que cuando se requiere realizar la traducción de mRNAs, la proteína de unión es fosforilada y “libera” al factor, permitiendo que éste se una al cap y se inicie la traducción del mRNA. Así, en animales los rangos de traducción y la selección de mRNAs, se encuentran directamente relacionados con la disponibilidad de 4E (Bayley-Serres, 1999). En plantas, no se ha encontrado un homólogo de la proteína de unión, lo que sugiere otro tipo de control traduccional. Por otro lado, se han encontrado diferentes niveles en la expresión de las isoformas durante la germinación de semillas de maíz, siendo mayoritario eIF-iso4E (Dinkova, 2003).

Lo anterior, aunado a la presencia de mRNAs almacenados que son traducidos selectivamente al inicio de la germinación, lleva a considerar un probable mecanismo de control traduccional muy específico en esta etapa. Este mecanismo involucraría un control a nivel de los mRNAs que son reclutados a la maquinaria de traducción en forma diferencial por las isoformas eIF-4E y eIF-iso4E, las cuales estarían a su vez reguladas para expresarse en etapas específicas de la germinación.

## ANTECEDENTES

El maíz, junto con el trigo y el arroz, es uno de los cereales más importantes del mundo, visto desde el punto de vista social, ya que suministra elementos nutritivos a los seres humanos y a los animales, además de ser una materia prima básica de la industria de la transformación con la cual se producen almidón, aceite, proteínas, bebidas alcohólicas, edulcorantes alimenticios y, recientemente, combustible.

La capacidad de las semillas para germinar es una de las principales características reflejo de su calidad, de la cual depende la propagación y productividad de la planta.

### Germinación

Las semillas son la forma de propagación sexual de las plantas y se forman a partir de la fertilización de un óvulo vegetal por un gránulo de polen compatible. El maíz (*Zea mays* L.) es una planta que pertenece a la familia de las gramíneas en el grupo de las monocotiledóneas.

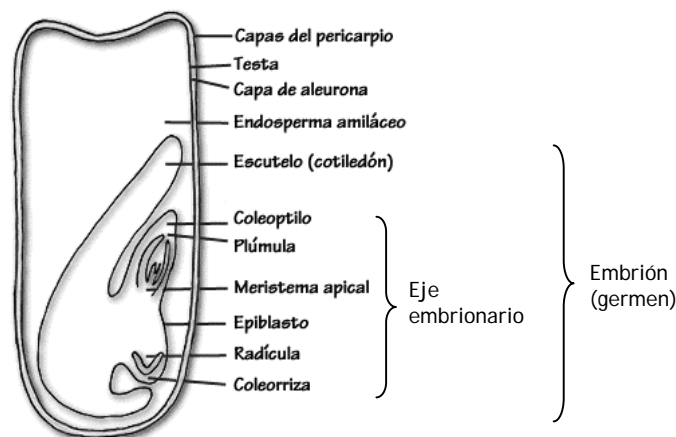


Fig. 1 Estructura de la semilla de maíz (*Zea mays* L.). Se muestra la sección correspondiente al eje embrionario, a partir del cual se desarrolla la nueva planta.

Las semillas en estado quiescente contienen un mínimo de agua y su metabolismo se encuentra prácticamente inactivo, sin embargo, una vez que la semilla se rehidrata, el metabolismo celular se activa e inicia una serie de acontecimientos que permiten el posterior desarrollo de la planta.

El proceso de germinación inicia con la incorporación de agua por la semilla quiescente (imbibición) y es completada cuando una parte del embrión, usualmente la radícula, se extiende para penetrar las estructuras que lo rodean (Bewley, 1997). Así, en un principio, las moléculas utilizadas para producir energía están presentes en las células vivas de los diferentes tejidos, mientras que al final de la germinación, la energía proviene de la movilización y ruptura de las reservas que la semilla acumuló en los cotiledones, o endospermo, durante el período de desarrollo (Bewley, 1994).

Por lo anterior, la germinación de las semillas es un proceso complejo multi-estado que requiere la expresión coordinada de numerosos genes en diferentes tejidos y, dada la complejidad del proceso, se espera que dichos genes sean regulados coordinadamente tanto espacial como temporalmente (Potokina, 2002). Un evento particularmente importante en el proceso de germinación de las semillas es la síntesis de proteínas, la cual ocurre en etapas tempranas (Bewley, 1994). Esto es posible gracias a que los embriones de semillas secas maduras contienen todos los componentes requeridos para dicho proceso, aunque sin la presencia de polisomas, los cuales se forman al cabo de unos minutos de imbibición (Bewley, 1997). Muchos de los mRNAs traducidos inicialmente están presentes en ejes embrionarios aún antes de la imbibición, éstos son los llamados mRNAs almacenados. La generación de nuevos mRNAs a través de la transcripción es un proceso que se observa en una etapa posterior a la del inicio de la traducción (Bewley, 1997). La traducción de los mRNAs almacenados se da de forma diferencial, ocurriendo en etapas tempranas en algunos mientras que otros se traducen en etapas tardías. Entre los mRNAs almacenados es probable también que algunos de ellos sean degradados (Dinkova, 2003).



En *Arabidopsis*, se ha encontrado que la inhibición de la síntesis de proteínas tiene la capacidad de inhibir totalmente la germinación, la cual resiste la inhibición de la transcripción. Estos resultados sugieren que las proteínas específicas de germinación son sintetizadas a partir de mRNAs almacenados (Rajjou, 2004). Por otro lado, en ejes de maíz, los mRNAs almacenados son traducidos selectivamente durante la germinación, lo cual se ha observado en patrones de expresión de proteínas *in vivo* en ausencia de transcripción (Sánchez de Jiménez, 1984).

## Síntesis de proteínas

La traducción es la etapa final de la expresión de la información genética y es mediante este proceso que la información codificada en la secuencia de nucleótidos del mRNA da lugar a la secuencia correspondiente de aminoácidos que constituyen el polipéptido. Para que este proceso se realice, se requiere la presencia de una serie de moléculas, como son: mRNA, ribosomas, tRNAs, aminoácidos, una serie de factores de naturaleza proteica, las enzimas aminoacil-tRNA sintetetasas y energía, la cual se utiliza en forma de ATP y GTP.

Los ribosomas son el sitio en el que se realiza la biosíntesis de las proteínas. Los ribosomas de diferentes organismos eucariotes presentan algunas características diferentes, sin embargo, todos están formados por dos subunidades, las cuales se identifican con las siglas 40S y 60S. Estos números hacen referencia a sus coeficientes de sedimentación, es decir, a las velocidades con que las subunidades sedimentan al ser ultracentrifugadas (Robertis, 1996). Cada subunidad ribosomal está integrada por una o más moléculas de RNA ribosomal y un número determinado de proteínas. La traducción únicamente se realiza en ribosomas completos, es decir, que presentan las dos subunidades.

Los RNA de transferencia actúan como adaptadores entre la información del mRNA

basada en nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de la proteína correspondiente; cada tRNA es específico para un solo residuo de aminoácido, aunque puede descodificar a más de un codón (Smith, 1998).

Existen 20 aminoacil-tRNA sintetasas diferentes, cada una diseñada para reconocer un tipo de aminoácido y, a la vez, el tRNA que contiene el anticodón compatible con él (Robertis, 1996). El papel de estas enzimas es esterificar el aminoácido con el tRNA correspondiente.

En eucariotes el mRNA maduro presenta una estructura tripartita (Fig. 2), la cual consiste de una región 5' no traducible (5'UTR), una región codificante formada por tripletes de nucleótidos (codones), cada uno de los cuales codifica para un aminoácido, y una región 3' no traducible (3'UTR). El principio de la secuencia codificante se representa por un codón iniciador (casi siempre AUG) y el final de la secuencia de codificación es un codón de terminación (UAA, UGA o UAG) (Smith, 1998). En la mayoría de los eucariotes, los transcritos nacientes que son sintetizados por la RNA polimerasa II, son modificados co-transcripcionalmente en su extremo 5' por adición de un 7-metilguanosa ( $m^7G$ ) ó cap. Además del ribosoma y los tRNAs, la decodificación de un mRNA requiere la asistencia de factores accesorios que facilitan la iniciación, elongación y terminación de la traducción. Ortólogos funcionales para algunos de estos factores están presentes tanto en procariotes como en eucariotes (Gallie, 2002). Sin embargo, dado que la transcripción y la traducción son procesos espacial y temporalmente separados en eucariotes, existen diferencias importantes en las interacciones y el número de factores que participan en la traducción en relación a los organismos procariotes.

Durante el inicio de la traducción, el cap participa en el reclutamiento de mRNAs a ribosomas por interacción con el factor eucariótico de iniciación eIF-4F (Cougot, 2004). En términos generales, 95 a 97% de los mRNAs totales de la célula parecen seguir la vía cap-dependiente para su traducción (Merrick, 2004). Existe un mecanismo

alterno para la iniciación de la traducción, el cual ocurre independientemente del cap, se trata de un elemento secuencial en el extremo 5'UTR, el cual actúa como un sitio interno de entrada del ribosoma (IRES). Los elementos IRES se han encontrado en muchos mRNAs celulares que codifican proteínas regulatorias, como factores de crecimiento (Mignone, 2002).

Muchos autores distinguen tres etapas en el proceso de traducción: iniciación, elongación o alargamiento y terminación. Sin embargo, algunos autores distinguen como primera etapa la activación, en la cual los aminoácidos son esterificados enzimáticamente a sus correspondientes tRNAs a expensas de la energía del ATP.

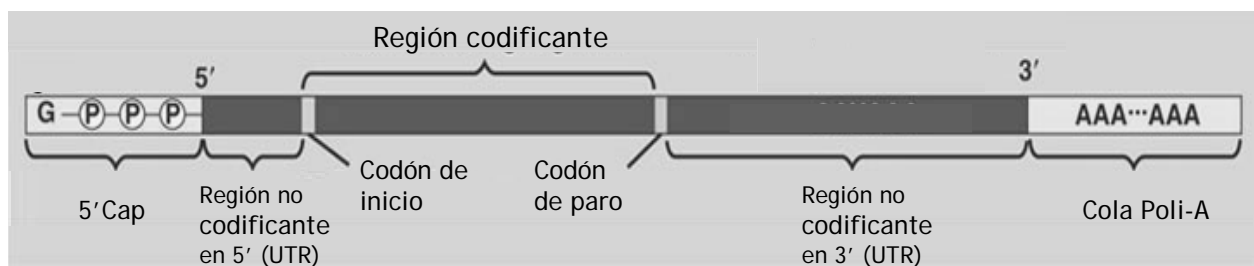


Fig. 2 Estructura de un mRNA.

La iniciación a su vez, puede ser subdividida en tres pasos: primero, unión del iniciador específico metionil-tRNA[i]<sup>met</sup> a la subunidad ribosomal pequeña; segundo, unión del complejo resultante a un mRNA y localización del codón de iniciación; y tercero, unión a la subunidad ribosomal grande para generar un ribosoma competente para la traducción (Sonenberg, 2003). Así, en el inicio la subunidad pequeña del ribosoma se une en el extremo 5' del mRNA y después se mueve a lo largo del mRNA hasta que encuentra el primer AUG. En esta unión del ribosoma están involucrados una serie de factores de naturaleza proteica que se unen a la estructura *cap* del mRNA, llamados factores eucarióticos de iniciación de la traducción (eIF). El llamado complejo de pre-iniciación 43S incluye al mRNA, las proteínas de eIF4, el complejo de

la subunidad ribosomal eIF2-tRNA<sup>met</sup>-40S, eIF3, eIF1A y eIF5 (Bailey-Serres, 1999). La etapa de iniciación concluye con la unión de la subunidad ribosomal 60S y la hidrólisis de GTP. Es entonces que se forma el ribosoma completo. En él se encuentran los primeros dos codones del mRNA: el codón AUG de iniciación unido al metionil-tRNA[i]<sup>met</sup> y enseguida el codón que codifica para el primer aminoácido de la cadena polipeptídica después de la metionina.

En la etapa de alargamiento, la cadena polipeptídica se prolonga por adición secuencial de nuevos restos aminoacilo, los cuales son transferidos enzimáticamente desde los aminoacil-tRNAs, los cuales se han unido al ribosoma en función del codón específico del mRNA. Para que esta etapa se lleve a cabo, también es necesaria la presencia de los denominados factores de elongación (eEF), además se requiere de energía, la cual es suministrada en forma de GTP.

La traducción termina cuando el ribosoma llega al codón de terminación del mRNA, pues no existe un tRNA cuyo anticodón corresponda a dicho codón. En ausencia de ello, los factores de terminación o liberación promueven el proceso de terminación, el cual implica la hidrólisis del enlace que une el aminoácido final de la cadena naciente con el último tRNA. En esta reacción también se requiere de GTP. Así, se libera el polipéptido completo y también se liberan las dos subunidades ribosómicas, junto con el mRNA.

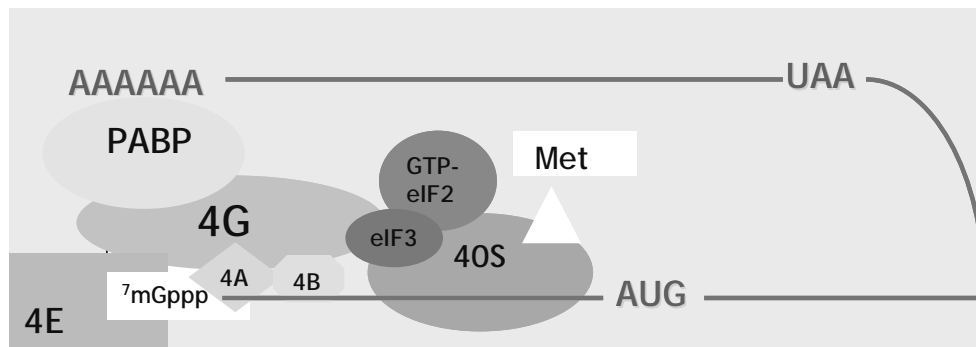


Fig. 3 Modelo de la unión de la subunidad 40S al mRNA.

