



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA PROGRAMA DE MAESTRÍA Y  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**“RELEVANCIA DE LA PROTEÍNA DE CHOQUE  
TÉRMICO HSP101 EN LA ACUMULACIÓN Y  
SÍNTESIS DE PROTEÍNAS DURANTE LA  
GERMINACIÓN DE MAÍZ”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO  
DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**PRESENTA**

**M.C. PEDRO EDUARDO LÁZARO MIXTECO**

**ASESORA DE TESIS: TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA**

**MÉXICO D.F.**

**AGOSTO, 2012**



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.

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova en el laboratorio 103 de la Facultad de Química conjunto “E” en la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradecemos al Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis, así como por sus valiosas aportaciones para la realización de este trabajo, el cual estuvo formado por:

Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez

Dra. Alejandra Covarrubias Robles

Este proyecto recibió apoyo de PAPITT IN204309, PAPITT IN210912 y CONACYT 81708. Durante los estudios de Doctorado gocé de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en el examen presentado el día 2 de Agosto de 2011.

Agradecemos a los sinodales que formaron parte del Jurado de Examen de Doctorado por sus comentarios y sugerencias durante la revisión, el cual estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Susana López Chárreton
Vocal	Dra. Xóchitl Pérez Martínez
Vocal	Dr. Dimitris Georgellis
Vocal	Dr. Jorge Nieto Sotelo
Secretario	Dra. Irma Bernal Lugo

## **DEDICATORIA**

Con especial cariño dedico este trabajo a mi familia, por acompañarme en cada etapa de mi formación académica.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme los espacios para desarrollarme como científico.

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias a la doctora Cesy, directora de esta tesis, por su asesoría durante el doctorado. Durante todo ese tiempo, su laboratorio me permitió desarrollarme profesionalmente, de manera libre e independiente, y este trabajo ha sido resultado de la dedicación de ambas partes, asesor-alumno.

A mis compañeros de laboratorio 103 y del Departamento de Bioquímica, con los que compartí momentos muy gratos, dentro y fuera del

Se agradece ampliamente al Dr. Jorge Nieto-Sotelo, jardín botánico, Instituto de Biología de la UNAM; al Dr. Guillermo Mendoza-Hernandez, Unidad de péptidos y proteínas de la facultad de medicina de la UNAM, y al grupo del Dr. Jay J. Thelen, Interdisciplinary Plant Group of The University of Missouri-Columbia, por su colaboración en el proyecto y en la publicación del artículo científico.

**“RELEVANCIA DE LA PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO  
HSP101 PARA LA ACUMULACIÓN Y SÍNTESIS DE PROTEÍNAS  
DURANTE LA GERMINACIÓN DE MAÍZ”**



Departamento de Bioquímica, Facultad de Química Conjunto “E”  
Laboratorio-103  
Universidad Nacional Autónoma de México

Pedro Eduardo Lázaro Mixteco  
México D.F. 2012

## ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	i
<b>Abreviaturas</b> .....	ii
<b>Abstract</b> .....	iii
<b>Conclusiones</b> .....	IV
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
I.1 La estructura y función de la semilla.....	1
I.2 La formación de la semilla: la embriogénesis, la maduración-desección.....	2
I.3 La Germinación-emergencia de la raíz.....	3
<b>II. PROTEÍNAS DE CHOQUE DE CALOR DE PLANTAS</b> .....	4
II.1 La familia de la HSP100: Clases, estructura y función.....	5
II.2 La familia de la HSP90: Clases, estructura y función.....	10
II.3 La familia de la HSP70: Clases, estructura y función.....	12
II.4 Las proteínas de choque de calor de bajo peso molecular (sHSPs): clases, estructura y función... 13	
<b>III. ANTECEDENTES</b> .....	18
III.1 Las proteínas de choque de calor como reguladores de síntesis de proteínas.....	18
III.2 La HSP101 como regulador de la traducción.....	20
<b>IV. JUSTIFICACIÓN</b> .....	22
<b>V. HIPÓTESIS</b> .....	23
<b>VI.1 Objetivo general</b> .....	24
<b>VI.2 Objetivos particulares</b> .....	24
<b>VII. Estrategia metodológica</b> .....	25
<b>VIII. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	26
VIII.1 Material biológico y condiciones de crecimiento.....	26
VIII.2 Extracción de DNA genómico y genotipificación de las líneas silvestres y mutantes L10 y L4.....	26
VIII.3 Amplificación del <i>Mutator1</i> mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	27
VI.4 Electroforesis de DNA en geles de agarosa.....	27
VI.5 Extracción de proteínas.....	27
VI.6 Purificación de los complejos eIF4F y eIF(iso)4F de los ejes embrionarios de maíz.....	28
VI.7 Electroforesis de SDS- PAGE en una dimensión .....	28
VI.8 Transferencia de las proteínas resueltas por SDS-PAGE .....	28

VI.9 Tinción de las proteínas del gel de SDS-PAGE con nitrato de plata.....	29
VI.10 Reacción de inmunodetección de las proteínas .....	29
VI.11 Electroforesis de SDS-PAGE bidimensional (2DGE).....	30
VI.12 Tinción de las proteínas del gel de SDS-PAGE con azul de Coomassie.....	31
VI.13 Digitalización de los geles de SDS-PAGE teñidos con Azul de Coomasie y análisis de las imágenes.....	31
VI.14 Separación de los polirribosomas en gradientes de sacarosa.....	32
VI.15 Marcaje metabólico radiactivo <i>in vivo</i> con <sup>35</sup> [S]-metionina .....	33
VI.16 Espectrometría de masas por LC/MS/MS.....	33
<b>IX. RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
IX.1 Migración de la HSP101 en perfiles polisomales durante la germinación del maíz.....	34
IX.2 Comparación de los complejos de unión a cap ( <sup>7</sup> mGTP-Sefarosa) en embriones <i>hsp101</i> y silvestres a las 24 horas de germinación.....	37
IX.3 Impacto de la ausencia de HSP101 en el proteoma de ejes de maíz quiescentes .....	42
IX.4 Síntesis proteica en semillas carentes de <i>Hsp101</i> a las 24 h de germinación (marcaje metabólico con metionina-[ <sup>35</sup> S]).....	48
<b>X. DISCUSIÓN.....</b>	<b>53</b>
<b>XI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>60</b>
<b>XII. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>61</b>
<b>XIII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>62</b>
<b>XIV. ANEXOS.....</b>	<b>70</b>

## RESUMEN

El inicio de la traducción en las plantas requiere que las proteínas eIF4E o eIF(iso)4E reconozcan la estructura *cap* (<sup>7</sup>mGpppG) presente en los mRNAs. Estas proteínas forman parte de los complejos heterotrimericos eIF4F y eIF(iso)4F, respectivamente. Recientemente, se ha demostrado que la proteína de choque térmico HSP101 de maíz (*ZmHSP101*) interacciona con los complejos eIF4F y eIFiso4F en el eje embrionario quiescente. La proteína HSP101 se acumula durante el periodo de maduración y desecación del embrión, y su presencia durante la germinación se mantiene en niveles altos durante las primeras 24h, cuando ésta ocurre a temperatura óptima. Las HSP101 de las plantas son miembros de la subfamilia Clp/B, proteínas que confieren capacidad termotolerante a la célula durante el estrés por calor. Sin embargo, estudios recientes proponen una función alternativa para este tipo de proteínas, la de regulador de la traducción de mRNAs específicos. La delección del gen *Hsp101* de maíz causa un mayor crecimiento de la raíz primaria y de las raíces adventicias del nodo coleoptilar en condición normal. Lo que sugirió, entre otras posibilidades, que dicho efecto pudo deberse al incremento en la síntesis de proteínas o a la falta de la síntesis de algún inhibidor de la elongación de la radícula. Basado en los antecedentes anteriores se planteó determinar la relevancia de HSP101 para el proceso de acumulación de proteínas en embriones maduros quiescentes y durante la síntesis de proteínas durante la germinación de maíz. Para ello, se utilizó el análisis proteómico comparativo entre ejes embrionarios de maíz, de la línea silvestre *Hsp101/Hsp101* y de la línea carente de HSP101, *hsp101-m5::Mu1/hsp101-m5::Mu1*, en el estado quiescente y durante las primeras 24h de la imbibición. Así mismo, se analizó la composición de los complejos de unión a *cap* y la síntesis proteica en ambos genotipos. Los resultados obtenidos en el presente trabajo demostraron que la chaperona HSP101 es capaz de interactuar con los complejos del inicio de la traducción (eIF4F), y parece estar involucrada en el inicio de la traducción durante las primeras 12 horas de la germinación. La comparación de los proteomas de ejes quiescentes, mutantes y silvestres, mostraron cambios significativos en los niveles de 26 manchas proteicas ( $p < 0.05$ ) con puntos isoeléctricos ( $pI$ ) entre 4 y 7. Adicionalmente, se encontraron siete manchas proteicas reproducibles, entre la mutante y silvestre, que mostraron cambios cualitativos, en ejes secos como germinados. La identificación de las proteínas en las diferentes manchas, por espectrometría de masas LC/MS/MS, reveló un reajuste de varias proteínas relacionadas con el estrés térmico. Lo que surgió que un nuevo sistema de chaperonas opera para contender con la carencia de HSP101. Adicionalmente, la mutante *hsp101-m5::Mu1/hsp101-m5::Mu1* mostró una alteración en la acumulación de actina y algunas enzimas del metabolismo de las citocininas. Lo que permitió explicar, parcialmente, la alteración del crecimiento de la raíz primaria y la emergencia de las raíces nodales en la mutante carente de HSP101. La comparación de los complejos de unión a *cap*, entre la mutante y silvestre, mostró un incremento del factor eIF(iso)4G y de la proteína HSP70. Adicionalmente, la mutante mostró alteraciones, de manera específica, en la síntesis de proteínas *de novo*.

En resumen, todos estos hallazgos indican que la HSP101 tiene una función dual: actúa como chaperona y como regulador de la traducción durante la germinación del maíz.

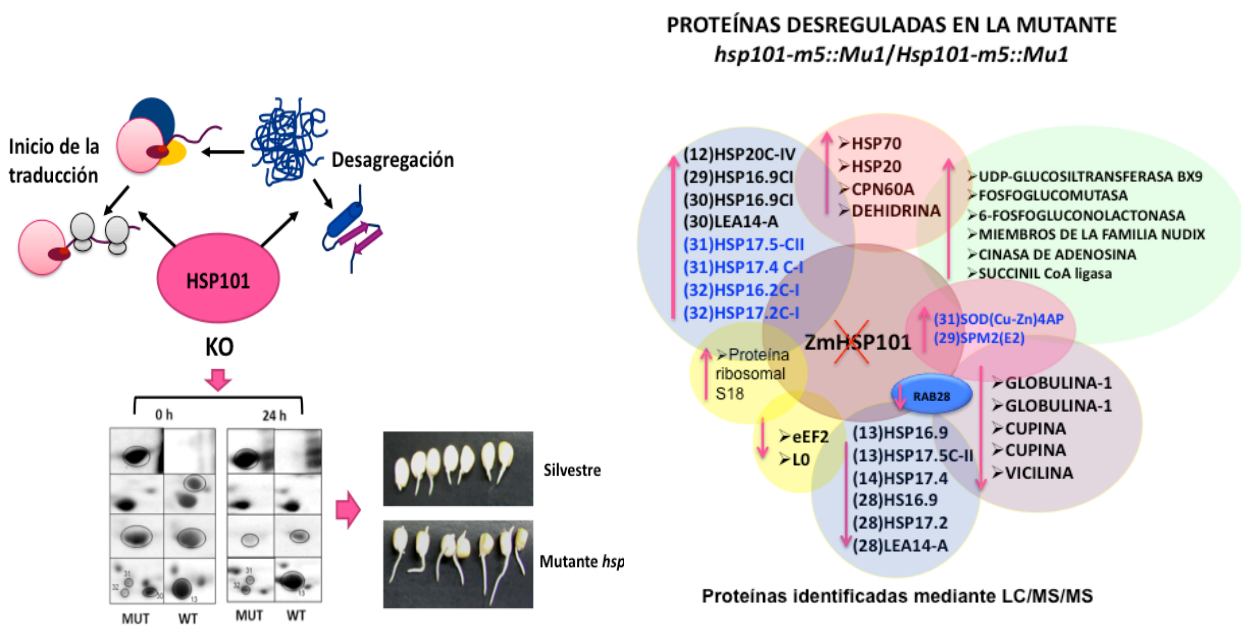


## ABSTRACT

In plants, the translation initiation process requires the recognition of the cap structure ( $^7\text{mGpppG}$ ), present at the mRNA 5' end, by either eIF4E or eIF (iso) 4E protein, as part of the heterotrimeric eIF4F and eIF (iso) 4F complexes, respectively. Recently, it has been shown that maize heat shock protein of 101 kDa HSP101 (HSP101) interacts with eIF4F and eIFiso4F complexes in quiescent embryonic axes. HSP101 protein accumulates during maturation and desiccation, and its presence is maintained at high levels during the first 24-h of germination at optimal temperature. Plant HSP101 proteins are members of the ClpB protein subfamily and play an important role in heat induced thermo-tolerance. However, recent studies suggest an alternative role for these proteins, as regulators of mRNA-specific translation. ZmHSP101 depletion causes an enhanced growth of the primary root and nodal root development from the coleoptilar node, when seeds are grown in the dark at optimal condition. Among other possibilities, it has been suggested that this effect could be due to the protein synthesis increment or lack of a root elongation inhibitor. In this work, a global proteomic approach was used to identify changes in the maize proteome due to the absence of HSP101 in the mature-dry embryo. The HSP101 relevance for protein synthesis during maize germination in embryos was also studied. To perform this, the proteomes of wild type-L10 line (*Hsp101/Hsp101*) and mutant-L10 line (*hsp101-m5::Mu1/hsp101-m5::Mu1*), lacking HSP101, were analyzed from quiescent (0-h) and 24-h imbedded maize embryonic axes. Furthermore, the composition of cap-binding complexes and the pattern of newly synthesized proteins in both genotypes was also analyzed. The results showed that HSP101 is able to interact with translation initiation complexes (eIF4F), and appears to be involved in translation initiation during the first 12 h of maize germination. The proteome analysis of mutant versus wild type embryos showed 26 differentially expressed protein spots ( $p < 0.05$ ) in the mature dry embryo with isoelectric points (pI) between 4 and 7. Additionally, six spots reproducibly showed qualitative changes between the mutant and wild type mature and germinating embryos. Several chaperones, translation-related proteins, actin, and enzymes participating in cytokinin metabolism were identified in these spots by tandem mass spectrometry LC/MS/MS. The proteomic changes partially explained the altered root growth and architecture observed in young *hsp101* mutant seedlings and suggested that a new chaperone system could be operating to compensate the absence of HSP101. Cap-binding protein analysis revealed that in the absence of HSP101, eIF(iso)4G and HSP70 increased in the cap-bound extracts. In addition, specific protein *de novo* synthesis was altered in the 24h-imbibed mutant embryos indicating that maize HSP101 functions as both, chaperone and translational regulator during germination.

## CONCLUSIONES

- 1) HSP101 regula la traducción de mRNAs específicos, ya sea como regulador traduccional o como chaperona de los complejos de inicio de la traducción.
- 2) HSP101 forma parte de los complejos eIF4F/eIF(iso)4F y de la maquinaria traduccional asociada al ribosoma 80S.
- 3) La presencia de HSP101 es importante para la estabilidad de algunas proteínas acumuladas en el embrión maduro de maíz como Rab28.
- 4) La ausencia de HSP101 provoca el reajuste de la expresión de proteínas pequeñas de choque térmico (sHSPs), factores traduccionales y algunas enzimas involucradas en vía de síntesis de citocininas y ABA.



Pedro E. Lázaro-Mixteco, Jorge Nieto-Sotelo, Kirby N. Swatek, Norma L. Houston, Guillermo Mendoza, Jay J. Thelen, and Tzvetanka D. Dinkova (2012). The Absence of Heat Shock Protein HSP101 Affects the Proteome of Mature and Germinating Maize Embryos. *Journal of Proteome Research*, 6 : 3246–3258.

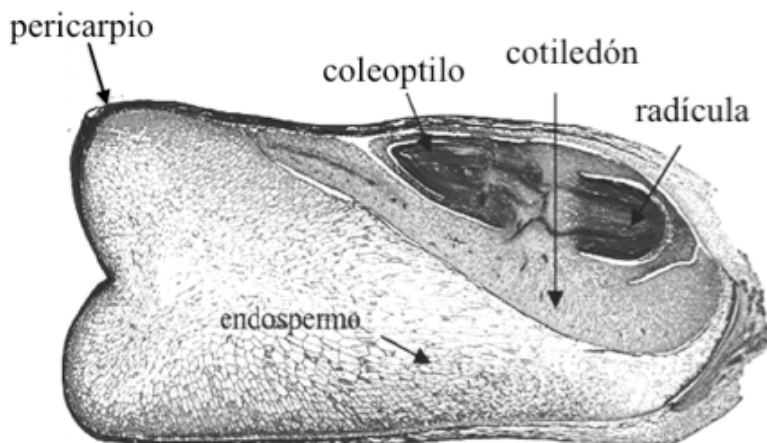
## ABREVIATURAS

- ACD: dominio  $\alpha$ - cristalino.
- APS: persulfato amónico.
- ATBFs: factores de unión a secuencias ricas en AT.
- ATP: adenosina trifosfato.
- BSA: albúmina de suero bovino.
- C/EBPs: proteínas de unión al potenciador CCAAT.
- CCH: heterocomplejo de chaperonas citoplasmáticas.
- CHAPS: (3-[(3-Cholamidopropil) dimetilamonio]-1-propano-sulfonato).
- Clp: proteasa caseinolítica.
- CTAD: dominio de activación.
- dpi: puntos por pulgada
- dATP: desoxi adenosina trifosfato.
- EDTA: ácido etilen diamino tetracético.
- eIF: Factores de iniciación eucariótico.
- 4EBP: Proteína de unión al factor eIF4E.
- GTP:Guanosina trifosfato.
- HSC: proteína de choque de calor constitutiva.
- HSE: elemento de respuesta al choque de calor.
- HSF: factor de transcripción de choque de calor.
- HSG: gránulo de choque de calor.
- HSP: proteína de choque de calor.
- IEF: isoelectroenfoque.
- kDa: kilodalton.
- L: Litro.
- LB: medio Luria-Bertani.
- LC/MS/MS: Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem.
- M: molar.
- <sup>7</sup>mGpppN: estructura cap del mRNA
- mRNA: RNA mensajero.
- $\mu$ Ci: microcuries
- $\mu$ L: microlitro
- $\mu$ g: microgramo
- mL: mililitro
- mg: miligramos
- NLS: dominio de localización nuclear.
- PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida.
- pI: punto isoeléctrico.
- PABP: proteína de unión a poly(A).
- PMSF: fenil metil sulfonil fluoruro.
- PM: peso molecular.
- PVDF: fluoruro de polivinilideno.
- rpm.: revoluciones por minuto.
- RNA: ácido ribonucleico.
- SDS: dodecil sulfato sódico.
- sHSP: proteína de choque de calor de bajo peso molecular.
- TBS: tampón tris salino.
- TEMED: N, N, N', N'- tetrametil-etilendiamina.
- UTR: Región no traducible del mRNA
- V: voltios.

# I. INTRODUCCIÓN

## I.1. Estructura y función de la semilla

Las plantas, como organismos sin locomoción, desarrollaron diversos mecanismos para enfrentar condiciones desfavorables de crecimiento, entre ellos la interrupción de su ciclo de vida; una de las estrategias más exitosas para la supervivencia. Las angiospermas interrumpen su ciclo de vida por la la formación de semillas que se originan por la fecundación del óvulo y que incluye al embrión y tejidos de origen materno. Durante la formación de la semilla, el desarrollo del embrión atraviesa una fase de maduración que permite la entrada a un estado quiescente, lo que le facilita su dispersión y le permite que se reinicie su metabolismo y crecimiento cuando las condiciones ambientales sean óptimas. La semilla es el producto de un evento de doble fertilización, en que una de las células espermáticas del grano de polen fertiliza al óvulo y la otra a la célula central. Del óvulo fecundado se originará el embrión diploide, mientras que la célula central se diferenciará en el endospermo triploide. En las plantas monocotiledóneas, el endospermo constituye el órgano principal de reserva donde se almacenan almidón y proteínas, que nutrirán el embrión tras la germinación. A esta clase de semillas se les denominan endospermicas y a ella pertenecen las semillas de los cereales, como el maíz (Fig. 1; Walbot y Evans, 2003; Dumas y Rogowsky, 2008). El grano de maíz es un fruto (cariopsis).



**Figura 1. Estructura de la cariopsis del maíz.** Los principales tejidos se indican mediante flechas.

## **I.2. La formación de la semilla: *la embriogénesis y la maduración-desección***

La formación de la semilla es un proceso que suele dividirse en dos grandes etapas: la embriogénesis, que comprende división y diferenciación celular; y la etapa de maduración, caracterizada por la acumulación de sustancias de reserva y la adquisición de tolerancia a la desecación. Al final de esta etapa el embrión deja de crecer y entra en el período de latencia (Dumas y Rogowsky, 2008).

El desarrollo de la semilla inicia con el período de la embriogénesis, que comprende el conjunto de cambios morfológicos, estructurales y de expresión génica que tienen lugar desde la formación del cigoto hasta que el embrión está diferenciado (Goldberg y col., 1994; Berleth y Chatfield, 2002).

Después de la morfogénesis, la semilla entra en el período de maduración, que es denominado el período de acumulación de reservas e incluye la reorganización del metabolismo y la síntesis de compuestos de almacenaje; almidón, proteínas de almacenaje y lípidos. También se ha denominado a este estadio como período de desecación, debido a que esta etapa se caracteriza por una gran pérdida de agua, llevando, mediante el secado de la semilla, al período de quiescencia (Wobus y col., 1999). Las fases tempranas y media de la maduración están dominadas por la acción del ácido abscísico (ABA, por sus siglas en inglés), sintetizado inicialmente en los tejidos maternos y luego, aunque en menor medida, por el embrión y el endospermo (Nambara y col., 2003). El ABA evita la germinación precoz, prepara al embrión para resistir la desecación e induce la latencia (Torti y col., 1986; Rock y Quartano, 1995; Raz y col., 2001). La transcripción de genes que codifican para las principales proteínas de reserva ocurre principalmente en este período. En la etapa de maduración tardía, los niveles de ABA decaen y comienzan a acumularse proteínas de tipo LEA (Late Embriogenesis Abundant) y dehidrinas, asociadas a los procesos de deshidratación y tolerancia a la desecación (Goldberg y col., 1989; Finkelstein y col., 2002; Nambara y col., 2003). Existen estudios del perfil transcripcional durante la etapa de desecación que indican que los mRNAs que se sobre-expresan y almacenan son los que codifican para componentes de la maquinaria traduccional, tales como proteínas ribosomales, factores de inicio de la traducción (Rajjou y col., 2004; Nakabayashi y col., 2005; Cadman y col., 2006), proteasas, proteínas relacionadas con la maquinaria ubiquitina-proteasoma (Nakabayashi y col., 2005), proteínas asociadas con el metabolismo energético, proteínas asociadas con la reparación del DNA y proteínas involucradas en la degradación de lípidos (Chia y col., 2005; Rajjou y col., 2008). Por otro lado, la pérdida gradual de agua durante la maduración, también induce la síntesis de proteínas de choque de calor (HSPs, por sus siglas en inglés; Sharma y Kaur, 2009). La denominación HSPs se deriva de su identificación como proteínas cuya concentración se incrementa con el estrés de calor. Sin embargo, la caracterización posterior de estas proteínas reveló que son muy abundantes aún sin estrés celular, representando del 1 al 2 % del contenido proteico de la célula

(Picard y col., 2002; Katschinski, 2004). Por ejemplo, en las semillas en período de maduración, muchas de estas proteínas son expresadas en ausencia de estrés y en distintos periodos del desarrollo (Helm y Abernethy, 1990; Wehmeyer y col., 1996; Wehmeyer y Vierling, 2000; Almoguera y col., 1998; Betty y col., 1998; Betty y Finch-Savage, 1998; Singla y col., 1998; Sung y col., 1998; Carranco y col., 1999). Lo anterior indica lo importante que es para la semilla la adquisición de la tolerancia durante la desecación, la latencia y la germinación (Nieto-Sotelo y col., 2002).

### **I.3. La Germinación y la emergencia de la raíz**

El proceso de germinación, que esencialmente es la reactivación de la actividad metabólica, comienza con la toma de agua (imbibición) y concluye con la emergencia de la raíz (Bewley, 1997). Para que una semilla pueda germinar, se requieren condiciones favorables de temperatura, luz y disponibilidad de oxígeno. La absorción de agua por la semilla desencadena una secuencia de cambios metabólicos, que incluyen la respiración, la síntesis proteica y la movilización de sustancias de reserva. A su vez, la división y el alargamiento celular en el embrión provocan la fractura de las cubiertas seminales, que generalmente se produce por la emergencia de la radícula, la cual, en la mayoría de las especies, es la primera estructura que emerge después de la rehidratación de los diferentes tejidos.

En el proceso de germinación podemos distinguir tres fases: i) Fase I, hidratación. La absorción de agua es el primer paso de la germinación, sin el cual el proceso no puede darse. Durante esta fase se produce una intensa absorción de agua por parte de los distintos tejidos que forman la semilla. Dicho incremento va acompañado de un aumento proporcional en la actividad respiratoria; ii) Fase II, germinación. Representa el verdadero proceso de la germinación. En ésta se producen las transformaciones metabólicas necesarias para el correcto desarrollo de la plántula y la absorción de agua se reduce considerablemente, incluso hasta detenerse y iii) Fase III, crecimiento. Es la última fase de la germinación y se asocia con la emergencia de la radícula (cambio morfológico visible). Esta fase se caracteriza porque la absorción de agua vuelve a aumentar, así como la actividad respiratoria (Botha y col., 1992; Bewley y Black, 1994).

Muchos de los genes asociados al proceso de maduración-desecación también son sobre-expresados durante la germinación. Se argumenta que muchos de los procesos biológicos que ocurren durante la desecación rigen el proceso germinativo (Dasgupta y Bewley, 1982; Contreras y col., 2008) ya que la emergencia de la radícula depende de la síntesis de proteínas codificadas por los mRNAs almacenados en la semilla y no por la síntesis de mRNAs sintetizados *de novo* (Waters y Dure, 1965; Rajjou y col., 2004). Además, dentro del embrión existe una transición sin problemas del proceso de maduración al de germinación, que indica que el embrión seco ya está programado (Sreenivasulu y col., 2008). La acumulación de aminoácidos libres durante la desecación está asociada con la sobre-

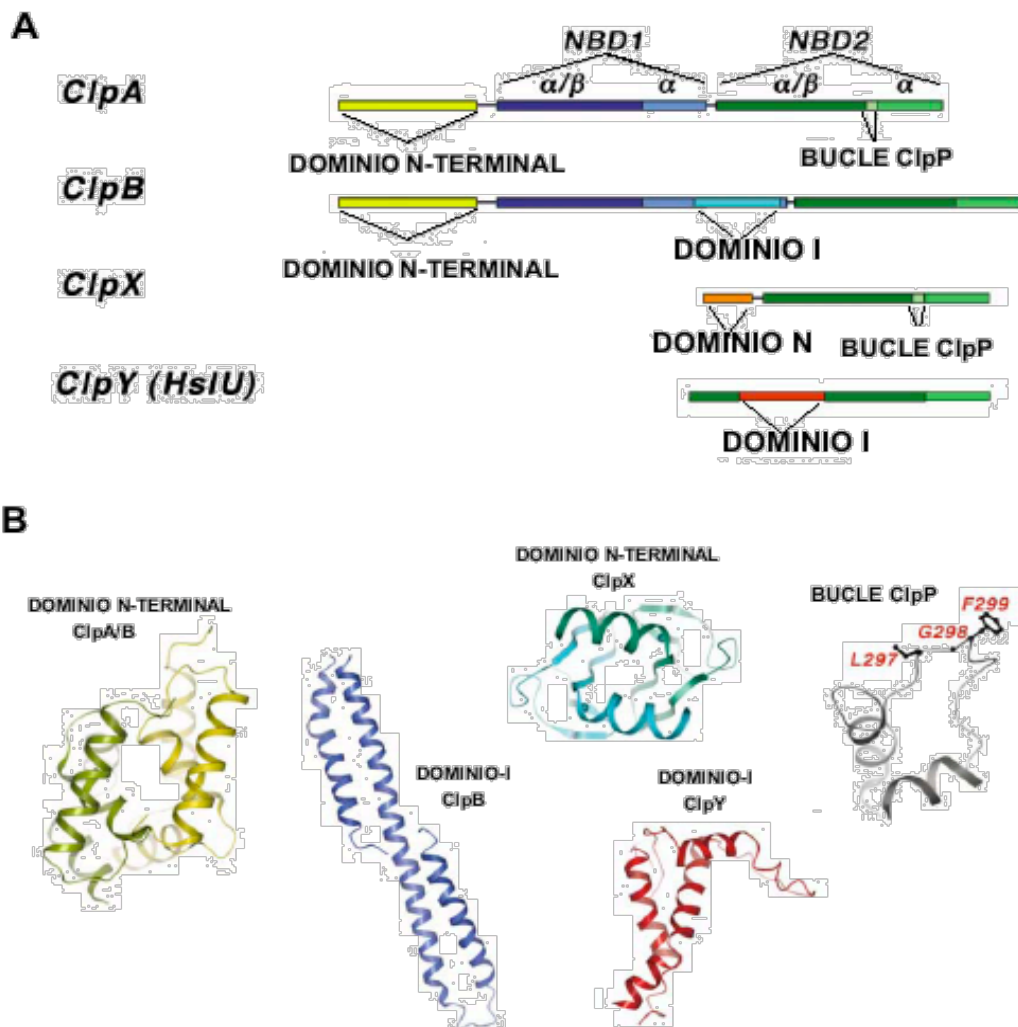
expresión de transcritos involucrados en la biosíntesis de aminoácidos (Fait y col., 2006). El número de aminoácidos que son sintetizados durante el período de desecación decrece durante la germinación, aparentemente para soportar el proceso de síntesis de proteínas durante la germinación temprana (Marcus y Feeley, 1964; Dasgupta y Bewley, 1982; Rajjou y col., 2004).

## **II. LAS PROTEÍNAS DE CHOQUE DE CALOR (HSPs)**

Las HSPs son chaperonas moleculares que actualmente son ubicadas en cinco familias: La familia de las HSP70 (DnaK), las chaperoninas (HSP60), la familia de las HSP90, la familia de las HSP100 (Clp) y la familia de las pequeñas proteínas de choque térmico (SHSPs). Sin embargo, hay otras proteínas con función de chaperonas que no son HSPs, entre ellas la disulfuro isomerasa y la calnexina-calreticulina, que asisten a las proteínas mal plegadas en el retículo endoplasmático (ER, por sus siglas en inglés). Por tanto, vale la pena aclarar que no todas las proteínas de estrés son chaperonas, ni todas las chaperonas son inducidas por estrés. Las HSPs son localizadas tanto en el citoplasma como en los organelos tales como el núcleo, la mitocondria, el cloroplasto y el ER (Vierling, 1991; Boston y col., 1996; Waters y col., 1996). Diferentes clases de chaperonas moleculares parecen unirse a sustratos específicos y a estados no nativos de las proteínas. Las HSPs no unen de manera covalentemente a sus sustratos. La importancia de las chaperonas reside en el hecho de que previenen y revierten los procesos de aglomeración o agregación de las proteínas cuando se encuentran en elevadas concentraciones, típicas de las células vivas. Por lo tanto, las chaperonas se necesitan para que el plegamiento de las proteínas se haga de manera eficiente bajo las condiciones altamente densas del ambiente celular. La agregación de las proteínas ocurre porque durante su plegamiento se forman conformeros intermediarios que exponen grupos hidrofóbicos en su superficie (a estos intermediarios se les denomina como: estado de glóbulo fundido). Debido a la alta densidad de proteínas en el ambiente celular, su actividad entrópica aumenta (desorden) hasta en dos o tres órdenes de magnitud. La mayoría de las chaperonas se unen a las superficies hidrofóbicas de las proteínas que están en proceso de plegamiento o que han sido desnaturalizadas, impidiendo su agregación (Nieto-Sotelo, 2008).

## II.1. Los miembros de la familia de la HSP100: Clases, estructura y función

Se han descrito dos grupos de proteínas Clp/HSP100: el de la clase 1 y el de la clase 2. Las proteínas de la clase 1 contienen dos dominios de unión a nucleótidos (NBD, por sus siglas en inglés), mientras que las de la clase 2 únicamente poseen un NBD. Las proteínas de la clase 1 claramente se pueden subdividir en cuatro subfamilias en función de la longitud del espaciador que separa a los dos NBD: ClpA, ClpB, ClpC y ClpD. Las proteínas tipo ClpA tienen un espaciador muy corto, de unos 54 residuos de aminoácidos, las proteínas tipo ClpB contienen un espaciador más largo, de 172 a 207 residuos de aminoácidos, mientras que en las proteínas tipo ClpC y ClpD el tamaño del espaciador es intermedio, de 101 a 118 residuos de aminoácidos. Además, las proteínas tipo ClpC y ClpD poseen secuencias en sus extremos N-terminales que les permiten ser translocadas a los plástidos en las plantas. La clase 2 está formada por las subfamilias ClpM, ClpN, ClpX y ClpY (Fig. 2).





**Figura 2. Estructuras de las proteínas Clp/HSP100.** (A) Las proteínas Clp/HSP100 están compuestas de uno o dos módulos AAA. Cada módulo consiste en un subdominio  $\alpha/\beta$ , con plegamiento nucleotídico tipo RecA, conectado con un subdominio  $\alpha$ . Mientras que los módulos AAA son divergentes para cada proteína, el dominio N-terminal (N-ter) y el dominio C-terminal (C-ter) están bien conservados dentro de diferentes familias. Las proteínas Clp/HSP100 puede no tener el dominio N-ter (HsIU), o un dominio N-ter de unión a zinc. El dominio I en HsIU y ClpB es producido por splicing en diferentes partes del módulo AAA-1. El asa ClpP, un motivo pequeño presente en ClpA y ClpX, está insertado dentro del módulo C-term, y facilita su interacción con interactores funcionales. (B) Principales dominios de las proteínas Clp/HSP100. Los dominios N-ter de ClpA y ClpB son dímeros pseudohelicoidales (código PDB 1KHY), mientras que el dominio N-ter de ClpX (código PDB 1OVX) tiene un motivo de unión a zinc y dos dominios asociados, para formar un dímero molecular. El dominio I es también altamente helicoidal; en ClpB, forma un doble espiral enrollado (código PDB 1QVR). Tomado de Mauruzi, 2004).

La actividad de solubilizar proteínas agregadas únicamente se ha observado en las proteínas ClpB y ClpC. Las otras proteínas Clp tienen diversas funciones: las ClpA y ClpX son subunidades regulatorias de la proteasa ClpP, aumentando su actividad proteolítica y determinando su espectro de sustratos. Las proteínas ClpB/HSP100 forman partículas hexaméricas y requieren de esta conformación cuaternaria para su funcionamiento. En *Saccharomyces cerevisiae*, el ensamblaje de la HSP104 en hexámeros depende de la presencia de nucleótidos de adenina, ya sea ADP o ATP.