## Factor eucariótico de iniciación 4F (eIF-4F)

El factor de iniciación eucariótico 4F (eIF-4F) juega un papel predominante en el control traduccional, ya que está implicado en la unión del ribosoma al mRNA, lo cual es un paso decisivo para que el mRNA sea expresado. Se trata de un complejo que consiste de eIF-4E, una proteína pequeña que se une al grupo m<sup>7</sup>G del extremo 5' de los mRNAs y eIF-4G, una proteína grande que interactúa con otros factores de iniciación (Browning, 2004). En este sentido, eIF-4E modula el reconocimiento del cap en la iniciación, siendo esencial para la traducción cap-dependiente (Gingras et al., 1999). Se ha visto que la disminución de eIF-4E (y proteínas asociadas) de extractos libres de células reduce drásticamente la traducción de mRNAs con cap; la actividad es restaurada por adición de eIF-4E nativo ó expresado en bacterias (Gingras, 1999). Por otro lado, eIF-4A es otra proteína asociada también a este complejo, se trata de una helicasa que participa en el desenrollamiento del mRNA dependiente de ATP.

Se han caracterizado muchas isoformas de eIF4E en eucariotes: tres en mamíferos (eIF4E-1, 4EHP, eIF4E-3), tres en plantas (eIF-4E, eIF-iso4E, nCBP), cinco en *C. Elegans*, dos en pez zebra, dos en *Xenopus*, dos en *S. pombe*, dos en *Leishmania* y ocho en *Drosophila*. En contraste, sólo un gen eIF-4E está presente en *S. cerevisiae* (Hernández, 2005). En la fig. 4 se presenta la secuencia tanto del factor eIF-4E como la del factor eIF-iso4E de algunos organismos, incluyendo maíz y ratón.

El proceso de traducción en plantas presenta algunas diferencias en comparación con otros eucariotes, y esto parece ser consecuencia de la estructura y función de eIF-4F, (Browning, 1996). Un hecho relevante es la presencia de la isoforma eIF-iso4F, la cual no está presente en otros eucariotes. eIF-iso4F consiste también de dos subunidades, una proteína pequeña (eIF-iso4E) que se une al cap y una subunidad grande (eIF-iso4G) y tiene actividades similares a eIF-4F *in vitro* (Browning, 2004). En maíz, eIF-4E y eIF-iso4E tienen una masa molecular de 26 y 28 KDa, mientras que eIF-4G y eIF-iso4G tienen una masa molecular de 220 y 86 KDa, respectivamente. Se ha identificado una

tercera proteína de unión al cap en *Arabidopsis*, la cual interactúa con eIF-iso4G en un sistema de levadura y reemplaza a eIF-4E o eIF-iso4E en un sistema de traducción *in vitro* (Bailey-Serres, 1999). La función de esta proteína aún no se ha identificado.

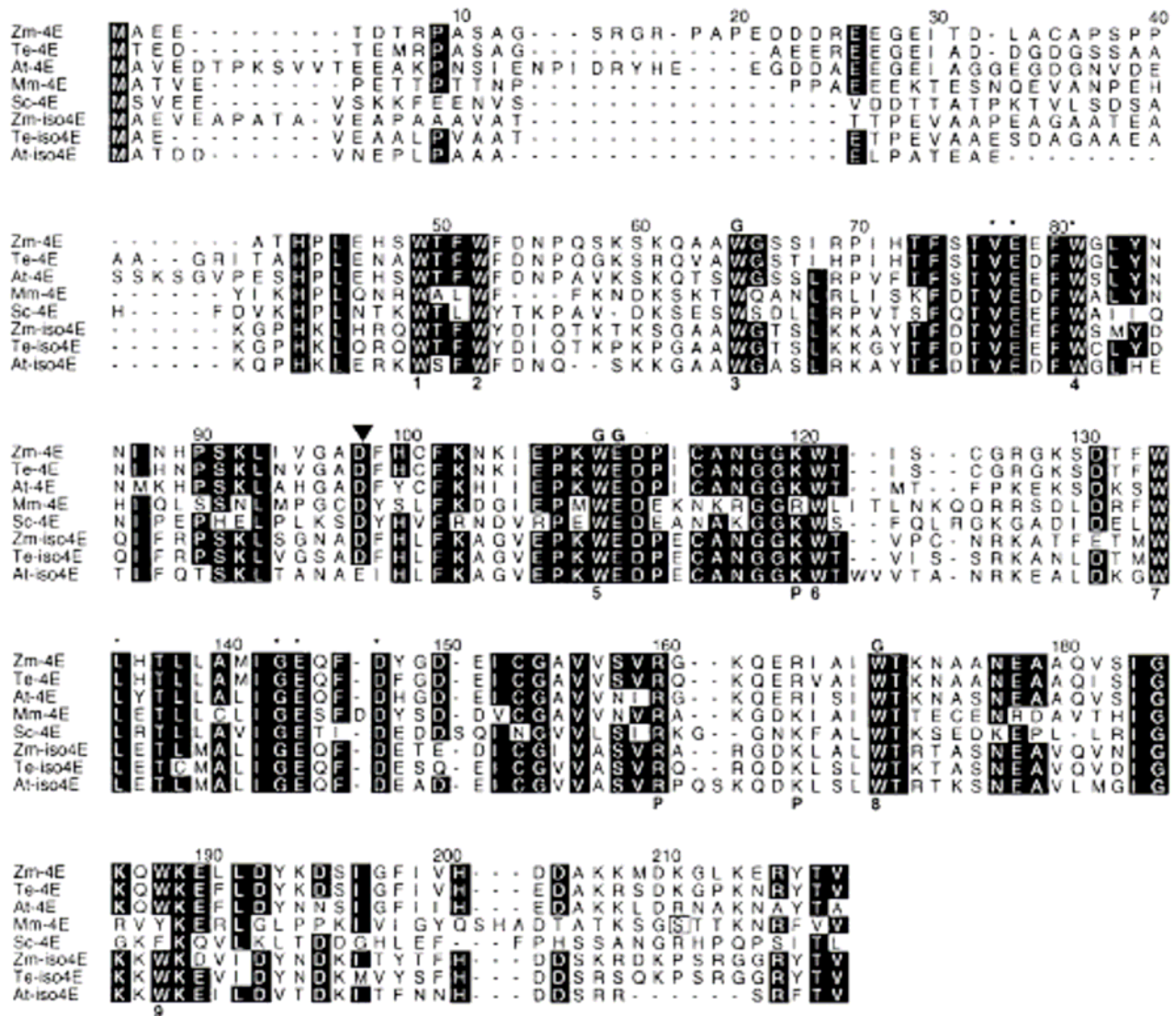


Fig. 4 Comparación de la secuencia de aminoácidos deducida para eIF-4E y eIF-iso4E de maíz (Zm), trigo (Te), *Arabidopsis thaliana* (At); eIF-4E de ratón (Mm) y levadura (Sc). Se distinguen nueve residuos de triptofano conservados (numerados del 1 al 9 en negritas); los residuos que interactúan con m<sup>7</sup>guaninas se marcaron como G; los residuos que interactúan con los fosfatos de m<sup>7</sup>guanina se marcan como P; los residuos involucrados en la interacción de eIF-4E con eIF-4G se marcan con un asterisco. En la secuencia correspondiente a ratón, se marca el residuo Ser209, el cual se fosforila en mamíferos y no está presente en plantas.

Se han encontrado diferentes niveles de expresión de eIF-4E y de eIF-iso-4E en diferentes tejidos de *Arabidopsis thaliana* (Rodríguez et al, 1998). En maíz, se han encontrado diferentes niveles en la expresión de las isoformas durante la germinación (Dinkova, 2003), de tal forma que en el inicio eIF-iso4E se encuentra en mucho mayor cantidad de eIF-4E, el cual incrementa sus niveles (tanto de proteína como de mensaje) hacia el final de la germinación (fig. 5). Los niveles de eIF-iso-4E dependen en gran medida de la traducción, al contrario de lo observado para eIF-4E. Además, la síntesis de eIF-iso4E aumenta selectivamente por estímulo con insulina (Dinkova, 2000).

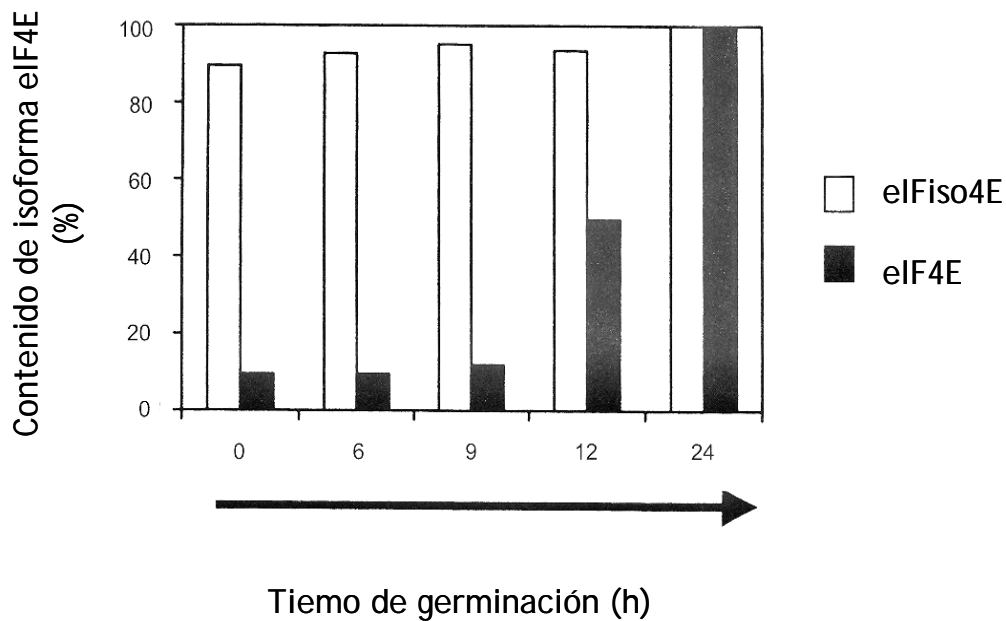


Fig. 5 Contenido de factores de iniciación de la traducción durante la germinación de maíz. La gráfica representa el análisis densitométrico para cada isoforma en los tiempos de germinación que se indican, a partir de ensayos de Western-blot para las proteínas purificadas. El contenido de proteína para cada isoforma a las 24 h de germinación fue tomado como el 100%. (Dinkova, 2003).

Por otro lado, estudios de unión a oligonucleótidos sugieren que la unión de eIF-4F es sensible a la presencia de estructuras secundarias y que eIF-iso4F exhibe una preferencia de unión para estructuras lineales (Carberry y Goss, 1991). De igual

forma, la afinidad de eIF-4F por estructuras cap hipermetiladas es mas baja que la de eIF-iso4F (Carberry *et al.*, 1991). Lo anterior sugiere que las dos isoformas 4E pueden tener actividad discriminatoria para el reconocimiento del mRNA, sin embargo, dicha actividad no está aún del todo demostrada, sobre todo en el nivel de la regulación. Finalmente, datos experimentales sugieren que eIF-4F está involucrado en promover la traducción de mRNAs no estándar, por ejemplo aquéllos que carecen de cap o que contienen una estructura 5'-líder, mientras que eIF-iso4F podría estar limitado a facilitar la traducción de mRNAs estándar (Gallie, 2002).

## Control traduccional

La expresión genética en eucariotes es regulada en muchos niveles, como son: transcripción, poliadenilación de RNA y "splicing", exporte de mRNAs del núcleo al citoplasma y degradación de mRNA. En los últimos años, se ha venido aclarando que la traducción de mRNA es también un importante punto de control, particularmente durante el desarrollo embrionario y en la regulación del crecimiento y diferenciación celular (Clemens, 1999). La producción de proteínas es regulada en muchos pasos diferentes para controlar tanto la cantidad como la naturaleza del producto final (von der Haar, 2004), contribuyendo en este aspecto a la regulación de la expresión genética.

El control traduccional involucra una serie de mecanismos presentes en el aparato traduccional de las células, cuya finalidad es regular la síntesis de proteínas en esta etapa. Esta regulación puede darse en cada uno de los tres pasos mencionados anteriormente, sin embargo, ocurre predominantemente en la iniciación, cuando el ribosoma se une a un mRNA y se posiciona en el codón de iniciación (Gingras et al, 1999). Así, la frecuencia de unión del ribosoma al mRNA correlaciona con la cantidad de la proteína codificada requerida por la célula (von der Haar, 2004).



El poder controlar la síntesis de proteínas sin la necesidad de sintetizar ó degradar primero los respectivos mRNAs le confiere a la célula muchas ventajas, tales como la capacidad de responder rápidamente a cambios ambientales extracelulares y la capacidad de producir abundantes cantidades de proteínas específicas a partir de un conjunto de mRNAs almacenados (Clemens, 1999), además de un significativo ahorro de energía.

En mamíferos, una parte importante del control traduccional lo constituye el factor eIF-4E, así como la proteína de unión a 4E (4E-BP). Esta última regula la síntesis de proteínas al “secuestrar” a eIF-4E. La interacción de 4E-BP con eIF-4E es modulada por fosforilación vía rutas de transducción de señales (Browning, 2004). El sitio de fosforilación para mamíferos y levaduras es la Ser-209. En plantas, a pesar de que existen residuos de serinas y treoninas conservados, la serina en ésta posición no está presente.

Se sabe que en mamíferos y otros eucariotes, la fosforilación de eIF-4E tiene diversas implicaciones en la regulación traduccional, mientras que en plantas no se ha aclarado del todo la importancia que esta modificación *in vivo* pueda tener en cada una de las isoformas 4E. En mamíferos, la fosforilación de eIF-4E se ha observado en respuesta a hormonas y factores de crecimiento (Day, 1998). La forma en la que estos compuestos actúan es a través de la estimulación de rutas de transducción de señales, como son la vía de la fosfatidil-inositol-3-cinasa (PI3K) y la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Sánchez de Jiménez, 2005). Estas vías de transducción de señales están presentes tanto en mamíferos como en plantas, por lo cual se podría esperar una respuesta similar en plantas a factores como insulina, que es un factor de crecimiento. A este respecto, la vía de transducción de señales en la que participa PI3K, se ha asociado con la traducción selectiva de mRNAs 5'TOP (mensajes con una secuencia de pirimidinas en el extremo 5'UTR) tanto en plantas como en animales. La secuencia característica de los mRNAs 5'TOP les confiere selectividad traduccional sobre otros en células inducidas por estímulos mitogénicos y/o nutricionales

(Proud,2002), entre dichos mRNAs se encuentran los que codifican para proteínas ribosomales y algunos factores de traducción, tales como el factor eIF-iso4E, en el caso de plantas.

La fosforilación de los factores eucarióticos de iniciación ha mostrado tener un importante significado para la regulación de la síntesis de proteínas. En el caso de las plantas, se ha identificado que los factores de iniciación experimentan cambios en el estado de fosforilación como resultado de estrés, infección viral y otras condiciones ambientales (Khan, 2004).

## HIPÓTESIS

Dado que eIF-iso4E y eIF-4E son requeridos para la iniciación de la traducción y están presentes en diferente cantidad durante la germinación en semillas de maíz, se espera que los mRNAs almacenados y traducidos al inicio de dicha etapa, sean reclutados de manera diferencial por ambas isoformas.

## OBJETIVOS

### General:

Identificar los requerimientos traduccionales de los mRNAs almacenados en semillas quiescentes de maíz, en función de los factores recombinantes eIF-4E y eIF-iso4E.

### Particulares:

1. Purificar las proteínas recombinantes correspondientes a los factores eIF-4E y eIF-iso4E de maíz, estableciendo las mejores condiciones para ello.
2. Determinar si los factores recombinantes purificados son funcionales en un sistema de traducción *in vitro*.
3. Establecer si es que existe una función diferencial de los factores eIF-4E y eIF-iso4E recombinantes, respecto de mRNAs almacenados en semillas de maíz en un sistema de traducción *in vitro*.

## Materiales y Métodos

### Material biológico:

Se utilizaron semillas de maíz (*Zea mays L*) variedad Chalqueño para realizar los experimentos. Las semillas se colocaron entre dos capas de algodón en una charola de plástico y se humedecieron con agua. Las charolas se colocaron en una incubadora a 25°C y en oscuridad para su germinación. Al término de 24 h se disectaron manualmente los ejes embrionarios de las semillas germinadas con una navaja de acero inoxidable o un bisturí. Se registró el peso de los ejes y se almacenaron a -70°C hasta su procesamiento.

### Extracción de proteínas citoplásmicas de maíz para la obtención de los factores de iniciación (Dinkova y Sánchez de Jiménez, 1999):

Los ejes embrionarios se molieron con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, el cual se mezcló con buffer de extracción a 4°C (20 mM HEPES, pH 7.6, 0.1% Tritón X-100, 100 mM KCl, 10% [v/v] glicerol, 0.2 mM EDTA, 2.0 mM DTT, 2.0 mM PMSF, 80 mM  $\beta$ -glicerofosfato, 5 mM NaF) en una relación de 6 mL de buffer por cada 4.5 g de ejes. El extracto se clarificó por centrifugación a 13 000 rpm durante 30 min a 4°C (Sorvall RC5B, rotor 35 Ti). Posteriormente, se centrifugó a 50 000 rpm durante 2.5 h (Beckman Óptima XL-100, rotor 75 Ti).

### Cromatografía de afinidad con <sup>7</sup>mGTP-sefarosa (Modificado de Zapata, 1994):

El sobrenadante obtenido fue fraccionado por cromatografía de afinidad con <sup>7</sup>mGTP-sefarosa. Por cada 10 mL de extracto se agregaron 300  $\mu$ L de <sup>7</sup>mGTP-sefarosa (Amersham Biosciences). Se incubó toda la noche con agitación suave, a 4°C. Se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min para separar la resina (Sorvall RC5B, rotor 35 Ti). El sobrenadante se guardó a -70°C. La resina se lavó tres veces con buffer *D* (20 mM HEPES, pH 7.6, 0.5 mM DTT, 0.2 mM EDTA, 10% [v/v] glicerol, 0.5 mM PMSF, 100 mM KCl) + 150 mM de KCl, posteriormente se equilibró, primero con buffer *D* y



Los pasos seguidos para la propagación y amplificación del inserto fueron:

- 1) Preparación de las células competentes y transformación bacteriana.
- 2) Aislamiento de plásmidos.
- 3) Separación de ácidos nucleicos por electroforesis en gel de agarosa al 1%.
- 4) Purificación del inserto.

**b) Inducción de los factores 4E e iso4E en células recombinantes de *E. coli*:** Las bacterias transformadas se sembraron en placas con medio Lb sólido (peptona de caseína 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L, agar 15 g/L) con ampicilina a una concentración de 100 µg/mL, y se incubaron a 37°C de 12 a 24 h para obtener colonias aisladas. Se trasladó una colonia a un tubo conteniendo 5 mL de medio Lb líquido y ampicilina a una concentración de 100 µg/mL, incubando a 28°C-30°C toda la noche. Se tomaron 160 µL de las células crecidas y se colocaron en un matraz con 125 mL de medio Lb líquido y ampicilina a una concentración de 50 µg/mL, incubando a 28°C-30°C hasta tener un valor de densidad óptica a 600 nm de 0.5 a 0.6, en ese momento se adicionó 0.25 mM de (IPTG) y se incubó tres horas más bajo las mismas condiciones para inducir la expresión de las proteínas recombinantes. Finalmente, el cultivo se centrifugó a 3600 rpm (Sorvall RC5B, rotor 35 Ti) por 10 min para separar el paquete celular, el cual se almacenó a -70°C.

**c) Cromatografía de afinidad con glutatión sefarosa:** Para eliminar el medio Lb residual, el paquete celular fue lavado en 8 mL de PBS pH 7.3 (NaCl 0.8 g/L, KCl 0.2 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24 g/L) y recuperado por centrifugación a 5000 rpm (Sorvall RC5B, rotor 35 Ti) durante 10 min. Las células se resuspendieron nuevamente en 8 mL de PBS adicionado con 20mM HEPES, 0.1 mM EDTA, 20% glicerol, 1mM DTT, 1 mM PMSF e inhibidor de proteasas (Complete B). Se alicuotó en tubos eppendorf y se lisaron las células con un sonicador de punta (Fisher Scientific 0550 Sonic Dismembrator) durante 20 s a 30 kHz. Al sonicado se agregó 1% de tritón X-100 y se incubó con agitación suave por 30 min a 4°C. Posteriormente, se centrifugó a 13000 rpm (4°C) hasta obtener un sobrenadante completamente transparente. Se purificaron

los factores por cromatografía de afinidad con glutatión sefarosa 4B (Amersham Pharmacia Biotech) al 50%, para lo cual se agregó al sobrenadante 125  $\mu\text{L}$  de la resina y se incubó a temperatura ambiente por una hora con agitación suave. La resina se separó por centrifugación a 3000 rpm durante 3 min (Sorval RT6000) a 4°C. El sobrenadante se eliminó y se lavó la resina 3 veces con PBS.

**d) Purificación de las proteínas recombinantes por corte de la proteína de fusión:** La resina se resuspendió en 1 mL de PBS y se incubó con trombina (50  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de Glutatión sefarosa 4B al 50%, Amersham Biosciences), a 4°C durante toda la noche con agitación suave. Se centrifugó a 3000 rpm por 5 min (Beckman GS-15R) obteniendo en el eluato la proteína de interés, la cual se concentró utilizando filtros centricon 30 (para separar la trombina) y centricon 10 (Amicon, Inc.).

**e) Purificación de las proteínas recombinantes por elución con glutatión reducido:** La resina se resuspendió en 0.5 vol. de buffer de elución (0.154 g de glutatión reducido (Roche) disuelto en 50 mM de Tris-HCl, pH 8.0) en relación al volumen de glutatión sefarosa 4B al 50% utilizada. Se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 10 min para liberar la proteína de fusión de la sefarosa, la cual fue sedimentada por centrifugación a 500 g por 5 min. El proceso de elución se repitió 4 veces más. Las eluciones se juntaron y se filtraron en centricon 10 (Amicon, Inc.).

**Determinación de proteína soluble (Bradford, 1976):**

Se tomó una alícuota de 5 a 20  $\mu\text{L}$  del eluato conteniendo la proteína purificada y se llevó a un volumen de 800  $\mu\text{L}$  con agua destilada, se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de reactivo de Bradford (Bio-Rad). La lectura de la reacción colorimétrica se realizó a 595 nm. Para determinar la concentración de proteína se realizó una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA), la cual se muestra a continuación:

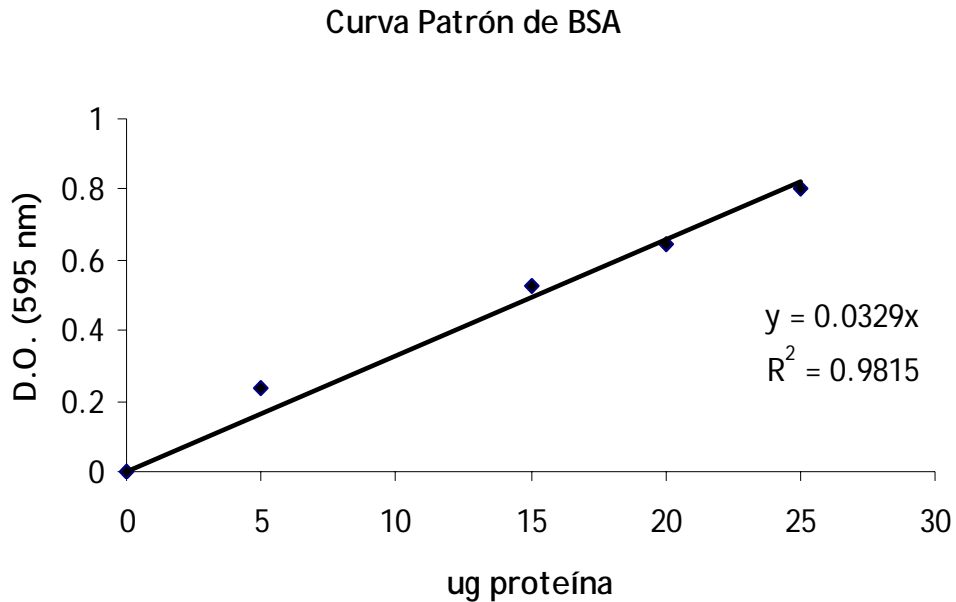


Fig. 7 Curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA) para la cuantificación de proteína soluble por el método de Bradford.

**SDS-PAGE:** Se realizó la electroforesis en gel en condiciones desnaturalizantes según el método de Laemmli (1970) usando geles de poliacrilamida al 12% y aplicando una corriente de 30 mA. En la tabla 1 se presenta la relación de los marcadores de peso molecular utilizados.

Tabla 1. Proteínas utilizadas como marcadores de peso molecular (Sigma).

Proteína	Masa molecular (Da)
Albúmina bovina	66000
Ovoalbúmina	45000
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de músculo de conejo	36000
Anhidrasa carbónica bovina	29000
Tripsinógeno (páncreas bovino)	24000
Inhibidor de tripsina (soya)	20100
$\beta$ -lactoalbúmina	14200



Los geles se tiñeron o se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF), aplicando una corriente de 1.5 mA/cm<sup>2</sup> en un sistema de transferencia semi-seco (LKB, 2117 Multuphor II).

**Western blot:**

Se trató la membrana que contiene la proteína de interés con metanol 15 s y después se hidrató en agua. Posteriormente, la membrana se saturó usando leche al 5% (Svelty, Nestlé) en TBS-T 0.15 (50mM Tris-HCL, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.15% Tween) durante 1 h a 37°C y se lavó con TBS-T 0.15 durante 15 min. Se utilizaron anticuerpos desarrollados contra los factores eIF-4E y eIF-iso4E de trigo inducidos en ratón, en una dilución de 1:3500 en TBS-T 0.15 con leche al 5%. Como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (Bio-Rad) en dilución 1:3000. La señal fue detectada por quimioluminiscencia (Sistema ECL, Amersham Biosciences) en películas radiográficas (Kodak X - OMAT K).

**Extracción de RNA total:**

Se pesaron 1.2 g de ejes de maíz y se molieron con N<sub>2</sub> líquido. El polvo obtenido se pasó a un tubo Eppendorf y se añadió 1 mL de Trizol (Invitrogen), se agitó vigorosamente y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se pasó a otro tubo y se incubó nuevamente a temperatura ambiente durante 5 min, posteriormente, se añadió 0.2 mL de cloroformo por mL de Trizol y se agitó vigorosamente. Se incubó la mezcla a temperatura ambiente por 5 min más. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 6 min y se colectó la fase acuosa en un tubo limpio al que se agregó isopropanol frío (0.750 mL/mL de trizol), después de mezclar se incubó a -20°C durante 60 min. Al cabo de este tiempo se centrifugó a 8,000 rpm durante 6 min a 4°C. El precipitado se lavó con 1 mL de etanol frío al 70%, agitando vigorosamente. Se resuspendió la pastilla en agua DEPC (800 µL) en un tubo eppendorf y se añadieron 200 µL de LiCl 10 M para eliminar el DNA contaminante, se incubó a 40°C toda la noche. El precipitado se lavó dos veces con 1 mL de etanol frío al 70% y se resuspendió en 400 µL de buffer TEN (Tris-HCl

10mM, pH 8, EDTA 1mM, NaCl 0.1 M) añadiendo 1 mL de etanol absoluto frío, la mezcla se incubó a -20°C durante 15 min. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 6 minutos a 4°C. El precipitado se lavó 2 veces con 1 mL de etanol frío al 70%. Se resuspendió el RNA en 50 µL de agua DEPC y se cuantificó midiendo absorbancia a 260 y 280 nm.

#### **Electroforesis para RNA:**

El equipo de electroforesis (peine, placa y cámara) se lavó con agua DEPC durante al menos 30 min con agitación suave. Se pesó 0.3 g de agarosa y se adicionaron 30 mL de buffer TBE 0.5 x. Una vez disuelta la agarosa, se adicionó 1 mL de EtBr y se vertió la mezcla en la placa, se colocó el peine, se tapó y se dejó gelificar. Se colocaron de 1-3 µg de RNA y 2 µL de buffer de carga (EDTA 1 mM, glicerol 50%, Azul de bromofenol 0.25%, xilen cyanol 0.25%) en un tubo eppendorf y se agregó el volumen necesario de agua DEPC para completar 10 µL, la muestra se mezcló y se cargó en el gel. La corrida se llevó a cabo con un voltaje de 85 volts. Se observó la integridad del RNA con una lámpara de luz UV.