La actividad de desagregasa de la ClpB/HSP100 se demostró mediante una combinación de ensayos *in vitro*. Se observó que la proteína Hsp104 desagrega a otras proteínas en combinación con Hsp70, Hsp40 (Glover y Lindquist, 1998) y Hsp26, una Hsp pequeña (sHsp) (Cashikar *et al.*, 2005). De igual forma, se vió que ClpB de *E. coli* requiere del complejo DnaK/DnaJ/GrpE para reactivar a los agregados proteínicos además de las sHsp, IbpA e IbpB (Mogk *et al.*, 2003). Un modelo reciente en *S. cerevisiae* propone que el grado de asociación de las sHsp (Hsp26) a los agregados determina la facilidad con la que éstos son solubilizados (Cashikar *et al.*, 2005). Cuando la concentración de Hsp26 es baja, forma complejos con las proteínas desnaturalizadas de mayor tamaño y, posiblemente, más apretados. A altas concentraciones, Hsp26 forma agregados de menor tamaño que son reactivados con mayor eficacia por el complejo Hsp104/Hsp70/ Hsp40. La solubilización de las proteínas agregadas se cree que ocurre mediante un mecanismo similar al de pasar el hilo de una madeja a través del ojo de una aguja (Haslberger *et al.*, 2007). Esto implica que las ClpB desenhebran el hilo (desagregan a la proteína agregada) y lo pasan a través del ojo de la aguja (translocan a la proteína a través del poro central del hexámero ClpB de manera dependiente de la hidrólisis del ATP). Se ha visto que DnaK ayuda a ClpB a extraer a los polipéptidos de los agregados. Una vez que se ha desplegado totalmente el polipéptido, pasa a través del poro de ClpB y finalmente la maquinaria DnaK/DnaJ/GrpE se encarga de plegarla a su conformación nativa (Haslberger *et al.*, 2007).

Trabajos recientes muestran que además de ser citosólicas, las HSP100s también se localizan en el núcleo, el cloroplasto, la mitocondria y la membrana plasmática (Singh, 2010). Mientras los genes de ClpB/HSP100 son inducidos por estrés en órganos vegetativos de la planta, la expresión de sus proteínas es constitutiva en estructuras reproductivas, tales como el polen, el grano, durante el desarrollo del embrión y la semilla (Mayer, 2010). La familia de HSP100 es mayor en plantas y la mayoría pertenecen al grupo de las ClpB (Schirmer y col., 1996). En *Arabidopsis thaliana*, se demostró que ClpB/HSP100 interacciona con la SHSP para resolubilizar agregados después de estrés por calor (Lee y col., 2005). Se sugiere que ClpB/HSP100 participa en la liberación de HsfA2 de los gránulos de choque de calor en cooperación con la chaperona HSP70 (Baniwal y col., 2007).

Hasta el momento, las ClpB/HSP100 de las plantas se han estudiado principalmente en *A. thaliana*, *Oryza sativa* y *Zea mays*. Las proteínas de estas tres especies muestran una semejanza del 40% en su secuencia de aminoácidos comparados con la HSP104 de *S. cerevisiae*, sugiriendo una conservación evolutiva de estos miembros (Schirmer y col., 1994; Singla y col., 1998; Agarwal y col., 2001, 2002, 2003; Batra y col., 2007). La Fig. 3 muestra los detalles de los dominios que son usualmente descritos en las proteínas ClpB/HSP100. Estos dominios exhiben una similitud muy notable entre diferentes especies. Las ClpB/HSP100 de las plantas son dirigidas a diferentes compartimentos celulares como es el caso de *A. thaliana*, maíz y arroz que contienen una ClpB/HSP100 citosólica, una nuclear, una mitocondrial y una de cloroplasto (Lee y col., 1994; Nieto-Sotelo y col., 2002; Singh y col., 2010). El álamo contiene una ClpB/HSP100 citosólica, una mitocondrial y dos en el cloroplasto (Singh y col., 2010). Es importante señalar que la OsClpB-cloroplástica, la OsClpB-mitocondrial y la OsClpB-citosólica muestran similitud en su estructura tridimensional, como se ha visto para la ClpB de *A. thaliana* (Singh y col., 2010). En las plantas, la expresión de los transcritos en proteínas de ClpB/HSP100 durante estrés por calor, ha sido ampliamente estudiada en *Arabidopsis* (Singla y Grover, 1993, 1994; Lee y col., 1994; Schirmer y col., 1994; Pareek y col., 1995, Singla y col., 1998; Shen y col., 2003; Singh y col., 2010), maíz (Young y col., 2001; Nieto-Sotelo y col., 1992; Nieto-Sotelo y col., 2002), tabaco y trigo (Wells y col., 1998; Campbell y col., 2001). Hay evidencias que también son inducidos por desecación (Shen y col., 2003). Aparte de la regulación por estrés en plantas, éstas se regulan durante el desarrollo (Queitsch y col., 2000). En embriones de semillas de arroz se expresan constitutivamente; se ha demostrado que el proceso de maduración de embriones cigóticos se asocia con la acumulación de proteínas HSP100 (Singla y col., 1998).

(A)

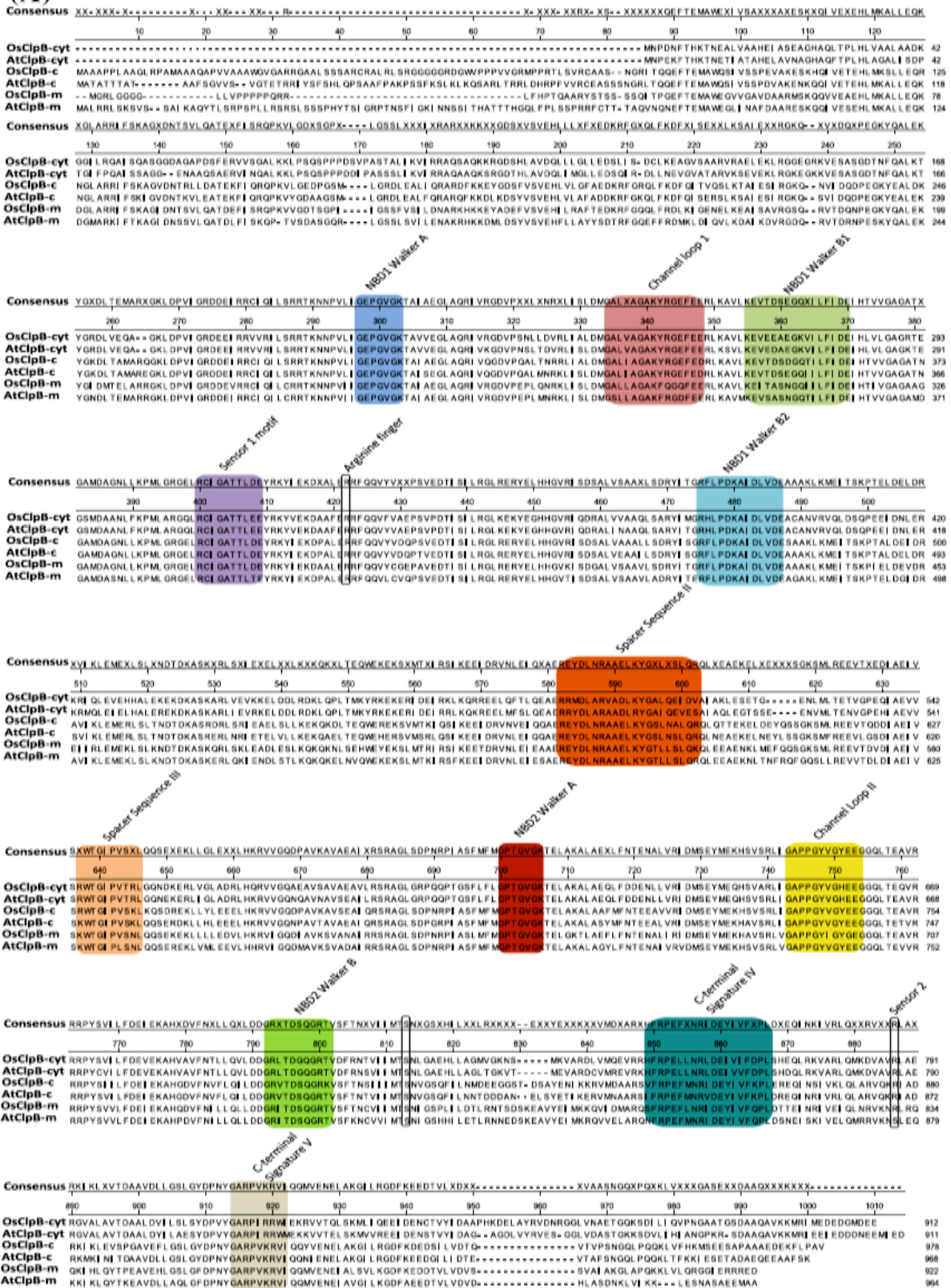


Figura 3. Esquema general que muestra la distribución de los principales dominios (diferentes colores) de arroz y *Arabidopsis* de la clase 1. Las ClpB/HSP100 cloroplásticas y mitocondriales contienen péptidos de tránsito en su N-terminal y la longitud de cada una de ellas es la siguiente: OsClpB-c, 1-76; OsClpB-m, 1-87; AtClpB-c (At5g15450), 1-90; AtClpB-m (At2g25140), 1-90. cyt, citosólica; m, mitocondrial, c, cloroplástica (tomado de Singh, 2010).

En plantas de maíz no estresadas, la proteína HSP101 se expresa en altos niveles en espigas, en el período pre-meiótico, en la mazorca, incluyendo los pistilos y embriones (Nieto-Sotelo y col., 1992; Young y col., 2001). Los niveles de HSP100 se incrementan en granos de polen durante el período de maduración del jitomate (Pressman y col., 2007). El análisis por el programa Genevestigator muestra que en arroz, la OsClpB/HSP100-citosólica se expresa principalmente en las semillas, los embriones y el endospermo, mientras que la OsClpB/HSP100-cloroplástica se expresa principalmente en tejidos vegetativos de la planta (Singh y col., 2010). La ClpB/HSP100-citosólica de *Arabidopsis* es inducida en respuesta a la infección de TMV (Carr y col., 2006); probablemente el virus la use para traducir su mensajero viral como fue demostrado para HSP101 de tabaco (Wells, y col., 1999, Ling y col., 2000). Los estudios de complementación demostraron que la ClpB/HSP100 de *Arabidopsis*, la de arroz y la de soya son funcionalmente análogos a la HSP104 de levadura (Lee y col., 1994; Schirmer y col., 1994, Agarwal y col., 2003). Estudios por micrografía electrónica mostraron que la HSP100 de arroz resolubiliza las proteínas agregadas y acumuladas después de someter a estrés por calor las células de levadura (Chernoff y col., 1995). La mutante *hot1-1* de *Arabidopsis* (en donde el residuo de Glu conservado en el segundo dominio de unión del ATP de la ClpB/HSP100-citosólica se cambia por un residuo de Lys, lo que compromete su actividad ATPasa) presentó inhibición completa de la elongación del hipocotilo durante el estrés térmico, así como en la adquisición de la termotolerancia (Hong y Vierling, 2000). La mutante *hot1-2* de *Arabidopsis* (que contiene una inserción en la región promotora) expresa 10 veces menos la proteína, comparada con la silvestre, resultando en la disminución de la termotolerancia en semillas en germinación (Hong y Vierling, 2000). La mutante *hot1-3* de *Arabidopsis* (que lleva un inserción de T-DNA en el segundo exón, que previene la expresión de la proteína) también muestra una inhibición de la elongación de hipocotilo después de 120 min a 45 °C. (Hong y Vierling, 2001). En plántulas de maíz se ha visto que la delección del gen *Hsp101* provoca un aumento en la tasa de crecimiento de la raíz primaria (Nieto-Sotelo *et al.*, 2002) y del tallo en plantas adultas crecidas en ambientes moderadamente cálidos (T máx. diaria de 40°C). Se vio que el choque de calor induce la emergencia de raíces adventicias en el nodo coleoptilar de las plántulas de maíz y que HSP101 juega un papel negativo en esta respuesta, ya que en plántulas mutantes *hsp101-m5::Mu1* la producción de este tipo de raíces es más abundante y no requiere de calor (López-Frías, 2006 y López-Frías *et al.* 2011). Así mismo, mutantes de la ClpB/HSP100-cloroplástica crecen lentamente en luz (y eventualmente mueren) comparadas con las plantas silvestres, sugiriendo que este tipo de proteínas juegan un papel importante en el desarrollo del cloroplasto, en contraste con las ClpB/HSP100-citosólicas que son requeridas durante la vida de la planta (Lee y col., 2007). Además, hay evidencia en la interacción genética entre la ClpB/HSP100-cloroplástica y la ClpR2, otra chaperona (Zybailov y col., 2009). Utilizando a la mutante ClpR2 de plantas de *Arabidopsis*, se ha observado que los niveles de la ClpB/HSP100-cloroplástica fueron

significativamente superiores comparados con los de la planta silvestre, sugiriendo un rol de esta proteína en la desagregación de proteínas. Se ha obtenido una mutante APG6, que interrumpe el gen ClpB/HSP100-cloroplástica. Las plantas APG6 muestran plástidos más pequeños comparados con los de las plantas silvestres. La sobre-expresión de *apg6* inhibe el desarrollo del cloroplasto, resultando en una planta con un fenotipo verde pálido (Myouga y col., 2006). Por otro lado, se ha reportado que las proteínas ClpC, localizadas en el cloroplasto, juegan un papel importante en la importación de proteínas (Constan y col., 2004). Sin embargo, el papel de las ClpB/HSP100 de cloroplasto y mitocondria no ha sido investigado a fondo. Se propone que estas proteínas, probablemente además de conferir termotolerancia a los respectivos compartimientos, podrían también estar involucradas en el tráfico de proteínas.

## 11.2. La familia de la HSP90: Clases, estructura y función

En esta familia se incluyen proteínas con un peso molecular comprendido entre 82 y 96 kD. Las proteínas de la familia HSP90, presentes en células eucariotas y procariotas, son proteínas muy conservadas evolutivamente y esenciales para la viabilidad de las células eucariotas (Picard *et al.*, 2002; Krishna *et al.*, 2001). El ortólogo procariota, HtpG, presenta una gran homología con la proteínas eucariotas, sin embargo no es indispensable para la viabilidad celular. En células animales, la HSP90 citosólica tiene dos isoformas la HSP 90 $\alpha$  y la HSP90 $\beta$ , en el retículo endoplásmico se encuentra la proteína grp 94 (glucose-regulated protein) y en las mitocondrias, la proteína TRAP 1 (Felts *et al.*, 2000). De igual manera, se han aislado genes de la HSP90 en varias especies de plantas superiores. Se ha aislado las HSP90 de *Arabidopsis thaliana* (Conner *et al.*, 1990; Takahashi *et al.*, 1992; Yabe *et al.*, 1994; Krishna *et al.*, 2001), de *Pharbitis nil* (Felshein y Das, 1992), de *Licopersicum esculentum* (Koning *et al.*, 1992), de *Zea mays* (Marrs *et al.*, 1993) y de *Brassica napus* (Krishna *et al.*, 1995). La HSP90 en las plantas se localizan en el citosol, retículo endoplásmico, plastos y mitocondrias (Krishna *et al.*, 2001). La expresión de la HSP90 de las plantas está regulada por el desarrollo (Koning *et al.*, 1992; Marrs *et al.*, 1993; Krishna *et al.*, 1995) y además es sensible al estrés por frío (Krishna *et al.*, 1995) y a los cambios luz/oscuridad (Katschinski, 2004).

La estructura de la HSP90 consiste de cuatro dominios estructurales: de un amino terminal de aproximadamente 25 kDa, de una región cargada (rica en ácido glutámico) que conecta el dominio medio, de un dominio medio de aproximadamente 50 kDa y de un carboxilo terminal de proximadamente 12 kDa (Pearl *et al.*, 2000; Katschinski, 2004; Krishna *et al.*, 2001).

Se han identificado dos sitios de unión a ATP, uno en el extremo amino y otro en el extremo carboxilo. La HSP90 de eucariotas se encuentran predominantemente en forma dimérica. En ausencia de ATP, los dos monómeros se unen por el dominio de dimerización localizado en el extremo carboxilo,

manteniendo separados los dos dominios amino terminal. La unión de ATP y las elevadas temperaturas hacen que la HSP90 pase a una forma en la que los dos dominios amino se asocian (Pearl *et al.*, 2000). Este cambio conformacional parece ser que permite la unión del sustrato (Katschinski, 2004). En el extremo carboxilo terminal, casi todas las HSP90 de eucariotas tienen el pentapéptido MEEVD que es esencial para la unión de la HSP90 a los dominios TPR (repeticiones de tetratricopéptidos) de sus proteínas cochaperonas (Picard, 2002).

La mayoría de los sustratos de la HSP90 son proteínas de transducción de señales de membrana, receptores de hormonas esteroideas y proteína kinasas. La unión de la HSP90 a estas proteínas es clave en los procesos celulares, en las rutas de transducción de señales de membrana, en el control del ciclo celular, en la degradación de proteínas y en el silenciamiento de genes (Young *et al.*, 2001, Zhang *et al.*, 2003). Además, desempeñan un papel muy importante en la evolución morfológica y en la adaptación al estrés en *Drosophila* (Rutherford *et al.*, 1998) y *Arabidopsis* (Queitsch *et al.*, 2002). En la última década se han identificado dos características claves del mecanismo de acción de la HSP90: a) la HSP90 tienen actividad de chaperona dependiente de ATP, b) la HSP90 por si misma es incapaz de promover el plegamiento y/o activación de ninguna de sus proteínas sustrato y para su actividad requiere formar parte de un heterocomplejo de chaperonas citoplasmáticas (CCH) que facilita el plegamiento de las proteínas sustrato a su conformación estable o activa (Zhang *et al.*, 2003). Los principales componentes de este complejo son la HSP90, la HSP70 y las cochaperonas como la Hop (HSP70 y HSP90-*organizing protein*), la p23, la HSP40, y la Hip (HSP70-*interacting protein*). Las inmunofilinas de alto peso molecular también forman parte del complejo pero no son esenciales para la unión y el plegamiento de proteínas sustrato (Krishna *et al.*, 2001). La chaperona p50 sólo se ha detectado en complejos de la HSP90 con proteína kinasas.

En las plantas todavía no se han identificado las proteínas sustrato de las HSP90, pero se ha demostrado la existencia de un complejo CCH similar al de mamíferos, que es capaz de activar al receptor de glucocorticoides de mamíferos *in vitro* (Stancato *et al.*, 1996). Dentro de este complejo se han identificado la HSP90, la HSP70, las inmunofilinas de alto peso molecular y la Hop (Owens-Grillo *et al.*, 1996; Stancato *et al.*, 1996; Reddy *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2003).

La disponibilidad del genoma completo de *Arabidopsis thaliana* ha permitido detectar genes que codifican proteínas homólogas a todos los componentes del complejo de la HSP90 de mamífero (Krishna *et al.*, 2001). La identificación de éste complejo en las plantas sugiere que la HSP90 está involucrada en las vías de transducción de señales, y entre sus sustratos potenciales se encuentran varias cinasas y el receptor de brasinoesteroides. De esta forma, la HSP90 podría intervenir en el control del crecimiento y desarrollo de la planta (Krishna *et al.*, 2001).

### 11.3. Los miembros de la familia de la HSP70: Clases, estructura y función

Las HSP70 constituyen un grupo de chaperonas moleculares con un peso molecular comprendido entre 68 y 110 kDa (Vierling, 1991; Miernyk, 1997). Están constituidas de un dominio con actividad ATPasa de aproximadamente 45 kDa en la región N-terminal y de un dominio en la región del C-terminal de aproximadamente 25 kDa. Ambos dominios están evolutivamente muy conservados. Los distintos tipos de HSP70 se diferencian en la secuencia de los extremos N- y C-terminales, donde reside la información para la localización subcelular (Hartl, 1996; Miernyk, 1997). Al igual que en otros eucariotas, en las plantas se han identificado proteínas HSP70 en todos los compartimentos subcelulares (Miernyk, 1997; Lin y col., 2001). El genoma de *Arabidopsis* contiene 18 genes que codifican para proteínas de la familia HSP70, de los cuales 14 pertenecen a la subfamilia DnaK y 4 a la subfamilia HSP110/SSE (Lin y col., 2001; Sung y col., 2001). En el genoma de la espinaca se han encontrado al menos 12 miembros de la familia HSP70 (Guy y col., 1998). La mayoría de estos genes se expresan durante el crecimiento normal (Lin y col., 2001) y algunos se expresan en respuesta a condiciones ambientales de estrés como calor, frío y sequía, así como en algunas fases del desarrollo (Guy y col., 1998; Lin y col., 2001; Sung y col., 2001; Cho y col., 2006; Zhang y col., 2006). Además, algunas HSP70s se expresan en respuesta a la infección por virus (Aparicio y col., 2005). La sobreexpresión de HSP70 está relacionada con un aumento de la tolerancia a altas temperaturas (Lee y col., 1996), bajas temperaturas (Zhang y col., 2006), sequía (Cho y col., 2006) y a estrés salino (Sugino *et al.*, 1999).

Las HSP70s tienen funciones esenciales como son la prevención de la agregación proteica así como la asistencia del plegamiento de proteínas no nativas en condiciones normales y de estrés (Hartl, 1996). También están involucradas en procesos de importación y translocación de proteínas y facilitan la degradación de proteínas inestables dirigiéndolas hacia los lisosomas o a los proteasomas (Hartl, 1996; Miernyk, 1997; Bukau y col., 1998; Mayer y col., 2005). Esta versatilidad de funciones de las HSP70s deriva de su capacidad de unirse a los fragmentos hidrofóbicos expuestos de las proteínas no plegadas (Miernyk, 1997; Hartl, 1996). Las HSP70s no participan activamente en el plegamiento de las proteínas sino que las unen, produciéndose la estabilización de estados no plegados y la liberación de éstas permite el plegamiento correcto (Hartl, 1996). La actividad ATPasa intrínseca de las HSP70s requiere, a su vez, la interacción de las co-chaperonas de HSP70. Esta maquinaria chaperona ha sido mejor estudiada en procariotas, donde el componente central es la proteína DnaK, en asociación con DnaJ, que funciona como chaperona mediante la hidrólisis del ATP, mientras que la GrpE regenera el ATP gastado apartir del ADP producido, restableciendo con esto el punto de partida del ciclo chaperona (Mayer y col., 2005). En mamíferos, las principales cochaperonas de las HSP70s son las HSP40s (análogos de la Dna J), las Bag-1 (también denominado Hap de HSP70 associating protein)

que son un factor intercambiador de nucleótidos, las Hip que estabilizan el estado ADP de las HSP70s y las Hop (Miernyk, 1997; Hartl, 1996; Miernyk, 1999; Mayer y col., 2005). Además, se han identificado distintas cochaperonas de las HSP70s de los orgánulos como la Sec63p en el retículo endoplásmico y la Tim44p (*Translocation across the inner membrane*) en la mitocondria (Miernyk, 1997). En plantas se conoce menos detalladamente la maquinaria chaperona de las HSP70s, pero se sabe que presenta características comunes con el complejo bacteriano y con el de mamíferos (Miernyk, 1999). Además de su función como chaperona general, las HSP70s también desempeñan un papel regulador en la expresión de otros genes asociados con el estrés (Lee y col., 1996; Wang y col., 2004). La interacción entre la HSP70 y el factor de choque de calor (HSF; por sus siglas en inglés) previene la trimerización, mientras que la unión del HSF al elemento de respuesta al choque de calor (HSE; por sus siglas en inglés), bloquea la activación transcripcional de los genes de choque térmico (Nieto-Sotelo y col., 1990; Morimoto, 1998; Kim y col., 2002; Katschinski, 2004). Las HSP70s también están implicadas en la modulación de las cinasas A y C, y de algunas fosfatasas (Ding y col., 1998). De esta forma, las proteínas de la familia HSP70 podrían participar en la regulación de la expresión de muchos genes en condiciones normales de crecimiento y durante algunos tipos de estrés (Wang y col., 2004).

#### **11.4. Las proteínas pequeñas de choque de calor (SHSPs) de plantas: Clases, estructura y función**

Las SHSPs son proteínas pequeñas con un peso molecular comprendido entre los 15 y 42 kDa (Sun y col., 2002; Haslbeck y col., 2005) y su abundancia varía significativamente en diferentes especies. Los organismos procariontes suelen tener una o dos SHSPs, sin embargo, algunas especies del género *Rhizobium* tienen 10 SHSPs (Munchbach y col., 1999). Aunque los eucariotes poseen un número mucho mayor de SHSPs, en organismos como *Caenorhabditis elegans* se han encontrado 16, en humanos 10, en *Drosophila melanogaster* 4 y en levaduras sólo hay dos, (Scharf y col., 2001; Haslbeck y col., 2005).

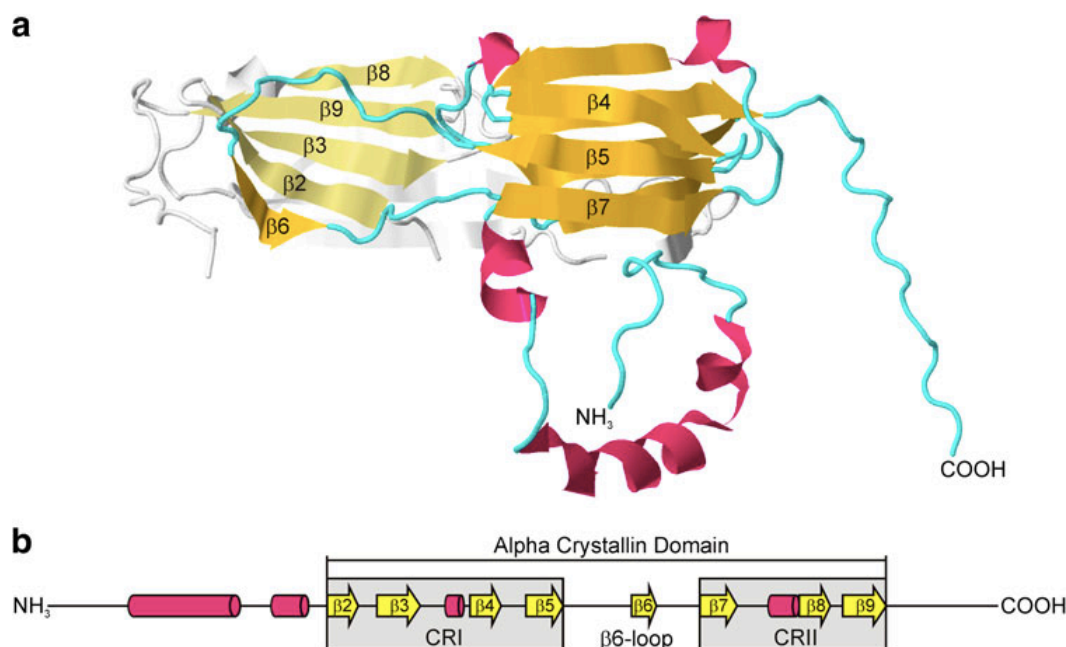
Las plantas se caracterizan por una especial abundancia y diversidad de proteínas SHSPs. La planta *A. thaliana* posee 19 genes que codifican para este tipo de proteínas, lo que refleja su mayor necesidad de adaptarse a cambios en las condiciones ambientales como la temperatura, la intensidad de luz, el grado de salinidad y de humedad (Sun y col., 2002). Las SHSPs son relevantes en la respuesta al estrés. En condición de estrés de calor algunas SHSPs pueden llegar a alcanzar hasta el 1% del total de proteínas en las células de hojas y raíces (DeRocher y col., 1991; Hsieh y col., 1992); las plantas poseen al menos seis familias de genes que codifican a SHSPs (Waters y col., 1996) y son las únicas en las que se han descrito SHSPs localizadas en orgánulos subcelulares (Waters y col., 1996), con la excepción de la SHSP22 mitocondrial de *D. melanogaster* (Morrow y col., 2000).



Las SHSPs de plantas están codificadas por genes nucleares que se agrupan en seis clases según el grado de homología en su secuencia de aminoácidos y su localización subcelular (Sun y col., 2002). Las clases CI, CII y CIII están localizadas en el citosol o en el núcleo (Waters y col., 1996; Scharf y col., 2001; Sun y col., 2002). Las que se distribuyen en el citosol lo hacen de manera uniforme, sin embargo, en condiciones de estrés prolongado, pasan a formar parte de gránulos de choque de calor (HSGs; por sus siglas en inglés; Nover y col., 1989) y pueden ser, inclusive, dirigidas al núcleo, de forma similar a lo que ocurre durante varias etapas del desarrollo (Kadyrzhanova y col., 1998). Las SHSPs de clase CIII se localizan preferentemente en el núcleo (Scharf y col., 2001). Las SHSPs de la clase P están localizadas en los cloroplastos (Vierling, 1991; Sundby y col., 2005). Las SHSPs de clase ER se localizan en el retículo endoplásmico (Helm y col., 1993; Zhao y col., 2007). Las SHSPs de la clase M están localizadas en las mitocondrias (Lenne y col., 1994, 1995; LaFayette y col., 1996). Estudios recientes han descrito SHSPs localizadas en peroxisomas, lo que podría representar una nueva clase de SHSPs (Ma y col., 2006). Con respecto a su estructura, todas las SHSPs de especies vegetales poseen un dominio C-terminal extremadamente conservado, llamado dominio de choque de calor o dominio  $\alpha$ -cristalino (ACD; por sus siglas en inglés) por su similitud con una región de las proteínas  $\alpha$ -cristalinas del ojo de los vertebrados. Este dominio está flanqueado por un dominio N-terminal y una región denominada extensión C-terminal (Waters y col., 1996; Mac Rae, 2000; Sun y col., 2005).

El ACD, de aproximadamente 100 residuos de aminoácidos, se divide en dos subdominios denominados CRI y CRII, separados por una región hidrofílica de longitud variable (asa  $\beta$ 6), que forman un  $\beta$ -sandwich entre dos láminas  $\beta$  (Waters y col., 1996). El ACD está involucrado en la interacción con la proteína sustrato (Java y col., 2009; Fig. 4). El dominio N-terminal es bastante divergente entre las distintas clases de SHSPs y participa en la unión de las proteínas desnaturalizadas. El dominio C-terminal está involucrado tanto en la homodimerización (Giese y Vierling, 2004), como en la formación de gránulos de estrés por calor (Kirschner y col., 2000). Las SHSPs cloroplásticas, mitocondriales y las localizadas en el retículo endoplásmico poseen una secuencia señal típica de exportación al orgánulo correspondiente. Sin embargo, comparando las secuencias de SHSPs de la misma clase entre varias especies de plantas, se pueden identificar regiones consenso dentro del dominio N-terminal que son específicas de cada clase (Chen y Vierling, 1991; Waters, 1995). Estos resultados indican que las distintas clases de SHSPs pueden desempeñar distintas funciones. Las SHSPs de plantas forman generalmente oligómeros que suelen estar compuestos por 12 subunidades y parece ser que nunca forman hetero-oligómeros ni siquiera entre las SHSPs citosólicas de las clases I y II, a pesar de tener la misma localización intracelular (Helm y col., 1997). Las SHSPs forman complejos proteicos bien estructurados de elevado peso molecular, hasta 300 kDa. Durante el período de estrés se produce la disociación de estos complejos hasta dímeros, a los que se unen las proteínas

sustrato. Una vez asociadas las SHSPs con las proteínas desnaturalizadas se vuelven a unir, formando a los HSGs (van Montfort y col., 2001; Scharf y col., 2001; Giese y col., 2002; Fu y col., 2003; 2006). Es posible que el tamaño y las propiedades de los complejos estén, en parte, controlados por el volumen del dominio N-terminal (Salerno y col., 2003).



**Figura 4. Esquema general que muestra la organización típica del ACD.** (A) Estructura tridimensional de un dímero de una SHSP de *Triticum aestivum* obtenido por difracción de rayos X (código PDB: 1GME). (B) Esquema de la estructura primaria de la proteína SHSP que muestra el ACD el cual contiene las regiones conservadas: CRI, CRII y el asa β6 (tomado de Bondino y col., 2011).

Los HSGs, formados en condiciones de estrés, tienen un peso molecular de aproximadamente 1 MDa (Nover, 1991). Todas las SHSPs, incluyendo las que se localizan en los organelos, pueden formar HSGs (Waters y col., 1996). Sin embargo, los HSGs estudiados contienen principalmente SHSPs citosólicas de clases CI y CII, HSP70s y el factor de transcripción HSFA 2 (Nover y col., 1989). Aunque se conoce poco acerca de los HSGs, debido a su insolubilidad, se ha propuesto que su formación puede reflejar un mecanismo para atrapar la gran cantidad de proteínas parcialmente desnaturalizadas, cuando se supera la capacidad de plegamiento por otras chaperonas (Löw y col., 2000).

Las SHSPs de plantas cumplen funciones biológicas muy importantes, ya que son sintetizadas en variadas situaciones de estrés, en etapas del desarrollo, y de la diferenciación celular. Algunas SHSPs se expresan sólo en respuesta al estrés, otras únicamente durante el desarrollo y otras en ambas situaciones (Volkov y col., 2005). Bajo condiciones normales de crecimiento, la mayoría de las SHSPs no se detectan en tejidos vegetales, pero se sintetizan rápidamente en respuesta al calor. Incrementos de temperatura de 10-15 °C sobre la temperatura óptima de crecimiento inducen la respuesta celular al

choque térmico, siendo la acumulación de las SHSPs proporcional al aumento de la temperatura y a la duración del estrés (Waters y col., 1996). Se ha observado que las SHSPs son bastante estables, con una vida media de  $52 \pm 12$  horas después del estrés, lo que sugiere que la función de estas proteínas es crítica durante el periodo de estrés y durante el periodo de recuperación (Chen y col., 1990). El choque térmico no es el único estímulo que desencadena la expresión de los genes de SHSPs, también ocurre por estrés osmótico (Almoguera y col., 1993) y por estrés oxidativo (tratamiento con metilviolágeno y con  $H_2O_2$ ; Banzet y col., 1998; Lee y col., 2000).

En ausencia de estrés ambiental, la síntesis de SHSPs está restringida a ciertos estados de desarrollo como la embriogénesis (Coca y col., 1994; Almoguera y col., 1995; Carranco y col., 1997; Sun y col., 2001), la germinación (Kruse y col., 1993; Wehmeyer y col., 1996; Sun y col., 2001; Puigderrajols y col., 2002), el desarrollo del polen (Bouchard, 1990; Dietrich y col., 1991; Zarsky y col., 1995; Volkov y col., 2005) y la maduración del fruto (Lawrence y col., 1997; Medina-Escobar y col., 1998; Löw y col., 2000; Neta-Sharir y col., 2005). La inducción de las SHSPs durante el desarrollo generalmente implica la síntesis de un solo tipo de SHSPs, lo que apoya la idea de que existen diferencias funcionales entre las distintas clases de SHSPs, e incluso entre proteínas de una misma clase (Waters y col., 1996). Se han encontrado proteínas o mRNAs de SHSPs citosólicas en una gran variedad de semillas (Hernández y Vierling, 1993; Coca y col., 1994; DeRocher y Vierling, 1994; Wehmeyer y col., 1996; Collada y col., 1997; Treglia y col., 1999; Schubert y col., 2002) y en polen de distintas especies (Dietrich y col., 1991; Hopf y col., 1992; Atkinson y col., 1993; Kobayashi y col., 1994; Volkov y col., 2005). La expresión de las SHSPs durante el desarrollo de la semilla es transitoria, las SHSPs comienzan a acumularse en la fase intermedia y son abundantes al final de la maduración y en semillas secas (Wehmeyer y col., 1996; Puigderrajols y col., 2002). Durante la germinación, las SHSPs son abundantes durante los primeros días pero después su concentración disminuye rápidamente (Wehmeyer y Vierling, 2000). La especificidad en la regulación de la expresión de las SHSPs citosólicas en respuesta al estrés y durante el desarrollo también sugiere que pueden tener funciones distintas en cada situación (Waters y col., 1996). El papel de las SHSPs citosólicas inducidas por el desarrollo es aún desconocido. Se ha propuesto que la síntesis de las SHSPs durante la maduración de la semilla puede deberse a que ejerzan funciones importantes en la adquisición de la dormancia y en la protección de los componentes celulares frente a la desecación (Wehmeyer y Vierling, 2000). Además del polen y la semilla, también se han encontrado SHSPs constitutivas en órganos vegetativos, aunque en estos órganos las SHSPs se localizan sólo en los tejidos que contienen gran concentración de proteínas de reserva como bulbos, tubérculos y ramas de árboles y arbustos durante la dormancia (Lubaretz y col., 2002). Ya que las proteínas de reserva se encuentran en vacuolas de almacenamiento, se cree que la presencia de SHSPs puede protegerlas de la proteólisis inespecífica (Lubaretz y col., 2002). El mecanismo por el cual las SHSPs ejercen esta

protección se desconoce. Mediante estudios *in vitro* se demostró que muchas SHSPs citosólicas (Lee y col., 1995, Collada y col., 1997) y mitocondriales (Shono y col., 2002) pueden actuar como chaperonas moleculares. Basándose en los estudios *in vitro* e *in vivo*, se ha propuesto un modelo para explicar el mecanismo de acción de las SHSPs: después de la exposición de las células a elevadas temperaturas, se acumulan en el citoplasma una gran cantidad de proteínas parcialmente desnaturalizadas, entonces, las SHSPs actúan uniéndose a estas proteínas mediante un mecanismo independiente de ATP. Se cree que las SHSPs son un importante reservorio de proteínas desnaturalizadas, ya que presentan una mayor afinidad de unión por los sustratos en comparación con otras chaperonas (Ehrnsperger y col., 1997; Lee y col., 1997; Lee y Vierling, 2000). Las proteínas sustrato unidas a las SHSPs son transferidas a otras chaperonas, como las HSP70s, que las pliegan por un mecanismo dependiente de ATP. No está claro si la transferencia del sustrato a otras chaperonas es un proceso activo (Lee y Vierling, 2000). Un destino adicional de los sustratos unidos a las SHSPs es la proteólisis, ya que el mantenimiento de los sustratos en una conformación no plegada puede facilitar su procesamiento proteolítico (Waters y col., 1996; Lee y col., 1997). Cuando el estrés térmico persiste, la cantidad de proteínas desnaturalizadas llega a estar por encima de la capacidad de plegamiento de las chaperonas y por consecuencia, se forman complejos que son almacenados transitoriamente como HSGs, que se desintegran después, durante el periodo de recuperación (Löw y col., 2000). Con la formación de los HSGs, las SHSPs se colocalizan con las HSP70s, haciendo más eficiente la cooperación entre los dos tipos de chaperonas (Sun y col., 2002). De esta manera, las SHSPs mantienen a las proteínas desnaturalizadas en un estado latente para su renaturalización por otras chaperonas previniéndolas de la inactivación térmica irreversible (Lee y col., 1997; Ehrnsperger y col., 1997; Lee y Vierling, 2000).