#### **Purificación de RNA mensajero:**

Se añadieron 2 volúmenes de agua DEPC al RNA total y se calentó a 65°C durante 5 minutos. Se añadió entonces un volumen de tampón de carga (20 mM Tris HCl, pH 7.5, 1 M NaCl, 2 mM EDTA, 0.2% SDS) y se mezcló con oligo(dT)-celulosa (Sigma) en una relación de 200 µL de resina/100 µL de RNA, incubando a temperatura ambiente con agitación suave durante 1 hora. Se centrifugó a 1500 g durante 5 minutos y se lavó la pastilla con 1 mL de tampón de lavado (10 mM Tris HCl, pH 7.5, 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.05% SDS), repitiendo la operación hasta obtener una absorbancia a 260 nm menor a 0.01 en el sobrenadante. Se añadieron entonces 220 µL de tampón de elución (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.08% SDS) a la pastilla y se centrifugó a 1500 g durante 10 minutos. El proceso se repitió dos veces más colocando los eluatos en el mismo tubo. Después de la última elución se agregó NH<sub>4</sub>Oac 2.5 M (200 µL/600 µL de eluato) para precipitar el mRNA. Se adicionaron 2 volúmenes de etanol frío al 70% y se

incubó a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche. Se centrifugó a 1500 g durante 5 min y se lavó la pastilla con etanol al 70%. Se eliminó el sobrenadante y se dejó evaporar el etanol. La pastilla se resuspendió en el mínimo volumen de agua DEPC. Se cuantificó el producto midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm.

#### **Sistema de síntesis de proteínas *in vitro*:**

Se utilizó un kit de traducción *in vitro* de extracto de germen de trigo (Wheat Germ Extract, Promega). La mezcla de traducción se realizó siguiendo las recomendaciones del proveedor. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 60 ó 90 min. En todos los experimentos de síntesis presentados se utilizó mRNA purificado de semillas quiescentes de maíz. Como control positivo se utilizó el RNA del virus bromo mosaico (BMV). Se utilizó [ $^{35}\text{S}$ ]-metionina ([ $^{35}\text{S}$ ]-met) para monitorear las reacciones de síntesis.

#### **Cuantificación de la incorporación de [ $^{35}\text{S}$ ]-met a las reacciones de síntesis de proteínas *in vitro*:**

Se tomaron alícuotas de 1  $\mu\text{L}$  de las reacciones de síntesis al inicio ( $T_0$ ) y al final de la reacción ( $T_1$ ). En algunos casos se monitoreó la reacción cada 30 min. Las alícuotas se depositaron sobre círculos de papel Whatman 3mm de 1 cm de diámetro y se dejaron secar a temperatura ambiente. Los papeles se lavaron primero con TCA al 10% en hielo durante 15 min y después con TCA al 5% a temperatura de ebullición por 5 min, enfriándose inmediatamente con hielo. Finalmente, se realizaron dos lavados con etanol absoluto y un lavado con acetona seca. Los papeles se dejaron secar y se colocaron en viales con 5 mL de líquido de centelleo (PPO 1 g, POPOP 0.06 g, en 200 mL de tolueno) ó Scinti-Prep 2 (Fisher Scientific Company)). Los viales se agitaron en vortex y se hizo la cuantificación de [ $^{35}\text{S}$ ]-met incorporada utilizando un contador de centelleo líquido (Beckman LS6000IC).

#### **Inducción de fosforilación de los factores de iniciación por estímulo con insulina:**

Se disectaron ejes de 22 h de germinación y se incubaron a  $25^{\circ}\text{C}$  en cajas Petri con medio Murashige & Skoog líquido (Murashige & Skoog, 1962) en ausencia (control) o en

presencia de 200  $\mu$ U de insulina/mL de medio durante 2 h con agitación suave. Se añadió ( $^{32}$ P)-ortofosfato (400  $\mu$ Ci; 10 mCi/ml) durante las 2 h de estímulo. Para observar la inhibición del estímulo de insulina, se incubaron los ejes en 0.1  $\mu$ M de rapamicina 30 min antes de la adición de insulina. Después de los tratamientos, los ejes se lavaron con agua desionizada y se almacenaron a -70 °C, hasta su procesamiento.

Los factores de iniciación se purificaron de acuerdo al método descrito y se llevaron a electroforesis SDS-PAGE, los geles se tiñeron con azul de Coomassie y se secaron. La incorporación de [ $^{32}$ P]-ortofosfato a las proteínas se detectó por autorradiografía en películas radiográficas (Kodak X-OMAT K).

Para cuantificar la incorporación de [ $^{32}$ P]-ortofosfato a los factores de iniciación, se colocaron en un vial 100  $\mu$ L de la muestra con 8 mL de líquido de centelleo, se agitó y se hizo el análisis en un contador de centelleo líquido (Beckman LS6000IC).

## Resultados

### Obtención de factores eIF-4E y eIF-iso4E nativos.

Se realizó la purificación del complejo eIF-4F de semillas de maíz de 24 h de germinación, con la finalidad de obtener los factores eIF-4E y eIF-iso4E para adicionarlos por separado al sistema de traducción depletado de ellos y observar las diferencias en los productos de traducción. En la Fig. 8A se presenta el gel SDS-PAGE teñido con plata en donde se observa la banda correspondiente a los factores purificados en el peso de entre 24 y 29 KDa. Para identificar la proteína se realizó un Western-blot usando como anticuerpo primario anti eIF-4E. En la fig. 1B se observa la banda que corresponde al factor 4E, lo cual indica que sí se obtuvo la proteína de interés, sin embargo el rendimiento es muy bajo. También, se realizó la cuantificación de la proteína purificada, estos datos se presentan en la tabla 2.

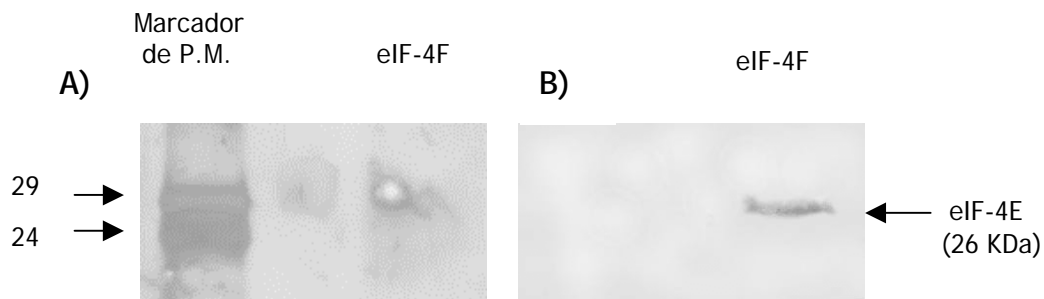


Fig. 8 Purificación de los complejos eIF-4F y eIF-iso4F de maíz.  
A) SDS-PAGE teñido con plata. B) Western-blot con anti-4F.

Se observó que las proteínas purificadas por éste método son muy susceptibles a degradarse o perderse en algunos de los tratamientos empleados, como podrían ser la concentración o la diálisis.

Tabla 2. Cuantificación de factores purificados de maíz de 24 h de germinación.

Fracción	Elución	Volumen total ( $\mu\text{L}$ )	Abs 595 nm	$\mu\text{g prot}/\mu\text{L}$
1	1, 2 y 3	90	0.3151	0.3
2	4, 5 y 6	90	0.2808	0.24

#### Obtención de factores eIF-4E y eIF-iso4E recombinantes.

Con la finalidad de obtener una mayor cantidad de cada factor, además de tenerlos por separado, se procedió a realizar la purificación de las respectivas proteínas recombinantes a partir de su producción en células de *E. coli*, las cuales ya habían sido transformadas en un trabajo anterior en el laboratorio. Se hizo la purificación de las proteínas recombinantes por dos tratamientos diferentes: elución con glutatión reducido (donde se obtienen las proteínas unidas a GST) y corte de la GST con trombina (se obtienen las proteínas sin GST). Las Fig. 9, 10 y 11 muestran geles SDS-PAGE de las proteínas recombinantes. La Fig. 9 corresponde a las proteínas de las células transformadas de *E. coli*, se observan las bandas correspondientes al factor 4E y al iso4E, en este gel se colocaron 5  $\mu\text{L}$  de cada muestra, y los pesos aparecen arriba de 45 KDa debido a que las proteínas de interés se encuentran en fusión con la proteína GST, que tiene una masa molecular de 26 KDa.

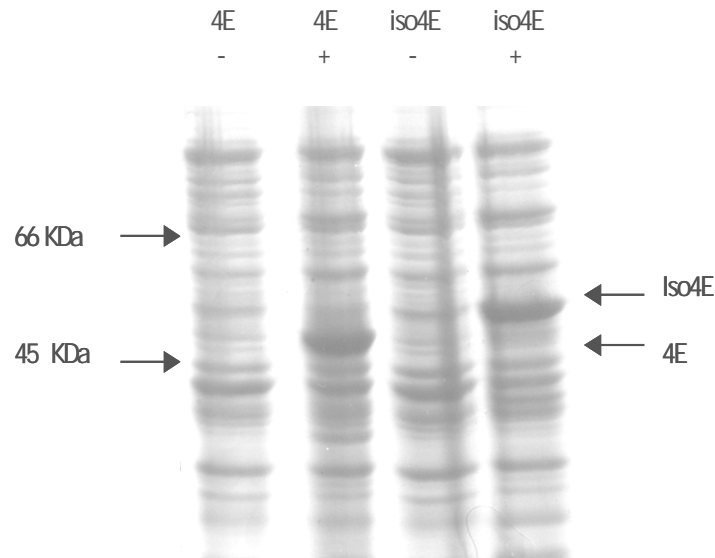


Fig. 9 Tinción con azul de Coomassie del gel SDS-PAGE para las proteínas de las células transformadas de *E. coli*, sin inducir (-), e inducidas (+).

En la Fig. 10 se muestran las proteínas recombinantes purificadas por cromatografía de afinidad a glutatión sefarosa, con la cual se obtienen las proteínas fusionadas a GST. Con los factores recombinantes purificados de esta forma se hizo una prueba para observar si tienen la capacidad de unirse a un análogo del motivo cap de los mRNAs ( $^7\text{mGTP}$ ) con lo cual se esperaría que puedan llevar a cabo la función de los factores de iniciación originales.

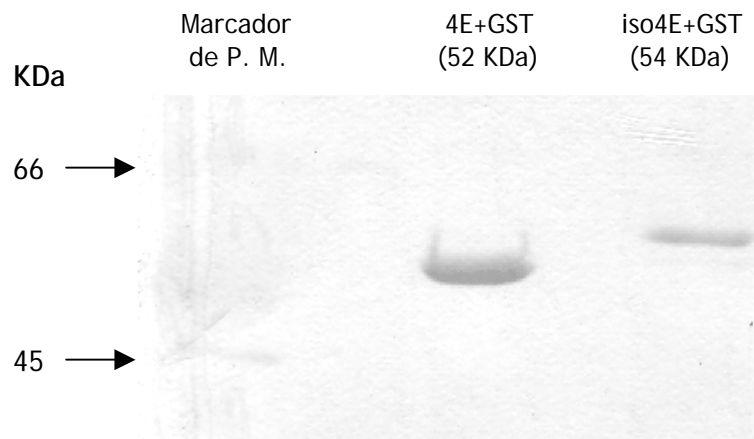


Fig. 10 Factores eIF-4E y eIF-iso4E recombinantes en fusión con la proteína GST. Se purificaron los factores por cromatografía de afinidad con glutatión sefarosa.

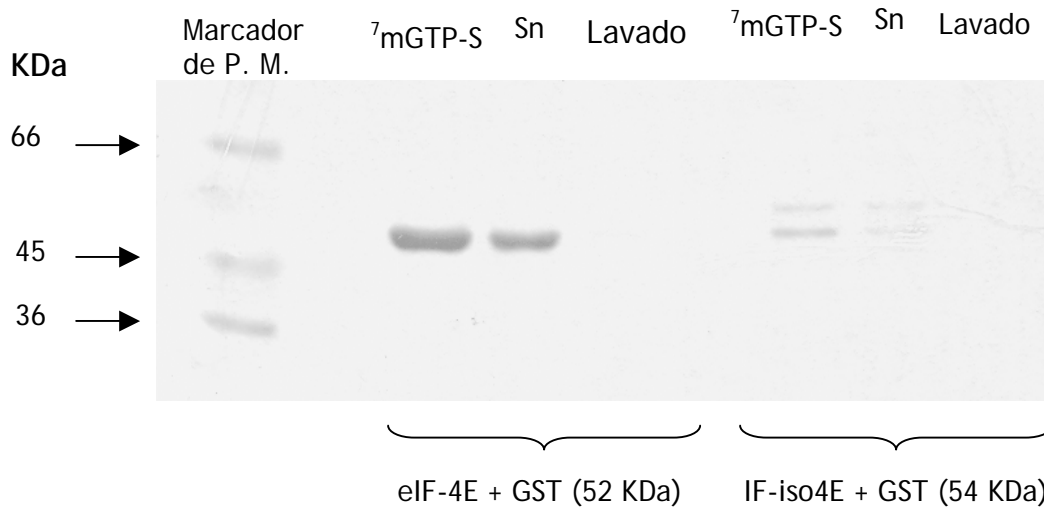


Fig. 11 Unión de factores recombinantes al análogo del cap ( $^7\text{mGTP}$ -sefarosa). Factores unidos al análogo del cap ( $^7\text{mGTP-S}$ ), factores que no se unieron y quedaron en el sobrenadante de la resina (Sn). En los lavados de la resina no se detectó presencia de los factores (Lavado).

En la Fig. 11 se muestran los factores unidos a  $^7\text{mGTP}$ -sefarosa, los factores recombinantes se adicionaron a la sefarosa y se dejaron en agitación suave por 1 hora, después se lavó la resina y se colocaron en el gel muestras de la resina y de los lavados para cada factor. Se comprobó que los factores recombinantes se unen al cap.

Puesto que es posible obtener las proteínas recombinantes con o sin la proteína de fusión unida, se hizo una comparación del rendimiento obtenido entre los dos métodos usados, la cual se presenta en la tabla 3. Se observa que se tiene mayor rendimiento en el caso de la elución con glutatión reducido; en el caso del factor 4E se tiene mayor rendimiento en una relación de aproximadamente 10 veces, considerando que la mitad de la proteína cuantificada sea GST. Se observó que cuando se hace el corte de la GST con trombina y se filtra para separarla de los factores y concentrar, se pierde una cantidad importante de las proteínas de interés. Esto resulta una desventaja en comparación con el primer método, donde sólo se requiere concentrar un poco y no hay una pérdida tan marcada de las proteínas purificadas.



Tabla 3. Comparación de los métodos utilizados para separar los factores recombinantes de la Glutación Sefarosa. Por un lado se realizó la elución de las proteínas con glutatión reducido (factores+GST), por otro lado, se adicionó trombina para cortar los factores de la proteína de fusión unida a la sefarosa (factores-GST).

Etapa		[Proteína] total (mg)	Rendimiento (%)
Extracción de proteínas citoplásmicas	eIF-4E	42.116	---
	eIF-iso4E	36.097	---
Cromatografía de afinidad a glutatión sefarosa	eIF-4E-GST	0.047	0.112
	eIF-iso4E-GST	0.018	0.050
	eIF-4E+GST	1.238	2.940
	eIF-iso4E+GST	0.1956	0.542

### Síntesis de proteínas *in vitro*

Por otro lado, se realizó la síntesis de proteínas *in vitro*, utilizando un sistema de germen de trigo (Wheat Germ Extract) y aminoácidos, incluyendo [<sup>35</sup>S]-metionina, como precursores. El mRNA utilizado en los experimentos de síntesis de proteínas se purificó de semillas quiescentes de maíz. Se realizaron cuatro purificaciones de mRNA (poliA+) y los productos de cada una se cuantificaron (tabla 4) y se probó su funcionalidad en el sistema de traducción. La Fig. 12 corresponde a la incorporación de [<sup>35</sup>S] durante la reacción de síntesis de proteínas utilizando cada una de las eluciones de mRNA purificado. Se observa que aunque se tienen diferentes concentraciones de mRNA, en todos los casos el mRNA purificado es funcional para la síntesis de proteínas.

Tabla 4. Cuantificación del mRNA (polyA+) usado en los experimentos de traducción *in vitro*.

Elución	Concentración (µg/µL)	Volumen total (µL)
1a	1.35	50
1b	5.56	50
2a	0.59	50
2b	1.18	50

Una vez que se contó con mRNA funcional, se hizo un experimento para quitar los factores de iniciación endógenos del sistema de traducción *in vitro*, lo cual tenía como finalidad sustituir dichos factores por los correspondientes recombinantes.

#### Traducción *in vitro* (IVT) con mRNAs almacenados en semillas de maíz

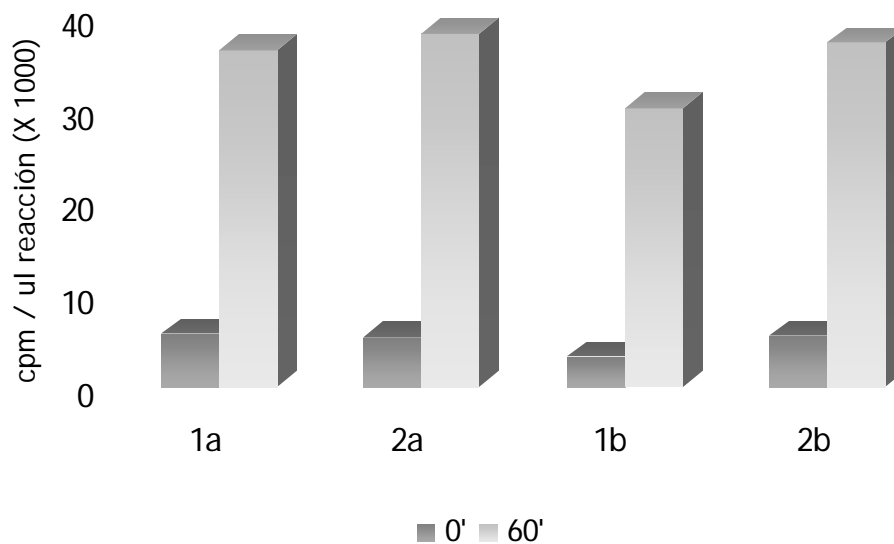


Fig. 12 Purificación de mRNA (polyA+) almacenado en semillas de maíz. Se hicieron cuatro purificaciones y se probaron los productos de cada una en el sistema de traducción. En la gráfica se muestra la incorporación de [<sup>35</sup>S]-met durante la reacción de síntesis de proteínas *in vitro*, a los 0 (barras oscuras) y 60 (barras claras) minutos.

La Fig. 13 muestra la incorporación de [ $^{35}\text{S}$ ] durante la reacción de síntesis de proteínas en el sistema de traducción carente de los factores eIF-4E y eIF-iso4E. La síntesis de proteínas en este sistema, es de aproximadamente un 17% respecto al sistema control, mostrado en la Fig. 12, lo cual indica que la mayor parte de los mRNAs estudiados requieren de dichos factores para su traducción. Al reponer los factores que se quitaron al sistema de traducción, se observa que hay un aumento en la síntesis de proteínas, alcanzando un 30% del sistema control. Cabe mencionar que en este experimento se adicionó aproximadamente la mitad de la proteína que se quitó al sistema debido a que se tenía un volumen mayor al que se podía adicionar al sistema de traducción.

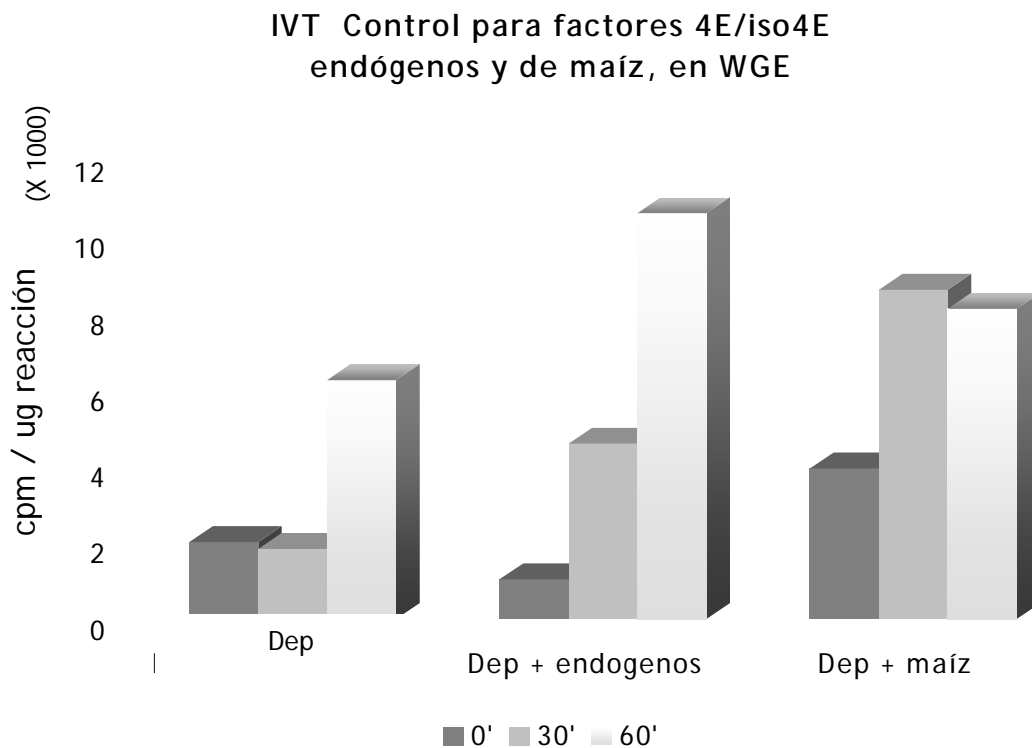


Fig. 13 Incorporación de [ $^{35}\text{S}$ ]-met al sistema de traducción *in vitro*. eIF-4E y eIF-iso4E fueron sustraídos del sistema de traducción (Dep). Se restituyó el sistema con parte de los factores sustraídos (dep+endógenos) y con factores purificados de maíz (dep + maíz). Se utilizó mRNA de maíz de semillas quiescentes en todos los casos. La incorporación de [ $^{35}\text{S}$ ]-met se cuantificó a los 0 (barras oscuras), 30 (barras grises) y 60 (barras más claras) minutos.

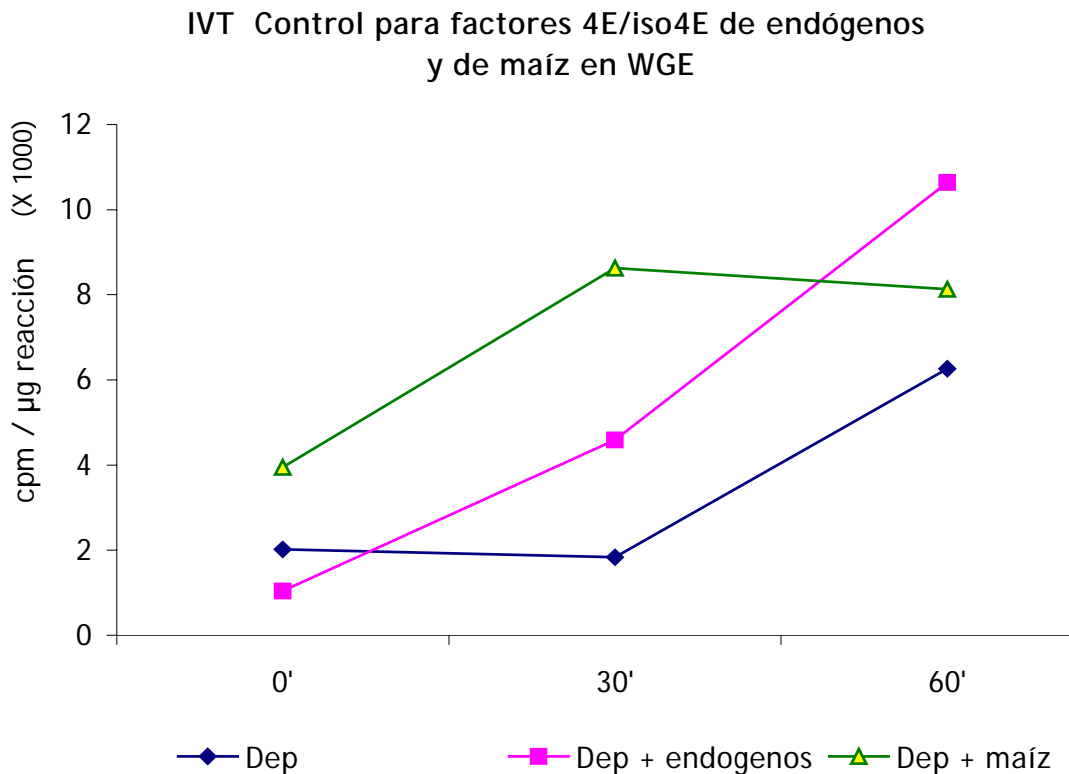


Fig. 14 Incorporación de [ $^{35}\text{S}$ ]-met al sistema de traducción *in vitro* (IVT). eIF-4E y eIF-iso4E fueron removidos del sistema de traducción (dep). Se restituyó el sistema con parte de los factores removidos (dep+endógenos) y con factores purificados de maíz (dep + maíz). Se utilizó mRNA de maíz de semillas quiescentes en todos los casos.

En un curso de reacción (Fig. 14), se observa que la síntesis de proteínas en el sistema carente de los factores de iniciación, se retrasa notablemente durante la primera mitad de la reacción y presenta un incremento en la segunda mitad. Esto no se observa cuando los factores están presentes, de hecho, la reposición de los factores endógenos al sistema de traducción, provoca un aumento en la síntesis de proteínas a lo largo del tiempo estudiado, no así la adición de factores de maíz, que parece llegar a un máximo y después se mantiene constante. Este experimento indica que al adicionar los factores de iniciación al sistema carente de ellos, se recupera en alguna medida la síntesis de proteínas, muy posiblemente, a partir de mRNAs cap-dependientes.

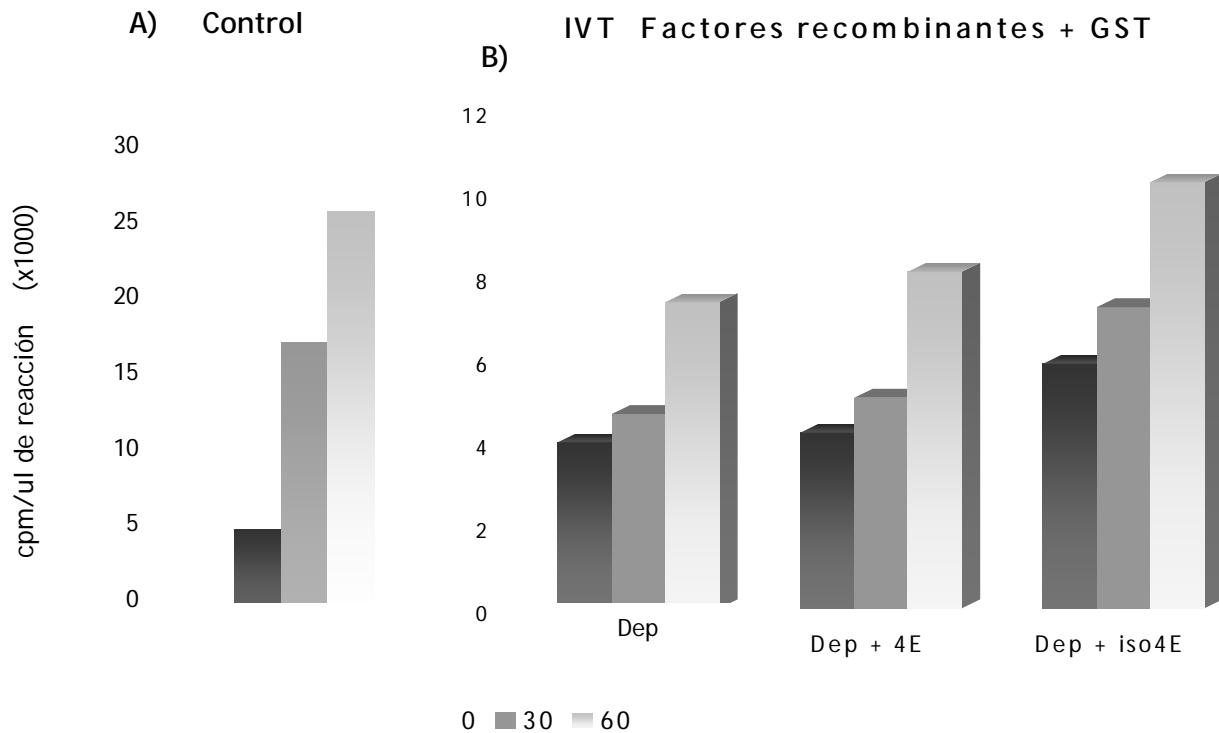


Fig. 15 Incorporación de  $[^{35}\text{S}]$ -met al sistema de traducción *in vitro* a los 0 (barras a la izquierda de cada grupo), 30 (barras de en medio) y 60 (barras a la derecha) minutos. A) Sistema de traducción al que no se han removido los factores de iniciación 4E/iso4E. B) Sistema de traducción carente de sus factores endógenos (Dep) y reconstituido con los factores recombinantes (Dep+4E y Dep+iso4E). Se utilizaron factores recombinantes unidos a GST. En todos los casos se utilizó mRNA de semillas de maíz quiescentes. La incorporación de  $[^{35}\text{S}]$ -met se cuantificó a los 0 (barras oscuras), 30 (barras grises) y 60 (barras más claras) minutos.