### III. ANTECEDENTES

#### III.1. Proteínas de choque térmico como reguladores de síntesis de proteica

Recientemente se ha reportado que las HSPs pueden regular el inicio de la traducción del mRNA, de manera global o específica, durante ciertas condiciones del desarrollo, estímulos y en condiciones de estrés (Michael, y col., 2008). La síntesis de proteínas es uno de los procesos metabólicos más importantes en los seres vivos, ya que permite sintetizar los polipéptidos acorde a la secuencia de codones del mRNA, para producir proteínas que asumen funciones muy variadas, tales como: reserva, reconocimiento de señales, transporte, enzimática, estructural, de movimiento, regulatoria, etc.

La iniciación es el primer paso del reclutamiento del mRNA a los ribosomas e involucra la unión del complejo hetero-multimérico eIF4F al extremo 5' cap del mRNA. Este complejo está formado por el factor eIF4E, un factor que tiene la capacidad de reconocer a la estructura <sup>7</sup>mGpppN en el extremo 5' del mRNA; al factor eIF4A, una helicasa dependiente de ATP que desenrolla estructuras secundarias en el extremo 5'; al factor eIF4G, una proteína de anclaje que se une a varios factores (eIF4E, eIF4A, eIF3) y a la proteína PABP de enlace a la cola de poli(A) (Michael, y col., 2008). Esto permite la circularización del mRNA, facilitando el reciclaje de la maquinaria traduccional y haciendo más eficiente la síntesis proteica. El segundo paso es la unión del complejo de preiniciación 43S, que está compuesto por la subunidad ribosomal pequeña 40S, el factor eIF3 y el complejo ternario constituido por el factor eIF2 acoplado a GTP y met-tRNA<sup>i</sup>. Este complejo de preiniciación reconoce al mRNA a través de la unión del eIF3 a la subunidad eIF4G del complejo eIF4F. Una vez que el complejo de pre-iniciación es colocado en el mRNA éste hace un escaneo en la dirección 5' → 3' a lo largo del mensaje hasta encontrar el codón de inicio (AUG), asistido por el eIF1 y el eIF1A. La iniciación concluye con la unión de la subunidad ribosomal 60S para formar el complejo de iniciación competente 80S, que cataliza la formación del primer enlace peptídico. Este evento es asistido por el factor eIF5B que dispara la hidrólisis de GTP unido al eIF2, una vez que se ha reconocido el codón de inicio (AUG). Hay evidencias sólidas que sugieren que las chaperonas actúan como reguladores de la traducción proteica: la Ssa de *S. cerevisiae*, con una semejanza del 60% comparada con la HSP70, interacciona con la Pab1 (Poly-A binding protein) y con Sis1 (HSP40). La interacción de la Pab1 con la Ssa es mediada por el dominio C-terminal de la Ssa. La Ssa parece ser necesaria para el inicio de la traducción global, ya que líneas celulares sensibles a la temperatura en Ssa, muestran una disminución en el contenido de polisomas y una acumulación de ribosomas 80S. La eliminación de la Ssa reduce la interacción de la Pab1 y el eIF4G, lo que sugiere que esta proteína podría ser necesaria, tanto para asistir a la Pab1 en su plegamiento como para la formación del complejo eIF4F o el ensamblaje de la subunidad ribosomal 80S (Horton y col., 2000). Datos recientes, muestran que la Ssb, otro miembro de

la familia de las HSP70 en levadura, está involucrada en la síntesis proteica en la etapa de la elongación del polipéptido (Nelson y col., 1992; James y col., 1997). La HSP90, otra chaperona conservada evolutivamente, interacciona con los complejos de unión a cap y con la CUP, una proteína represora de la traducción de los mRNAs de *nanos* y de *gurken* en embriones de *D. melanogaster*. La interacción del complejo HSP90-Cup con el eIF4F sugirió que estas dos proteínas podrían mediar la localización y la traducción de los mRNAs específicos durante el desarrollo de la cámara ovárica de *Drosophila* (Pisa y col., 2008). Esta hipótesis se fundamenta en que la HSP90 se requiere para la localización de los mRNAs durante la embriogénesis (Song y col., 2007). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que la HSP90 contribuya al plegamiento de las proteínas involucradas en la localización y la traducción de los mRNAs. La HSP90 también es requerida para la traducción del mRNA del virus de la hepatitis C (HCV), que contiene en su 5'UTR sitios de entrada interna al ribosoma (IRES). Existen resultados que muestran que la HSP90 une al factor eIF3c, a través del IRES del HCV, y lo protege de la degradación vía proteasoma (Ujino y col., 2011). Así mismo, está documentado que la HSP90 une a la ribonucleasa PMR60 y permite la formación del complejo PMR60-Src, que promueve la fosforilación de la ribonucleasa. La PMR60 fosforilada se activa para degradar a los mRNAs celulares (Peng y col., 2008). Otros trabajos han demostrado que la HSP70 y la HSC70 coinmunoprecipitan con la PABP, el eIF4G y el AUF1, un factor de degradación que une a secuencias de poliU (secuencia ARE) presentes en el extremo 3' del mRNA, soportando la hipótesis de que la interacción directa de este complejo podría estar ligado ya sea a la rápida degradación del complejo ARE-mRNA con la maquinaria traduccional o acoplado a la estabilización de estos mRNAs mediada por la HSP70 y la HSC70 (Laroya y col., 1999; Lu y col., 2006). Trabajos más recientes han determinado que la HSC70 y la HSP40 junto con la PABP y el eIF4F estabilizan al complejo ARE-mRNA de BIM (un activador de muerte celular en células progenitoras hematopoyéticas que controla el número de células de la sangre; REF), evitando su degradación, de este modo regula la expresión de BIM, (Matsui y col., 2007). Una de las SHSPs que está involucrada en la regulación de la traducción es la HSP27, que es capaz de enlazar al eIF4G previniendo el ensamblaje del eIF4F en condiciones de choque térmico, en donde el eIF4G se encuentra insoluble en HSGs Cuesta y col., 2000).

Interesantemente, algunos factores traduccionales poseen actividad de chaperonas: el factor de la traducción IF2 de bacteria tiene actividad de chaperona similar al de la HSP70 (Caldas y col., 2000). Adicionalmente, el factor eEF1A asiste a la aminoacil-tRNA sintetasa para que mantenga su conformación durante los ciclos de traducción proteica. Más aún, el factor eEF1A, de maíz y trigo, protege a la rubisco activasa de la agregación en condiciones de estrés térmico. El factor eIF5B de *Pisum sativum* evita la agregación de proteínas lábiles, tales como la citrato sintasa y la NdeI, bajo condiciones de estrés de calor (Suragani y col., 2011). Todos estos datos sugieren que el chaperoneo de componentes de la maquinaria traduccional, asistida por HSPs o por factores traduccionales que

presentan actividad de chaperona, es necesaria para mantener su estabilidad o conformación en los distintos pasos de la traducción proteica.

### III.2. La HSP101 como regulador de la traducción en plantas

En plantas, la HSP101 está altamente conservada (Lee y col., 1994; Schirmer y col., 1994; Wells y col., 1998; Nieto-Sotelo y col., 1999; Keeler y col., 2000; Campbell y col., 2001). Se ha reportado que la ZmHSP101 de maíz se acumula en el eje embrionario y en el escutelo de la semilla y que sus niveles de expresión decrecen en las primeras 48 h después de haber embebido la semilla en agua (Nieto-Sotelo y col., 2002). En este estudio se demostró que la ZmHSP101 no sólo induce termotolerancia a altas temperaturas, sino que también ejerce un efecto en el crecimiento de la raíz primaria en condición basal. Se observó que plantas de mutantes nulas en ZmHSP101 tienen un mayor crecimiento radicular en las primeras horas de la germinación. Tal efecto pudo deberse a la inhibición de la división celular, elongación de la célula o a ambas. Trabajos previos han mostrado que la HSP101 de plantas posee una función dual. La HSP101 de tabaco (NtHSP101) y de *Arabidopsis* (AtHSP101), además de poseer actividad de desagregasa, es capaz de potenciar la traducción del RNA del virus del mosaico del tabaco (TMV) mediante su interacción con la secuencia omega presente en la región 5'-UTR del RNA viral (Wells y col., 1999, Ling y col., 2000). Wells y colaboradores observaron que tanto el factor eIF4G como el eIF3c son indispensables para el incremento traduccional, lo que sugiere que la HSP101 promueve la unión del eIF4G y el eIF3, necesaria para el reclutamiento de la subunidad ribosomal pequeña (40S) al RNA viral. También se ha planteado que su actividad chaperona podría tener un papel en su función traduccional (Wells y col., 1998). De manera similar, la NtHSP101 es capaz de interactuar con un elemento regulatorio (iLRE) presente en el 5'-UTR del mRNA de la ferredoxina de *Arabidopsis* (*fed1*) aumentando su traducción (Ling y col., 2000). En un trabajo previo, se propone que el complejo HSP101- $\Omega$  es funcionalmente análogo a los complejos eIF4E-5'-cap y PABP-poly(A), lo cual permite reclutar al complejo eIF4F a un mRNA e incrementar su traducción (Gallie y col., 2002). Actualmente con todos estos estudios se ha logrado utilizar la tecnología del complejo HSP101- $\Omega$  con fines biotecnológicos, en donde la alta expresión de la HSP101 de arroz (OsHSP101) mediado por la secuencia omega incrementa la capacidad termotolerante, además puede ser utilizado como un marcador de selección en plantas de tabaco. Así mismo la HSP101 puede transactivar *in vivo* a la traducción del reportero  $\Omega$ -luciferasa mediante una crucea recíproca de líneas transgénicas de tabaco, las cuales contienen a la HSP101 y a la  $\Omega$ -luciferasa, brindando la posibilidad de utilizar esta tecnología para producir grandes cantidades de proteínas de interés comercial en plantas (Chang y col., 2007).

En un trabajo reciente, se encontró que la ZmHSP101 co-eluye con principalmente con el complejo eIFiso4F en el estado quiescente (0h) y estado germinado (24h) del eje embrionario de maíz (Lázaro-Mixteco, 2012). Además, se ha demostrado que las proteínas eIFiso4E y eIF4E promueven la traducción selectiva de los mRNAs almacenados en semillas de maíz quiescentes. Se encontró que los mRNAs almacenados dependen del factor eIFiso4E, aunque el factor eIF4E también es capaz de traducir algunos mRNAs en un sistema *in vitro*, indicando que la selectividad de cada isoforma para traducir los mensajeros almacenados. Así mismo, la traducción *in vitro* de los mRNAs de 24 h, por los complejos de unión a cap, obtenidos a 0 y 24 h de germinación, reveló una clara selectividad traduccional (Dinkova, y col., 2011). Lo que sugiere que la HSP101 también podría estar contribuyendo a la diferencia observada.



#### IV. JUSTIFICACIÓN

Por varios años, el estudio de la expresión génica en plantas se ha enfocado principalmente en el análisis en los cambios a nivel transcripcional. Sin embargo, el conocimiento de la regulación traduccional en este tipo de organismos es muy escasa. La regulación traduccional juega un papel central en la respuesta al estrés y a los estados del desarrollo. Se cree que la regulación de la síntesis de proteínas bajo condiciones de estrés abiótico es un proceso conservado, ya que, en general, el ribosoma y los factores de traducción son básicamente parecidos en todos los eucariontes. Sin embargo, esta conservación no está clara en plantas y los conocimientos de su control traduccional son muy poco entendidos en las distintas condiciones ambientales y durante las etapas de vida de una plántula. Además, los reguladores básicos del inicio de la traducción (bien caracterizados en otros sistemas) faltan por ser identificados en plantas. Por otro lado, la composición de los complejos de unión a cap es también relevante, ya que garantiza la presencia de una proteína o grupo de proteínas indispensables en diferentes estados del desarrollo de una plántula. Por lo tanto, el estudio de la activación traduccional de los mRNAs almacenados en el eje embrionario quiescente es de gran importancia para comprender los mecanismos moleculares que rigen el proceso germinativo, que le permiten a la semilla establecerse exitosamente como una planta.

## **V. HIPÓTESIS**

**La** proteína de choque de calor HSP101 es una proteína relevante para la para la regulación de la síntesis de proteínas y su acumulación durante las primeras horas de la germinación del maíz.

## VI. OBJETIVOS

### VI.1. Objetivo general

Determinar la relevancia de la HSP101 para la acumulación y síntesis proteica durante la germinación de maíz.

### VI.2. Objetivos particulares

1. Determinar la presencia de la HSP101 en perfiles traduccionales durante la germinación de maíz.
2. Comparar los complejos de inicio de la traducción de ejes embrionarios de maíz, en plantas con mutación nula para la Hsp101 y plantas silvestres.
3. Analizar el proteoma de ejes quiescentes de maíz a las 0 h en plantas con mutación nula para la Hsp101 y plantas silvestres mediante geles de doble dimensión y espectrometría de masas LC/MS/MS.
4. Comparar la síntesis proteica a las 24 h de germinación de los ejes embrionarios de maíz en plantas con mutación nula para la HSP101 y plantas silvestres, mediante marcaje metabólico con metionina radiactiva ( $^{35}\text{S}$ -Met).

## VII. Estrategia metodológica

- Con el fin de discernir a qué nivel de la traducción (pre-inicio, inicio o traducción activa) la HSP101 actúa, se analizó la migración de la HSP101 en perfiles polisomales, utilizando gradientes de sacarosa y ultracentrifugación. Para la obtención de los perfiles, como primer paso, se concentraron los complejos de pre-inicio, inicio de la traducción, los monosomas y polisomas, en un colchón de sacarosa al 60%. Posteriormente, la pastilla se resolverá en un gradiente de sacarosa de 10 a 35% para separar dichos complejos, como está descrito en Sambrook y col. (1988).
- Para evaluar el papel que la HSP101 pudiera tener en la composición de los complejos de unión a *Cap*, se compararan los perfiles proteicos, obtenidos por cromatografía de afinidad a <sup>7</sup>mGTP-sefarosa, entre ejes embrionarios carentes de HSP101 y silvestres.
- Las semillas carentes de la HSP101 también serán utilizadas para comparar la acumulación de proteínas en ejes quiescentes, mediante el análisis de mapas proteómicos mediante electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) de dos dimensiones.
- Para comparar la síntesis proteica se realizarán ensayos de incorporación de metionina radioactiva [<sup>35</sup>S]-Met en proteínas a las 24 h de germinación del maíz, mediante mapas proteómicos y patrones fluorográficos en geles de SDS-PAGE de una y dos dimensiones.
- Las proteínas diferenciales entre los ejes embrionarios mutantes *hsp101* y las silvestres, tanto de 0 h como de 24 h, serán identificadas por espectrometría de masas LC/MS/MS.

## VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

### VIII. 1. Material biológico y condiciones de crecimiento

Para el análisis proteómico, el ensayo de unión de proteínas a <sup>7</sup>mGTP-sefarosa y la incorporación *in vivo* de metionina-[<sup>35</sup>S], se utilizaron las líneas de maíz carentes de la proteína HSP101, reportadas por Nieto-Sotelo y col. (2002). Estas líneas fueron: la línea mutante L10 (*hsp101-m5::Mu1/hsp101-m5::Mu1*), la línea mutante L4 (*hsp101-m2::Mu1/hsp101-m2::Mu1*) y las líneas silvestres L10 (*Hsp101/Hsp101*) y L4 (*Hsp101/Hsp101*). Para los perfiles polisomales se utilizaron semillas de maíz de la raza Chalqueño, de origen mexicano. Las semillas de las líneas, o la raza, fueron germinadas por imbibición en un colchón de algodón humedecido con agua, a 25 °C, durante 24 h en oscuridad. Los embriones de maíz, quiescentes o germinados, fueron extirpados manualmente.

### VIII. 2. Extracción de DNA genómico y genotipificación de las mutantes L4 y L10

Se extrajo DNA genómico de las dos líneas de mutantes, L4 y L10, cuyas semillas contienen la inserción del transposón en el gen de *Hsp101* dentro del cromosoma 6. Las líneas L4 y L10 contienen insertada una copia del *mutator1* en el exón 3 y en el exón 1, respectivamente (Fig. 6A). Se genotipificaron 5 mazorcas de plantas mutantes y 5 mazorcas de plantas silvestres de la línea L10. De la misma manera se genotipificó la línea L4. El DNA genómico se extrajo de 5 ejes embrionarios de cada mazorca y se verificó la presencia del *mutator1* mediante PCR con oligonucleótidos específicos (Fig. 6A). Se pulverizó un gramo de ejes embrionarios en nitrógeno líquido y se resuspendió, con agitación fuerte, en un amortiguador de extracción de tris 10 mM a pH 7.5 con HCl, el cual además contenía NaCl 350 mM, EDTA 50 mM, urea 7 M, 2% de sarcosil (p/v) y 0,1 % de SDS (p/v). A esta mezcla se le añadió un volumen igual de una mezcla de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico (25:24:1). La muestra se centrifugó a 15000 rpm y se recolectó la fase acuosa en la que se precipitaron los ácidos nucleicos con dos volúmenes de alcohol isopropílico y un décimo de volumen de acetato de sodio 3M a pH 5.2. El precipitado se lavó por centrifugación a 15000 rpm con etanol al 70% (v/v), se resuspendió en agua destilada estéril, y se trató con una enzima RNAasa A (Roche) según las especificaciones del fabricante. Finalmente, la concentración del DNA genómico se determinó por espectrofotometría, a 260 nm de densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro Biomate 3S (Thermo Scientific, USA). Los factores de conversión usados son los descritos en Sambrook y Russell (2001).

### **VIII. 3. Amplificación del *Mutator1* mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

En cada mezcla de reacción de amplificación se añadió: iniciadores en sentido y en antisentido a una concentración final de 10  $\mu\text{M}$ , dNTPs (dATP, dTTP, dCTP y dGTP) a una concentración final de 200  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{L}$  de la enzima taq-DNA polimerasa a concentración final de 5 unidades/100  $\mu\text{l}$ , y de 100 a 500 ng de DNA genómico como molde, en un amortiguador de tris 200 mM a pH 8.4 con HCl, que además contenía KCl 500 mM,  $\text{MgCl}_2$  15 mM, 0.5% de glicerol (v/v) y 1% de Tween 20 (v/v), en un volumen total de reacción de 15  $\mu\text{L}$ . Las condiciones de reacción de amplificación fueron las siguientes: 45 s de desnaturalización a 94 °C, seguida de 35 ciclos de 45 s a 94 °C, un min a 62 °C, 2 min a 72 °C y se concluyó con una extensión de 10 min a 72 °C.

### **VIII. 4. Electroforesis de DNA en geles de agarosa**

La separación de los fragmentos de DNA se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) disuelta previamente en un amortiguador de tris-boratos-EDTA (TBE; tris 40 mM a pH 8.5 con NaOH, 11% de ácido bórico (p/v), EDTA 2 mM y 0.1% de bromuro de etidio). La electroforesis de las muestras de DNA se efectuó aplicando un voltaje de 80 V. La visualización del DNA se llevó a cabo mediante la exposición del gel a la luz ultravioleta a 260nm, en un transiluminador Stratagene (Model 4000 transilluminator).

### **VIII. 5. Extracción de proteínas**

Se maceraron 250 mg de ejes embrionarios con nitrógeno líquido y se homogenizaron en un amortiguador de tris 100 mM a pH 8.8 con NaOH, el cual contenía fenol al 50% (p/v), sacarosa 0.9 M, EDTA 10 mM, 0.4% de 2-mercaptoetanol (v/v), y un cóctel de inhibidores de proteasas (Complete<sup>TM</sup>, USA). El homogenizado se incubó durante 30 min en un agitador orbital y se centrifugó a 5,000 rpm durante 30 min para recuperar la fase fenólica. Las proteínas obtenidas en el paso anterior, se precipitaron por incubación de la fase fenólica a -80 °C durante 2 h con acetato de amonio 0.1 M previamente disuelto en 100 mL de metanol absoluto. La pastilla proteica se resuspendió en un amortiguador de proteínas IEF, que contenía CHAPS al 4% (p/v) urea 8 M, tiourea 2 M, 2% de triton X-100 (v/v), ditiotretitol 50 mM, un cóctel de inhibidores de proteasas (Complete<sup>TM</sup>, USA) y 1% de anfólitos (v/v) en un intervalo de pH de 4-7, (IPG, GE Healthcare). Las partículas insolubles se eliminaron por centrifugación a 14,000 rpm durante 20 min a 4 °C. La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Bradford (1976), usando una curva de concentración estándar de albúmina sérica de bovino (BSA).

## **VIII. 6. Purificación de los complejos eIF4F y eIF(iso)4F de los ejes embrionarios de maíz**

Se maceraron 2.5 g de ejes embrionarios en un mortero con nitrógeno líquido y se homogenizaron en 20 mL de amortiguador A [HEPES 20 mM a pH 7.6 con NaOH, KCl 100 mM, EDTA 0.2 mM, 10% de glicerol (v/v), PMSF 100 mM, DTT 0.5 mM y una tableta de inhibidores de proteasas libre de EDTA (Complete™)] por cada 50 mL de solución a utilizar. La extracción se realizó a 4 °C y el extracto proteico se clarificó por centrifugación a 15,000 rpm en un rotor Sorvall tipo 20. El sobrenadante se pasó a través de 7 capas de gasa y se incubó con 0.5 mL de la resina <sup>7</sup>mGTP-Sefarosa (GE Healthcare) durante 1.5 h. Posteriormente, la mezcla se depositó en una microcolumna y la a resina se sometió al siguiente proceso: con el fin de eliminar impurezas proteicas, un lavado con 5 mL (10 veces el volumen de la resina) de amortiguador B [HEPES 20 mM a pH 7.6 con KOH, KCl 100 mM, EDTA 0.2 mM, 10% de glicerol (v/v), PMSF 0.5 mM, DTT 0.5 mM, inhibidores de proteasas]; para eliminar proteínas que se unan a GTP se hizo un lavado con 5 ml (10 veces el volumen de la resina) de amortiguador C (HEPES 20 mM a pH 8.6 con KOH, KCl 100 mM, EDTA 0.2 mM, 10% de glicerol (v/v), PMSF 0.5 mM, DTT 0.5 mM, , GTP 100 μM e inhibidores de proteasas). La elución del eIF4F y del eIF(iso)4F se realizó con 2 mL de amortiguador D (HEPES 20 mM a pH 7.6 con KOH, KCl 100 mM, EDTA 0.2 mM, 10% de glicerol (v/v), PMSF 0.5 mM, DTT 0.5 mM, inhibidores de proteasas y <sup>7</sup>mGTP 200 μM), en 5 fracciones de 400 μL, cada una.

## **VIII. 7. Electroforesis de SDS-PAGE en una dimensión**

Las proteínas eluidas en el paso anterior se resolvieron por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 15%. Los pozos del gel se cargaron con 50 μL de cada fracción y 50 μL del último mililitro de cada lavado, además, un pozo se cargó con 7 μL del extracto total. La electroforesis se llevó a cabo en un equipo de BIORAD (Mini-PROTEAN 3 cell), con un amortiguador de corrida-SDS (Tris 55 mM a un pH de 8.5 con HCl, glicina 431 mM y 1% de SDS) a 90 V.

## **VIII. 8. Transferencia de las proteínas resueltas por SDS-PAGE**

Las proteínas resueltas por SDS-PAGE se transfirieron del gel a una membrana de PVDF (Millipore), usando un amortiguador de transferencia (compuesto por 20% de metanol (v/v) en el amortiguador de corrida) a 100 V, durante 1 h, en un equipo de inmunotransferencia marca BIORRAD( (Mini-PROTEAN 3 cell).

## VIII. 9. Tinción de las proteínas del gel de SDS-PAGE con nitrato de plata

Las proteínas resueltas por SDS-PAGE se fijaron al gel que las contenía por incubación de éste durante 3 horas con una solución acuosa de metanol al 50%, ácido acético al 12% y formaldehído al 0.007%; posteriormente, para lavar el gel de la solución anterior, se realizaron tres incubaciones de éste con etanol al 35%, durante 20 min. El gel se sensibilizó por su incubación con una solución de tiosulfato de sodio al 0.02% durante 2 min y se lavó con agua ( $\times$  3 veces; 5 min). Para tener las proteínas del gel, se incubó a éste con una solución de plata (0.4% de  $\text{AgNO}_3$ , 25 mL de NaOH al 0.36%, 2 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 28-30%) durante 30 min y se lavó con agua (2 a 3 veces; 5 min). Las proteínas se revelaron por incubación del gel con una solución acuosa de citrato de sodio al 0.01% y formaldehído al 0.037%. La reacción de tinción se detuvo por incubación del gel de con una solución que contiene 50% de metanol, 12% de ácido acético y 0.007% de formaldehído.

## VIII.10. Reacción de inmunodetección de las proteínas

La reacción de inmunodetección de las proteínas se llevó a cabo mediante la incubación de la membrana de PVDF, que contenía las proteínas transferidas del gel de SDS-PAGE, durante una hora con una solución de leche descremada en polvo al 5% en una solución de PBS-t ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1 mM, NaCl 68 mM, KCl 1.3 mM y 1% de tween 20), este paso se realiza para bloquear las reacciones inespecíficas de antígeno-anticuerpo. Después de la reacción de bloqueo, se realizó una incubación de 2 h, de la membrana con una solución de anticuerpo policlonal de suero de conejo dirigido contra: i) el complejo eIF(iso)4F de trigo a una dilución 1:5000 (donado por la Dra K. S. Browning, Universidad de Texas, USA); ii) la HSP101 de maíz (Nieto-sotelo y col., 2002) a una dilución 1:1000, donado por el Dr. Jorge Nieto (Instituto de Biotecnología, UNAM, México); iii) la HSP70 universal de *Arabidopsis*, a una dilución 1:5000 (Agrisera AB, Vännäs, Suecia) y iv) el complejo eEF1b- $\beta$  de *Arabidopsis* a una dilución 1:1000 (Agrisera AB, Vännäs, Suecia). Las membranas se incubaron por 1 hora más con un segundo anticuerpo (conjugado con una enzima peroxidasa) dirigido contra el anticuerpo de conejo (anti-anticuerpo), a una dilución 1:5000 (New England Biolabs, USA). Entre las incubaciones de las membranas con el primer y segundo anticuerpos se realizaron 3 lavados de 15 min con solución de PBS-t. La visualización de la inmunodetección se realizó por reacción de la enzima peroxidasa con su sustrato quimioluminiscente (Immobilon HRP, Millipore, USA), mediante exposición a una película radiográfica.



## VIII. 11. Electroforesis de SDS-PAGE bidimensional (2DGE)

La cantidad de proteína y el volumen de amortiguador utilizado, en cada caso, dependió del tamaño de la tira de gradiente de pH inmovilizado (IPG; Immobiline Dry Strip, GE Healthcare). Así, para rehidratar tiras de 24 cm, se llevó 1 mg de proteína total a un volumen final de 450  $\mu$ L con IEF; mientras que para rehidratar tiras de 11 cm, se llevaron 200  $\mu$ g de proteína a un volumen final de 215  $\mu$ L con IEF. Con cada una de estas mezclas se rehidrató la correspondiente tira de IPG, de intervalo de pH lineal de 4-7, durante 90 min a temperatura ambiente en una bandeja de rehidratación (Immobiline DryStrip Reswelling Tray, GE Healthcare). Después de la rehidratación pasiva, las tiras se cubrieron con aceite mineral, la bandeja se transfirió a la unidad de isoelectroenfoque (PROTEAN IEF cell, BioRad) y se rehidrataron entonces, de manera activa, con las siguientes condiciones: i) 12 h a 20 °C y 50 V para las tiras de 24 cm, seguido de tres pasos de focalización: 100 V por 100 Vh, 500 V por 500 Vh, y 8,000 V por 99 kVh y ii) 12 h, a 20 °C, a 50 V para las tiras de 11 cm, seguido de 5 pasos de focalización: 500 V por 30 min (rápida), 1000 V  $\times$  1 h (gradiente), 3000 V  $\times$  1 h (gradiente), 5,000 V  $\times$  2 h (gradiente) y 8,000 V (rápida)  $\times$  3 h, hasta una voltaje acumulado de 30-35 kVh. Tras el proceso de isoelectroenfoque, las tiras de IPG se removieron de la charola, se les eliminó el aceite mineral, y se incubaron con un amortiguador de equilibrio SDS [tris 1.5 M pH 8.8 con HCl, urea 6 M, 30% de glicerol (v/v) y 5% de SDS (p/v)]. El equilibrado se realizó en dos pasos, empleando en cada uno 2 mL de solución de equilibrio por tira; en el primero, a la solución de equilibrio se le añade DTT al 1% (p/v) para mantener el estado reducido de las proteínas desnaturalizadas. Las tiras se incuban en esta solución durante 15 min con agitación constante y a temperatura ambiente. A continuación se elimina el amortiguador, e inmediatamente después se realiza el segundo paso, en el que al amortiguador de equilibrio se le añade 2.5% de iodoacetamida (p/v), para derivatizar los residuos de cisteína y evitar la posible reoxidación de las mismas por puente disulfuro. Después de la segunda incubación y, tras un breve lavado con amortiguador de corrida-SDS, las tiras quedan listas para efectuarles la segunda dimensión de electroforesis. La preparación y las condiciones de corrida de los geles 2DGE se realizó como se describe a continuación: en el caso de las tiras de 24 cm, se utilizó un sistema de electroforesis de doble dimensión (Ettan DALT*twelve*; GE Healthcare), el cual emplea geles de SDS-PAGE de 24  $\times$  20 cm al 12% de poliacrilamida. Para las tiras de 11 cm se utilizó un sistema de electroforesis de doble dimensión (SE600, Hoefer Scientific, Minnesota, USA), el cual emplea geles de SDS-PAGE de 16  $\times$  15 cm al 15% de poliacrilamida. Para elaborar los geles de poliacrilamida se prepararon tres soluciones: i) solución concentrada de acrilamida al 30% (p/v) y bisacrilamida al 0.8% (p/v) en agua bidestilada, ii) amortiguador separador de tris 1.5 M a pH 8.8 con NaOH y SDS al 10% (p/v) en agua bidestilada, y iii). amortiguador concentrador de tris 0.5 M a pH 6.8 con NaOH y SDS al

10% (p/v) en agua bidestilada. El gel separador se prepara mezclando la solución de acrilamida-bisacrilamida con el amortiguador separador en la proporción que sea requerida para la resolución de las proteínas. Su función es separar a las proteínas por peso molecular. El gel concentrador se prepara mezclando la solución de acrilamida-bisacrilamida con el amortiguador concentrador en la proporción que sea requerida. Su función es concentrar rápidamente a las proteínas que vienen de las tiras de IPG para que éstas puedan pasar de manera ordenada al gel de resolución. Es importante señalar que para que la reacción de polimerización de la acrilamida-bisacrilamida en poliacrilamida se lleve a cabo, es necesario adicionar 0.05% de APS como iniciador de la reacción y 0.005% de TEMED como catalizador. Las reacciones de polimerización se llevan a cabo en la cámara del sistema de doble dimensión, donde, para aumentar reproducibilidad, se polimerizan 12 geles a la vez. Una vez preparados los geles, cada tira de IPG previo tratamiento con la muestra de proteínas, se coloca sobre la superficie de un gel de 2DGE, evitando que queden burbujas atrapadas entre la tira y la superficie del gel, o entre el gel y el cristal de la base del sistema. Para fijar los geles y evitar pérdidas de proteínas cuando éstas migran de la tira al gel, se añade una solución de agarosa al 0.5% (p/v) en el amortiguador de corrida-SDS y unas trazas de azul de bromofenol como indicador del frente de corrida. Las tiras de 24 cm se corrieron a 25 °C, aplicando una potencia de 2 W/gel hasta la salida del indicador. Las tiras de 11 cm, se corrieron a un voltaje constante de 150 V por 4 horas a temperatura ambiente. En ambos casos, la electroforesis se llevó a cabo con el amortiguador de corrida-SDS.

#### **VIII. 12. Tinción de las proteínas del gel de SDS-PAGE con azul de Coomassie**

La visualización de las proteínas en el gel de SDS-PAGE se hizo mediante la tinción de éstas con el colorante azul de Coomasie, pero lo cual primero se realizó la fijación de las proteínas al gel por incubación de estos con una solución de metanol al 50 % (v/v) durante al menos 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se retiró la solución de fijación y se incubaron los geles en una solución de tinción [azul de Coomassie G-250 al 0.1%, sulfato de amonio al 8% (p/v), ácido fosfórico al 2% y 20% de metanol] durante, al menos, 16 h a temperatura ambiente. Finalmente, los geles se destiñeron con agua bidestilada, hasta alcanzar el contraste adecuado.

#### **VIII. 13. Digitalización de los geles de SDS-PAGE teñidos con Azul de Coomasie y análisis de las imágenes**

Los geles de 2DGE se digitalizaron en un escáner (ScanMarker 9800XL) con una resolución de 300 dpi en escala de grises de 16 bits (Microtek, Carson, CA, USA) y las imágenes obtenidas se analizaron por triplicado con el programa ImageMaster 2D platinum, versión 6.0 (GE Healthcare, Piscataway,

NJ). El volumen de cada mancha se normalizó como volumen relativo para compensar las diferencias sutiles en cantidad de muestra cargada, tinción y destinción. Para determinar los cambios de expresión de manchas proteicas, entre los ejes embrionarios mutantes y silvestres, se utilizaron los siguientes criterios: i) que cada mancha esté presente en 3 de los geles en las subclases de la mutante y la silvestre, ii) que cada mancha esté presente en los geles de referencia de la silvestre y mutante y iii) que las manchas tengan un valor de  $t$  superior a 2.78.

El valor  $t$  pronostica la probabilidad de que dos promedios pertenezcan a una misma población (en el caso de que las diferencias no sean significativas) o que provengan de distintas poblaciones (en el caso de que las diferencias de promedios sean significativas).