En las figuras 15 y 16 se muestra la síntesis de proteínas mediante la incorporación de  $[^{35}\text{S}]$ -met. En el primer caso se utilizaron factores recombinantes fusionados a GST. La Fig. 15A corresponde al sistema control, al cual no se le han removido los factores de iniciación de la traducción. En la Fig. 15B se presentan los resultados obtenidos en la síntesis de proteínas cuando los factores del sistema de traducción son removidos de éste y sustituidos por los correspondientes factores recombinantes (eIF-4E+GST y eIF-iso4E+GST). Se observa que cuando se adiciona el factor iso4E+GST, la incorporación

de [ $^{35}\text{S}$ ]-met alcanza un 39.7% del control, mientras que al adicionar el factor 4E+GST, la incorporación es del 31.3%. Si el análisis se hace tomando como referencia el sistema de traducción carente de los factores (Dep, Fig. 15B), se observa que al adicionar iso4E+GST, la incorporación de [ $^{35}\text{S}$ ]-met es mayor en un 39%, mientras que en el caso del factor 4E+GST, el aumento es apenas del 9.8%.

En los resultados mostrados en la Fig. 16 se usaron los factores recombinantes libres de su fusión a GST mediante corte con trombina. Se observa que al adicionar el factor iso4E-GST, la síntesis de proteínas, vista como la incorporación de [ $^{35}\text{S}$ ]-met, aumenta en un 45% respecto del sistema carente de los factores, mientras que cuando se adiciona el factor 4E-GST el aumento es de sólo el 4.3%.

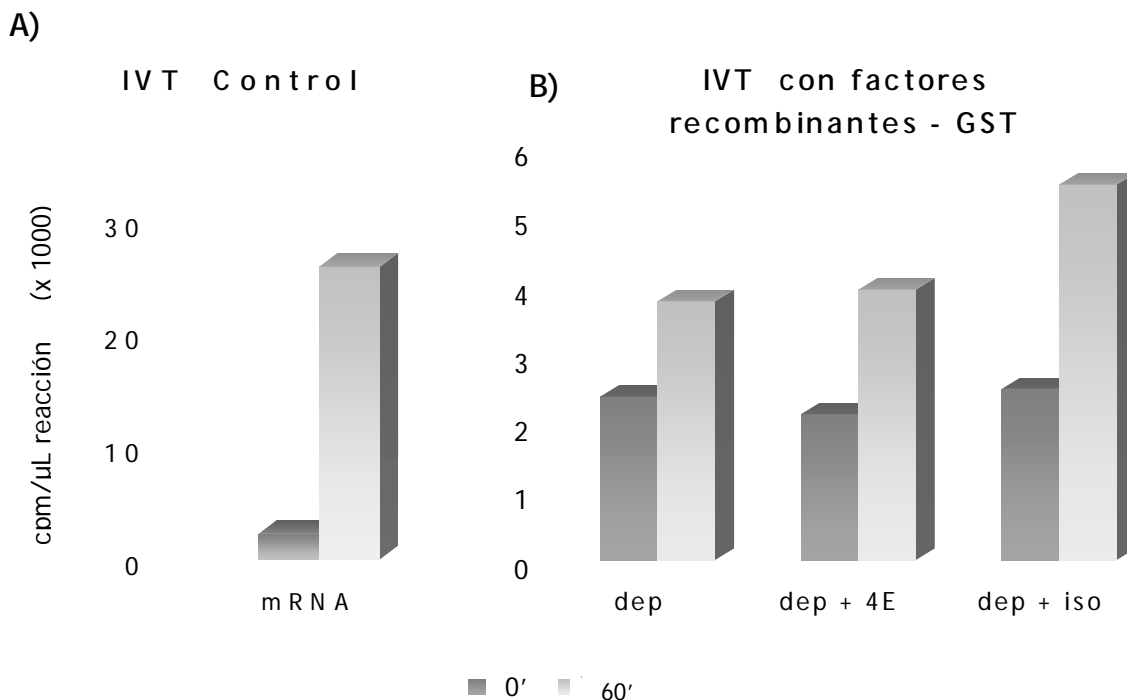


Fig. 16 Incorporación de [ $^{35}\text{S}$ ]-met durante la síntesis de proteínas *in vitro*, a los 0 (barras oscuras) y 60 (barras claras) minutos. A) Control. B) Sistema de traducción depletado de los factores 4E/iso4E y adicionado con los respectivos factores recombinantes. En todos los casos se usaron mRNAs almacenados en semillas de maíz. Los factores recombinantes carecen de la proteína de fusión.

Éstas diferencias son mas claras en las figuras 17 y 18, donde se presenta el curso temporal de las reacciones y se observa que al adicionar el factor iso-4E hay mayor síntesis de proteínas que al adicionar el factor 4E. Esto ocurre tanto al usar las proteínas recombinantes en fusión con GST como al hacer el corte de ésta última. En la Fig. 17 se observa que la diferencia en la síntesis de proteínas al usar iso4E+GST es mayor desde el inicio en comparación con el sistema carente de factores y con el sistema al que se adiciona 4E+GST.

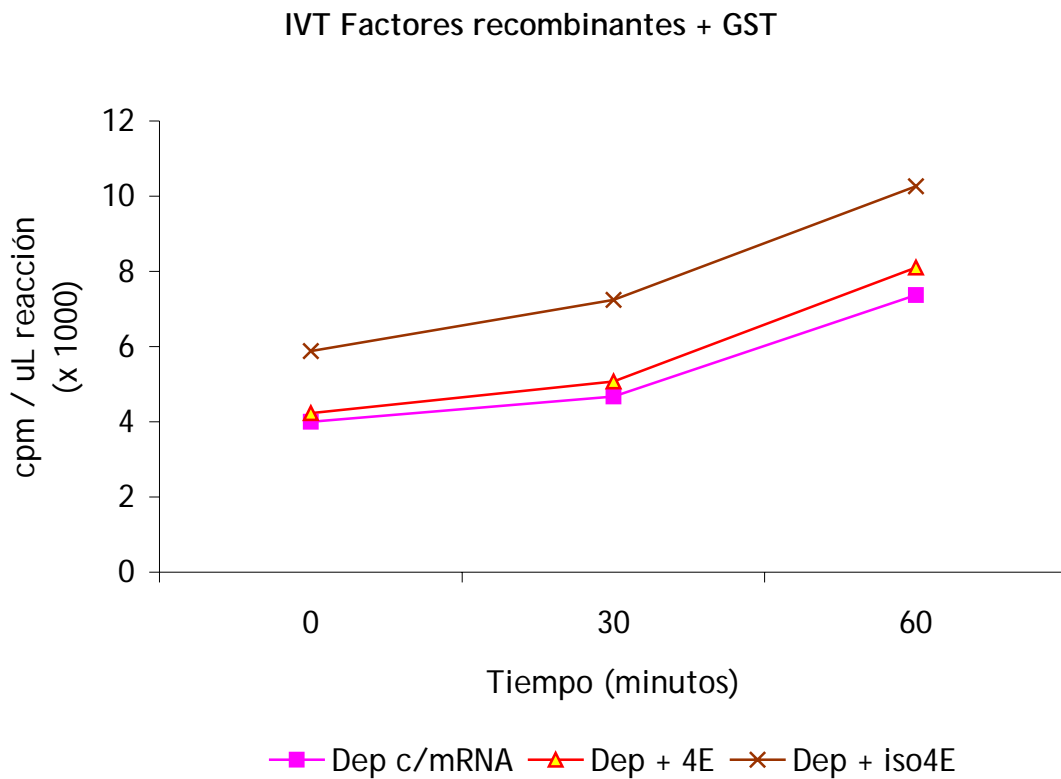


Fig. 17 Incorporación de [<sup>35</sup>S]-met al sistema de traducción *in vitro*. Se utilizaron factores recombinantes purificados por elución con glutatión reducido (Dep+4E y Dep+iso4E). Como control se utilizó el sistema depletado con mRNA (Dep c/mRNA).

En la Fig. 18, la curva correspondiente a la adición del factor iso4E-GST presenta un comportamiento similar a los otros casos hasta los 30 min, aumentando en el curso de los 30 min siguientes, mientras que el curso correspondiente a la adición del factor 4E,

aunque es ligeramente mayor al inicio, al término de una hora es prácticamente igual al correspondiente al sistema al que no se han adicionado factores. A pesar de que no se observa una diferencia tan clara como al usar los factores fusionados a GST, la tendencia observada de que hay mayor incorporación de [ $^{35}\text{S}$ ]-met cuando se usa el factor eIF-iso4E, se observó en al menos tres experimentos diferentes. No se presenta un análisis estadístico de las repeticiones de los experimentos debido a que no se realizaron en las mismas condiciones y hay variaciones debidas al tiempo de decaimiento de la [ $^{35}\text{S}$ ]-met utilizada en cada experimento.

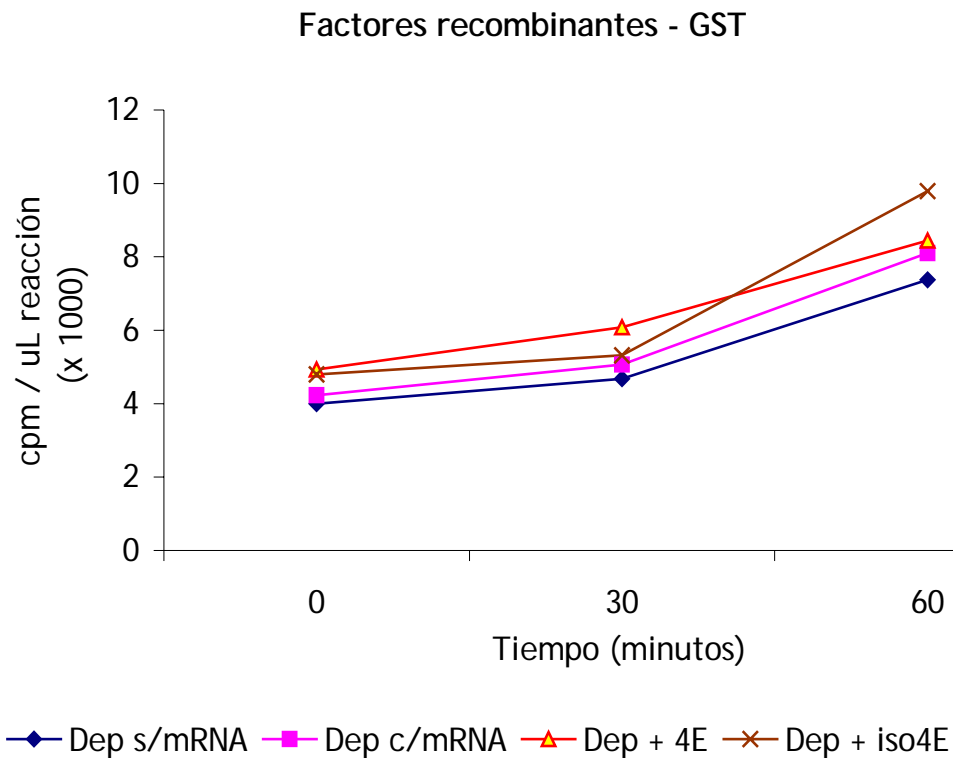


Fig. 18 Incorporación de [ $^{35}\text{S}$ ]-met al sistema de traducción *in vitro*. Se utilizaron factores recombinantes a los que se cortó la proteína de fusión (GST) con trombina (Dep + 4E y Dep + iso4E). Como control se utilizó el sistema carente de factores sin y con mRNA (Dep s/mRNA y Dep c/mRNA, respectivamente). Se utilizó mRNA de semillas quiescentes de maíz.



### Preparación de anticuerpos contra eIF-4E y eIF-iso4E recombinantes.

Se hizo una inmunización en conejos con los factores recombinantes. En la tabla 4 se presenta el esquema de inmunización. El método utilizado consiste en inyectar la proteína directamente en el ganglio popliteo y se tienen resultados en aproximadamente un mes, dependiendo de la respuesta del animal, lo cual es notablemente menor al tiempo que lleva una inmunización normal que es de aproximadamente 3 meses.

Tabla 5 Esquema de inmunización seguido para la obtención de los anticuerpos contra los factores 4E e iso4E recombinantes. Para las dosis administradas se utilizaron factores purificados por elución con glutatión reducido.