Las imágenes fluorográficas, de la incorporación de metionina-[ $^{35}\text{S}$ ], se obtuvieron por digitalización de las señales radiactivas de los geles, empleando un escáner de fluorescencia (Typhoon 9400 Variable Mode Imager, GE Healthcare), con una resolución de 100  $\mu\text{m}$ .

#### **VIII. 14. Separación de los polirribosomas en gradientes de sacarosa**

Un gramo de ejes embrionarios de 0 h (quiescentes), 12 h y 24 h de germinación se pulverizaron en nitrógeno líquido y se resuspendieron en amortiguador de lisis (Tris 200 mM a pH 8.5 con HCl, acetato de potasio 50 mM, acetato de magnesio 25 mM, EDTA 2 mM y cicloheximida 0.01 mg/mL). El extracto se clarificó por centrifugación a 5,000 rpm durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un colchón de sacarosa (tris 50 mM a pH 8.5 con KOH, acetato de potasio 20 mM, acetato de magnesio 10 mM, sacarosa al 60% y cicloheximida 0.01 mg/mL) y se centrifugó a 40,000 rpm en un rotor 74Ti (Beckman, Coulter Inc., USA) durante 3 h a 4 °C. La pastilla polirribosomal se resuspendió en 1 mL de amortiguador de lisis. Inmediatamente después, la suspensión de polirribosomas se transfirió a un gradiente de sacarosa del 10 a 35% (tris 50 mM a pH 8.5 con KOH, acetato de potasio 20 mM, acetato de magnesio 10 mM y cicloheximida 0.01 mg/mL). Los polirribosomas se resolvieron por centrifugación en un rotor SW40 (Beckman) a 37,000 rpm durante 2.5 h a 4°C. El registro y el fraccionamiento de los gradientes se obtuvo usando el fraccionador Auto Densi-flow system (Labconco, San Luis, Missouri; USA) conectado al detector Econo UV Monitor EM-1(BioRad) a una longitud de onda de 260 nm. Se recolectaron 17 fracciones de 0.7 mL. La integridad del RNA ribosomal se analizó en geles de agarosa con muestras de 15  $\mu\text{L}$  de cada fracción. Las proteínas en cada fracción se precipitaron con ácido tricloroacético a una concentración final de 12%, se centrifugó a 15 000 rpms y la pastilla proteica se resuspendió en 100  $\mu\text{L}$  en  $\text{H}_2\text{O}$ , se tomaron 25  $\mu\text{L}$  de cada fracción se resolvió en mini-geles SDS-PAGE.

### **VIII. 15. Marcaje metabólico radiactivo *in vivo* con metionina-[<sup>35</sup>S]**

Para la incorporación de metionina-[<sup>35</sup>S] a las proteínas, se germinaron semillas de maíz durante 21 h, se extirparon 500 mg de ejes embrionarios y se incubaron en 5 mL de medio Murashige-Skoog (MS) el cual contenía 150 µCi de metionina-[<sup>35</sup>S] (Perkin Elmer, Boston, USA), con una breve infiltración mediante vacío, durante 3 h con agitación constante. Después de la incubación, los embriones se lavaron con medio MS libre de marca radiactiva. Se tomaron 5 µL del extracto clarificado para determinar la cantidad de radioactividad incorporada en los ejes. La cantidad de metionina-[<sup>35</sup>S] incorporada fue determinada como se reporta en Dinkova y col. (2000). El análisis comparativo de la síntesis *in vivo*, entre los ejes embrionarios mutantes y silvestres, se realizó cuantitativamente (cargando una concentración constante de proteínas, 10 µg) y cualitativamente (cargando la misma cantidad de marca radiactiva, 5000 cpms). Para resolver mejor las diferencias entre ambos genotipos, se realizaron geles de 2DGE de 11 cm.

### **VIII. 16. Espectrometría de masas por LC/MS/MS**

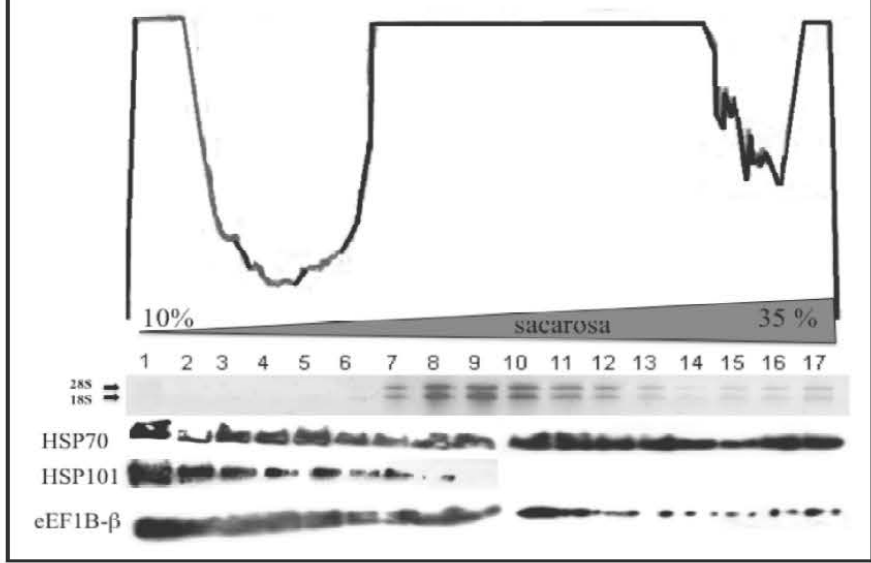
Las manchas de proteínas correspondientes en los geles, previamente teñidos con azul de Coomassie, se escindieron y se sometieron a desteñido con una solución decolorante y a una digestión proteolítica con una solución de tripsina (Sigma) que se dejó incubando durante toda la noche a 37 °C. Al día siguiente, se liofilizó durante 4 h a 30 °C. Inmediatamente después el liofilizado se resuspendió en 50 µL de ácido fórmico y se centrifugó a 1,000 rpm durante 10 minutos. Luego se cargaron 10 µL de la muestra en un equipo de espectrometría de masas (LTQ Proteome X linear ion trap LC-MS/MS instrument, Thermo Fisher, San Jose, CA). El procedimiento de la corrida de las muestras en el espectrómetro y la obtención de los espectros de los péptidos, se realizó similarmente al reportado por Stevenson y col. (2009) y González-Zamorano y col. (2009). Para la identificación de las proteínas por comparación, los fragmentos obtenidos de cada proteína se introdujeron a los siguientes servidores: Bioworks y SEQUEST, De novo sequencing y MS-BLAST, y la base de datos MASCOT (<http://www.matrixscience.com>).

## IX. RESULTADOS

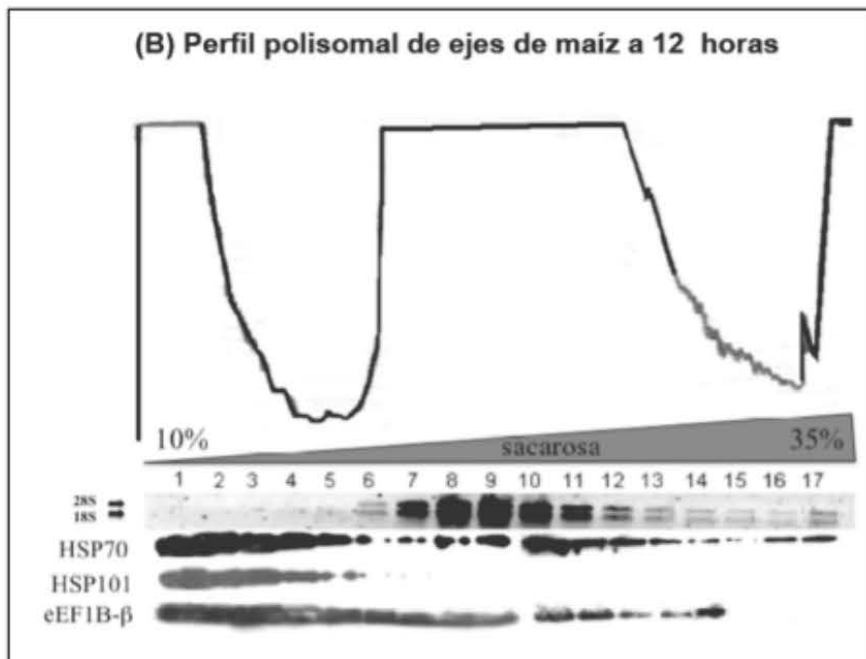
### IX. 1. Migración de la HSP101 en perfiles polisomales durante la germinación del maíz

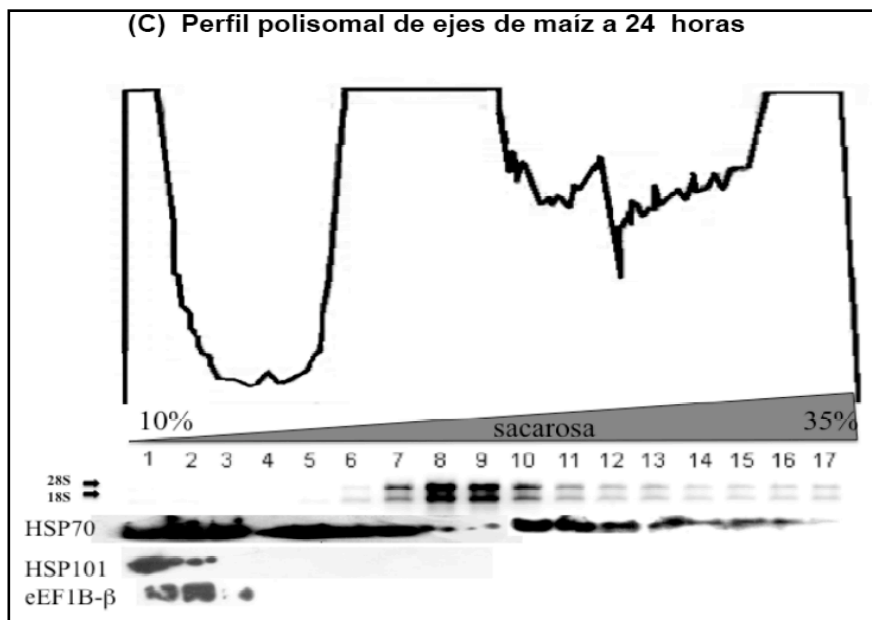
Con el fin de saber si HSP101 co-migraba con los complejos traduccionales-ribosomales, y el nivel de la traducción (pre-inicio, inicio o traducción activa) a la que podría actuar durante la germinación, se analizó la migración de HSP101 en perfiles polisomales, utilizando gradientes de sacarosa y ultracentrifugación. En este análisis se encontró que a las 0 h (ejes quiescentes), la HSP101 se localiza tanto en fracciones no traduccionales (fracciones 1-5, Fig. 4A) como en monosomas (fracciones 6-8, Fig. 4A). A las 12 h de germinación, la HSP101 se desplaza a fracciones más ligeras donde se localizan los complejos de pre-inicio e inicio de la traducción (fracciones 1-5, Fig. 4B). A las 24 horas de germinación, donde se observa un enriquecimiento de las fracciones polisomales acorde a la absorbancia a 260 nm (fracciones 10-17) y por ende una mayor actividad traduccional, la HSP101 se encuentra completamente desplazada hacia las fracciones no traduccionales (fracciones 1-2, Fig. 4C). A diferencia de la HSP101, la proteína HSP70 se detectó a lo largo de todo el gradiente polisomal de manera constante durante la germinación del maíz. Se ha reportado que la HSP70 se une al polipéptido naciente para ayudar al plegamiento correcto de las proteínas sintetizadas de *novo*. Su presencia a lo largo del perfil polisomal correlaciona con su función. Sin embargo, no se puede descartar que esta proteína, que contiene el motivo de unión al eIF4E, pueda participar en la regulación de la traducción junto con la HSP101. Como control de estos experimentos se utilizó al factor eEF1B $\beta$  (31 kDa), que tiene actividad de intercambiador de nucleótido y junto a eEF1B $\alpha$  (25 kDa) y eEF1B $\gamma$  (51 kDa) forman el factor de elongación eEF1B. El factor eEF1B une a eEF1A para formar el complejo llamado eEF1H (Mansilla, F. 2002), que permite la fosforilación y activación de eEF1A para unir a los aminoacil tRNA y llevarlos al ribosoma 80S. Este factor en ejes embrionarios de 0 h se localiza en todas las fracciones del perfil polisomal y durante la germinación se desplaza a fracciones ligeras y aparece como dos bandas, lo cual indica que se encuentra fosforilado (activo) para regenerar eEF1A-GTP durante la elongación (Fig. 4. A, B y C). Por consiguiente, la interacción de HSP101 con la maquinaria de la traducción (eIFs) y su presencia en las primeras fracciones de un perfil polisomal, sugiere que HSP101 podría regular el inicio de la traducción.

(A) Perfil polisomal de ejes de maíz a 0 horas



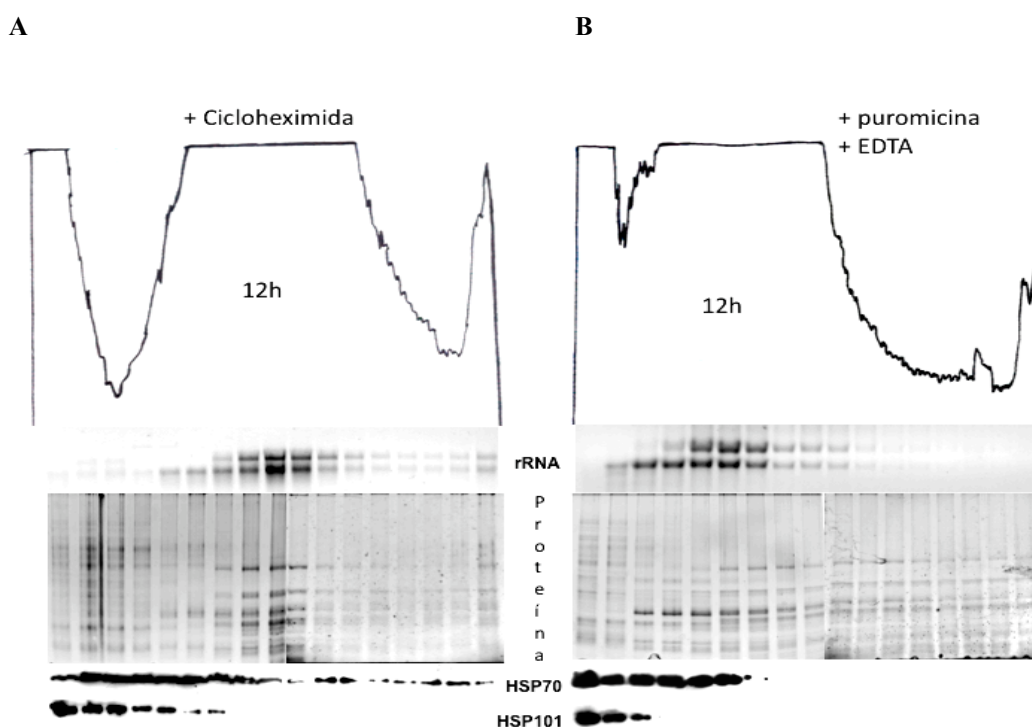
(B) Perfil polisomal de ejes de maíz a 12 horas





**Figura 4. Identificación de la HSP101 en perfiles polisomales durante la germinación del maíz mediante *immunoblot*.** Los polisomas se obtuvieron de ejes embrionarios de 0 h (A), 12 h (B) y 24 h (C) de germinación. Los gradientes de sacarosa se colectaron en 17 fracciones, midiendo el RNA ribosomal a 260 nm. La integridad del RNA 28S y 18S se determinó por electroforesis en un gel de agarosa.

Para confirmar si la HSP101 forma parte de los complejos de inicio de la traducción, los polirribosomas, extraídos de los ejes de maíz a las 12 h de germinación, fueron tratados con puromicina y EDTA para disociar al ribosoma 80S del mRNA, o con cicloheximida para estabilizar a los complejos. Los resultados muestran que la HSP101 se desplaza hacia las fracciones más ligeras en presencia de puromicina y EDTA, similar a la HSP70 y el RNA ribosomal, indicando que la HSP101 forma parte de la maquinaria traduccional e involucra al ribosoma 80S, en lugar de sólo formar agregados proteicos independientes de los ribosomas (Fig. 5). Este resultado no excluye la posibilidad de que la HSP101 y la HSP70 actúen como chaperonas sobre la maquinaria traduccional en las primeras etapas de germinación.



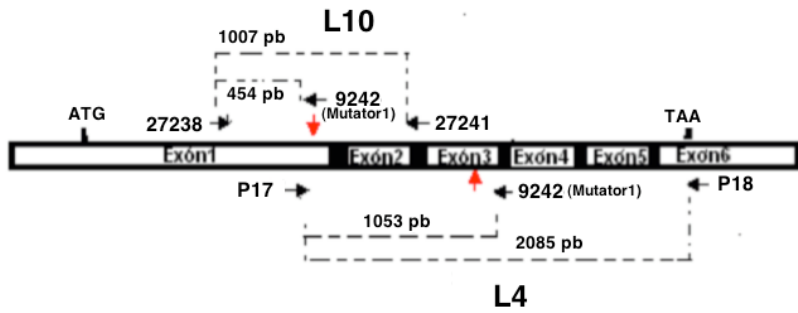
**Figura 5. Efecto de la puromicina en la co-migración de la HSP101 con fracciones traduccionales.** El fraccionamiento polisomal en gradientes de sacarosa del 10% al 35% se realizó en presencia de (A) cicloheximida o (B) con un tratamiento previo con puromicina y EDTA para disociar al ribosoma 80S. Todos los gradientes se colectaron en 17 fracciones y los perfiles se obtuvieron por espectrofotometría a 260 nm. La distribución del RNA ribosomal (rRNA) se determinó mediante geles de agarosa, teñidos con bromuro de etidio. Las proteínas precipitadas con TCA resolvieron mediante SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de PVDF y se inmunodetectaron con anticuerpos contra la HSP101 de maíz y la HSP70 universal.

## IX.2. Comparación de los complejos de unión al cap (<sup>7</sup>mGTP-Sefarosa) de ejes embrionarios mutantes y silvestres a las 24 horas de germinación

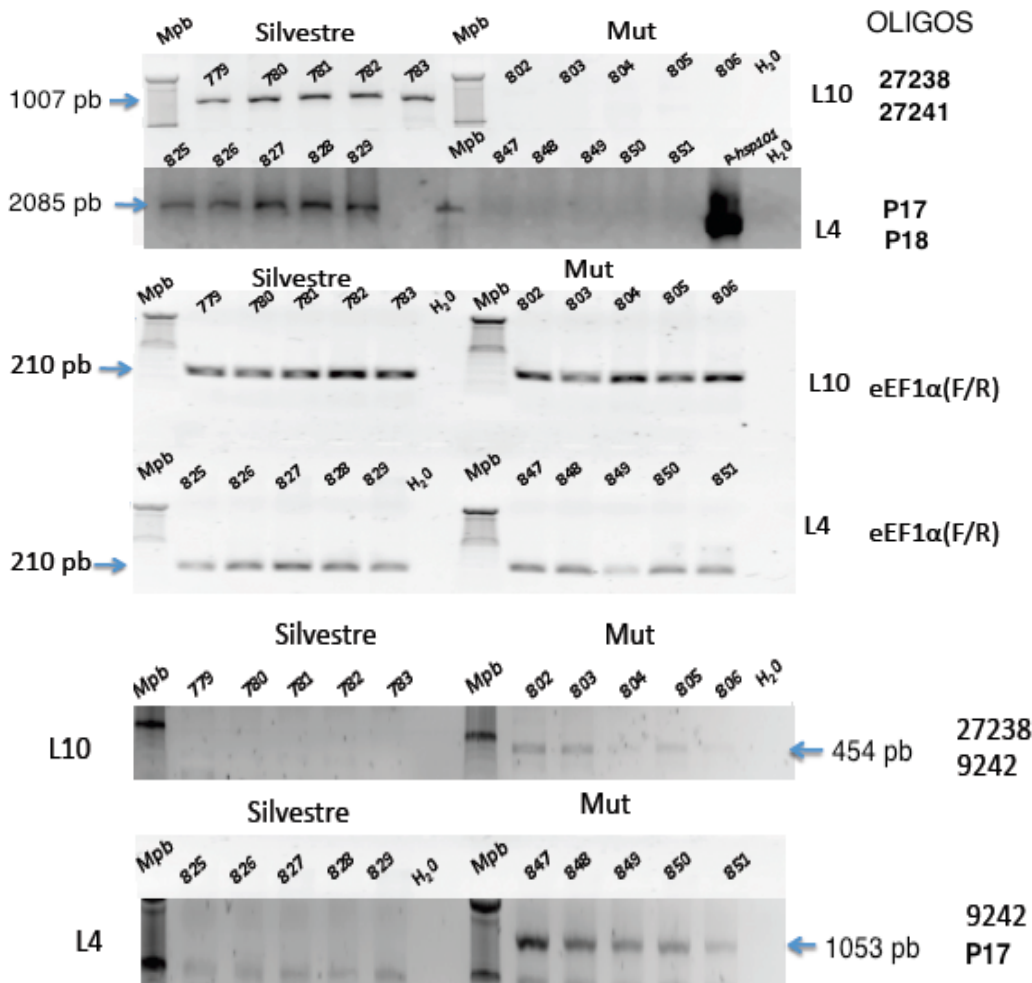
Como la HSP101 co-eluye con los complejos eIF4F y eIFiso4F, se hipotetizó que su ausencia podría causar un reajuste en la composición de los complejos de unión al cap. Para contestar a esta pregunta, se utilizaron las líneas carentes de la HSP101: L10 y L4. La mutación en *hsp101-m5::Mu1/hsp101-m5::Mu1* se verificó por PCR, mediante oligos específicos diseñados para DNA (Fig. 6A y 6B), y por inmunodetección de la HSP101, respectivamente (Fig. 7). Por otra parte, también se evaluaron los niveles de la HSP70 y los factores eIFiso4E y eIFiso4G en las semillas mutantes, mediante inmunodetección de extractos de proteína total (Fig. 7).



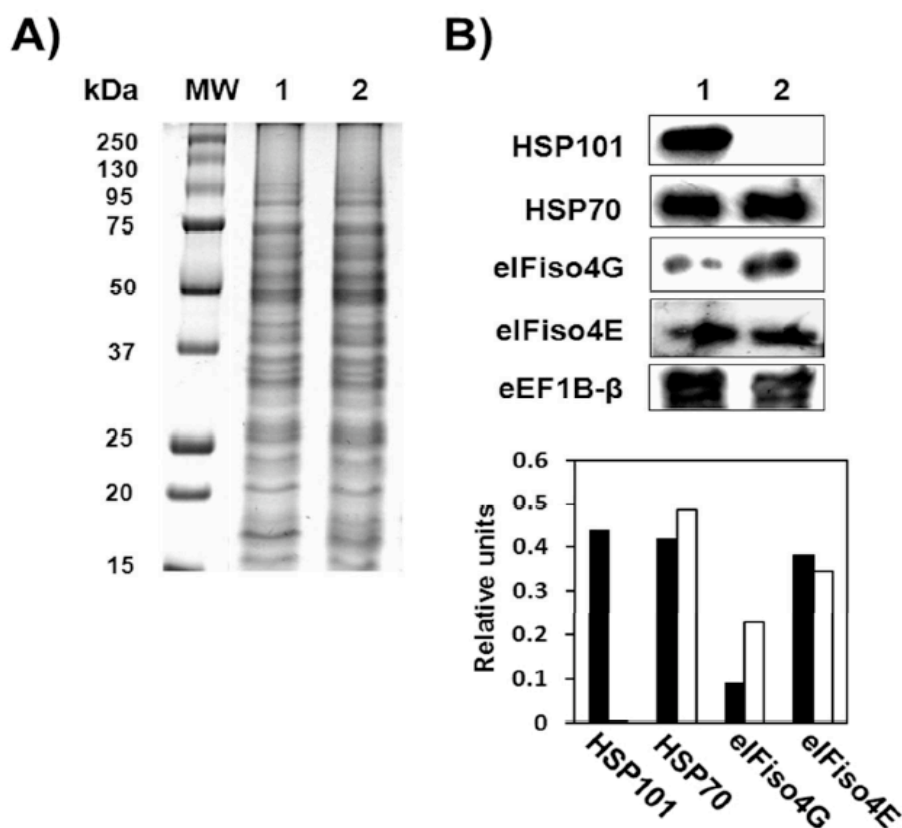
A



B

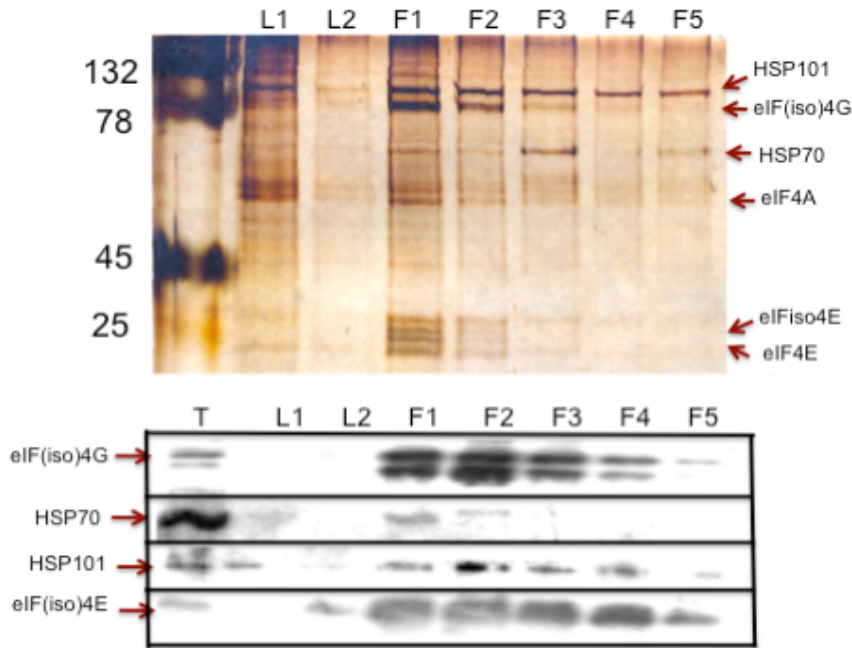


**Figura 6. Verificación de la mutación en *Hsp101* en las líneas L4 y L10 por PCR genómico.** (A) Mapa del gen de *Hsp101* y las mutaciones por inserción de *Mutator1*. La inserción de *Mutator1* se localiza en el exón 1 para la línea L10 y en el exón 3 para la línea L4, ambas representadas con flecha roja. Las líneas punteadas representan los tamaños de los fragmentos (en pares de bases) que se amplificaron mediante PCR. Las flechas negras representan el número, el sentido y el alineamiento de los oligonucleótidos que se utilizaron para la genotipificación de las mutantes. (B) Se genotipificaron 5 mazorcas de plantas silvestres (779-783) y 5 de plantas mutantes (802-806) de la línea L10; así como 5 mazorcas de plantas silvestres (825-829) y 5 de plantas mutantes (847-854) de la línea L4. Como control positivo se usó el plásmido pKS clonado con el gen de *Hsp101* sin intrones (p*Hsp101*) y como control negativo se usó agua.



**Figura 7. Inmunodetección de las proteínas específicas en ejes embrionarios silvestres (1) y en ejes embrionarios mutantes (2) de la línea L10.** (A) Tinción de las proteínas con azul de Coomassie. Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE en geles al 12% y se transfirieron a una membrana de PVDF para su inmunodetección con inmuglobulinas policlonales contra la HSP101 de maíz, la HSP70 universal, el eIFiso4E y el eIFiso4G de trigo, así como el eEF1b-β de *A. thaliana*, como control.. (B) Parte superior, inmunodetección; parte inferior, densitometría de las inmunodetecciones utilizando unidades relativas del control de carga, eEF1B-β. Silvestre, barras oscuras; mutante, barras claras.

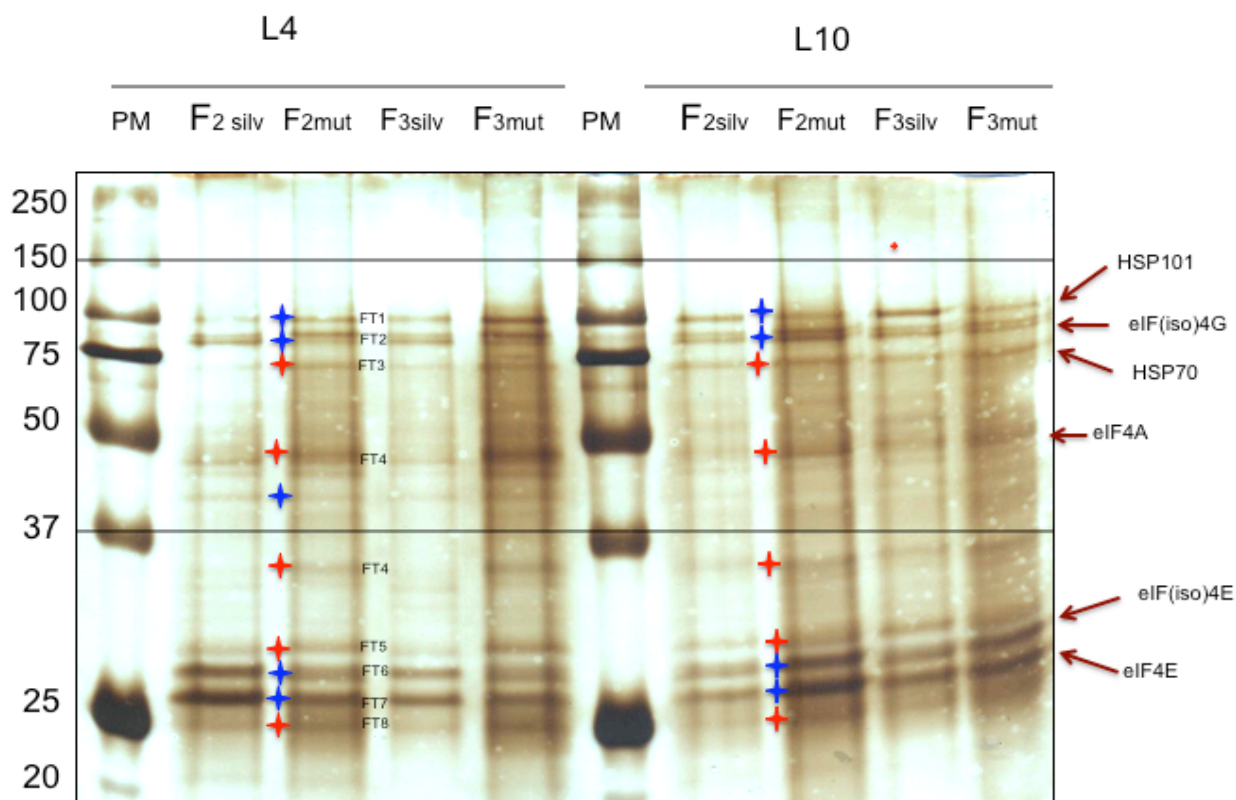
Previo a la comparación de los complejos de unión a cap entre las líneas mutantes y las silvestres, se verificó si HSP101 co-eluía en las líneas L4 y L10 de forma similar a la variedad chalqueño como se describió previamente en (Lázaro-Mixteco y Dinkova, 2012). El perfil proteico de los complejos de unión a cap en la línea L10 fué similar a los descritos previamente (Fig. 8). Resultados similares se obtuvieron para la línea L4.



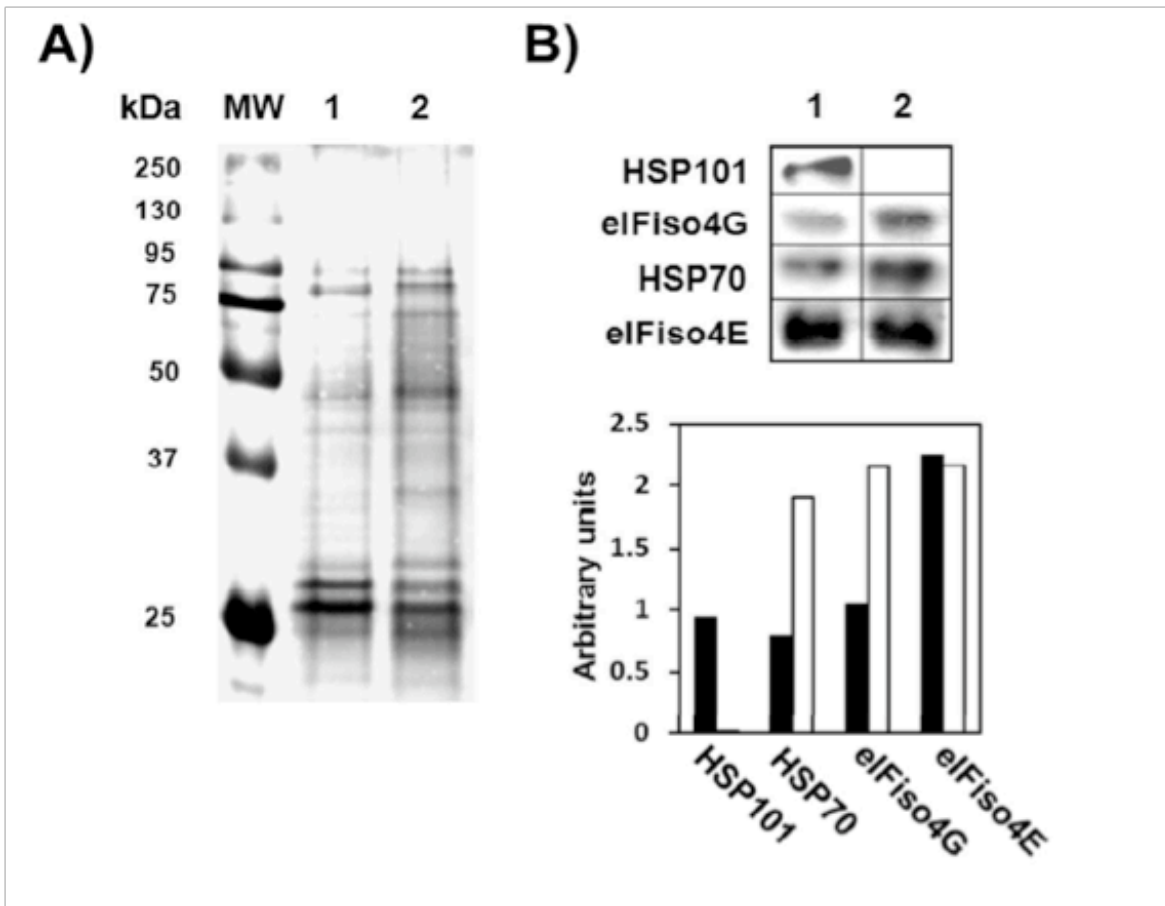
**Figura 8. Gel SDS-PAGE teñido con plata que muestra la purificación parcial de los complejos de unión a cap de la línea L10 silvestre.** Se obtuvieron 5 fracciones (F1-F5) para los complejos de unión a cap mediante cromatografía de afinidad en  $^7$ mGTP-sefarosa las cuales se resolvieron mediante SDS-PAGE y tinción con plata (parte superior); T, proteína total; L1 y L2, representan el primero y segundo lavado de la columna, respectivamente. La inmunodetección se realizó en membranas de PVDF con anticuerpos dirigidos contra la HSP101, la HSP70, el eIFiso4E y el eIFiso4G (parte inferior).