Fecha	Acción	Tratamiento
16-nov-04	1 <sup>a</sup> dosis 4E (353.9 µg)	-----
17-nov-04	1 <sup>a</sup> dosis iso4E (55.9 µg)	-----
24-nov-04	Sangría de prueba (10 mL)	Elisa-Dot (antígeno: 4E, iso4E)
30-nov-04	2 <sup>a</sup> dosis 4E (353.9 µg) 2 <sup>a</sup> dosis iso4E (55.9 µg)	----
14-dic-04	Sangría (40 mL)	Dot-blot (antígeno: 4E, iso4E)

En la primera sangría de prueba realizada a la semana de la primera dosis administrada al conejo, se realizó un Elisa-Dot donde se observó la presencia de los anticuerpos en el suero, que dieron positivo hasta una dilución de 1:4000, sin embargo, debido a que las secuencias de las dos proteínas tienen una similitud del 47%, no sorprende el encontrar que los anticuerpos cruzaron. El esquema de inmunización se presenta en la tabla 5.

Después de la segunda dosis, la cual se hizo con la finalidad de aumentar el título y la especificidad, se hizo un Dot-Blot utilizando diferentes concentraciones de cada anticuerpo. Se encontró que ambos anticuerpos dieron una respuesta positiva hasta la dilución de 1:15000 y se observó el cruce de los anticuerpos con los antígenos respectivos. El título resultó ser más alto y específico en el caso del anti-iso4E, tal como se observa en la Fig. 19.

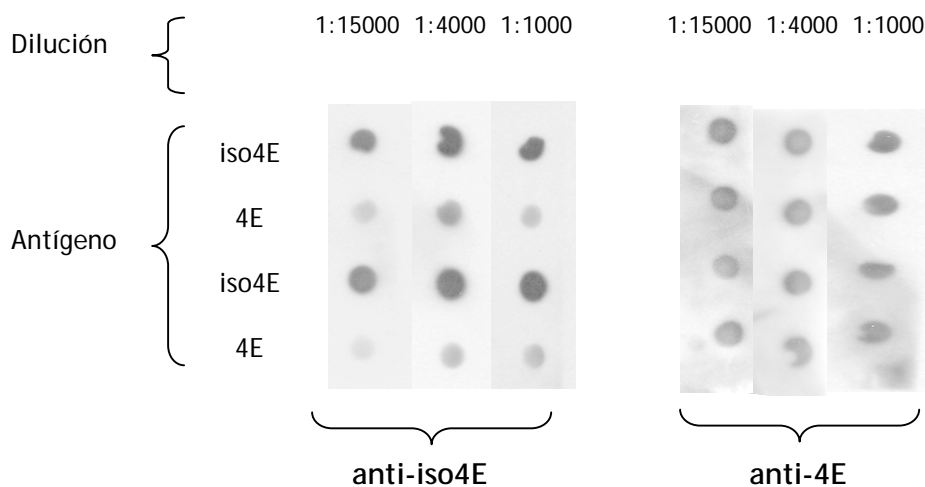


Fig. 19 Dot-blot realizado con suero obtenido de inmunización en conejo con factores recombinantes + GST. Se utilizó como antígeno los factores recombinantes - GST. Se colocaron 3.75  $\mu$ g de iso4E y 4.00  $\mu$ g de 4E por pozo.

## Efecto de Insulina sobre la fosforilación de los factores de iniciación 4E/iso4E

En mamíferos, la insulina activa una vía de transducción de señales que induce la fosforilación de las proteínas de unión al factor eIF-4E (4E-BP), dando lugar a la liberación de dicho factor y permitiendo su unión al *cap* del mRNA. Asimismo, se tienen antecedentes de que eIF-4E en mamíferos experimenta fosforilación por diversos estímulos como son factores de crecimiento y hormonas, lo cual correlaciona con un aumento de la síntesis de proteínas (Manjunath, 1999).

Por otro lado, tanto en plantas como en mamíferos, la insulina activa una vía que involucra la fosforilación de la proteína ribosomal S6 y la movilización a polisomas de mRNAs 5'TOP, entre los que se encuentra eIF-iso4E. La implicación de que los factores eIF-4E y eIF-iso4E de plantas experimenten fosforilación es algo que aún no está del todo esclarecido. En el presente trabajo se hizo un estudio preliminar para detectar la fosforilación de eIF-4E y eIF-iso4E por estimulación con insulina. Como precursor del grupo fosfato se utilizó [<sup>32</sup>P]-ortofosfato. En la tabla 5 se presentan los resultados de la cuantificación de proteína purificada por cromatografía de afinidad a <sup>7</sup>mGTP-Sefarosa. Para determinar la cantidad de proteína, se utilizó la siguiente ecuación:  $\text{mg/ml} = 1.55A_{280} - 0.76A_{260}$ . El factor de dilución fue 10/120.

*Tabla 5. Cuantificación de las fracciones obtenidos por cromatografía de afinidad a <sup>7</sup>mGTP-Sefarosa a partir de extractos de semillas de maíz con 24 h de germinación.*

Tratamiento	D. O. <sub>260</sub>	D. O. <sub>280</sub>	µg proteína/µL
<i>Control</i>	0.1783	0.1198	0.6024
<i>Insulina</i>	0.1601	0.1091	0.5688
<i>Insulina + rapamicina</i>	0.1704	0.1154	0.5928

La incorporación de [ $^{32}$ P]-ortofosfato a los complejos purificados se muestra en la tabla 6, en este experimento se tomaron 3 alícuotas de cada tratamiento y se cuantificaron dos de ellas precipitando las proteínas de cada uno en papel Whatman, los resultados de éstas determinaciones no se presentan por no ser posible realizar un análisis estadístico debido a que no se tienen repeticiones del experimento, pero en todos los casos se observó la misma tendencia.

*Tabla 6. Incorporación de [ $^{32}$ P] a los complejos eIF-4F y eIF-iso4F de semillas de maíz con 24 h de germinación. Se registró la incorporación de [ $^{32}$ P]-ortofosfato en 100  $\mu$ L de muestra con 8 mL de líquido de centelleo.*

Tratamiento	Control	Insulina	Insulina + rapamicina
cpm / 100 $\mu$ L de muestra	28.59	37.98	18.36
cpm / $\mu$ g proteína	0.4746	0.6677	0.3097

Se hizo una electroforesis SDS-PAGE con los eluatos obtenidos de la purificación y se realizó una autorradiografía. Al parecer la única proteína fosforilada bajo las condiciones de experimentación fue el factor eIF-4E, como se puede ver en la Fig. 21.

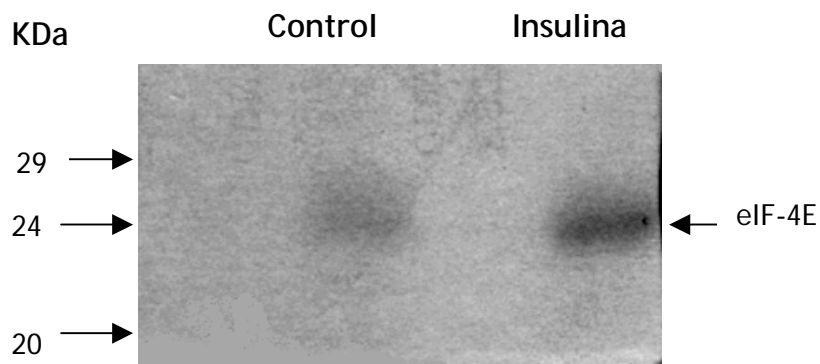


Fig 21 Película fotográfica que muestra la fosforilación del factor 4E

## DISCUSIÓN

### Purificación de los factores eIF-4E y eIF-iso4E

eIF-4E y eIF-iso4E son proteínas similares en punto isoeléctrico y masa molecular (Manjunath, 1999), lo que, aunado a que la técnica de purificación a partir de semillas de maíz se basa en una característica compartida por ambos, que es su capacidad de unión a un análogo de la estructura "cap" ( $\gamma$ mGTP), dificulta su separación. Además, se requiere de una cantidad relativamente alta para llevar a cabo los ensayos biológicos (traducción *in vitro*), lo que no es fácil de obtener dado que su concentración celular es baja (Dinkova, 1999). Todo lo anterior se reflejó al realizar la purificación de eIF-4F a partir de semillas de maíz. A pesar de que se comprobó la presencia de eIF-4E en el eluato de la purificación (Fig. 8), el rendimiento fue muy bajo (tabla 2) y se observó que las proteínas purificadas son susceptibles a degradarse con tratamientos posteriores a su purificación, tales como concentración por vacío y diálisis. Es importante hacer notar que en los eluatos obtenidos de esta purificación se incluyen tanto las isoformas 4E como las isoformas 4G, presentes ambas en los complejos eIF-4F y eIF-iso4F.

Por otro lado, por trabajos previos en el laboratorio (Dinkova, no publicado), se contaba con células de *E. coli* transformadas para la sobreexpresión de los factores eIF-4E y eIF-iso4E de maíz, así que se procedió a realizar la inducción y purificación de los mismos. Con este método se logró tener ambas isoformas purificadas por separado (Figs. 9 y 10) y el rendimiento fue notablemente mayor al obtenido para la purificación de los factores endógenos (tabla 3).

La purificación de las proteínas recombinantes se realizó por dos preparaciones diferentes: con y sin corte de la proteína de fusión (GST). Se observó que al hacer el corte de la proteína de fusión, la proteína purificada se va perdiendo en los pasos

sucesivos al corte, lo cual no ocurre cuando se utiliza la preparación que no implica hacer dicho corte. A partir de esta observación, se probó la capacidad que tienen los factores 4E-GST para unir a un análogo del cap ( $^7\text{mGTP}$ -Sefarosa) y se corroboró que la proteína de fusión no interfiere en dicha unión (Fig. 11). Por otro lado, a partir de los datos experimentales obtenidos en el presente trabajo, no se tienen evidencias para asegurar que la proteína de fusión no provoca alguna alteración en el funcionamiento del sistema de traducción *in vitro*.

Aún cuando las proteínas recombinantes purificadas de *E. coli* puedan realizar una función en experimentos *in vitro* similar a la observada por los factores endógenos, no se puede dejar de lado el hecho de que las proteínas recombinantes tienen la desventaja de no presentar las modificaciones postraduccionales que pudieran existir en las proteínas endógenas del sistema estudiado, tal es el caso de la fosforilación. Una incorrecta traducción del mRNA o la falta de una modificación postraduccional puede provocar alguna diferencia estructural de las proteínas recombinantes respecto de las nativas, dando origen a una función nula o disminuida de las mismas. A este respecto, se sabe que eIF-4E es una proteína sujeta a fosforilación, mientras que la proteína recombinante eIF-iso4E de trigo, producida también en *E. coli* ha sido fosforilada en experimentos *in vitro* (Khan, 2004). Sin embargo, el efecto de esta fosforilación durante la traducción *in vivo* no ha sido dilucidado todavía.

### Síntesis de proteínas *in vitro*

eIF-4E y eIF-iso4E son requeridos para iniciar la síntesis de proteínas dirigida por mRNAs cap-dependientes. Cuando el sistema de traducción carece de dichos factores, la síntesis de proteínas a partir de mRNAs de semillas quiescentes de maíz, disminuye significativamente (Fig. 13). El hecho de que esta disminución no llegue a la completa nulidad puede deberse a la presencia de mRNAs que no requieren de los factores de iniciación para ser traducidos (cap-independientes), o bien, a que existan trazas de

factores endógenos en el sistema de traducción. En el caso particular de maíz, se sabe que al menos uno de los mRNAs almacenados se traduce de manera cap independiente por tener un IRES su región 5'UTR (Dinkova, 2005).

Al reconstituir el sistema de traducción con los factores que le fueron quitados, se observa un aumento en la síntesis de proteínas del 70% respecto del sistema que no fue reconstituido (Fig. 13). Cabe mencionar que la incorporación de [<sup>35</sup>S]-met es notablemente menor a la observada en el control (Fig. 12), debido probablemente a que las proteínas han perdido funcionalidad en alguna medida como consecuencia de cambios ocasionados al ser removidos del sistema de traducción y después purificados, además de que se añadieron en cantidad menor a la presente en el sistema control. Es probable que existan cambios estructurales debido a pequeños cambios en el pH o a la concentración de sales, ya que, como se mencionó anteriormente, los factores purificados son susceptibles a la degradación. Se debe considerar que al eliminar los factores 4E del sistema de traducción, ocurre también una pérdida relativa del factor eIF-4G, el cual forma parte del complejo eIF-4F (Dinkova, 2005). La unión de eIF-4E y eIF-4G al cap vía la actividad de eIF-4E es esencial para la traducción tanto *in vivo* como *in vitro* (von der Haar, 2004), sin embargo, eIF-iso4G podría realizar la función de eIF-4G si el sistema de traducción carece de él, ya que se ha visto que estos factores son funcionalmente intercambiables.

Al probar los factores recombinantes en el sistema de traducción con mRNAs de ejes de semillas quiescentes de maíz, se observó una tendencia a una mayor síntesis de proteínas cuando se usó el factor iso4E en comparación con el 4E, tanto al usar las proteínas en fusión con GST (Fig. 15) como sin GST (Fig. 16). Esto es congruente con el reporte de que en ejes embrionarios quiescentes de maíz, eIF-iso4E está presente en niveles más altos respecto a eIF-4E (Dinkova, 2000).

Realizando un seguimiento de la reacción de síntesis, es de hacer notar el hecho de que en el sistema de traducción carente de los factores 4E, la velocidad de síntesis de proteínas (vista como la pendiente de la recta) parece ser muy lenta en la primera mitad y aumentar en los siguientes 30 minutos, tanto al usar los factores recombinantes como en el sistema carente de ellos (Fig. 17 y 18). Esto no se observa en el sistema control, que presenta un comportamiento casi lineal a lo largo de toda la reacción (Fig. 15A). Resulta evidente que el hecho de remover los factores 4E e iso4E del sistema de traducción, provoca una disminución de la velocidad de síntesis de proteínas. Otra posibilidad es que la carencia de los factores endógenos implique, más que una disminución de la velocidad, un retraso de la síntesis, y que al paso del tiempo se observe un comportamiento semejante al del control. Una explicación para esto sería que a la maquinaria de traducción le toma más tiempo el reconocimiento de los factores recombinantes o que éstos reclutan de manera menos eficiente los mRNAs, por lo tanto, las interacciones requeridas para la traducción se hacen más difíciles de alcanzar, pero que una vez alcanzadas, el proceso de traducción avanza de manera mas rápida.