Para la comparación del patrón proteico de los complejos de unión a cap, en presencia y ausencia de la HSP101, se utilizaron 2 g de ejes embrionarios de las semillas mutantes y silvestres, respectivamente. La obtención de los complejos, su separación por SDS-PAGE y su tinción con plata se realizó al menos en tres repeticiones de manera independiente para cada línea. Se encontraron diez bandas altamente reproducibles de las semillas silvestres y mutantes, tanto de la línea L10 como de la línea L4 (Fig. 9). De las diez bandas, 5 presentaron los niveles diferenciales entre la mutante y la silvestre. Las bandas FT2 (eIFiso4G) y FT6 (eIFiso4E), de los complejos de unión a cap de semillas mutantes y silvestres se analizaron por espectrometría de masas LC/MS/MS con la finalidad de asegurar que la tinción fuera congruente con resultados previos reportados (Lázaro-Mixteco y Dinkova, 2012). Los resultados confirmaron la identificación del factor de traducción eIFiso4E en FT6 y del eIFiso4G en FT2 (Fig. 9). Sin embargo, la identificación de ambos factores fue con un bajo porcentaje de péptidos alineados a lo largo de las secuencias, lo cual probablemente se debió a la baja cantidad de proteína presente en la muestra. Debido a esta limitante, no se procedió con el análisis de las bandas diferenciales por espectrometría de masas sino que se decidió analizar la presencia de algunas proteínas conocidas de los complejos eIF4F/eIFiso4F mediante inmunodetección. Como se puede observar en la fig. 10, la HSP70 y el eIF(iso)4G mostraron mayores niveles en los complejos de

unión a cap de la mutante. Esto sugiere que hay un reajuste en los complejos de unión a cap, probablemente para compensar la falta de la HSP101 (Fig. 10). Estos hallazgos también sugirieron que la síntesis de proteínas podría verse afectada por la ausencia de la HSP101, ya que los complejos de unión a cap tienen un papel fundamental en la regulación del inicio de la traducción.



**Figura 9. Gel SDS-PAGE teñido con plata que muestra la purificación parcial de los complejos de unión a cap de los ejes embrionarios de semillas mutantes y silvestres correspondientes a las líneas L10 y L4.** Se utilizaron la segunda y tercera fracción de la purificación de los complejos mediante de la columna de cromatografía de afinidad por m<sup>7</sup>GTP-sefarosa, F<sub>2</sub>silv, F<sub>2</sub>mut y F<sub>3</sub>silv, F<sub>3</sub>mut, respectivamente. Las estrellas azules representan las bandas que mostraron una expresión similar en ejes de semillas mutantes y semillas silvestres de ambas líneas, L10 y L4. Las estrellas rojas representan las bandas que mostraron una expresión diferencial entre los ejes de las semillas mutantes y los de las semillas silvestres de ambas líneas, L10 y L4. Las proteínas fueron detectadas mediante tinción con plata. PM, peso molecular.

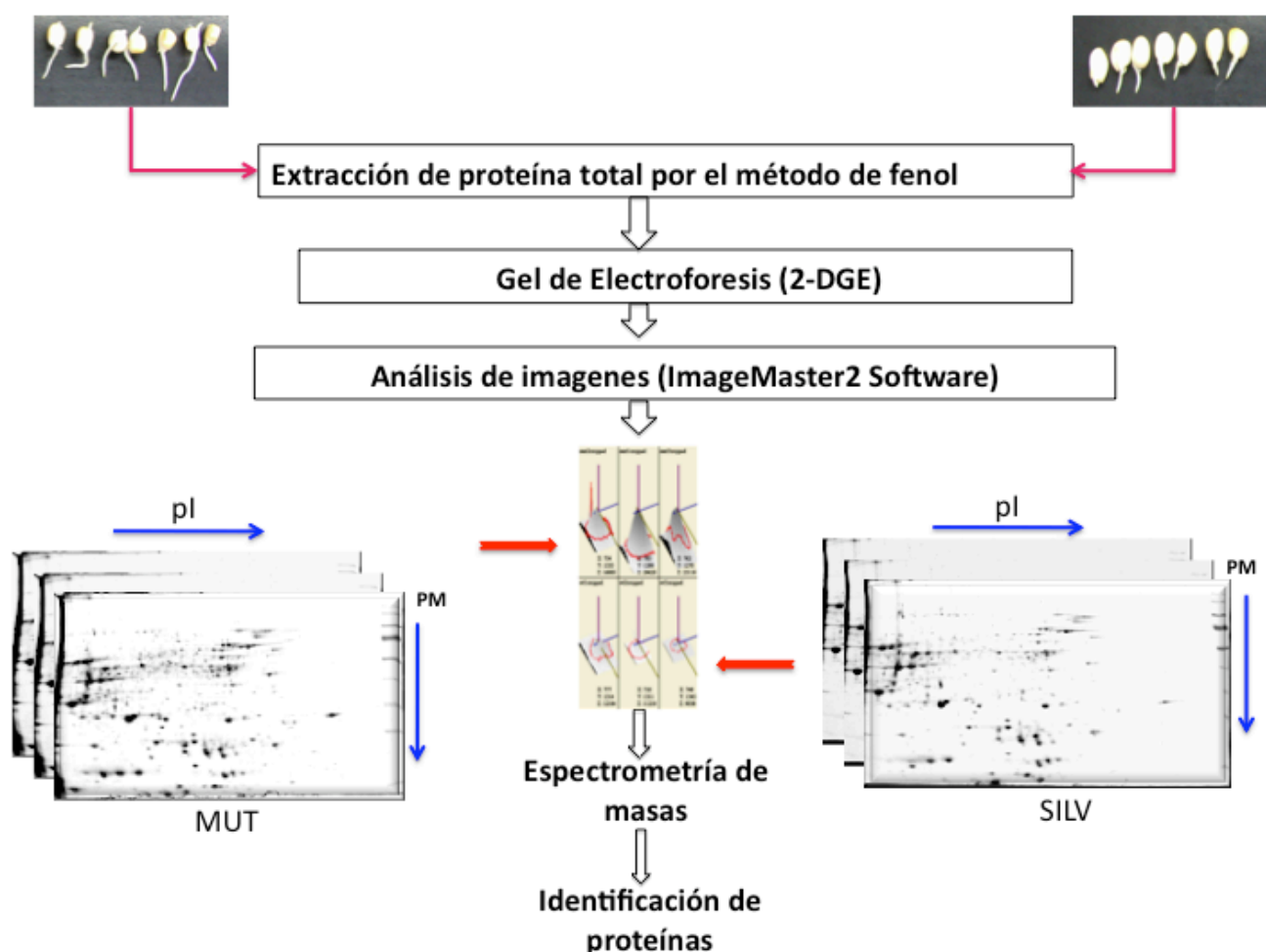


**Figura 10. Cambios en la expresión de proteínas específicas de los complejos de unión a cap, de ejes embrionarios maduros de semillas silvestres (1) y mutantes (2) de la línea L10.** Las proteínas de una muestra de extracto total, de ambos genotipos se incubaron con  $^7\text{mGTP}$ -sefariosa, y después de varios lavados, se eluyeron con una solución de  $^7\text{mGTP}$  0.2 mM. Cantidades iguales de cada fracción se resolvieron por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 15%, se transfirieron a membranas de PVDF, y se incubaron con anticuerpos policlonales dirigidos contra la HSP101 de maíz, la HSP70 universal, el eIFiso4E y el eIFiso4G de trigo. A) Tinción con plata de los complejos de unión a cap. B) Inmunodetección de proteínas específicas, parte superior; análisis densitométrico de las inmunodetecciones, parte inferior. Silvestre, barras oscuras; mutante, barras claras.

### IX. 3. Impacto en el proteoma en los ejes de maíz quiescentes por la ausencia de la HSP101

Con los resultados antes expuestos, se hipotetizó que la HSP101 puede ser un regulador de la traducción durante el desarrollo de la semilla (síntesis y acumulación de proteínas, previos a la maduración/desecación), y por ende, su ausencia podría estar asociada a diferencias en el proteoma del eje embrionario quiescente de maíz. Para analizar esto, se utilizaron las dos líneas mutantes en *Hsp101* descritas anteriormente. Para el análisis proteómico se utilizó electroforesis en dos dimensiones (2DGE), la primera separación se hizo por punto isoeléctrico con un intervalo de pH entre 4-7 y la segunda por masa molecular por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12.5%. Las imágenes de las proteínas teñidas con Azul de Coomassie se analizaron por triplicado con el programa ImageMaster 2D platinum, versión 6.0 (GE Healthcare, Piscataway, NJ). El área de cada mancha se normalizó como

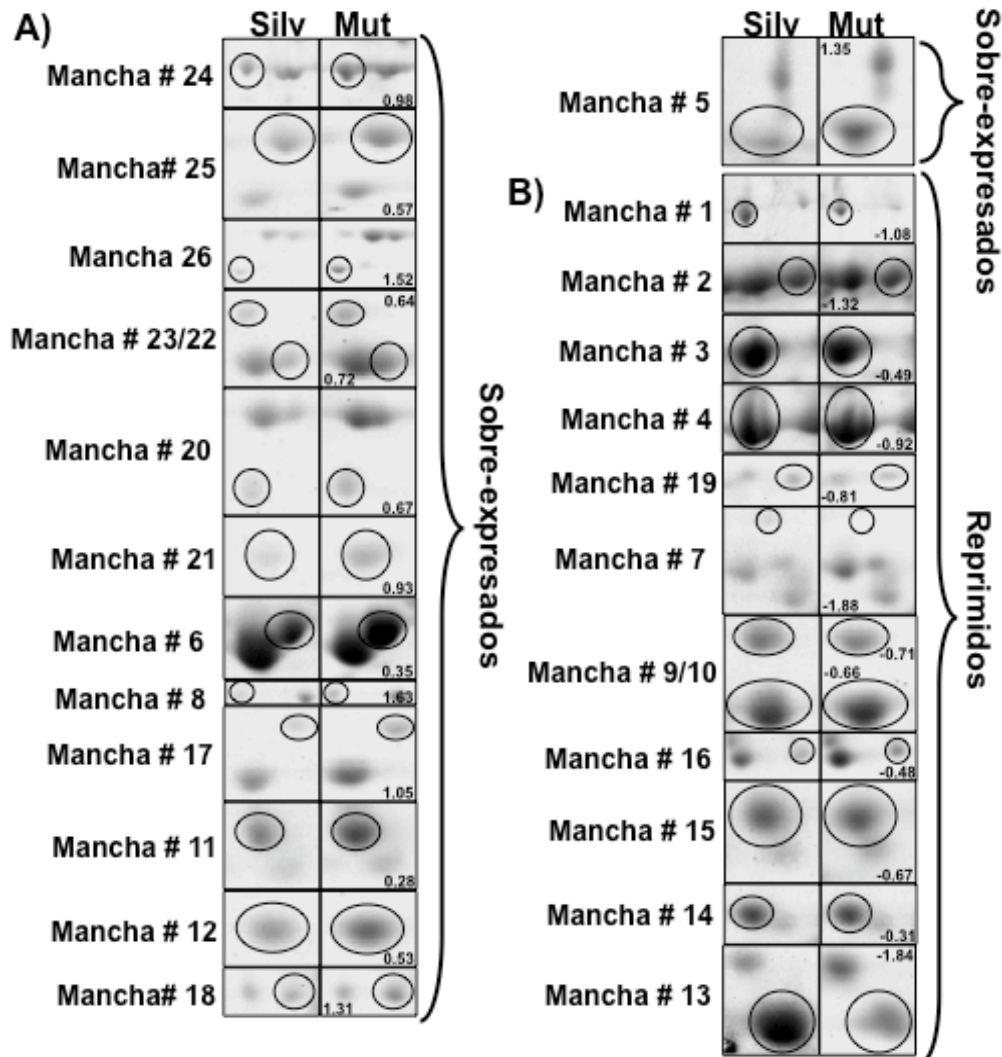
área relativa para compensar las diferencias sutiles en cantidad de muestra cargada, tinción y destinción (Fig. 11). Para determinar los cambios de expresión de manchas proteicas, entre la mutante y la silvestre, se utilizaron los siguientes criterios: i) que cada mancha esté presente en 3 de los geles en las subclases de la mutante y la silvestre, ii) que cada mancha esté presente en los geles de referencia de la silvestre y mutante y iii) que las manchas tengan un valor  $t$  superior a 2.78.



**Figura 11. Esquema experimental para la identificación de las proteínas expresadas diferencialmente en ejes embrionarios mutantes y silvestres.** Las proteínas se extrajeron por molienda del tejido y por el método de extracción por fenol. Después se cuantificaron y se separaron por electroforesis de dos dimensiones (por triplicado a partir del material biológico). Los geles se escanearon; las manchas se cuantificaron y las áreas de las manchas se alinearon usando el programa ImageMaster2 Platinum Software. Un total de 26 manchas expresadas diferencialmente se identificaron por espectrometría de masas LC-MS/MS, usando los buscadores SEQUEST/BioWorks, los buscadores *de novo* por similitud de secuencia sequencing/MS o Mascot.



Del total de manchas de los geles, 26 cumplieron los criterios antes mencionados; éstas se extrajeron de los geles y se digirieron enzimáticamente con tripsina durante toda la noche (Fig. 12). El análisis por espectrometría de masas se realizó según lo reportado por Stevenson y col., (2009), y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1.



**Figura 12.** Las 26 manchas estadísticamente diferenciales entre los ejes embrionarios mutantes (Mut) y silvestres (Silv) de la línea L10 se encuentran circularizadas. A) Sobre-expresadas y B) Reprimidas. El número dentro del recuadro izquierdo representa el nivel de expresión en la mutante comparada con la silvestre. La identificación de las proteínas en cada mancha se hizo por espectrometría de masas LC/MS/MS, y se resume en la Tabla 1. (*Laboratorio de Jay J. Thelen; Interdisciplinary Plant Group, University of Missouri-Columbia*)

**Tabla 1.** Identificación por espectrometría de masas LC/MS/MS de las 26 proteínas que se acumularon diferencialmente entre los ejes de las semillas mutantes *hsp101-m5::Mu1/hsp101-m5::Mu1* y de las semillas silvestres *Hsp101/Hsp101*

Nombre de la proteína	Número de mancha <sup>a</sup>	Acceso <sup>b</sup>	Expresión <sup>c</sup>	% que cubren los péptidos a lo largo de las proteínas <sup>d</sup>	Xcorr <sup>e</sup>	No. de únicos péptidos
<b>Proteínas sobre-acumuladas en la mutante</b>						
HSP70 ( <i>Zea mays</i> ) <sup>3</sup>	24	GRMZM2G153815_P01	1.97	45.22	388.42	30
Fosfoglucomutasa citosólica ( <i>Zea mays</i> ; EC:5.4.2.2) <sup>3‡</sup>	25	GRMZM2G109383_P02	1.49	28.62	146.36	23
Subunidad alfa de la chaperonina 60 kDa(CPN60A) de unión la subunidad mayor de la rubisco ( <i>Zea mays</i> ) <sup>3‡</sup>	26	GRMZM2G434173_P01	2.86	40.68	332.98	29
UDP-glucosil transferasa BX9 ( <i>Zea mays</i> ; EC:2.4.1.0) <sup>3‡</sup>	23	GRMZM2G161335_P01	1.55	36.72	157.55	16
Actina-1 ( <i>Zea mays</i> ) <sup>3‡</sup>	22	GRMZM2G126010_P01	1.65	56.1	235.05	16
succinil-CoA ligasa, beta ( <i>Zea mays</i> ) <sup>3‡</sup>	20	GRMZM2G064695_P04	1.59	26.24	98.95	14
Cinasa de adenosina ( <i>Zea mays</i> ; EC:2.7.1.0; EC:2.7.1.20) <sup>2‡</sup>	21	GRMZM2G540538_P01	1.91	43.57	185.67	12
Proteína embriogénica DC-8 ( <i>Zea mays</i> ) <sup>3‡</sup>	6	GRMZM2G063287_P01	1.27	55.42	440.2	32
Proteína embriogénica DC-8 ( <i>Zea mays</i> ) <sup>3‡</sup>	5	GRMZM2G063287_P01	2.56	48.46	195.42	23



6-fosfoglucono-lactonasa ( <i>Zea mays</i> ; EC:3.1.1.31) <sup>3</sup>	17	GRMZM2G1487 69_P01	2.07	37.69	73.54	12
Proteína embriogénica DC-8 ( <i>Zea mays</i> ) <sup>3‡</sup>	8	GRMZM2G3713 75_P01	3.08	27.71	82.01	10
Globulina-1 ( <i>Zea mays</i> ) <sup>2‡</sup>	11	GI 75140005	1.21	24.67	236.35	14
HSP20 kDa, clase IV ( <i>Zea mays</i> ) <sup>2</sup>	12	GRMZM2G3317 01_P01	1.44	53.11	168.2	15
Dehidrina ( <i>Hordeum vulgare</i> )*	18	GI 226500940	2.48	5.09*	99.0*	-

---

**Proteínas con menores niveles en la mutante**

---

Factor de elongación 2 ( <i>Zea mays</i> ) <sup>3‡</sup>	1	GRMZM2G0403 69_P01	0.47	39.34	275.77	26
Proteína de almacenaje embrionario parecida a vicilina ( <i>Zea mays</i> ) <sup>3‡</sup>	2	GRMZM2G0679 19_P02	0.4	36.91	334.46	25
Cupina ( <i>Orzya sativa japonica</i> ) <sup>3‡</sup>	3	GRMZM2G0784 41_P01	0.71	13.23	242.93	16
Aldosa reductasa ( <i>Zea mays</i> ) <sup>1‡</sup>	19	GRMZM2G0593 14_P01	0.57	29.13	111.13	12
Cinasa de adenosina ( <i>Zea mays</i> ; EC:2.7.1.0; EC:2.7.1.20) <sup>1‡</sup>	7	GRMZM2G5405 38_P01	0.27	32.46	131.04	9
Cupina ( <i>Orzya sativa japonica</i> ) <sup>2</sup>	9	GRMZM2G0784 41_P01	0.61	17.27	250.56	12

Cupina ( <i>Orzya sativa japonica</i> ) <sup>2‡</sup>	10	GRMZM2G0784 41_P01	0.63	24.09	420.54	18
Proteína de almacenaje embrionario parecida a vicilina ( <i>Zea mays</i> ) <sup>2</sup>	15	GRMZM2G0679 19_P02	0.63	22.16	262.1	15
HSP16.9, clase I ( <i>Zea mays</i> ) <sup>2‡</sup>	13	GRMZM2G4371 00_P01	0.28	30.32	76.27	4
Globulina-1 ( <i>Zea mays</i> ) <sup>1‡</sup>	4	Gi 75140005	0.53	54.67	609.12	24
Globulina ( <i>Zea mays</i> ) <sup>2</sup>	16	Gi 75140005	0.72	22.44	169.53	11
HSP17.4, Clase I ( <i>Zea mays</i> ) <sup>2</sup>	14	AC208204.3_FG T006	0.81	28.93	85.42	4

<sup>a</sup>Número de mancha asociada con el gel de referencia de la silvestre

<sup>b</sup>Número de acceso a la base de datos NCBI y de maíz (Unigene)

<sup>c</sup>Razón de expresión (*hsp101* mutante/ *Hsp101* silvestre), determinada del promedio de la área relativa de cada mancha.

<sup>d</sup>Porcentaje que cubren los péptidos a lo largo de las proteínas identificadas por el algoritmo SEQUEST.

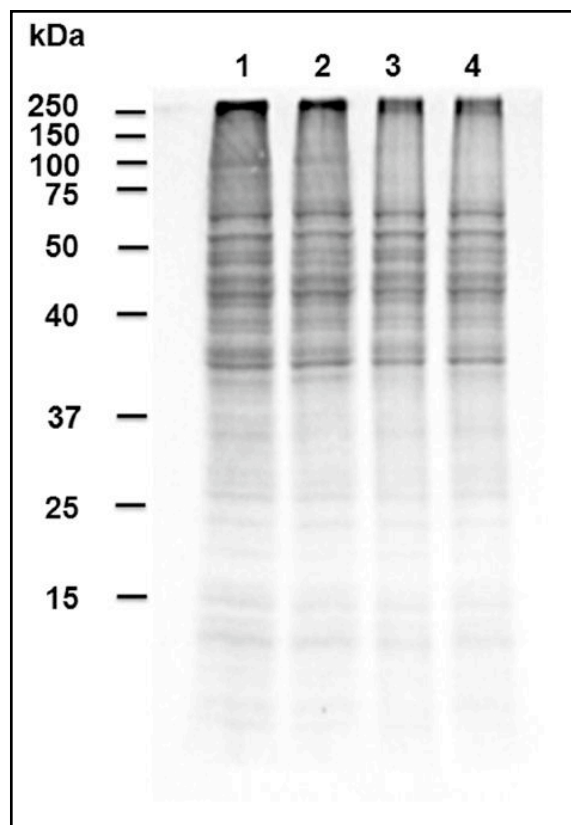
<sup>e</sup>Valores de Xcorr del algoritmo SEQUEST.

\*Proteína identificada usando buscadores de similitud de secuencia, PepNovo y MS BLAST.

<sup>1,2,3</sup>Indica si la identificación de la proteína fue de la silvestre, de la mutante, o de ambas, respectivamente.

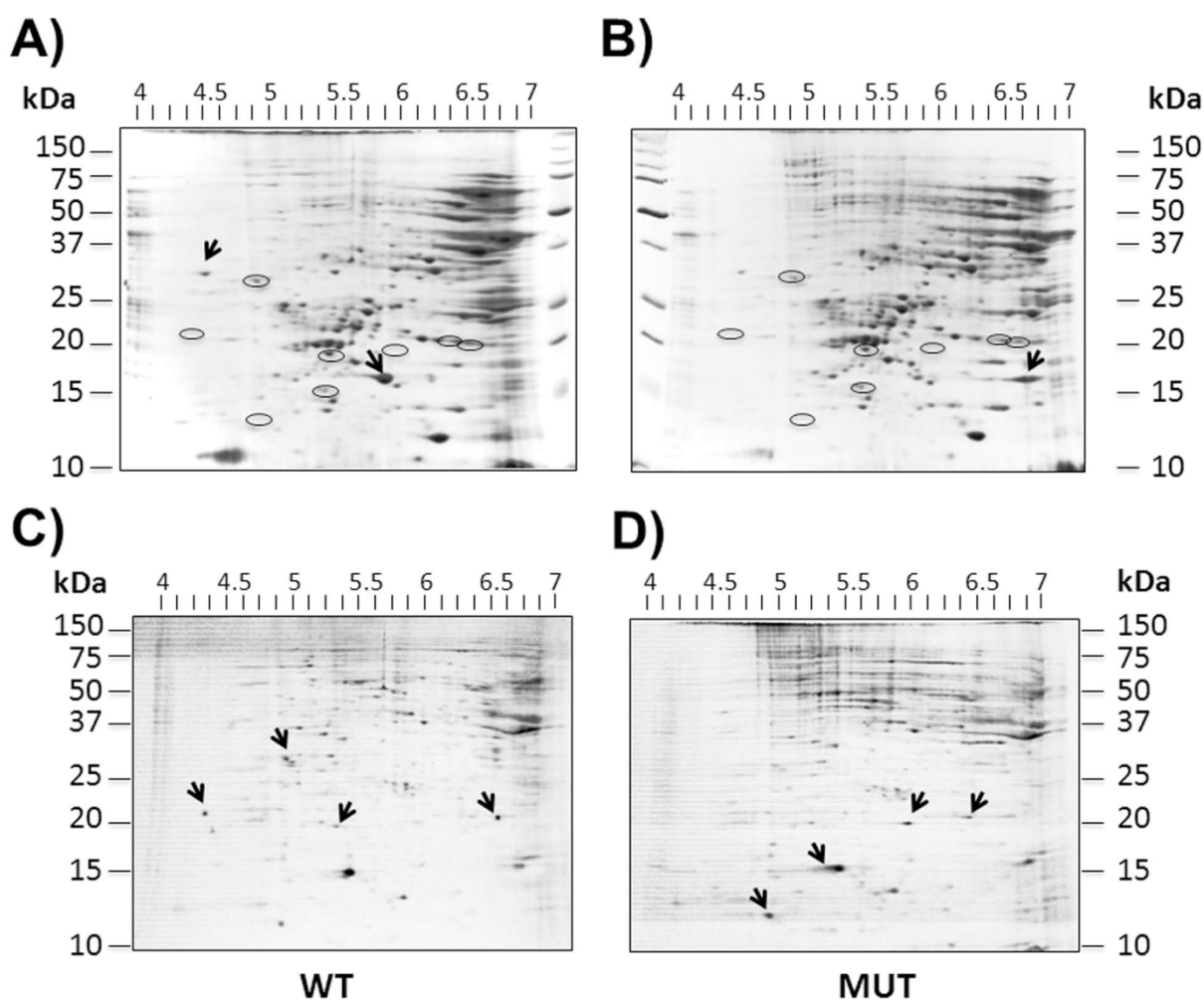
#### IX.4. Síntesis proteica en semillas carentes de *Hsp101* a las 24 h de germinación (marcaje metabólico con metionina- $^{35}\text{S}$ )

La comparación de los proteomas entre los ejes embrionarios de semillas maduras de plantas mutantes y de plantas silvestres, sugirió que el reajuste de los niveles de algunos factores traduccionales, como la proteína ribosomal P0, el factor de elongación eEF2 y la chaperona HSP70, que contiene la secuencia de unión al eIF4E, podrían tener algún efecto en la síntesis de proteínas durante las primeras horas de germinación. Del mismo modo, Nieto-Sotelo y col. (2002) hipotetizaron que el aumento en la longitud de la raíz en las plantas mutantes, también pudo deberse al incremento de la síntesis de proteínas. Para abordar esta hipótesis, se comparó la síntesis proteica en ejes embrionarios provenientes de la mutante L10 (*hsp101-m5::Mu1/hsp101-m5::Mu1*) y silvestre *Hsp101/Hsp101*, se analizó la síntesis de proteínas *de novo* en embriones germinados (24h), mediante un pulso de incorporación de metionina- $^{35}\text{S}$ , durante las últimas 3 horas de la germinación. El análisis se realizó por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida de 11 cm, en una y dos dimensiones, para saber si el efecto de la ausencia de la HSP101 sobre la síntesis de proteínas era global o específico, respectivamente. Los resultados mostraron que la síntesis global no es afectada por la ausencia de la HSP101 (Fig. 13); sin embargo, la presencia de algunas proteínas marcadas radioactivamente fue diferencial (Fig. 14).

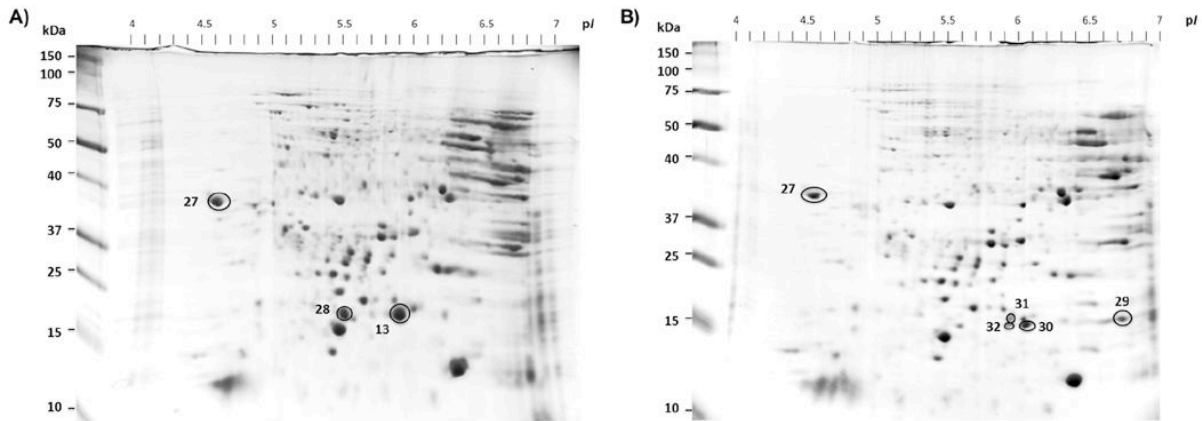


**Figura 13. Incorporación de metionina- $^{35}\text{S}$  en proteínas a las 24 h de germinación.** Los embriones se extirparon manualmente a las 21 h de germinación y se incubaron durante 3 h en medio MS en presencia de 150  $\mu\text{Ci}$  de metionina- $^{35}\text{S}$ . Después de la extracción de las proteínas, se calculó la cantidad de proteína total y la radiactividad incorporada, se realizó un SDS-PAGE y se analizaron las diferencias, cuantitativamente (igual cantidad de proteína cargada, carriles 1 y 2) y cualitativamente (igual cantidad de radiactividad cargada, carriles 3 y 4).

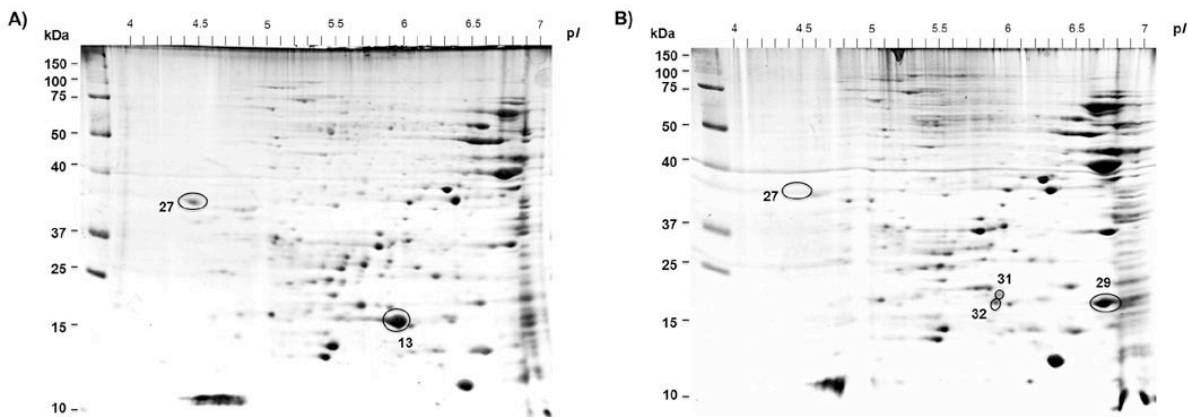
Una comparación entre el fluorograma y el gel teñido con Azul de Coomassie indicó que varias de las proteínas diferenciales, en cuanto a incorporación de metionina-[<sup>35</sup>S], no eran detectadas por la tinción, indicando una baja cantidad de las mismas. Por otra parte, se observaron diferencias entre los ejes embrionarios de las semillas mutantes y las semillas silvestres para algunas proteínas de bajo peso molecular detectadas por Azul de Coomassie pero no por señales radiográficas (fluorogramas), indicando cambios en los niveles de proteínas durante el proceso de germinación (Fig. 14). Para resolver mejor estas diferencias se volvieron a analizar los ejes embrionarios quiescentes (0h) y germinados (24h), mediante SDS-PAGE con geles al 15% en vez de los de 12.5%, previamente utilizados (Figs. 15, 16 y 17).



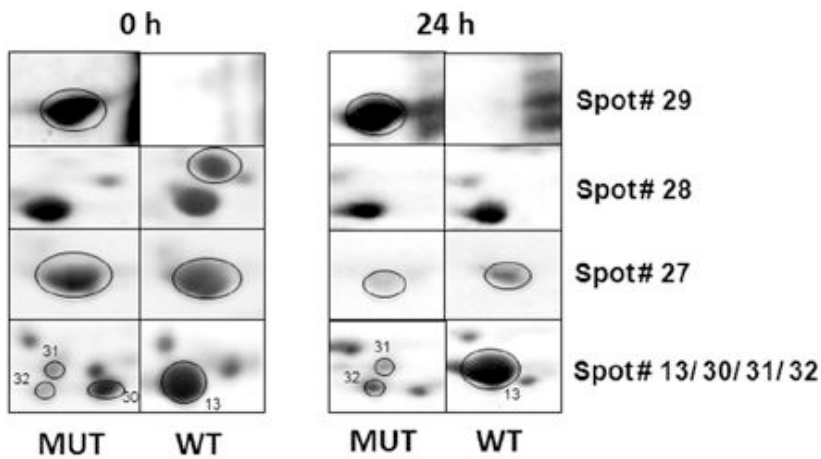
**Figura 14. Mapas comparativos 2-DGE de la síntesis *de novo* de proteínas en la línea L10 mutante (MUT) y silvestre (WT) a 24 h de germinación.** Se focalizaron 200 µg de proteína en tiras IPG de 11 cm (Biorad, USA) con un intervalo de pH 4 a 7. Los geles de la mutante (B) y silvestre (A) se teñieron con Azul de Coomassie y se incubaron con Amplify (GE Healthcare) para incrementar la señal radiográfica (fluorografía). Los fluorogramas de la mutante (D) y la silvestre (C) se obtuvieron mediante exposición a pantallas Storage Phosphor Screens (GE Healthcare). Las manchas diferenciales entre los dos genotipos en tinción con Azul de Coomassie y fluorográfico se indican con flechas negras. Los círculos en los geles (A) y (B) indican la posición de las flechas en C y en D.



**Figura 15. Mapas representativos en 2DGE de la acumulación diferencial de proteínas de bajo peso molecular, marcadas radiactivamente, en ejes embrionarios de semillas mutantes (B) comparados con semillas silvestres (C) de la línea L10 a las 0h de germinación.** Las proteínas de bajo peso molecular (menores de 15 kDa) obtenidas de ejes quiescentes (0h) de la mutante (B) y silvestre (A) se resolvieron mediante SDS-PAGE en geles al 15%. Las manchas correspondientes a las proteínas que se acumularon preferencialmente, o ausentes en la mutante, se encuentran circularizadas y numeradas en los mapas. La mancha 27 también se numeró como referencia, aunque no muestra diferencias entre genotipos en los ejes quiescentes. La identificación de las proteínas en cada mancha se realizó por espectrometría de masas LC/MS/MS y se muestra en la Tabla 2. (Dr. Guillermo Mendoza-Hernández. Unidad de Péptidos y Proteínas de la Facultad de Medicina, UNAM).



**Figura 16. Mapas representativos en 2DGE de la acumulación diferencial de proteínas de bajo peso molecular en ejes embrionarios mutantes (B) comparados con silvestres (C) de la línea L10 a las 24 h de la germinación.** Las proteínas de bajo peso molecular (menores de 15 kDa) obtenidas de ejes germinados (24h) de semillas mutantes (B) y silvestres (A) se resolvieron mediante SDS-PAGE en geles al 15%. Las manchas correspondientes a proteínas que se acumularon preferencialmente, o ausentes en la mutante, se encuentran circularizadas y numeradas en los mapas. La mancha 27 mostró un importante decremento en la mutante en comparación con lo observado en ejes quiescentes (ver Fig. 19). La identificación de las proteínas en cada mancha se realizó por espectrometría de masas LC/MS/MS, y se muestra en la Tabla 2. (Dr. Guillermo Mendoza-Hernández. Unidad de Péptidos y Proteínas de la Facultad de Medicina, UNAM).



**Figura 17.** Acercamiento de las manchas correspondientes a proteínas que mostraron acumulación diferencial en los ejes embrionarios de la mutante *hsp101-m5::Mul/hsp101-m5::Mul* a las 0h y 24h de germinación. Las manchas correspondientes a proteínas con acumulación diferencial entre los genotipos mutante (MUT) y silvestre (WT) se encuentran circularizadas. La identificación de esas proteínas se resume en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Proteínas acumuladas diferencialmente en los ejes embrionarios de la mutante *hsp101-m5::Mul/hsp101-m5::Mul* a las 0h y 24h de germinación.