Las evidencias en la expresión diferencial de ambos factores durante el curso de la germinación, aunado a la discriminación hecha por los mismos para traducir mRNAs almacenados, nos llevan a pensar que la presencia de eIF-iso4E sobre eIF-4E es específica para traducir selectivamente mRNAs almacenados en las semillas o que son requeridos para las primeras etapas de la germinación. Esta observación apoya la idea de que la diversidad en la familia eIF4 permite que la síntesis de proteínas sea regulada en tejidos específicos y/o en diferentes estados de desarrollo (Hernández, 2005). Por otro lado, hay evidencias bioquímicas que muestran que las subunidades de eIF-4F y eIF-iso4F son funcionalmente intercambiables y, sin embargo, son capaces de discriminar entre diferentes mRNAs *in vitro* (Browning, 2004). Lo anterior resulta de especial interés al situarnos en etapas específicas del desarrollo de la planta, de



forma particular en la etapa de germinación que es, como se sabe, un paso sumamente importante para que el desarrollo de la misma se complete con éxito.

### Producción de anti-suero policlonal contra eIF-4E y eIF-iso4E de maíz

La producción de anticuerpos para eIF-4E y eIF-iso4E de maíz resulta un proceso complicado debido a la dificultad que representa la purificación de los factores por separado y en cantidad suficiente para la inducción de la respuesta inmune. El uso de anticuerpos hechos a partir de proteínas recombinantes es frecuente en el estudio de estas proteínas (Manjunath, 1999; Browning, 1998). Por esta razón y contando con las proteínas recombinantes, se utilizaron éstas para realizar una inmunización en conejos y obtener así el anti-suero correspondiente.

Respecto a la técnica utilizada (inyección en el ganglio popíleo), el tiempo de respuesta de 1 mes fue muy bueno respecto al método tradicionalmente usado (inyección intravenosa y/o intramuscular), el cual es de aproximadamente 2 meses. El esquema de inmunización se presenta en la tabla 5.

Sin embargo, a pesar de tener un buen título (dilución 1:15000), los dos anti-sueros tuvieron un alto grado de reconocimiento hacia ambas proteínas, aunque ésta respuesta cruzada disminuye al aumentar la dilución, sobre todo en el caso del anti-suero correspondiente a eIF-iso4E (Fig. 19). Esto es comprensible dada la semejanza en su secuencia de aminoácidos, la cual es del 47%. Se plantea entonces generar nuevamente anticuerpos pero ahora se harían a partir de las proteínas recombinantes carentes de la proteína de fusión GST, con lo cual se espera aumentar la especificidad. Otra forma de generar anticuerpos más específicos, sería a partir de péptidos, sintéticos o recombinantes, generados de las zonas de menor similitud entre ambas proteínas. Cabe resaltar que para determinar de manera adecuada el título de

los anticuerpos, se debe seguir un esquema para Dot-Blot en el cual no sólo se varíe la concentración del anticuerpo, sino también la cantidad de antígeno en cada caso, incluyendo cantidades del orden de nanogramos.

La producción de anticuerpos por éste método resulta ser una buena alternativa para futuros trabajos, ya que no se requiere una cantidad grande de proteína, el tiempo de respuesta es relativamente corto y no es necesaria la adición de adyuvantes.

### **Fosforilación de los factores de iniciación eIF-4E y eIF-iso4E**

Se sabe que en mamíferos y otros eucariotes, la fosforilación de eIF-4E tiene diversas implicaciones en la regulación traduccional, mientras que en plantas no se ha aclarado del todo la importancia que pueda tener esta modificación *in vivo* en cada una de las isoformas 4E e iso4E. Congruente con datos de la literatura (Mateen, 2004) se verificó que eIF-4E es susceptible de ser fosforilado, tanto en condiciones normales de germinación como al inducir un estímulo con insulina (Fig. 20). Este resultado estaría entonces implicando la ruta de señalización que involucra a TOR, dado que el efecto de estimular la fosforilación es contrarrestado por la adición de rapamicina, que es un inhibidor de dicha vía (tabla 6). En mamíferos, eIF-4E es fosforilado por la vía de señalización que involucra a las MAPK, dicha fosforilación se incrementa en respuesta a diversas señales, entre ellas insulina (Scheper, 2002). Si la fosforilación de eIF-4E como respuesta a insulina en maíz es similar a la observada en mamíferos, este proceso estaría involucrando tanto la ruta de las MAPK como la vía de TOR, dado el efecto inhibitorio observado al adicionar rapamicina al sistema.

Por otra parte, eIF-iso4E presenta múltiples sitios potenciales de fosforilación y esta modificación parece ser susceptible de ocurrir bajo ciertas condiciones de estímulo (Manjunath, 1999). Al contrario de lo esperado, no se observó fosforilación de eIF-

iso4E al producir un estímulo con insulina. Sin embargo, este resultado no es concluyente, ya que es probable que no se hayan dado las condiciones apropiadas para que se llevara a cabo dicha fosforilación, como podría ser el tiempo de estímulo; también existe la posibilidad de que la fosforilación de eIF-iso4E esté regulada por eventos diferentes al estudiado en este trabajo. Además, cabe recordar que la fosforilación de este factor se ha observado en estudios realizados "*in vitro*" (Mateen, 2004).

La implicación de la fosforilación de los factores de iniciación eIF-4E y/o eIF-iso4E en plantas aún no está totalmente esclarecida, a pesar de tener claras evidencias de que podría ocurrir en eIF-iso4E y que, de hecho, ocurre en eIF-4E. En reticulocitos de conejo se realizó un estudio donde es claro que la forma fosforilada tiene una afinidad de tres a cuatro veces mayor por estructuras análogas al cap en comparación con la forma no fosforilada (Minich, 1994). Se ha visto también, que la fosforilación de eIF-4E correlaciona con un incremento en la síntesis de proteínas en células cultivadas y estimuladas por factores de crecimiento y hormonas (Manjunath, 1999).

Es importante hacer notar que los datos respecto a fosforilación de eIF-4E y eIF-iso4E de maíz presentados en este trabajo son sólo preliminares y aún no se puede dar una conclusión definitiva al respecto.

## CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se concluye que:

- La purificación de los factores recombinantes correspondientes a eIF-4E y a eIF-iso4E de maíz, expresados en *E. coli*, es más eficiente cuando no se elimina la proteína de fusión GST, ya que se obtiene un mayor rendimiento en comparación con las isoformas a las que se les ha quitado dicha proteína. En ambos casos, las proteínas son funcionales en un sistema de traducción *in vitro* de extracto de germen de trigo.
- La inserción de la proteína de fusión GST a los factores recombinantes, aparentemente no interfiere con las interacciones proteína-proteína ó proteína-mRNA requeridas para que se lleve a cabo el proceso de traducción.
- A pesar de ser funcionalmente intercambiables, los factores eIF-4E y eIF-so4E recombinantes ejercen una discriminación sobre los mRNAs reclutados para su traducción.
- Los resultados presentados apoyan la propuesta de que los mRNAs almacenados en semillas de maíz son reclutados a ribosomas preferencialmente por el factor eIF-iso4E, por lo que se propone que este factor puede estar involucrado en la síntesis de proteínas requeridas para el arranque de la germinación, tales como proteínas ribosomales y factores de la maquinaria de traducción.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bailey-Serres, J. (1999) Selective translation of cytoplasmic mRNAs in plants. *Trends in Plant Science*. 4(4):142-148.
- Bewley, J. (1997) Seed germination and dormancy. *Plant Cell*. 9:1055-1066.
- Bewley, J., Black, M., (1994) *Seeds physiology of development and germination*. Plenum Press, New York.
- Bradford, M. M. (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, K. (2004) Plant translation initiation factors: it is not easy to be green. *Biochemical Society Transactions*. 32:589-591.
- Browning, K. (1996) The plant translational apparatus. *Plant Molecular Biology*. 32:107-144.
- Browning, K., Humphreys, J., Hobbs, W., Smith, G.B., Ravelt, J.M. (1990) Determination of the amounts of the protein synthesis initiation and elongation factors in wheat germ. *J. Biol. Chem*. 265:17967-17973.
- Carberry S., Goss, D. (1991) Interaction of wheat germ protein synthesis initiation factors eIF-3, eIF-(iso)4F, and eIF-4F with mRNA analogues. *Biochemistry*. Jul 16;30(28):6977-82.
- Clemens, M., Bommer, U. (1999) Translational control: the cancer connection. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 31:1-23.

- 
- Combe, J., Petracek, M., Van Eldik, G., Meulewaeter, F., Twell, D. (2005) Translation initiation factors eIF4E y eIFiso4E are required for polysome formation and regulate plant growth in tobacco. *Plant Molecular Biology*. 57:749-760.
  - Cougot, N., Van Dijk, E., Babajko, S. Séraphin, B. (2004) 'Cap-tabolism'. *TRENDS in Biochemical Sciences*. 29(8):436-444.
  - Day, D., Tuite, M. (1998) Post-transcriptional gene regulatory mechanisms in eukaryotes: an overview. *Journal of Endocrinology*. 157:361-371.
  - Dinkova, T., Zepeda, H., Martínez-Salas, E., Martínez, L., Nieto-Sotelo, J., Sánchez de Jiménez, E. (2005) Cap-independent translation of maize Hsp101. *The Plant Journal*. 41, 722-731.
  - Dinkova, T., Aguilar, R., Sánchez de Jiménez, E. (2003) Translational Control by differential CAP-dependency in selected subpopulations of maize-stored mRNAs. *The Biology of Seeds*. 181-188.
  - Dinkova, T., Aguilar, R., Sánchez de Jiménez, E. (2000) Expression of maize eukaryotic initiation factor (eIF) iso4E is regulated at the translational level. *Biochemical Journal*. 351:825-831.
  - Gallie, D. (2002) Protein-protein interactions required during translation. *Plant Molecular Biology*. 50:949-970.
  - Gallie, D., Le, H., Tanguay, R., Browning, K. (1998) Translation initiation factors are differentially regulated in cereals during development and following heat shock. *The Plant Journal*. 14(6):715-722.
  - Gingras, A., Raught, B., Sonenberg, Nahum. (1999) eIF4 initiation factors:
-

- 
- Effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* 68:913-963.
- Hernández, G., Vazquez-Pianzola, P. (2005) Functional diversity of the eukaryotic translation initiation factors belonging to eIF4 families. *Mechanisms of Development.* 122:865-876.
  - Kawaguchi, R., Bailey-Serres, J. (2002) Regulation of translational initiation in plants. *Cell Signalling and Gene Regulation.* 460-465.
  - Khan, M., Goss, D. (2004) Phosphorylation states of translational initiation factors affect mRNA cap binding in wheat. *Biochemistry.* 43:9092-9097.
  - Hib, J. Traducción del ARN mensajero. *Biología Celular y Molecular.* De Robertis, E.D.P. (1996) Librería-Editorial El Ateneo, duodécima edición, Buenos Aires, Argentina. pág. 341-351.
  - Laemmli, U. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of phage T4 head. *Nature.* 227:680-685
  - Manjunath, S., Williams, A., 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(1):21-30.
  - Merrick, W. (2004) Cap-dependent and cap-independent translation in eukaryotic systems. *Gene.* 332:1-11.
  - Mignone, F., Gissi, C., Liuni, S., Pesole, G. (2002) Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biology.* 3(3):1-10.
  - Minich, W., Balasta, M., Goss, D., Rhoads, R. (1994) Chromatographic resolution of in vivo phosphorylated and nonphosphorylated eukaryotic translation

- 
- initiation factor eIF4E: Increased cap affinity of the phosphorylated form. Proc. Natl. Acad. Sci. 91:7668-7672.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
  - Preiss, T., Hentze, M. (2003) Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation. *BioEssays.* 25:1201-1211.
  - Proud, C. (2002) Regulation of mammalian translation factors by nutrients. *Eur. J. Biochem.* 269:5338-5349.
  - Potokina, E., Sreenivasulu, N., Altschmied, L., Michalek, W., Graner, A. (2002) Differential gene expression during seed germination in barley (*Hordeum vulgare* L.) *Funct. Integr. Genomics* 2:28-39. 2002.
  - Rajjou, L., Gallardo, K., Debeaujon, I., Vandekerckhove, J., Job, C., Job, D. (2004). The effect of  $\alpha$ -amanitin on the Arabidopsis seed proteome highlights the distinct roles of stored and neosynthesized mRNAs during germination. *Plant Physiology.* 134:1598-1613.
  - Rodríguez, C. M., Freire, M. A., Camilleri, C., Robaglia, C. (1998) The *Arabidopsis thaliana* cDNAs coding for eIF4E y eIF(iso)4E are not functionally equivalent for yeast complementation and are differentially expressed during plant development. *Plant J.* 13:465-473.
  - Ruvinsky, I., Meyuhas, O. (2006) Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *TRENDS in Biochemical Sciences.* 20(20):1-7.
  - Sánchez de Jiménez, E., Dinkova, T., Reyes de la Cruz, H. (2005) Mecanismos de control traduccional en la germinación de maíz. *Mensaje Bioquímico.* Vol XXIX pp



---

1-13, Facultad de Medicina, UNAM.

- 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.
- Scheper, G., Proud, C. (2002) Does phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E play a role in translation initiation? *Eur. J. Biochem.* 269:5350-5359.
- Sha, M., Wang, Y., Xiang, T., Van Heerden, A., Browning, K.S., Goss, D. J. (1995) Interaction of wheat germ protein synthesis initiation factor eIF-(iso)4F and its subunits p28 and p86 with m7GTP and mRNA analogues. *J. Biol. Chem.* 270:29904-29909.
- Smith, C., Wood, E. **Biosíntesis de proteínas.** *Biología Molecular y Biotecnología.* (1998) Addison Wesley Iberoamericana, S. A. México, D. F. pp. 63-84.
- Sonenberg, N., Dever, T. (2003) Eukaryotic translation initiation factors end regulators. *Current Opinion in Structural Biology.* 13:56:63.
- Von der Haar, T., Gross, J., Wagner, G., McCarthy, J. (2004) The mRNA cap-binding protein eIF4E in post-transcriptional gene expression. *Nature Structural & Molecular Biology.* 11(6):503-511.
- Zapata, J. M., Martínez, M. A., Sierra, J.M. (1994) Purification and characterization of eukaryotic polypeptide chain initiation factor 4F from *Drosophila melanogaster* embryos. *J. Biol. Chem.* 269(27):18047-18052.