0h	Proteína (especie)/ AC <sup>a</sup>	No. Mancha	Presencia <sup>b</sup>	MASCOT Score <sup>c</sup>	(%) que cubren los péptidos a lo largo de la proteína <sup>d</sup>	Números de únicos péptidos	emPAI <sup>e</sup>
	HSP16.9 kDa, clase I (Zea mays)/ ACG36285	29	2	759	68	13	1.97
	Proteína <i>spm2</i> , que conjuga la ubiquitina [Zea mays]/ ACG25186	29	2	129	35	3	0.74
	HSP16.9 kDa, clase I (Zea mays)/ ACG31332	28	1	613	71	12	4.5
	Proteína que responde al ácido abscísico Rab28 (Zea mays)/ CAA41854	28	1	276	52	1	1.22
	HSP17.2, clase I [Zea mays]/ NP_001105442	28	1	226	35	3	0.43
	Proteína que abunda durante la embriogénesis tardía Leal4-A [Zea mays]/ NP_001152646	28	1	133	51	5	0.77
	HSP16.9 kDa, clase I (Zea mays)/ ACG36285	30	2	1110	71	36	4.13
	Proteína hipotética LOC100279096 [Zea mays]/ NP_001145613	30	2	159	57	6	0.57
	Proteína que abunda durante la embriogénesis tardía Leal4-A [Zea mays]/ NP_001152646	30	2	125	47	6	0.77
	HSP17.5, clase II (Zea mays)/ NP_001105705	31	2	410	49	5	1.88

24h	HSP17.4 kDa, clase I [Zea mays] ACG35098	31	2	156	43	3	1.01
	Superóxido dismutasa [Cu-Zn] 4AP [Zea mays]/NP_001105704	31	2	239	44	1	0.84
	HSP16.9 kDa, clase I (Zea mays)/ACG36285	32	2	405	67	24	3.28
	Proteína que responde al ácido abscísico Rab28 (Zea mays)/ CAA41854	32	2	344	64	5	1.49
	HSP17.2, clase I [Zea mays]/NP_001105442	32	2	155	44	2	1.05
	HSP16.9 kDa class I (Zea mays)/ACG48548	13	1	1107	57	23	9.45
	Proteína hipotética [Zea mays] /NP_001145613	13	1	112	57	5	2.11
	HSP17.5, class II [Zea mays]/ NP_001105705	13	1	169	49	8	1.02
	HSP16.9, class I (Zea mays)/ACG36285	29	2	893	66	12	5.15
	Proteína S18 del ribosoma 40S [Zea mays]/NP_001151612	29	2	35	88	1	0.69
	Proteína que responde al ácido abscísico Rab28 (Zea mays)/ CAA41854	27	1	1204	82	23	5.18
	HSP16.9, clase I [Zea mays] /ACG36285	27	1	236	49	3	1.04
	HSP16.9, clase I (Zea mays)/ACG36285	13	1	857	75	20	5.15
	HSP17.5, clase II [Zea mays]/ NP_001105705	13	1	261	49	3	1.41

<sup>a</sup>Número de acceso a la base de datos maizesequences.org.

<sup>b</sup>1, 2 indica si la identificación de la proteína es de una mancha de los ejes embrionarios de la semilla silvestre o de la mutante, respectivamente.

<sup>c</sup>Probabilidad basada en el puntaje de MASCOT, la cual se define como  $-10 \cdot \log(p)$ , donde  $p$  es la probabilidad que los alineamientos observados sean eventos aleatorios. Puntaje  $> 43$ , indica una extensa homología ( $p < 0.05$ ).

<sup>d</sup>Porcentaje que cubren los péptidos a lo largo de las proteínas identificadas por el algoritmo MASCOT.

<sup>e</sup>Índice exponencial modificado de la abundancia de la proteína (emPAI) para la estimación de la cantidad absoluta, igual a  $10^{\text{PAI}} - 1$ , que es proporcional al contenido proteico en la mezcla presente en una mancha.

Los resultados de identificación por espectrometría de masas LC/MS/MS mostraron que hay un reajuste en la acumulación de chaperonas de bajo peso molecular, principalmente de la HSP16.9, la HSP17.2, la HSP17.4, la HSP17.5. Algunas de estas diferencias se mantuvieron durante las primeras 24h de germinación. Interesantemente, la estabilidad de la proteína inducida por ácido abscísico Rab28 se comprometió en ausencia de la HSP101. Así mismo, spm2, un miembro del sistema ubiquitina-proteasoma está presente únicamente en la mutante a las 0h. La proteína ribosomal S18 se detectó a las 24 h en la misma mancha que spm2.



## X. DISCUSIÓN

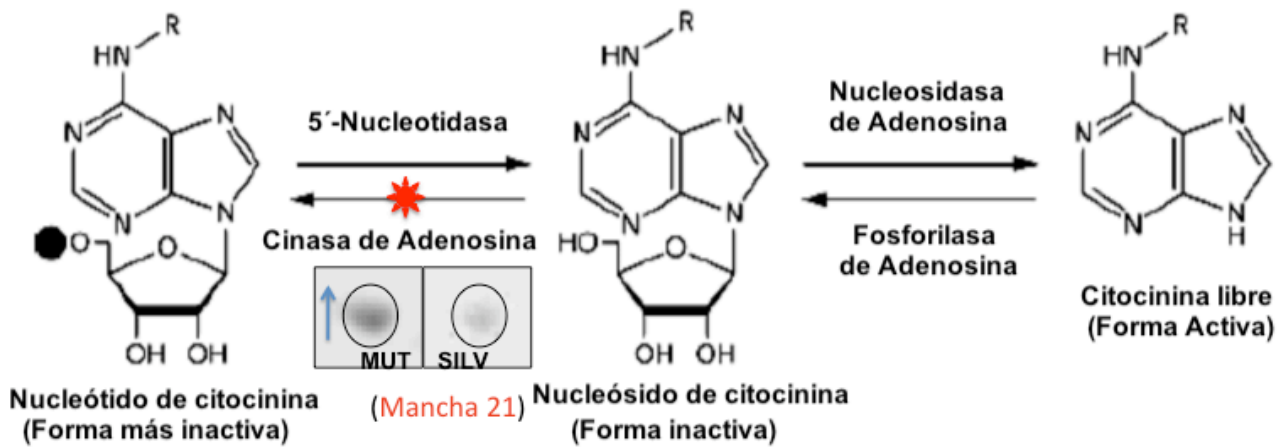
Los resultados obtenidos en el presente trabajo demostraron que la chaperona HSP101 es importante para la acumulación y síntesis de proteínas en la semilla de maíz durante su maduración y posterior germinación. Esta chaperona, que funciona como desagregasa, es capaz de interactuar con los complejos del inicio de la traducción (eIF4F), y acorde a su distribución en perfiles poliribosomales parece estar involucrada en el inicio de la traducción durante las primeras 24 h de la germinación. Previamente, la HSP101 se había reportado como un regulador positivo de la traducción de ciertos mRNAs mediante interacción con los factores eIF4G y eIF3c para favorecer el reclutamiento de la subunidad ribosomal pequeña (40S) al mRNA. Así mismo, se ha sugerido que su actividad de chaperona podría jugar un papel en su actividad traduccional (Wells, *et. al*, 1998). Por lo tanto, durante la maduración y las primeras horas de germinación del maíz, la zmHSP101 podría tener una función dual; por un lado actuando como chaperona, y por el otro, como un regulador de la traducción. La comparación en la síntesis de proteínas, entre los ejes embrionarios de la semilla mutante L10 (*hsp101-m5::Mu1/hsp101-m5::Mu1*) y silvestre *Hsp101/Hsp101*, mostró una traducción diferencial específica, sugiriendo que la HSP101 puede regular los mRNAs con características particulares. Sin embargo, la identificación de los mRNAs correspondientes a las proteínas diferenciales (señales flouográficas) no se pudo realizar, ya que en la mayoría de los casos las proteínas no se observaron en los geles teñidos con azul de Coomassie.

Las diferencias en la acumulación de proteínas observadas para la mutante L10 (*hsp101-m5::Mu1/hsp101-m5::Mu1*), sugiere que el aumento de algunas proteínas podrían servir para compensar las funciones de la HSP101 de manera directa (tal es el caso del aumento de expresión de la HSP70, la HSP20 y la chaperonina de la rubisco) o indirecta, complementando algún proceso bioquímico o molecular en la semilla, que durante la germinación del maíz pudo verse afectada. Por otra parte, se observó una disminución de la HSP16.9C-I (mancha silv-28; y mancha silv-13; Fig. 17) y la HSP17.4C-I (mancha mut-14). Simultáneamente, en la mutante L10, en la posición que corresponde a la mancha silv-13, aparecieron dos manchas tenues: la mancha 31, que contiene a la HSP17.5C-II, la HSP17.4C-I y la superóxido dismutasa; y la mancha 32, que contiene a la HSP16.9C-I y a la HSP17.2C-I. La disminución de la HSP16.9 se vio compensada con la aparición de la misma, en otras manchas presentes sólo en la mutante (manchas mut-29, mut-30). Cabe destacar, que en la mancha mut-29, también se identificó a *spm2*, una proteína que conjuga ubiquitina (E2), la cual está involucrada en el segundo paso de la reacción de ubiquitinación, que marca a las proteínas para su degradación mediada por el proteasoma. Los estudios de la función de las SHSPs indican que su efectividad para prevenir la agregación está asociada a las estructuras cuaternarias que forman. En trigo, la estructura de la TaHSP16.9C-I es dodecamérica, mientras que la de la HSP17.8C-II es de



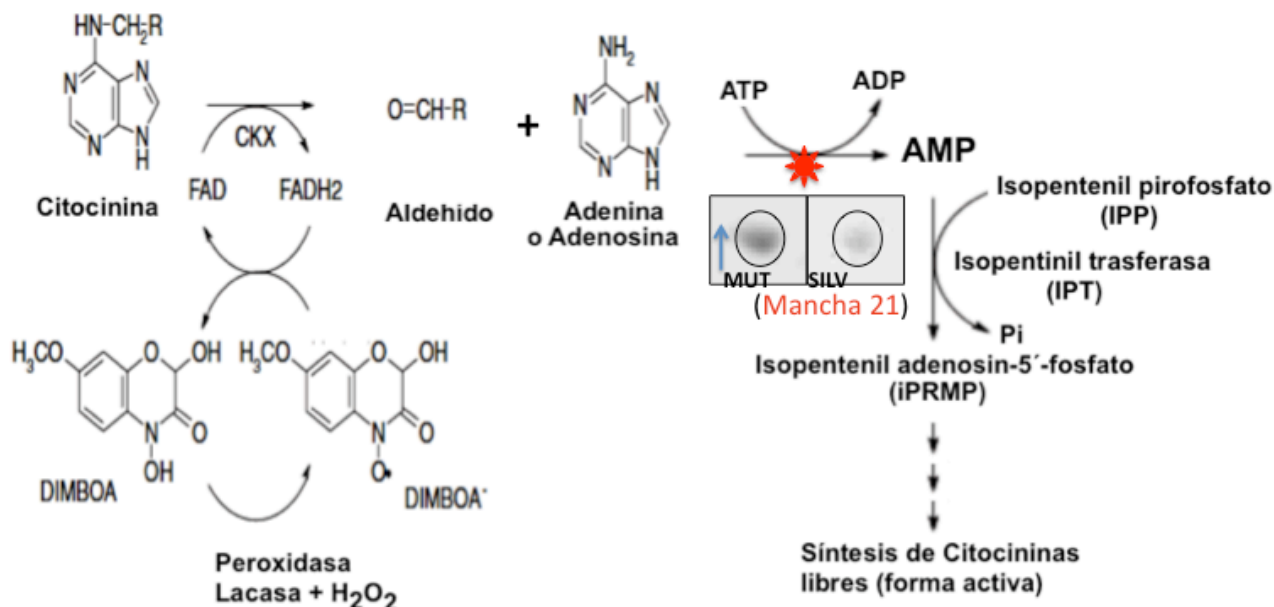
oligómeros pequeños con 9 a 10 subunidades. La TaHSP16.9C-I y la TaHSP17.8C-II son capaces de suprimir la agregación en condiciones de estrés por calor; sin embargo la TaHSP16.9C-I es más efectiva. A la luz de estos datos, el reajuste proteómico encontrado en la mutante L10 podría indicar la necesidad de un nuevo sistema de chaperonas (como HSP70/SHSPs) para contender con la ausencia de la HSP101, el cual aún podría ser menos efectivo que el sistema de la SHSPs en presencia de la HSP101. Como consecuencia de lo anterior, se podría hipotetizar que en la mutante algunas proteínas no pueden salir de los agregados proteicos, y por lo tanto, se activa su degradación por la vía del proteosoma. Uno de estos casos, es la Rab28, que es menos estable en la mutante L10 durante las primeras 24 horas de germinación.

Por otro lado, la ausencia de la HSP101 en la semilla también indicó un reajuste en la acumulación de algunas proteínas del metabolismo, de almacenaje embrionario y del citoesqueleto. Con respecto a las proteínas del metabolismo, aumentadas en la mutante, éstas parecen estar involucradas en el metabolismo de las citocininas. Las citocininas forman un numeroso grupo de fitohormonas, y entre otros aspectos del desarrollo vegetal, se involucran en la promoción de la división celular, la diferenciación de cloroplastos, el desarrollo de brotes y el antagonismo de la senescencia (Mok, y col., 1994; 2001). Las citocininas en los tejidos vegetales son de dos grupos químicos: los conformados a base de adeninas y los que son a base de fenilureas. De las primeras se ha identificado químicamente a la zeatina, de la cual parece que se derivan muchas otras citocininas activas como la ribofuranosil-zeatina. En el caso del segundo tipo, se destaca la presencia de la difenilurea y algunos derivados de ésta, como forclorfenurón o tidiazurón. Las formas activas de las citocininas se controlan mediante tres pasos: por la síntesis *de novo*, por su activación-inactivación y por su degradación (Kakimoto, 2001; Werner y col., 2006; Kurakawa y col., 2007). Las citocininas también regulan, de manera negativa, el crecimiento de las raíces y el meristemo apical del tallo. Mientras que la aplicación exógena de citocininas libres, o el incremento de su concentración endógena, trae como resultado un decremento en el crecimiento del meristemo apical de la raíz; las mutantes y plantas transgénicas con bajas concentraciones de citocininas muestran raíces más elongadas (Dell Ioio, 2007). Los hallazgos en el análisis proteómico sugieren que podría haber una inactivación de las citocininas en la mutante L10. Entre las evidencias que soportan esto se encuentra el aumento de la cinasa de adenosina, una enzima que fosforila al nucleósido de citocinina (forma inactiva) para formar un nucleótido de citocinina (forma aún más inactiva; Fig. 18).



**Figura. 18.** La cinasa de adenosina (CA) regula las formas inactivas de las citocininas. La CA fosforila al oxígeno en la posición 5' de la ribosa del nucleósido de citocinina (forma inactiva) para formar un nucleótido de citocinina (una forma más inactiva). La estrella roja muestra la dirección de la reacción que lleva a cabo la CA. La flecha azul dentro del recuadro, al lado de la mancha MUT-21, muestra el aumento de la CA en la mutante L10 (MUT), comparada con la de la silvestre (SILV).

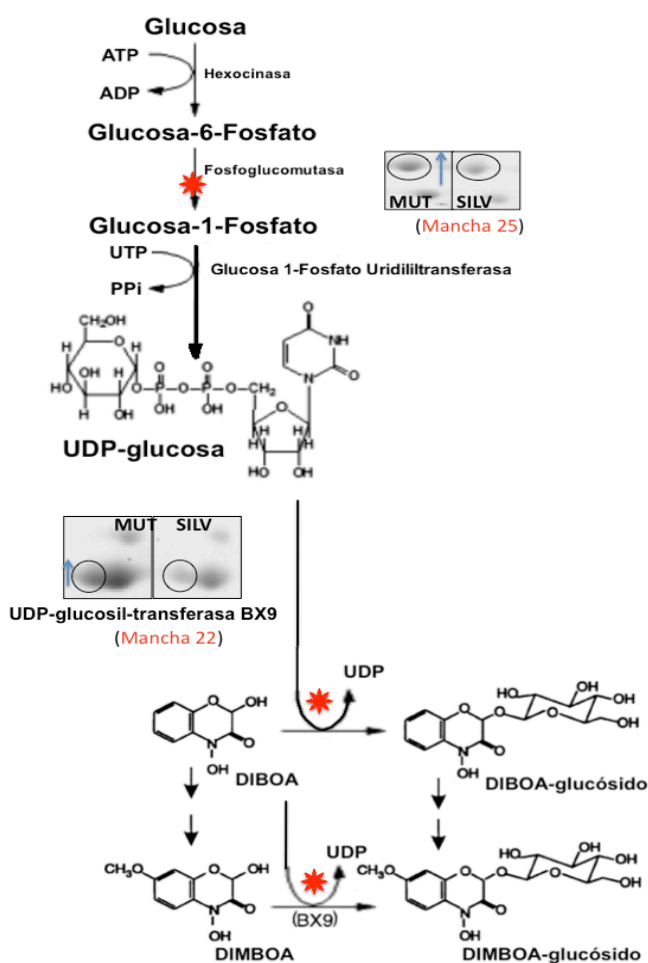
Recientemente, un análisis proteómico reveló que la distribución de las enzimas involucradas en la síntesis de auxinas y citocininas en la raíz de maíz se encuentra regulada por la glucosilación de la zeatina y probablemente degradación. Esto permite la acción de las auxinas sobre el crecimiento de la raíz primaria y la emergencia de las raíces laterales (Saleem y col., 2010). En este mecanismo, la UDP-glucosil transferasa BX9 (proteína identificada en la mancha 22 con mayor acumulación en ausencia de la HSP101) es una de las enzimas clave que podría estar participando, a través de la síntesis de 2,4-dihidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona (DIMBOA), en la inactivación de las citocininas. Aunque en un principio este compuesto se relacionó con la defensa contra patógenos (Von Rad., 2001), recientemente se ha reportado una función importante en la destrucción de la zeatina, inducida por la formación de radicales libres derivados de DIMBOA (Frebortova y col., 2010; Fig. 19).



**Figura 19. Degradación de citocininas por radicales libres de DIMBOA.** El radical DIMBOA, generado por la peroxidasa o la lacasa, es capaz de incrementar la actividad de la citocinina oxidasa (CKX). DIMBOA sirve como un precursor para aceptación de electrones provenientes de la oxidación de las citocininas. Durante la degradación de las citocininas, se producen bases de adenina o adenosina que pueden ser reincorporadas a la ruta de síntesis de citocininas mediante la CA, que la fosforila para producir AMP. El AMP puede conjugarse con isopentenil pirofosfato (IPP) para la producción de isopentenil adenosin-5'-fosfato, compuesto clave para la producción de citocininas libres. La estrella roja es para señalar que la CA también está involucrada en el reciclaje de bases de adenosina, y en la mutante L10 está incrementada.

Otras enzimas que fueron identificadas entre las proteínas acumuladas diferencialmente en la mutante L10, que también están involucradas en el metabolismo de citocininas son: la fosfoglucomutasa y la cinasa de adenosina. La fosfoglucomutasa cataliza la interconversión entre glucosa-1-fosfato a glucosa-6-fosfato. Ambos sustratos son importantes para la formación de UDP-glucosa, que es a su vez un sustrato para la BX9. La cinasa de adenosina es una enzima de salvamento de nucleótidos que convierte al ADP en AMP, a expensas de ATP. En *Arabidopsis*, la cinasa de adenosina se expresa en raíz y su principal función es la de reciclar adenosinas generadas por varios procesos (Moffatt y col., 2002; Fig. 19). Dado que durante la degradación de las citocininas hay formación de una gran cantidad de adenosina, el incremento de la cinasa de adenosina resultaría importante para la formación de AMP utilizado en la síntesis *de novo* de citocininas (Fig. 19). En este sentido, la inactivación de DIMBOA por glucosilación, y el reciclaje de sustratos por las enzimas involucradas en la síntesis de nucleósidos y nucleótidos para la síntesis de citocininas *de novo* pueden recuperar los niveles normales de esta hormona posterior a la germinación, donde el fenotipo de la mutante de la *Hsp101* se pierde gradualmente al comparar con la silvestre (Nieto y col., 2002).

Por otra parte, se ha reportado una correlación positiva entre el contenido de citocininas y la tolerancia a estrés por calor. La aplicación de zeatina exógena a las plantas confiere tolerancia al calor, por el aumento de proteínas pequeñas de choque térmico (Veerasamy y col., 2007; Zhang y col., 2008). Esto indica, que la falta de una desagregasa, como la HSP101, causa un reajuste en la maquinaria de chaperonas de bajo peso molecular con alteraciones en las enzimas involucradas en el metabolismo de citocininas.



**Figura 20. Enzimas involucradas en la formación e inactivación de DIMBOA por glucosilación.** Las estrellas rojas señalan las distintas enzimas que aumentaron en la mutante L10 (*hsp101-m5::Mu1/hsp101-m5::Mu1*) y su posición en la ruta metabólica referida.

La germinación de la semilla también es determinada por el balance de otras dos hormonas antagonistas, el ácido giberélico (GA), de manera positiva y el ácido absísico (ABA), de manera negativa (White y col., 2000). Cuando el ABA interacciona con los receptores de proteínas de unión a GTP, otras proteínas entran en acción para la transducción de la señal que impide la germinación

prematura. Las proteínas cupinas (manchas 3, 9 y 10, aumentadas en la mutante), compiten con el ABA, para unir a las proteínas de unión GTP, y por tanto, se permite la germinación positiva (Mak y col., 2009). Además, se sabe que las proteínas de respuesta a ABA, dehidrinas, y LEAs desaparecen durante la germinación o permanecen constantes para proteger otras proteínas desagregadas por el estrés hídrico u osmótico (Mak y col., 2009). Interesantemente, una proteína que se induce por ABA, la Rab28, es menos estable en la mutante que carece de la *Hsp101*. La regulación de la Rab28 ha sido estudiada en mutantes *viviparous-1 (vpi)* de maíz, insensibles a ABA, que muestran una germinación precoz. La acumulación de Rab28-mRNA es reprimida en la mutante *vpi* durante el desarrollo del embrión (Pla y col., 1991). Resultados similares también fueron descritos para la globulina-1 (manchas mut- 4, mut-11 y mut-16) de maíz (Kriz y col., 1990). Interesantemente, la Rab28, al igual que la HSP101, se localiza en el núcleo. Estas dos proteínas no contienen secuencias señal para su transporte al núcleo, no obstante, se ha propuesto que esta clase de proteínas son reclutadas al núcleo mediante la interacción con otras proteínas, en vez de utilizar una secuencia señal de transporte. Dado que la Rab28 es menos estable durante la germinación en ausencia de la HSP101, podría proponerse que la HSP101 es requerida para su estabilidad y probablemente su función en el núcleo. Por otra parte, la ZmDC-8 (manchas 6 y 8) y la dehidrina (mancha 18), dos proteínas embriogénicas reguladas por ABA y por deshidratación, fueron sobre expresadas en la mutante L10; la desregulación de este tipo de proteínas sugiere que también podrían contribuir a la mayor elongación de la raíz que muestra la mutante L10. El fenotipo de la mutante L10 también se puede verse reflejado por el aumento de la actina (mancha Mut-22), ya que es un componente del citoesqueleto que organiza, remodela y controla la elongación y división celular (Barrero R., 2002).

Se ha visto que la emergencia de la radícula es regulada por citocininas y ABA, y esta regulación es prioritaria durante las primeras horas de la germinación, en contraparte con la emergencia de las raíces laterales. Se cree que esta prioridad se debe a que la toma de agua es el proceso inmediato cuando la semilla entra en contacto con el suelo (la raíz primaria tiene principalmente esta función durante las primeras horas de la germinación), en contraste con la toma de nutrientes del suelo, que es un proceso post-germinativo (Serena Perilli y col., 2010). Cabe mencionar que un estudio reciente con la mutante L10 (*hsp101-m5::Mu1/hsp101-m5::Mu1*) mostró que la HSP101 juega un papel negativo en inducir la emergencia de raíces adventicias en el nodo coleoptilar de las plántulas de maíz, y no requiere de calor (López-Frías y col., 2011). La desregulación de las citocininas en la mutante, probablemente, también es un mecanismo que favorece la protrusión de la raíz primaria y las adventicias para contender el estrés mediante la toma de agua (más eficiente) durante las primeras horas de la germinación en ausencia de la HSP101.

En resumen, este estudio muestra la importancia de la HSP101 como regulador de la traducción específica durante las primeras horas de germinación ya sea debido a su función como chaperona en los complejos de inicio de la traducción o por una acción directa sobre los mRNAs específicos. La identificación de las proteínas con acumulación alterada en ausencia de la HSP101 permitió sugerir las causas que conllevan a la mutante L10 a incrementar la longitud de su raíz primaria y la emergencia de las raíces laterales. Estos hallazgos también revelaron cómo la semilla reajusta los niveles de las HSPs y las sHSP en respuesta a la carencia de una desagregasa como la HSP101 y la importancia de la HSP101 para el balance de proteínas almacenadas en el embrión durante el proceso de germinación del maíz.

## **XI. CONCLUSIONES**

- 1) La HSP101 regula la traducción de los mRNAs específicos, ya sea como regulador traduccional o como chaperona de los complejos de inicio de la traducción.
- 2) La HSP101 forma parte de los complejos eIF4F/eIF(iso)4F y de la maquinaria traduccional asociada al ribosoma 80S.
- 3) La presencia de la HSP101 es importante para la estabilidad de algunas proteínas acumuladas en el embrión maduro de maíz como la Rab28.
- 4) La ausencia de la HSP101 provoca el reajuste de la expresión de proteínas pequeñas de choque térmico (SHSPs), factores traduccionales y de algunas enzimas involucradas en la vía de síntesis de citocininas y ABA.

## XII. PERSPECTIVAS

La HSP101 es una de las proteínas con potencial para ser usada con fines biotecnológicos. Se ha demostrado que la alta expresión de la HSP101 de arroz mediado por la secuencia omega (OsHSP101- $\Omega$ ) incrementa la capacidad termotolerante de la planta, y por tanto puede ser utilizado como un marcador de selección en plantas. La HSP101 transactiva *in vivo* la traducción del reportero  $\Omega$ -luciferasa, brindando la posibilidad de utilizar esta tecnología para producir grandes cantidades de proteínas de interés comercial en plantas (Chang, 2007). Sin embargo, el presente estudio ha mostrado que la pérdida de la función de la HSP101 trae como consecuencia un reajuste en la síntesis y acumulación de algunas proteínas necesarias para la germinación, lo que sugiere que esta chaperona podría tener otras funciones en la célula. Por lo que la ganancia de la función, de manera constitutiva, podría afectar otros procesos celulares. Una posibilidad para usar a la HSP101 como activador traduccional de  $\Omega$ -mRNAs que codifiquen proteínas clave para el mejoramiento del maíz, es utilizar promotores inducibles de tejido específico o del desarrollo. Por consiguiente, el siguiente paso es i) medir los niveles de citocininas en las semillas de plantas mutantes L10 (*hsp101-m5::Mu1/hsp101-m5::Mu1*) y de semillas de plantas silvestres *hsp101/hsp101* de ejes quiescentes, durante la germinación y la postgerminación. ii) Comparar el proteoma, entre las semillas de plantas mutantes L10 (*hsp101-m5::Mu1/hsp101-m5::Mu1*) y las semillas de plantas silvestres *hsp101/hsp101*, en tejidos específicos a estadios post-germinativos del maíz, para identificar proteínas reguladas por la HSP101 durante la post-germinación. iii) Estudiar la interacción de la HSP101 con factores traduccionales nucleares para comprender su modo de acción en el núcleo y nucleolo (Nieto-Sotelo y col., 2002), en su posible papel como transportador de mRNAs específicos para su traducción en el citoplasma.



### XIII. BIBLIOGRAFÍA

**Agrawal GK, Thelen JJ. (2009).** A high-resolution two dimensional Gel- and Pro-Q DPSbased proteomics workflow for phosphoprotein identification and quantitative profiling. *Methods Mol Biol.* 527:3-19.

**Almoguera C, Rojas A, Díaz-Martín J, Prieto-Dapena P, Carranco R, Jordano J. (2002).** A seed-specific heat-shock transcription factor involved in developmental regulation during embryogenesis in sunflower. *Journal of Biological Chemistry* 277: 43866-43872.

**Almoguera C, Prieto-Dapena P, Jordano J. (1998).** Dual regulation of a heat shock promoter during embryogenesis: stage-dependent role of heat shock elements. *The Plant Journal* 13: 437-446.

**Bessman MJ, Frick DN, O'Handley SF (1996).** The MutT proteins or "Nudix" hydrolases, a family of versatile, widely distributed, "housecleaning" enzymes. *J Biol Chem* 271: 25059-25062.

**Browning, K.S. (2004).** Plant translation initiation factors: it is not easy to be green. *Post-Transcriptional Regulation of Plant Gene Expression.* 289-291.

**Barrero R. A, Umeda M, Yamamura S, Uchimiya H. (2002).** *Arabidopsis* CAP regulates the actin cytoskeleton necessary for plant cell elongation and division. *Plant Cell.* 14(1):149-63.

**Bewley, J. Derek. (1997).** "Seed Germination and Dormancy." *Plant Cell* : 1055–1066.

**Bienz M, Pelham HRB. (1987).** Mechanism of heat-shock gene activation in higher eukaryotes. *Advances in Genetic* 24: 31-72.

**Baniwal SK, Bharti K, Chan KY, Fauth M, Ganguli A, Kotak S, Mishra SK, Nover L, Port M, Scharf KD, Tripp J, Weber C, Zielinski D, von Koskull-Doring P. (2004).** Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. *Journal of Bioscience* 29: 471-87.

**Basha E, Lee GJ, Breci LA, Hausrath AC, Buan NR, Giese KC, Vierling E. (2004).** The identity of proteins associated with a small heat shock protein during heat stress in vivo indicates that these chaperones protect a wide range of cellular functions. *J Biol Chem* 279:7566–7575.

**Cabiscol E, Bellí G, Tamarit J, Echave P, Herrero E, Ros J. (2002).** Mitochondrial HSP60, resistance to oxidative stress, and the labile iron pool are closely connected in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 277:44531–44538.

**Carranco R, Almoguera C, Jordano J. (1997).** A plant small heat shock protein gene expressed during zygotic embryogenesis but noninducible by heat stress. *Journal of Biological Chemistry* 272: 27470-27475.

**Carranco R, Almoguera C, Jordano J. (1999)** An imperfect heat shock element and different upstream sequences are required for the seed-specific expression of a small heat shock protein gene. *Plant Physiology* 121: 723-730.

**Casaretto, J. A., Ho, T.-h. D. (2003).** The transcription factors HvABI5 and HvVP1 are required for the abscisic acid induction of gene expression in barley aleurone cells. *Plant Cell*, 15, 271-284.

**Chang C. C., Huang Pin-Sheng, Lin Huei-Ru y Lu Chun-Hsien. (2007).** Transactivation of protein expression by rice HSP101 in planta and using HSP101 as a selection marker for transformation. *Plant Cell Physiol.* 48(8): 1098–1107.

**Christian Dumas y Peter Rogowsky (2008).** Fertilization and early seed formation. *C. R. Biologies* 331. 715–725

**Coca MA, Almoguera C, Thomas TL y Jordano J. (1996)** Differential regulation of small heat-shock genes in plants: analysis of a water-stress-inducible and developmentally activated sunflower promoter. *Plant Molecular Biology* 31: 863-876.

**Czarnecka-Verner E, Yuan CX, Scharf KD, English G y Gurley WB. (2000).** Plants contain a novel multi-member class of heat shock factors without transcriptional activator potential. *Plant Molecular Biology* 43: 459–471.

**Czarnecka-Verner E, Pan S, Salem T y Gurley WB. (2004).** Plant class B HSFs inhibit transcription and exhibit affinity for TFIIB and TBP. *Plant Molecular Biology.* 56: 57–75.

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

**Dinkova, T.D., Aguilar R. y Sánchez de Jiménez E. (2000).** Expression of maize initiation factor eIF(iso)4E is regulated at translational level. *Biochemical J.* 351: 825-831.

**Dello Ioio R, Linhares FS, Scacchi E, Casamitjana-Martinez E, Heidstra R, Costantino P y Sabatini S. (2007).** Cytokinins determine *Arabidopsis* root-meristem size by controlling cell differentiation. *Curr Biol.* 17:678–682

**Doerwald L, van Genesen ST, Onnekink C, Marín-Vinader L, de Lange F, de Jong WW y Lubsen NH. (2006).** The effect of  $\alpha$ B-crystallin and HSP27 on the availability of translation initiation factors in heat-shocked cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 63; 735–743.

**Felsheim RF, Das A. (1992)** Structure and expression of a heat-shock protein 83 gene of *Pharbitis nil*. *Plant Physiology.* 100: 1764–1771.

**Felts SJ, Owen BAL, Nguyen PM, Trepel J, Donner DB, Toft DO. (2000)** The Hsp90-related protein TRAP1 is a mitochondrial protein with distinct functional properties. *Journal of Biological Chemistry.* 275: 3305–3312.

**Furihata, T., Maruyama, K., Fujita, Y., Umezawa, T. y col., (2006).** Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 1988–1993.

**Frebortova J (2010).** Function of plant defense secondary metabolite in cytokinin degradation. *Plant Signal Behav.* 5 (5).

**Freire M. Angel. (2005).** Translation initiation factor (iso) 4E interacts with BTF3, the h subunit of the nascent polypeptide-associated complex. *Gene.* 345:271–277.

**Gallie, D.R. (2002)** The 5'-leader of tobacco mosaic virus promotes translation through enhanced recruitment of eIF4F. *Nucleic Acids Res.* 30: 3401–3411.

- Gallie, D.R., Le, H., Tanguay, R.L., Browning, K.S. (1998).** Translation initiation factors are differentially regulated in cereals during development and following heat shock. *Plant J.* 14, 715–722.
- Galloni, M., Edgar, B., 1999.** Cell-autonomous y non-autonomous growth-defective mutants of *Drosophila melanogaster*. *Development.* 126, 2365–2375.
- Gingras, A. C., Raught, B., Gygi, S. P., Niedzwiecka, A., Miron, M., Burley, S. K., y col., (2001).** Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes Dev.*, 15, 2852–2864.
- Gómez-Cardenas, A., Zentella, R., Walker-Simmons, M. K., Ho, T. H. D. (2001).** Gibberellin/abscisic acid antagonism in barley aleurone cells: site of action of the protein kinase PKABA1 in relation to gibberellin signaling molecules. *Plant Cell*, 13, 667–679.
- Helm, K.W., Lee, G.J. & Vierling, E. (1997).** Expression and native structure of cytosolic class II small heat shock proteins. *Plant Physiol.* 114, 1477–1485.
- Hong, S.W., Lee, U. y Vierling, E. (2003).** Arabidopsis hot mutants define multiple functions required for acclimation to high temperatures. *Plant Physiol.* 132: 757–767.
- Houston NL, Hajduch M, Thelen JJ. (2009).** Quantitative proteomics of seed filling in castor: comparison with soybean and rapeseed reveals differences between photosynthetic and nonphotosynthetic seed metabolism. *Plant Physiol.* 151(2):857-6.
- Joshi, B., Cameron, A., Jagus, R., 2004.** Characterization of mammalian eIF4E-family members. *Eur. J. Biochem.* 271, 2189–2203.
- Katschinski DM. (2004).** On Heat and Cells and Proteins. *News Physiology Science.* 19: 11-15.
- Kakimoto T. (2001).** Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiol.* 42:677–685.
- Kapp, L.D. y Lorsch, J.R. (2004)** The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 657–704.
- Kim BH, Schoffl F. (2002).** Interaction between Arabidopsis heat shock transcription factor 1 and 70 kDa a heat shock proteins. *Journal of Experimental Botany.* 53: 371-375.
- Kozak, M. (2006)** Rethinking some mechanisms invoked to explain translational regulation in eukaryotes. *Gene.* 382, 1–11.
- Kruger N. J. , von Schaewen A. (2003).** "The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation". *Curr. Opin. Plant Biol.* 6 (3): 236–46.
- Koning, AJ, Rose R, Comai L. (1992).** Developmental expression of tomato heat-shock cognate protein 80. *Plant Physiology* 100: 801–811.
- Krishna P, Gloor G. (2001).** The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress & Chaperones* 6: 238–246.
- Krishna P, Sacco M, Cherutti JF, Hill S. (1995).** Cold-induced accumulation of Hsp90 transcripts in *Brassica napus*. *Plant Physiology* 107: 915–923.

- Kriz, A.L., Wallace, M.S. y Paiva, R. (1990).** Globulin gene expresión in embryos of maize viviparous mutants: evidence for regulation of the *Glb1* gene by ABA. *Plant Physiol.* 92: 538-542.
- Kurakawa T, Ueda N, Maekawa M, Kobayashi K, Kojima M, Nagato Y, Sakakibara H, Kyojuka J. (2007).** Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature.* 445:652–655.
- Lazaro-Mixteco P.E. y Dinkova T.D. (2012).** Identification of proteins from Cap-binding complexes by mass spectrometry during maize (*Zea mays* L.) germination. *J. Mex. Chem. Soc* 56, 36-50.
- Lapik, Y. R., Kaufman, L. S. (2003).** The *Arabidopsis* cupin domain protein *AtPirin1* interacts with the G protein subunit GPA1 and regulates seed germination y early seedling development *Plant Cell*, 15, 1578–1590.
- Lee JH, Schoffl F. (1996).** An HSP70 antisense gene affects the expression of HSP70/HSC70, the regulation of HSF, and the acquisition of thermotolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Genetics y Genomics.* 252: 11-19.
- Lee, G.J., Pokala, N. & Vierling, E. (1995).** Structure y in Vitro molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from pea. *J. Biol. Chem.* 270, 10432–10438.
- Ling, J., Wells, D.R., Tanguay, R.L., Dickey, L.F., Thompson, W.F. y Gallie, D.R. (2000)** Heat shock protein HSP101 binds to the Fed-1 internal light regulatory element and mediates its high translational Activity. *Plant Cell.* 12 (7): 1213–1228.
- Lindberg B, Klenow H, Hansen K (1967).** "Some properties of partially purified mammalian adenosine kinase". *J. Biol. Chem.* 242 (3): 350–6.
- López-Frías G, Martínez LM, Ponce G, Cassab GI, Nieto-Sotelo J (2011).** Role of HSP101 in the stimulation of nodal root development from the coleoptilar node by light and temperature in maize (*Zea mays* L.) seedlings. *J Exp Bot* 62: 4661- 4673.
- Lohmann C, Eggers-Schumacher G, Wunderlich M, Schöffl F. (2004).** Two different heat shock transcription factors regulate immediate early expression of stress genes in *Arabidopsis*. *Molecular Genetics y Genomics* 271: 11–21.
- Löw D, Brändle K, Nover L, Forreiter C. (2000)** Cytosolic heat-stress proteins Hsp17.7 class I and Hsp 17.3 class II of tomato act as molecular chaperones *in vivo*. *Planta* 211: 575-582.
- Lubaretz O, zur Nieden U. (2002)** Accumulation of plant small heat-stress proteins in storage organs. *Planta* 215: 220–228.
- Luján R, Lledías F, Martínez LM, Barreto R, Cassab GI, Nieto-Sotelo J. (2009).** Small heat shock proteins and leaf cooling capacity account for the unusual heat tolerance of the central spike leaves in *Agave tequilana* var. *Weber*. *Plant Cell and Environment.* 32, 1791–1803.
- Mak, Y. X., Willows, R. D., Roberts, T. H., Wrigley, C. W. y col., (2009).** Germination of wheat: a functional proteomics analysis of the embryo. *Cereal Chem.*, 86, 281–289.
- Marrs KA, Casey ES, Capitant SA, Bouchard RA, Dietrich PS, Mettler IJ, Sinibaldi RM. (1993).** Characterization of two maize HSP90 heat shock protein genes: expression during heat shock,

embryogenesis and pollen development. *Developmental Genetics*. 14: 27–41.

**Manjunath S, Lee CH, VanWinkle P, Bailey-Serres J (1998).** Molecular and biochemical characterization of cytosolic phosphoglucomutase in maize. Expression during development and in response to oxygen deprivation. *Plant Physiol* 117: 997-1006.

**Maurizi M.R. y Xia, D. (2004).** Protein binding and disruption by Clp/ Hsp100 chaperones. *Structure (Camb.)*. 12, 175–183

**Mok, D.W.S y M.C. Mok (2001).** Cytokinin metabolism y action. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 52, 89-118.

**Mok, M.C. (1994).** Cytokinins and plant development: an overview. pp. 155-166. En: Mok, D.W.S. y M.C. Mok (eds.) *Cytokinins: chemistry, activity, and function*. CRC, Boca Raton, FL.

**Moffatt BA, Stevens YY, Allen MS, Snider JD, Pereira LA, y col., (2002).** Adenosine kinase deficiency is associated with developmental abnormalities and reduced transmethylation. *Plant Physiol* 128: 812-821.

**Morant AV, Jorgensen K, Jorgensen C, Paquette SM, Sanchez-1 Perez R, y col., (2008).** beta-Glucosidases as detonators of plant chemical defense. *Phytochemistry* 69:1795-1813.

**Morimoto RI. (1998)** Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes & Development* 12: 3788–3796.

**Nieto-Sotelo, J. (2008).** Las desagregasas: herramientas moleculares contra los efectos del estrés y de las enfermedades neurodegenerativas en: Lopez-Munguia, A. Una ventana al quehacer científico. Instituto de Biotecnología de la UNAM. 25 aniversario, cap 21. Mexico, D.F.. UNAM. 239-252.

**Nieto-Sotelo, J., Martinez, L.M., Ponce, G., Cassab, G.I., Alagon, A., Meeley, R.B., Ribaut, J.M. y Yang, R. (2002).** Maize HSP101 plays important roles in both induced and basal thermotolerance and primary root growth. *Plant Cell* 14: 1621–1633.

**Nieto-Sotelo J, Kannan K.B., Segal M.C. (1999).** Characterization of a maize heat-shock protein 101 gene, HSP101, encoding a ClpB/Hsp100 protein homologue. *Gene* 230: 187-195.

**Nieto-Sotelo J., Wiederrecht, G., Okuda, A. and C.S. Parker. (1990).** The Heat Shock Transcription Factor contains a transcriptional activation domain whose activity is repressed under non-shock conditions. *Cell*. 62. 807-817.

**Nover L, Scharf KD. (1997).** Heat stress proteins y transcription factors. *Molecular y Cellular Life Science* 53: 80-103.

**Nover L, Bharti K, Döring P, Mishra SK, Ganguli A, Scharf KD. (2001).** *Arabidopsis* and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need?. *Cell Stress & Chaperones* 6: 177-189.

**Ogawa T, Ishikawa K, Harada K, Fukusaki E, Yoshimura K, y col., (2009).** Overexpression of an ADP-ribose pyrophosphatase, AtNUDX2, confers enhanced tolerance to oxidative stress in *Arabidopsis* plants. *Plant J* 57: 289-301.

- Owens-Grillo JK, Stancato LF, Hoffmann K, Pratt WB, Krishna P. (1996).** Binding of immunophilins to the 90 kDa heat shock protein (Hsp90) via a tetratricopeptide repeat domain is a conserved protein interaction in plants. *Biochemistry*. 35: 15249–15255.
- Pain, V.M. 1996.** Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells. *Eur. J. Biochem.* 236, 747–771.
- Yong Peng, Liu X. and Schoenberg D. R.(2008).** The 90-kDa Heat Shock Protein Stabilizes the Polysomal Ribonuclease 1 mRNA Endonuclease to Degradation by the 26S Proteasome. *Mol Biol Cell*. 19; 546–552,
- Prändl R, Kloske E, Schöffl F. (1995)** Developmental regulation y tissuespecific differences of heat shock gene expression in transgenic tobacco and *Arabidopsis* plants. *Plant Molecular Biology* 28: 73-82.
- Pandey, S., Nelson, D. C., Assmann, S. M. (2009).** Two novel GPCR-type G proteins are abscisic acid receptors in *Arabidopsis*. *Cell* , 136, 136–148.
- Pearl LH, Prodromou C. (2000).** Structure and *in vivo* function of Hsp90. *Current Opinion in Structural Biology*. 10: 46–51.
- Phillips D, Aponte AM, French SA, Chess DJ, Balaban RS. (2009).** Succinyl-CoA synthetase is a phosphate target for the activation of mitochondrial metabolism. *Biochemistry*; 48(30):7140-9.
- Picard D. (2002).** Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 59:1640–1648.
- Pla, M., Gomez, J., Goday, y Pages, M. (1991).** Regulation of the abscisic acid responsive gen rab28 in maize viviparous mutan. *Mol. Gen. Genet.* 230, 394-400.
- Queitsch C, Sangster TA, Lindquist S. (2002).** Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. *Nature*. 417: 618–624.
- Queitsch, C., Hong, S.W., Vierling, E. y Lindquist, S. (2000)** Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 479–492.
- Rajjou L, Lovigny Y, Groot SPC, Belghazi M, Job C, Job D. (2008).** Proteome-wide characterization of seed aging in *Arabidopsis*: a comparison between artificial and natural aging protocols. *Plant Physiol* 148:620–641.
- Rafael Cuesta, Gaurav Laroia, y Robert J. Schneider (2000).** Chaperone HSP27 inhibits translation during heat shock by binding eIF4G and facilitating dissociation of cap-initiation complexes. *Genes & Dev.* 14: 1460-1470.
- Reddy RK, Kurek I, Silverstein AM, Chinkers M, Breiman A, Krishna P. (1998).** High molecular weight FK506-binding proteins are components of heat shock protein 90 heterocomplexes in wheat germ lysate. *Plant Physiology*. 118: 1395–1401.
- Richter, J.D. y Sonenberg, N. (2005)** Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* 433, 477–480.
- Robaglia C. 2000.** Plant lipoxygenase 2 is a translation initiation factor-4E-binding protein. *Plant Molecular Biology* 44: 129–140.

- Rutherford SL, Lindquist S. (1998).** Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature*. 396: 336–342.
- Sakakibara H, Takei K, Hirose N (2006).** Interactions between nitrogen and cytokinin in the regulation of metabolism y development. *Trends Plant Sci*. 11: 440-448.
- Saleem M, Lamkemeyer T, Schutzenmeister A, Madlung J, Sakai H, y col., (2010).** Specification of cortical parenchyma y stele of maize primary roots by asymmetric levels of auxin, cytokinin, and cytokinin-regulated proteins. *Plant Physiol* 152: 4-18.
- Santner, A., Estelle, M. (2009).** Recent advances y emerging trends in plant hormone signaling. *Nature*, 459, 1071–1078.
- Stancato LF, Hutchison KA, Krishna P, Pratt WB. (1996).** Animal and plant cell lysates share a conserved chaperone system that assembles the glucocorticoid receptor into a functional heterocomplex with Hsp90. *Biochemistry*. 35: 554–561.
- Stone, S. L., Williams, L. A., Farmer, L. M., Vierstra, R. D. y col.,(2006).** KEEP ON GOING, abscisic acid signaling. *Plant Cell*. 18, 3415–3428.
- Schöffl F, Prändl R, Reindl A. (1998)** Regulation of the Heat-Sock Response. *Plant Physiology* 117: 1135-1141.
- Sun W, Van Montagnu M, Verbruggen N. (2002).** Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1577: 1-9.
- Suragani M., Rasheedi S., Hasnain S. E., Ehtesham N. Z. (2011).** The translation initiation factor, PeIF5B, from *Pisum sativum* displays chaperone activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 414 :390–396..
- Takahashi T, Naito S, Komeda Y. (1992).** Isolation and analysis of the expression of two genes for the 81-kilodalton heat-shock proteins from *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 99: 383–390.
- Van Montfort, R.L.M., Basha, E., Friedrich, K.L., Slingsby, C. & Vierling, E. (2001).** Crystal structure y assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nat. Struct. Biol*. 8, 1025–1030.
- Veerasamy M, He Y, Huang B (2007).** Leaf senescence and protein metabolism in creeping bentgrass exposed to heat stress and treated with cytokinins. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 132: 467-472.
- Virginia Walbot y Matthew M. S. Evans (2003).** Unique features of the plant life cycle and their consequences. *Nature Reviews Genetics* 4. 369-379.
- Von Rad U, Huttl R, Lottspeich F, Gierl A, Frey M (2001).** Two glucosyltransferases are involved in detoxification of benzoxazinoids in maize. *Plant J* 28: 633-642.
- Waters ER, Lee GJ, Vierling E. (1996)** Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *Journal of Experimental Botany* 47: 325-338.
- Warner, J.R.(1990).** The nucleolus and ribosome formation. *Curr. Opinions Cell Biol*. 2, 521-527.

**Wells, D.R., Tanguay, R.L., Le, H., Gallie, D.R., 2004.** HSP101 functions as a specific translational regulatory protein whose activity is regulated by nutrient status. *Genes Dev.* 12, 3236–3251.

**Wells, S. E., Hillner, P. E., Vale, R. D. & Sachs, A. B (1998).** Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol. Cell* 2, 135–140.

**Werner T, Motyka V, Laucou V, Smets R, Van Onckelen H, y col., (2003).** Cytokinin deficient transgenic Arabidopsis plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* 15: 2532-2550.

**Werner T, Kollmer I, Bartrina I, Holst K, Schmülling T (2006)** New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant Biol* 8:371–381.

**White, C. N., Proebsting, W. M., Hedden, P., Rivin, C. J. (2000).** Gibberellins and seed development in maize. I. Evidence that gibberellin/abscisic acid balance governs germination versus maturation pathways. *Plant Physiol.* 122, 1081–1088.

**Yabe N, Takahashi T, Komeda Y. (1994).** Analysis of tissue-specific expression of *Arabidopsis thaliana* Hsp90-family gene *HSP81*. *Plant Cell Physiology.* 35: 1207–1219.

**Young JC, Moarefi I, Hartl FU. (2001).** Hsp90: a specialized but essentials protein-folding tool. *The Journal of Cell Biology.* 154: 267–273.

**Zandi E, Tran TN, Chamberlain W, Parker CS. (1997)** Nuclear entry, oligomerization, y DNA binding of the *Drosophila* heat shock transcription factor are regulated by a unique nuclear localization sequence. *Genes & Development* 11: 1299-1314.

**Zhang Z, Quick MK, Kanelakis KC, Gijzen M, Krishna P. (2003).** Characterization of a Plant Homolog of Hop, a Cochaperone of Hsp90. *Plant Physiology,* 131: 525–535.

**Zhang, C. y Guy, C.L. (2005)** Co-immunoprecipitation of HSP101 with cytosolic Hsc70. *Plant Physiol. Biochem.* 43: 13–18.

**Zhang X, Ervin EH (2008).** Impact of Seaweed Extract-1 Based Cytokinins and Zeatin Riboside on Creeping Bentgrass Heat Tolerance. *Crop Science* 48.

**Zhou Y, Chen H, Chu P, Li Y, Tan B, Ding Y, Tsang EW, Jiang L, Wu K, Huang S (2011).** NnHSP17.5, a cytosolic class II small heat shock protein gene from *Nelumbo nucifera*, contributes to seed germination vigor y seedling thermotolerance in transgenic Arabidopsis. *Plant Cell Rep.* 31(2):379-89.



## **XIV. ANEXOS**

XIV.1. Tight translational control by the initiation factors eIF4E and eIF(iso)4E is required for maize seed germination. Seed Science Research .

XIV.2. Identification of proteins from Cap-binding complexes by mass spectrometry during maize (*Zea mays* L.) germination.

# The Absence of Heat Shock Protein HSP101 Affects the Proteome of Mature and Germinating Maize Embryos

Pedro E. Lázaro-Mixteco,<sup>†</sup> Jorge Nieto-Sotelo,<sup>‡</sup> Kirby N. Swatek,<sup>§</sup> Norma L. Houston,<sup>§</sup> Guillermo Mendoza-Hernández,<sup>#</sup> Jay J. Thelen,<sup>§</sup> and Tzvetanka D. Dinkova<sup>\*,†</sup>

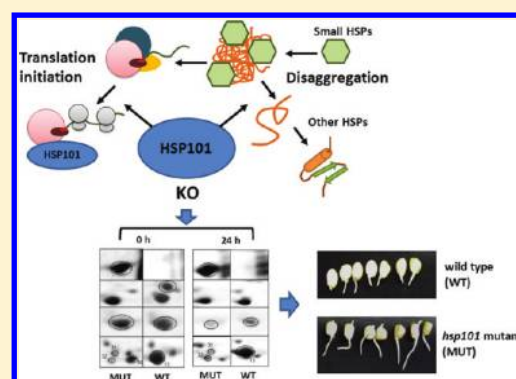
<sup>†</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, <sup>‡</sup>Jardín Botánico, Instituto de Biología, and <sup>#</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F., Mexico

<sup>§</sup>Interdisciplinary Plant Group and Division of Biochemistry, 109 Bond Life Sciences Center, University of Missouri—Columbia, Columbia, Missouri 65211, United States

## S Supporting Information

**ABSTRACT:** Maize heat shock protein HSP101 accumulates during embryo maturation and desiccation and persists at high levels during the first 24 h following kernel imbibition in the absence of heat stress. This protein has a known function in disaggregation of high molecular weight complexes and has been proposed to be a translational regulator of specific mRNAs. Here, a global proteomic approach was used to identify changes in the maize proteome due to the absence of HSP101 in embryos from mature-dry or 24 h-imbibed kernels. A total of 26 protein spots from the mature dry embryo exhibited statistically significant expression changes in the L10 inbred *hsp101* mutant (*hsp101-m5::Mu1/hsp101-m5::Mu1*) line as compared to the corresponding wild type (*Hsp101/Hsp101*). Additional six spots reproducibly showed qualitative changes between the mutant and wild-type mature and germinating embryos. Several chaperones, translation-related proteins, actin, and enzymes participating in cytokinin metabolism were identified in these spots by tandem mass-spectrometry (MS). The proteomic changes partially explain the altered root growth and architecture observed in young *hsp101* mutant seedlings. In addition, specific protein de novo synthesis was altered in the 24 h-imbibed mutant embryos indicating that maize HSP101 functions as both chaperone and translational regulator during germination. Supporting this, HSP101 was found as part of Cap-binding and translation initiation complexes during early kernel imbibition. Overall, these findings expose the relevance of maize HSP101 for protein synthesis and balance mechanisms during germination.

**KEYWORDS:** heat shock protein HSP101, polyribosomes, translation, plant proteomics, *Zea mays*



## INTRODUCTION

The mature maize kernel or caryopsis is a one-seeded fruit, in which the seed, composed of embryo (central axis surrounded by scutellum), endosperm, and remnants of seed coat and nucellus, is enclosed by the pericarp.<sup>1</sup> During the maturation process, the maize caryopsis decreases its relative water content until a quiescent metabolic state is achieved. This desiccation event allows the embryo survival and maintenance under a variety of conditions.<sup>2</sup> Along with other metabolic processes, protein synthesis has significant changes in the late stages of caryopsis development. Following the completion of seed storage protein accumulation, the levels of free amino acids, sugars, and degraded fatty acids, relevant for the supply of energy required during imbibition and germination phases, increase concomitantly with the desiccation tolerance of the caryopsis.<sup>3</sup> The mature caryopsis contains all the machinery required to initiate protein synthesis immediately upon imbibition, which at the very first stages of germination is supported exclusively by a pool of stored mRNAs.<sup>4</sup> This pool

largely contains transcripts that are required for germination, as well as mRNAs remaining from the caryopsis maturation process. At subsequent germination stages, other mRNAs are synthesized to facilitate root emergence.

Stored or newly transcribed mRNA pools are selectively translated at specific times in the course of development.<sup>5</sup> One regulatory mechanism for selective translation of mRNAs involves eukaryotic translation initiation factor (eIF) 4E that recognizes the Cap structure (7mGpppN, where N is any nucleotide) at the 5' end of mRNAs. This protein acts during translation initiation by formation of a complex with platform protein, eIF4G, which recruits 43S preinitiation complex formed by eIF3, ternary complex (eIF2-Met-tRNA<sup>Met</sup>-GTP), 40S ribosomal subunit, and other initiation factors.<sup>6</sup> The Cap-binding protein eIF4E has a highly conserved amino acid sequence in all organisms allowing for its direct contact with

Received: January 2, 2012

Published: April 30, 2012

the Cap structure.<sup>7</sup> eIF4G interacts with eIF4E through an YXXXXLΦ motif (where X is any amino acid and Φ is a hydrophobic residue) and stabilizes the interaction with the 5' Cap, forming an eIF4F-mRNA complex. The interaction between 5' Cap and the translational machinery is prevented by the binding of eIF4E to other cellular proteins through the same motif used for its interaction with eIF4G. By such means, cells can modulate either global translation levels, or specific mRNA recruitment.<sup>8</sup>

Multiple eIF4E family members have been identified in a wide range of organisms including plants, flies, mammals, frogs, birds, nematodes, and fish.<sup>9</sup> eIF4E family members show different Cap-binding affinities or altered interactions with eIF4G and other proteins, providing clues to their physiological roles. It has been suggested that each organism has at least one eIF4E that is ubiquitous and constitutively expressed to carry out basal translation levels, and that other family members are involved in specialized functions. In maize caryopses, the Cap-binding complex formed by eIF(iso)4E and eIF(iso)4G is predominant over eIF4E and eIF4G at the mature dry stage, but after 24 h of imbibition, both complexes are present at similar levels.<sup>10</sup> Recently, two proteins belonging to the heat shock protein (HSP) family, HSP101 and HSP70, were identified as interactors of the Cap-binding complexes in fully mature dry caryopses, but not in caryopses imbibed for 24 h.<sup>11</sup> This finding can be interpreted as evidence for a possible role of chaperones in the initiation of protein synthesis during caryopsis development.

The accumulation of many HSPs in the mature embryo is controlled during caryopsis development in a heat shock-independent manner.<sup>12,13</sup> Many HSPs appear before the onset of desiccation and are present several days after germination.<sup>12–15</sup> Although it has been suggested that HSPs may function in desiccation tolerance,<sup>14</sup> their role in the seed development and germination is not yet clear as these processes are normal in heat shock protein mutants.<sup>14–16</sup>

Plant HSP101 proteins are members of the ClpB protein subfamily that plays an important role in heat induced thermo-tolerance.<sup>17</sup> HSP101 accumulates during development of the maize caryopsis and usually disappears within the first 3 days after imbibition.<sup>14</sup> HSP101 localizes to the cytoplasm, the nucleus, and some nucleoli. During the first 3 days after caryopsis imbibition, maize *Hsp101* gene knockouts show increased primary root growth at optimal temperature<sup>14</sup> indicating that HSP101 may act as negative regulator of plant growth. HSP101 also inhibits nodal root development in maize seedlings grown in the dark and in seedlings stimulated by light or high temperature.<sup>15</sup>

In addition to its role as a chaperone, HSP101 has been proposed to function as a translational regulator. HSP101 binds to the omega (Ω) sequence found in the 5'-untranslated region (UTR) of tobacco mosaic virus (TMV) and to the internal light-regulatory element (iLRE) of ferredoxin mRNA enhancing the translation of reporter genes containing these sequences, when expressed in yeast or carrot protoplasts.<sup>18,19</sup> A current working model proposes that HSP101 enhances translation of 5' Ω or iLRE carrying mRNAs through its interaction with the translation initiation factors eIF4G and eIF3.<sup>18,20</sup>

As already mentioned above, HSP101 interacts with Cap-binding complexes in mature maize caryopses, but not in caryopses imbibed for 24 h.<sup>11</sup> This result substantiates the hypothesis that HSP101 has a supporting role in the initiation

of protein synthesis and/or in the early steps of folding of native protein structures during maize caryopsis development and perhaps caryopsis germination. To assess the relevance of HSP101 during protein accumulation in mature maize caryopses, the proteomes of wild-type and previously characterized *hsp101* knockout insertion mutant lines were analyzed. The results showed 26 differentially expressed protein spots ( $p < 0.05$ ) in the mature dry embryo with isoelectric points (pI) between 4 and 7. Additionally, six spots reproducibly showed qualitative changes between the mutant and wild-type mature and germinating embryo. Among them, several HSP family members, translation-related proteins, and enzymes of the cellular metabolism were found. During caryopsis germination, a differential distribution of HSP101 along sucrose polyribosomal gradients was observed between 0 and 24 h of imbibition. The global de novo protein synthesis during germination was not affected by the absence of HSP101; however specific proteins showed differential in vivo labeling or accumulation patterns in the *hsp101* mutant. Overall, these results indicate that HSP101 seems to play specific roles in protein synthesis that are reflected in the maize embryo proteome from mature and germinating caryopsis.

## ■ MATERIALS AND METHODS

### Plant Materials and Growth Conditions

Two previously reported maize (*Zea mays* L.) *hsp101* mutant alleles and their corresponding near-isogenic wild-type lines were used for proteomic analysis, m<sup>7</sup>GTP-Sepharose-binding assay and protein labeling with [<sup>35</sup>S]-methionine. These were the inbred lines L4, mutant (*hsp101-m2::Mu1/hsp101-m2::Mu1*), wild type (*Hsp101/Hsp101*); and L10, mutant (*hsp101-m5::Mu1/hsp101-m5::Mu1*), wild type (*Hsp101/Hsp101*). A Mexican landrace Tuxpeño, var. Chalqueño was used to analyze the HSP101 protein distribution along sucrose gradients. For all experiments involving germination, the maize caryopses were imbibed in wet cotton sheets in the dark at 28 °C in an incubator. The embryos were excised manually from either quiescent or 24-h-imbibed caryopses.

### Isolation of Total Proteins

All reagents were purchased from Sigma-Aldrich Quimica, Mexico, unless otherwise stated. Excised embryos (250 mg) were homogenized in 10 mL of buffer containing 50% [v/v] phenol, pH 8.8, 0.9 M sucrose, 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.4% [v/v] 2-mercaptoethanol, 100 mM Tris-HCl, pH 8.8, EDTA-free protease inhibitors (Complete, Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA) using a mortar and pestle. The homogenate was agitated for 30 min at 4 °C on a shaker. After a 15 min centrifugation at 10 000g and 4 °C, the phenol phase was removed and proteins were precipitated with 5 vol of ice-cold 0.1 M ammonium acetate in 100% methanol at –80 °C for 2 h. The protein pellet was recovered by 10 min centrifugation at 10 000g, washed twice in 10 mL of 0.1 M ammonium acetate in 100% methanol, twice in ice-cold 80% acetone, and once in 70% ethanol. The pellet was dried for 5 min at room temperature and resuspended immediately in 1 mL of isoelectrofocusing (IEF) buffer containing 8 M urea, 2 M thiourea, 4% (w/v) CHAPS, 2% (v/v) Triton X-100, 50 mM dithiothreitol (DTT), and EDTA-free Complete protease inhibitors. Insoluble matter was removed by centrifugation for 20 min at 18 000g. Protein concentration was determined in triplicate against a standard curve of bovine serum albumin

(BSA) using a protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA) based on a Bradford<sup>21</sup> modified procedure.

### Isolation of Cap-Binding Proteins by m<sup>7</sup>GTP-Sepharose Affinity Chromatography

Sepharose bound to m<sup>7</sup>GTP was purchased from GE Healthcare (Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden), and equilibrated in Buffer A [20 mM HEPES, pH 7.6, 100 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 10% (v/v) glycerol, 0.1% (v/v) Triton X-100, 0.5 mM dithiothreitol] prior to use. For Cap-binding complexes purification, 2 g of excised embryos from mutant and wild-type (WT) L4 and L10 caryopses was used. Axes were pulverized to a fine powder in liquid nitrogen with a mortar and pestle. The powder was suspended in 15 mL of Buffer A containing Complete EDTA-free protease inhibitors. The extracts were clarified by centrifugation at 20 000g and 4 °C for 30 min. The supernatants were filtered through 8 layers of cheesecloth, 0.5 mL of m<sup>7</sup>GTP-Sepharose was added, and the mixture was incubated with gentle agitation for 1.5 h at 4 °C. The bead slurry was poured onto a 10 mL Column (Bio-Rad). The sepharose beads were washed first with 10 mL of Buffer A, and then with 10 mL of Buffer A including 0.1 mM GTP. The m<sup>7</sup>GTP-Sepharose-bound proteins were eluted with Buffer A containing 0.2 mM m<sup>7</sup>GTP in five fractions of 400  $\mu$ L each. Fifty microliters of each fraction was resolved by 15% (w/v) SDS-PAGE and silver-stained.

### Analysis of Sucrose Gradient Fractions (Polyribosomes)

One gram of excised embryos from dry (0 h) or imbibed for 12 h (12 h) and 24 h (24 h) caryopses was used. The axes were pulverized to a fine powder with liquid nitrogen and mortar and pestle. The powder was suspended in 6 mL of lysis buffer containing 200 mM Tris-HCl, pH 8.5, 50 mM KAc, 25 mM MgAc, 2 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA), and 0.01 mg/mL cycloheximide. The extract was clarified by centrifugation at 20 000g for 15 min at 4 °C. The supernatant was layered onto 2 mL of sucrose cushion buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 20 mM KAc, 10 mM MgAc, 60% sucrose, and 0.01 mg/mL cycloheximide) and centrifuged at 50 000 rpm in a 75Ti rotor (Beckman Coulter, Mexico City, Mexico) for 3 h. The pellet was resuspended in 1 mL of lysis buffer and layered on 10–35% sucrose gradient containing 50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 20 mM KAc, 10 mM MgAc, and 0.01 mg/mL cycloheximide. The gradient was centrifuged in SW-40 rotor (Beckman) at 37 000 rpm for 2.5 h at 4 °C. Fractionation and absorptivity at 260 nm of the gradient was done using the Auto Densi-flow system (Labconco, Kansas City, MO) connected to Econo UV Monitor EM-1 (Bio-Rad). Seventeen fractions (0.7 mL each) were collected for each sample and the RNA integrity was determined by electrophoresis. Proteins in each fraction were precipitated with 12% trichloroacetic acid (TCA). The protein pellets were resuspended in 100  $\mu$ L of distilled water, and 25  $\mu$ L of each fraction was resolved by SDS-PAGE.

### Western Blotting

Thirty micrograms of total protein extract or equal volumes of either cap-binding complexes or sucrose gradient fractions were loaded on a 15% SDS-PAGE gel and transferred onto a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Millipore Corp., Billerica, MA). After briefly drying, the membrane was blocked with 5% (w/v) fat-free milk in phosphate-buffered saline (PBS) for 1 h. Blocked membranes were incubated overnight at 4 °C with primary antibodies. The membranes were incubated with the secondary antibody for 2 h after 3 washes with PBS and 1%

(v/v) Tween 20. Detection was performed with the Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore). The primary antibody dilutions were as follows: the maize anti-HSP101,<sup>14</sup> the universal anti-HSP70 (Agrisera, Vännäs, Sweden), and the *Arabidopsis thaliana* anti-eEF1b- $\beta$  (Agrisera) were used at 1:1000 dilution; the wheat anti-eIF4F and anti-eIF(iso)4F (kindly donated by Karen S. Browning, University of Texas, Austin, TX) were used at 1:5000 dilution; the secondary antibody was used at 1:10 000 dilution.

### In Vivo Protein Labeling

Mutant and WT L4 and L10 caryopses were germinated for 21 h under the described conditions. Embryos were excised and placed in 2 mL of Murashige and Skoog media (MS) containing 150  $\mu$ Ci [<sup>35</sup>S]-methionine (Perkin-Elmer, Waltham, MA) and briefly vacuum infiltrated. Following incubation for 3 h with continuous agitation, the embryos were washed twice with label-free MS and total proteins were extracted. Clarified extracts (5  $\mu$ L) were used for radioactivity incorporation estimation. The amount of total protein and radioactivity incorporated into proteins was calculated and SDS-PAGE was performed to detect quantitative (equal protein quantity loaded) and qualitative (equal radioactivity loaded) differences.

### Two-Dimensional Gel Electrophoresis

Isolated proteins were separated by two-dimensional (2D) gel electrophoresis as described elsewhere.<sup>22</sup> Briefly, 1 mg of total protein was brought up to 450  $\mu$ L with IEF extraction buffer. IEF was performed in a Protean IEF cell unit (Bio-Rad) under the following conditions: active rehydration 50 V for 12 h, 100 V for 100 Vh, 500 V for 500 Vh, and 8000 V for 99 kVh. Following IEF, IPG strips were incubated in SDS equilibration buffer (1.5 M Tris-HCl, 6 M urea, 30% [v/v] glycerol, 5% [w/v] SDS) supplemented with 2% (w/v) DTT for 15 min, followed by incubation for 15 min in the same buffer supplemented with 2.5% (w/v) of iodoacetamide. IPG strips were briefly rinsed with SDS running buffer (25 mM Tris, 0.1% [w/v] SDS) and placed onto 12% acrylamide gels. Strips were then overlaid with 1% (w/v) agarose in SDS running buffer. The second-dimension SDS-PAGE was performed in a Ettan DALT 12 System (GE Healthcare) until the dye migrated off the gel. Following SDS-PAGE, gels were fixed with 50% methanol for 30 min and then, stained with Coomassie Colloidal (20% [v/v] ethanol, 1.6% [v/v] phosphoric acid, 8% [w/v] ammonium sulfate, 0.08% [w/v] Coomassie Brilliant Blue G-250) for at least 16 h. For S<sup>35</sup>-labeling analysis, after destaining, the gels were impregnated with Amplify, dried and exposed to an amplifier phosphor screen (GE Healthcare).

### MS Data Analysis and Protein Identification

Two-dimensional gels corresponding to three independent (different biological samples) trials were scanned using a ScanMaker 9800XL (Microtek, Carson, CA) (300 dpi; 16-bit grayscale pixel depth).<sup>23</sup> Scanned images were analyzed with ImageMaster 2D Platinum software version 6.0 (GE Healthcare) to detect, quantify, and match spots. To compensate for subtle differences in sample loading, gel staining, and destaining, the volume of each spot (i.e., spot abundance) was expressed as relative volume. Protein abundance was expressed as relative volume whereby the relative spot volume is each spot volume per total spot volume. Spots were analyzed further only if they were present in all biological samples. Spots were matched to a chosen reference gel and matched spots were termed spot groups. To identify statistically significant



**Table 1. Differentially Expressed Proteins Identified in Maize Embryos from Mature and Dry Caryopses of *hsp101* Mutant (*hsp101-m5::Mu1/hsp101-m5::Mu1*) vs. Wild Type (*Hsp101/Hsp101*) Using SEQUEST Search Algorithms**

protein ID <sup>a</sup>	spot no. <sup>b</sup>	accession <sup>c</sup>	expression ratio <sup>d</sup>	% protein coverage <sup>e</sup>	Xcorr <sup>f</sup>	no. of unique peptides <sup>g</sup>	total no. of peptide spectral matches <sup>h</sup>
Up-Regulated Proteins							
Heat shock protein 70 ( <i>Z. mays</i> ) <sup>3</sup>	24	GRMZM2G153815_P01	1.97	45.22	388.42	30	233
Phosphoglucosyl-transferase-cytoplasmic ( <i>Z. mays</i> ; EC:5.4.2.2) <sup>3‡</sup>	25	GRMZM2G109383_P02	1.49	28.62	146.36	23	88
RuBisCO large subunit-binding protein- $\alpha$ subunit ( <i>Z. mays</i> ) <sup>3‡</sup>	26	GRMZM2G434173_P01	2.86	40.68	332.98	29	203
UDP-glucosyl-transferase BX9 ( <i>Z. mays</i> ; EC:2.4.1.0) <sup>3‡</sup>	23	GRMZM2G161335_P01	1.55	36.72	157.55	16	104
Actin-1 ( <i>Z. mays</i> ) <sup>3‡</sup>	22	GRMZM2G126010_P01	1.65	56.1	235.05	16	88
Succinyl-CoA ligase, beta-chain ( <i>Z. mays</i> ) <sup>3‡</sup>	20	GRMZM2G064695_P04	1.59	26.24	98.95	14	62
Adenosine kinase ( <i>Z. mays</i> ; EC:2.7.1.0; EC:2.7.1.20) <sup>2‡</sup>	21	GRMZM2G540538_P01	1.91	43.57	185.67	12	48
Embryonic protein DC-8 ( <i>Z. mays</i> ) <sup>3‡</sup>	6	GRMZM2G063287_P01	1.27	55.42	440.2	32	245
Embryonic protein DC-8 ( <i>Z. mays</i> ) <sup>3‡</sup>	5	GRMZM2G063287_P01	2.56	48.46	195.42	23	112
6-Phosphoglucono-lactonase domain containing protein ( <i>Z. mays</i> ; EC:3.1.1.31) <sup>3</sup>	17	GRMZM2G148769_P01	2.07	37.69	73.54	12	46
Embryonic protein DC-8 ( <i>Z. mays</i> ) <sup>3‡</sup>	8	GRMZM2G371375_P01	3.08	27.71	82.01	10	52
Globulin-1 s allele precursor ( <i>Z. mays</i> ) <sup>2‡</sup>	11	GI 75140005	1.21	24.67	236.35	14	75
HSP20 Class IV heat shock protein precursor ( <i>Z. mays</i> ) <sup>2</sup>	12	GRMZM2G331701_P01	1.44	53.11	168.2	15	52
Dehydrin ( <i>Hordeum vulgare</i> )*	18	GI 226500940	2.48	5.09*	99.0*	-	-
Down-Regulated Proteins							
Elongation factor 2 ( <i>Z. mays</i> ) <sup>3‡</sup>	1	GRMZM2G040369_P01	0.47	39.34	275.77	26	122
Vicilin-like embryo storage protein ( <i>Z. mays</i> ) <sup>3‡</sup>	2	GRMZM2G067919_P02	0.4	36.91	334.46	25	202
Cupin protein family ( <i>Oryza sativa japonica</i> ) <sup>3‡</sup>	3	GRMZM2G078441_P01	0.71	13.23	242.93	16	138
Aldose Reductase ( <i>Z. mays</i> ) <sup>1‡</sup>	19	GRMZM2G059314_P01	0.57	29.13	111.13	12	33
Adenosine kinase ( <i>Z. mays</i> ; EC:2.7.1.0; EC:2.7.1.20) <sup>1‡</sup>	7	GRMZM2G540538_P01	0.27	32.46	131.04	9	36
Cupin protein family ( <i>O. sativa japonica</i> ) <sup>2</sup>	9	GRMZM2G078441_P01	0.61	17.27	250.56	12	74
Cupin protein family ( <i>O. sativa japonica</i> ) <sup>2‡</sup>	10	GRMZM2G078441_P01	0.63	24.09	420.54	18	115
Vicilin-like embryo storage protein ( <i>Z. mays</i> ) <sup>2</sup>	15	GRMZM2G067919_P02	0.63	22.16	262.1	15	69
HSP16.9D Class I heat shock protein 1 ( <i>Z. mays</i> ) <sup>2‡</sup>	13	GRMZM2G437100_P01	0.28	30.32	76.27	4	14
Globulin-1 s allele precursor ( <i>Zea mays</i> ) <sup>1‡</sup>	4	Gi 75140005	0.53	54.67	609.12	24	182
Globulin-1 s allele precursor ( <i>Z. mays</i> ) <sup>2</sup>	16	Gi 75140005	0.72	22.44	169.53	11	53
HSP17.4 Class I Heat shock protein 3 ( <i>Z. mays</i> ) <sup>2</sup>	14	AC208204.3_FGT006	0.81	28.93	85.42	4	29

<sup>a</sup>Asterisk (\*) indicates protein identified using PepNovo and MS BLAST sequence similarity searches. Numbers (1–3) indicate whether the protein identification was from (1) the wild-type, (2) *hsp101* mutant, or (3) both (*hsp101* mutant and wild-type) samples. Double dagger (‡) indicates protein spots with more than one protein identification. <sup>b</sup>Spot number associated with the wild-type reference gel. <sup>c</sup>Accession number from maize Unigene or NCBI protein database. <sup>d</sup>Expression ratio (*hsp101* knockout/wild type) determined from the average relative volume of each spot. <sup>e</sup>Average or identified, percent protein coverage from SEQUEST search algorithms. <sup>f</sup>Average or identified, combined Protein Xcorr values from SEQUEST search algorithms. <sup>g</sup>Represents the peptide unique identifiers of all master proteins from all protein groups. All were identified with high confidence. <sup>h</sup>Displays the total number of peptide spectrum matches (PSMs) from peptide unique identifiers.

expression changes between matched wild-type and mutant spot groups, a two-sample test was performed. Each spot group with a *t*-value greater than 2.78 which determines a statistical significance of  $p < 0.05$  was considered for significant protein expression changes between the mutant and wild-type maize samples. Spot identification criteria were as follows: (1) present in 3 of 3 gels in wild-type and mutant subclasses; (2) present in both wild-type and mutant reference gels; (3) *t*-value greater than 2.78. According to these three criteria, 26 spots were picked from a chosen reference gel of the wild-type and mutant samples for MS analysis (Table 1 and Supporting Information Table S1). Spots present or absent in the mutant versus wild-type comparison or changed in their accumulation at the 24 h-imbibed stage were subjected to qualitative analysis using three independent (different biological samples) replicate 2D gels. Those spots reproducibly detected in only the mutant or only

the wild-type samples were chosen for protein identification by MS (Table 2 and Supporting Information Table S2).

For the protein spots listed in Table 1 and Supporting Information Table S1, the mass spectrometry (MS) analysis was performed similarly to previous report.<sup>24</sup> Protein samples treated with trypsin were lyophilized for 4 h at 30 °C. Samples were resuspended in 50  $\mu$ L of 0.1% formic acid and centrifuged at 1000 rpm for 10 min. Digested protein (10  $\mu$ L) samples were analyzed on a LTQ Proteome X linear ion (Thermo Fisher, San Jose, CA). Before mass spectrometry analysis, peptides were concentrated with C<sub>8</sub> Captraps (Michrom Bioresources, Auburn, CA) and separated by a C<sub>18</sub> column using a 20 min acetonitrile (ACN) gradient 3%–97% solvent B (100% ACN in 1% (v/v) formic acid), in solvent A (0.1% (v/v) formic acid).

**Table 2. Proteins Preferentially Accumulated in Maize Embryos Isolated from Mature Dry (0 h) or Imbibed for 24 h (24 h) Caryopses from *hsp101* Mutant (mut) or Wild-Type (WT)**

protein (species)/AC <sup>a</sup>	spot no.	spot presence <sup>b</sup>	MASCOT score <sup>c</sup>	sequence coverage (%) <sup>d</sup>	M <sub>r</sub> predicted/ M <sub>r</sub> gel	pI predicted/ pI gel	no. unique peptides	emPAI <sup>e</sup>
0 h								
HSP16.9A class I heat shock protein 1 ( <i>Z. mays</i> )/ ACG36285	29	2	759	68	16.9/16.7	6.77/6.7	13	1.97
HSP16.9B class I heat shock protein 1 ( <i>Z. mays</i> )/ ACG31332	28	1	613	71	16.9/17.0	6.77/5.55	12	4.5
HSP16.9A class I heat shock protein 1 ( <i>Z. mays</i> )/ ACG36285	30	2	1110	71	16.9/16.0	6.77/6.07	36	4.13
HSP17.5 class II heat shock protein ( <i>Z. mays</i> )/ NP_001105705	31	2	410	49	17.5/17.0	5.56/5.92	5	1.88
HSP16.9A class I heat shock protein 1 ( <i>Z. mays</i> )/ ACG36285	32	2	405	67	16.9/15.9	6.77/5.95	24	3.28
HSP16.9C class I heat shock protein 1 ( <i>Z. mays</i> )/ ACG48548	13	1	1107	57	17.1/17.2	6.77/5.8	23	9.45
24 h								
HSP16.9A class I heat shock protein 1 ( <i>Z. mays</i> )/ ACG36285	29	2	893	66	16.9/16.7	6.77/6.8	12	5.15
abscisic acid-responsive gene rab28 ( <i>Z. mays</i> )/ CAA41854	27	1	1204	82	27.7/38.7	4.9/4.6	23	5.18
HSP16.9A class I heat shock protein 1 ( <i>Z. mays</i> )/ ACG36285	13	1	857	75	16.9/16.1	6.77/6.08	20	5.15

<sup>a</sup>Accession number from the maizesequence.org database. <sup>b</sup>Indicates whether the protein identification was from a given spot in wild type (1) or *hsp101* mutant (2), respectively. <sup>c</sup>Probability based MASCOT score is defined as  $-10 \times \log(p)$ , where  $p$  is the probability that the observed match is a random event. Scores >43 indicate identity or extensive homology ( $p < 0.05$ ). Protein scores are derived from ions scores as a nonprobabilistic basis for ranking protein hits. <sup>d</sup>Percentage of protein coverage by peptide sequencing. <sup>e</sup>Exponentially Modified Protein Abundance Index (emPAI) for estimation of absolute protein amount is equal to  $10^{\text{PAI}} - 1$ , which is proportional to protein content in a protein mixture.

Digested peptides were separated by using a 10 cm fused silica nanospray needle (360  $\mu\text{m}$  outer diameter, 150  $\mu\text{m}$  inner diameter; Polymicro Technologies, Phoenix, AZ) packed with "Magic C18" (200  $\text{\AA}$ , 5  $\mu\text{m}$  particles; Michrom Bioresources) in 95% methanol. This nanospray needle was equilibrated for 2 h at 200 nL/min with 1 h 97:3 mix of solvent B to solvent A, then 30 min 50:50 B/A mix, and finally a 30 min 3:97 B/A mix. Dynamic exclusion was enabled using a 5 repeat count, 30 s repeat duration, exclusion list size 50, and 30 s exclusion duration. The scan range was set between 300 and 2000  $m/z$ . Data dependent MS/MS scans were collected for the eight most intense parent ions. The nanospray column was held at ion sprays of 2.1 kV and a flow rate of 200  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

Raw files were searched using SEQUEST via Proteome Discoverer 1.3.339 (ThermoFisher Scientific) against the Unigene maize database (Zmays\_166\_peptide,<sup>25</sup>) supplemented with NCBI maize entries (106 114 total entries, downloaded Sept. 2011) that had been concatenated to a randomized database as a decoy. SEQUEST parameters were set up accordingly: (1) mass type = average precursor and fragment, (2) peptide tolerance = 1000 ppm, (3) fragment ion tolerance = 1 atomic mass unit, (4) maximum peptides considered = 500, (5) maximum peptides output = 10, (6) ion series = b and y ions, (7) enzyme = trypsin, (8) maximum missed cleavage sites = 2. Additionally, peptide modifications parameters were the following: (1) post-translation modifications per peptide = 4, (2) fixed modification of cysteine = carboamidomethylation (+57), (3) variable modification of methionine = oxidation (+16). Mass Spec Format files generated from SEQUEST were filtered using the following settings: (1) peptide confidence = high; (2) Minimal Xcorr for charge state = +1:1.5, +2:2, +3:2.5, +4:3.0, +5:3.1, +6:3.2, +7:3.3, >+7:3.4; (3) protein = minimum of 2 peptides per protein. Proteins identifications were consensus if they were assigned as the same protein accession in both wild-type and

*hsp101* mutant samples. If protein assignments were different, the protein with the highest combined Xcorr value in either wild-type or mutant maize samples was reported. For spots with more than one protein identification, the proteins with lower Xcorr value are listed in Supporting Information Table S1. Protein sequences and their accession numbers were uploaded into the Blast2GO program<sup>26</sup> for gene annotation. Blast2GO default settings were used for blast, mapping, and annotation searches.

To identify the differential expressed protein (spot no. 18) that had not been identified using SEQUEST searches, DTA files generated by BioWorks (version 3.3.1) from both maize wild-type and *hsp101* mutant were subjected to batch de novo sequencing using the PepNovo program.<sup>27</sup> De novo sequencing and MS-BLAST searches were performed similarly to previous report,<sup>28</sup> with the threshold for high scoring segment pairs set at 64. Other parameters used in the MS-BLAST searches included: (1) application of the default filter, (2) application of LC-MS/MS presets, and (3) 1 unique peptide. Using the PepNovo program and MS-BLAST searches, hits with the highest value were considered to be significant and resulted in protein identifications (Supporting Information Figure S1).

All the proteomic data were uploaded to the Proteomics Identifications database (PRIDE<sup>29</sup>) with the accession number 20434-20485.

For the identifications listed in Table 2 and Supporting Information Table S2, the protein spots were excised from the Coomassie stained 2D gels, and destained with 50% (v/v) methanol 5% (v/v) acetic acid for 12 h. The destained gels were washed with deionized water, soaked for 10 min in 100 mM ammonium bicarbonate, cut into small pieces, completely dehydrated with 100% acetonitrile, and vacuum-dried. In-gel digestion was performed by adding 30  $\mu\text{L}$  of modified porcine trypsin solution containing 20 ng/ $\mu\text{L}$  (Promega, Madison, WI) in 50 mM ammonium bicarbonate followed by overnight

incubation at room temperature. Peptides were extracted with 50% (v/v) acetonitrile and 5% (v/v) formic acid twice for 30 min each time with sonication. The volume of the extracts was reduced by evaporation in a vacuum centrifuge and then adjusted to 20  $\mu\text{L}$  with 1% (v/v) formic acid.

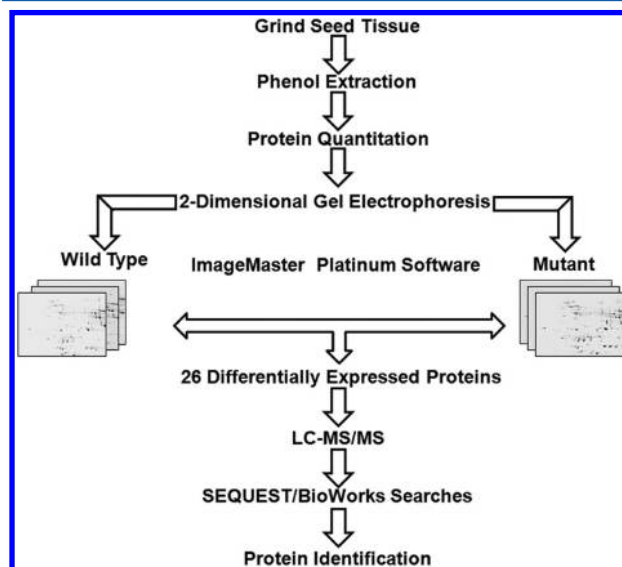
Mass spectrometric analysis of tryptic peptides was carried out using an integrated nano-LC–ESI–MS/MS system (quadrupole/time-of-flight, Synapt G2 High Definition mass spectrometer, Waters Corporation), equipped with a NanoLockSpray ion source. The instrument was coupled on-line to a NanoAcquity Ultra Performance liquid chromatograph (UPLC) (Waters Corporation). The binary solvent system used was 2% acetonitrile in Milli Q water with 0.1% formic acid (mobile phase A) and 98% acetonitrile in Milli Q water with 0.1% formic acid (mobile phase B). Samples were concentrated and desalted by injection onto a Symmetry C<sub>18</sub> UPLC trapping column (5  $\mu\text{m}$ , 180  $\mu\text{m}$   $\times$  20 mm, Waters Corporation) and washed with 100% mobile phase A at a flow rate of 15  $\mu\text{L}/\text{min}$ . After 3 min, the trap column was switched in-line with the analytical column. Peptides were separated on a BEH, C<sub>18</sub> UPLC column (1.7  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$   $\times$  100 mm, Waters Corporation) using a linear gradient to 40% B over a 30 min period, at a flow rate of 0.3  $\mu\text{L}/\text{min}$  followed by a 10 min rinse of 98% mobile phase B. The mass spectrometer was calibrated with a NaCsI solution and operated in ESI positive V-mode at a resolution of 10 000 full width at half height (fwhh). Spectra were acquired in automated mode using data-dependent acquisition (DDA). [Glu<sup>1</sup>] fibrinopeptide B solution (100 fmol/ $\mu\text{L}$ ) was infused through the reference sprayer of the NanoLockSpray source at a flow rate of 500 nL/min and was sampled at 30 s intervals during the acquisition. MS survey scans of 1 s over the  $m/z$  range 300–1600 were used for peptide detection followed by two MS/MS scans of 2 s each ( $m/z$  50–2000) of detected precursors. Collision energies were automatically adjusted based upon the ion charge state and the mass. The five most intensive precursor ions were interrogated per MS/MS switching event. Dynamic exclusion for 60 s was used to minimize multiple MS/MS events for the same precursor.

DDA raw data files were processed and converted to pkl files using ProteinLynx Global Server version 2.4 (PLGS) software (Waters Corporation). Pkl files were subsequently database searched by MASCOT search algorithm (Version 1.6b9, Matrix Science, London, U.K.) available at <http://www.matrixscience.com>). Searches were conducted using the *Other green plants* subset (696 476 sequences, 20110818) of the National Center for Biotechnology Information nonredundant database (NCBI nr, <http://www.ncbi.nih.gov>). Trypsin was used as specific protease, one missed cleavage was allowed with mass tolerances of 50 ppm and 0.05 Da for the precursor and fragment ion, respectively. Variable modifications included methionine oxidation and glutamine–asparagine deamination. Peptide matches with Mascot scores exceeding the 95% level of confidence were accepted as correct matches. Ion score is  $-10 \times \log(P)$  where  $P$  is the probability that the observed match is a random event. The threshold score in the above conditions was 52 for  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### The Absence of HSP101 Coincides with Particular Changes in the Proteome of Maize Mature Embryos

Proteins present in the dry and mature maize embryo accumulate during its development and provide part of the energy required to achieve a germination competitive state. To detect differentially expressed proteins during embryo maturation in the absence of HSP101, total proteins obtained from the L10 mutant (*hsp101-m5::Mu1/hsp101-m5::Mu1*) and the L10 WT (*Hsp101/Hsp101*) inbred lines were analyzed by 2-DE in biological triplicate as depicted in the workflowchart shown in Figure 1. Isoelectrofocusing of total protein was performed in a

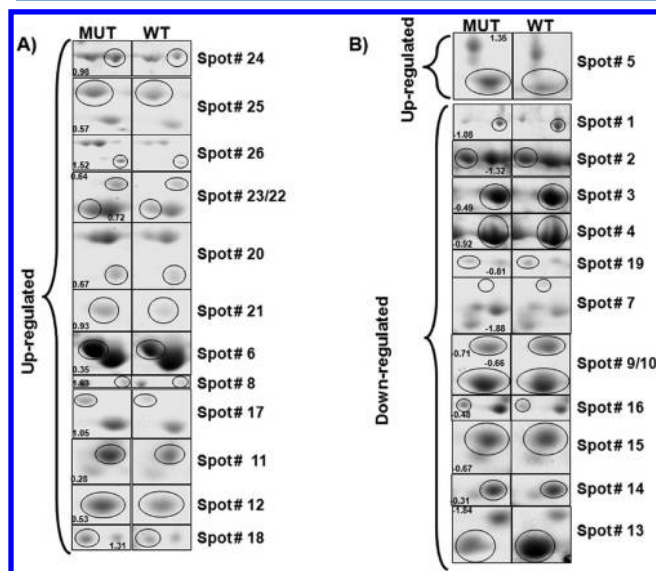


**Figure 1.** Experimental approach for identifying differentially expressed proteins. Proteins were extracted by grinding tissues and phenol extraction methods. After total protein quantitation of both mutant and wild-type maize embryos, proteins were separated by 2-dimensional gel electrophoresis in biological triplicate. Gels for both wild-type and mutant were imaged, spot volumes quantified, and spot areas matched using ImageMaster Platinum Software. Spots that were present in 3 out of 3 gels in both wild-type and mutant subclasses, present in both wild-type and mutant reference gels, and spots with a  $t$ -value greater than 2.78 were considered statistically significant. A total of 26 differentially expressed proteins were identified by liquid chromatography tandem mass-spectrometry (LC–MS/MS) using both SEQUEST searches and de novo sequencing/MS BLAST sequence similarity searches.

$pI$  range of 4–7, as most proteins from mature embryo fall within this  $pI$  range (Supporting Information Figure S2). Separation between  $pI$  3 and 10 caused poor resolution of the majority of spots detected by Coomassie staining (data not shown). To identify differentially expressed 2-DE protein spots, all scanned images were analyzed with ImageMaster 2D Platinum software as described in the Material and Methods. Only spots present in all biological samples and with  $t$ -values greater than 2.78, representing a statistical significance ( $p < 0.05$ ) in the difference between the mutant and WT embryos, were considered. The 26 spots fulfilling these criteria were identified from reference gels (Supporting Information Figure S2) in each mutant and WT L10 inbred lines using SEQUEST or PepNovo and MS Blast similarity searches (Table 1). In several cases, a single spot rendered more than one protein identification. The highest Xcorr values corresponded to 12



proteins that were down-regulated and 14 that were up-regulated in the absence of HSP101 (Table 1). The proteins with lower Xcorr values are listed in Supporting Information Table S1. A detailed diagram of these spots with corresponding spot numbers and the expression  $\log_2$  ratios (up-regulated; positive and down-regulated; negative) is shown in Figure 2. All



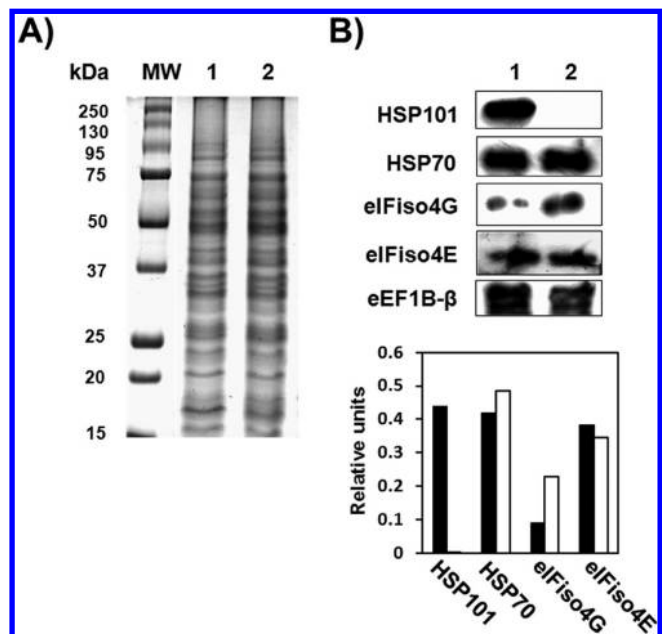
**Figure 2.** Differentially expressed protein spots between L10 *hsp101* mutant and *Hsp101* WT mature dry embryos. The 26 statistically significant spots are circled and the  $\log_2$  ratios (mutant/WT) are shown. (A) Up-regulated and (B) down-regulated.

of the shown changes were statistically significant at  $p < 0.05$  from three independent biological replicates. Additionally, there were spots present only in the mutant or in the WT that were qualitatively analyzed in three biological replicates for reproducibility (Supporting Information Figure S3) and were also identified by mass spectrometry (Table 2). Proteins with lower expression levels in embryos at the mature-dry stage in the *hsp101* mutant were chaperones HSP17.4-CI and HSP16.9D-CI, the translation elongation factor eEF2, vicilin-like storage proteins, cupin, aldose reductase, adenosine kinase, and the globulin-1 S allele (Table 1). In addition, some of the down-regulated spots also contained peptides matching HSP16.9E-CI, HSP17.8-CII, alcohol dehydrogenase I, the acidic ribosomal protein P0, cysteine synthase precursor I, pyridoxine biosynthesis protein ER1, glycine-rich protein 2, GSH reductase, and anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase (Supporting Information Table S1). Proteins showing increased expression levels in the *hsp101* mutant were chaperones HSP70, HSP20, and the Rubisco chaperonin CPN60A; phosphoglucomutase, the UDP-glucosyl transferase BX9, actin, adenosine kinase and other proteins related to cellular metabolism, the late embryogenesis abundant (LEA) protein DC-8, a dehydrin and the Globulin-1 S allele precursor (Table 1). In addition to the above changes, mature dry embryos from the *hsp101* mutant contained some proteins not present in the WT (Table 2). These included HSP17.5-CII and isoforms of HSP16.9A-CI with different  $pI$ 's (spots 29, 30, and 32 from Supporting Information Figure S2) identified with the highest MASCOT score. In contrast, HSP16.9B-CI and HSP16.9C-CI were only observed in the WT (Table 2). The spots where these proteins were identified contained additional

proteins listed in Supporting Information Table S2. The results shown above suggested that HSP101 affects the levels of several proteins stored in the maize mature embryo. This might be achieved through effects on protein synthesis, protein stability, or post-translational modifications.

### The Absence of HSP101 Modifies the Abundance of Proteins within Cap-Binding Complexes

In a previous study, HSP101 was detected as a component of the Cap-binding complexes together with HSP70.<sup>11</sup> Therefore, its absence might affect some of the components within these complexes. To evaluate this, the L10 mutant (*hsp101-m5::Mu1/hsp101-m5::Mu1*) and the L10 WT (*Hsp101/Hsp101*) inbred lines were analyzed by immunoblots against proteins present in the Cap-binding complexes either from total (Figure 3) or affinity-purified (Figure 4) extracts. In the total

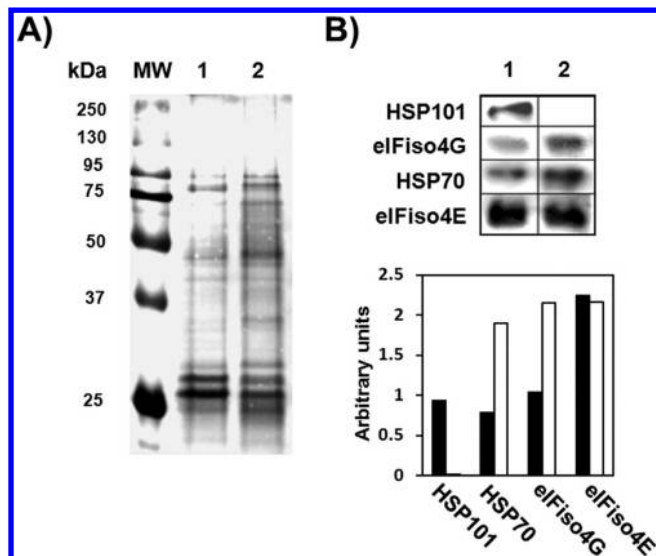


**Figure 3.** Western blot analysis of specific proteins in total extracts from L10 *hsp101* mutant and *Hsp101* WT mature dry embryos. Proteins were extracted from the mutant (2) and WT (1) quiescent embryos, separated on 12.5% SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane, and incubated with maize  $\alpha$ -HSP101-P15C, universal  $\alpha$ -HSP70, wheat  $\alpha$ -eIFiso4G, and  $\alpha$ -eIF(iso)4E antibodies, as well as maize  $\alpha$ -eEF1B- $\beta$ . (A) Coomassie Blue-stained gel and (B) immunoblots. Coomassie Blue-staining and  $\alpha$ -eEF1B- $\beta$  were used as loading controls. Densitometric analysis of the immunoblots is shown as units relative to eEF1B- $\beta$ .

extract, no HSP101 was observed in the mutant line, whereas HSP70 and eIF(iso)4E appeared at similar levels in both lines. However, in the  $m^7$ GTP-Sepharose-bound fraction, HSP70 was increased in the absence of HSP101. The eIF(iso)4G protein appeared increased in both the total and  $m^7$ GTP-bound fractions obtained from the L10 mutant (*hsp101-m5::Mu1/hsp101-m5::Mu1*).

Differences in the  $m^7$ GTP-purified complexes from WT and mutant embryos were detected even at the level of silver stained gels (Figure 4A) and were reproducibly observed in three different protein isolations as well as in an independent L4 mutant (*hsp101-m2::Mu1/hsp101-m2::Mu1*) and L4 wt (*Hsp101/Hsp101*) lines (Supporting Information Figure S4). Therefore, HSP101 might influence the stability and





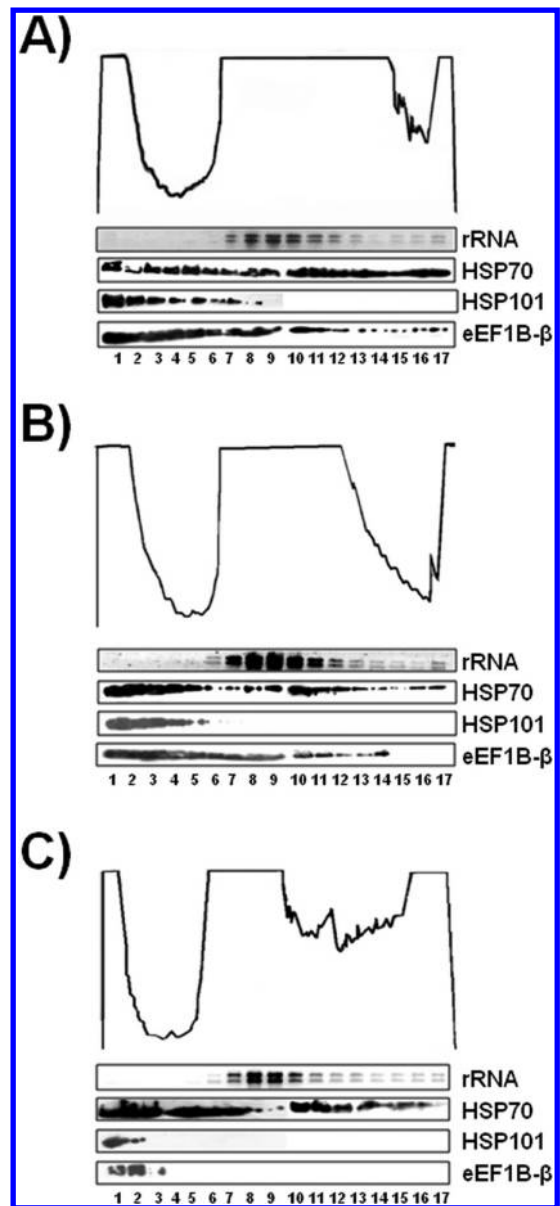
**Figure 4.** Specific protein changes in Cap-binding complexes from L10 mutant (*hsp101/hsp101*) and L10 WT (*Hsp101/Hsp101*) mature dry embryos. Total protein extracts from the mutant (2) and WT (1) quiescent embryos were incubated with  $m^7$ GTP-Sepharose, and after extensive washing, the bound proteins were eluted with a buffer containing 0.2 mM  $m^7$ GTP. Equal amount (50  $\mu$ L) of each eluate was resolved by 15% (w/v) SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane, and incubated with maize  $\alpha$ -HSP101-P15C, universal  $\alpha$ -HSP70, and wheat  $\alpha$ -eIFiso4G or  $\alpha$ -eIF(iso)4E antibodies. (A) Silver stained gel and (B) immunoblots. Densitometric analysis of the immunoblots is shown as arbitrary units.

composition of the Cap-binding complexes in the maize mature embryo. Also, according to previous findings, it could participate in these complexes as a translational regulator.<sup>19</sup>

#### The Distribution of HSP101 along Sucrose Gradient Fractions Is Differential during Maize Germination

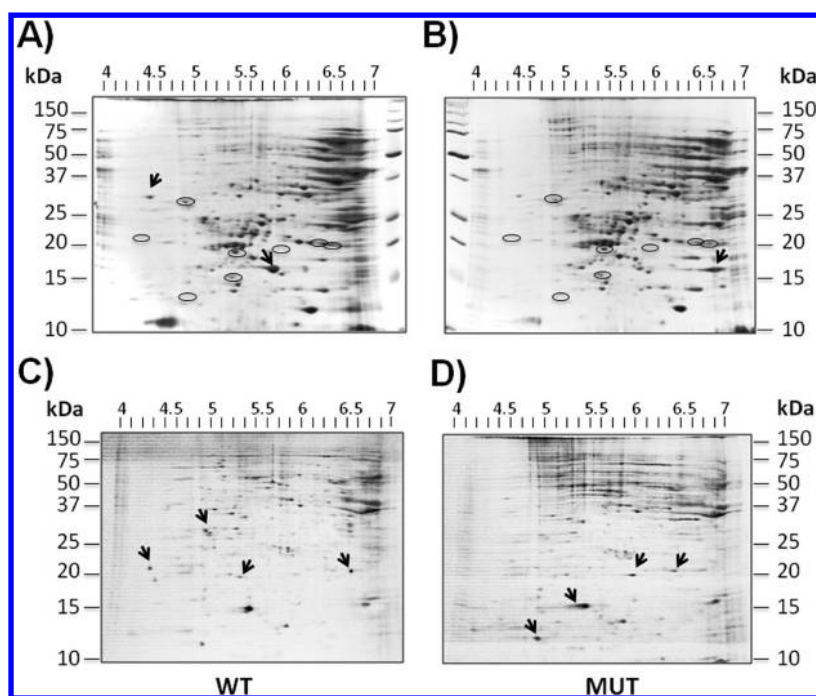
To ask whether HSP101 forms part of the translation initiation complexes during maize germination, embryo extracts from 0 h-, 12 h-, and 24 h-imbibed caryopses were fractionated on continuous 10–35% density sucrose gradient (Figure 5). Proteins isolated from each fraction were detected by immunoblots. HSP101 was observed in fractions representing free ribonucleoproteins (1–3), translation initiation complexes (4–5), and monosomes (6–9), but not polyribosomes (10–17) in the 0 h- and 12 h-imbibed embryo extracts (Figure 5, panels A and B). In the extracts from 24 h-imbibed embryos (Figure 5C), HSP101 appeared fully displaced toward non-translational fractions (1–2). However, the HSP70 protein was located steadily along the sucrose gradient profile during maize germination which is consistent with its binding to nascent polypeptide chains to assist the folding of newly synthesized proteins inside the cells. The eEF1B- $\beta$  factor (31 kDa), which has a nucleotide exchange activity and binds to eEF1A (25 kDa) and eEF1B- $\gamma$  (51 kDa) to form the elongation factor eEF1B, was used as a control protein for the gradients. It appeared in low and high density fractions in the 0 h- and 12 h-imbibed embryos, and was fully displaced to lighter fractions in the 24 h-imbibed embryos (Figure 5C). This behavior is consistent with its recruitment to free ribonucleoprotein fractions to exchange GDP for GTP in eEF1A during active translation.<sup>30</sup>

To confirm whether HSP101 was part of a translation complex in the 12 h-imbibed embryos, the extracts were treated



**Figure 5.** HSP101 differentially comigrates with translational fractions of polyribosome profiles depending on the caryopsis imbibition time. Polyribosome fractionation was performed on 10–35% sucrose gradients to gain better resolution of translation initiation complexes. All gradients were collected in 17 fractions and profiles were obtained at 260 nm. The rRNA distribution and integrity was determined by ethidium bromide staining of an agarose gel. Proteins were precipitated from each fraction with 12% trichloroacetic acid and resuspended in 60  $\mu$ L of  $H_2O$ . One-fifth of the total volume was resolved by SDS-PAGE, blotted to PVDF membranes, and analyzed by immunoblotting with maize  $\alpha$ -HSP101, universal  $\alpha$ -HSP70, and maize  $\alpha$ -eEF1B- $\beta$  antibodies. (A) Mature dry embryos, (B) 12 h after caryopsis imbibition, and (C) 24 h after caryopsis imbibition.

with puromycin and EDTA to dissociate ribosomes and mRNAs, or with cycloheximide which freezes the translation complexes as they appear at the moment of separation (Supporting Information Figure S5). The results showed that HSP101 was shifted toward the lighter fractions in the presence of puromycin/EDTA similar to HSP70 and the rRNA indicating that it was part of complexes involved in translation, rather than other heavy ribosome-independent aggregates.



**Figure 6.** Comparative proteomic IEF/2-DE map of proteins extracted from L10 mutant (*hsp101/hsp101*) and L10 WT (*Hsp101/Hsp101*) embryos at 24 h of caryopsis imbibition. Embryos were excised from 21 h-imbibed caryopsis and incubated for three additional hours in the presence of [ $^{35}\text{S}$ ]-methionine for in vivo protein labeling. Phenol-extracted total proteins were separated first according to their pI on IPG strips pH 4–7 and in a second dimension according to their molecular masses on 15% SDS-PAGE. The gels were stained with colloidal Coomassie Blue G-250 and incubated with Amplify for fluorographic enhancement. (A) L10 WT and (B) L10 mutant Coomassie Blue-stained gels. (C) L10 WT and (D) L10 mutant fluorograph maps. Differential protein spots between the two genotypes at the level of either Coomassie Blue-staining or fluorography are highlighted with black arrows. Circles on (A) and (B) gels indicate the position of arrows shown in (C) and (D).

### The HSP101 Null Mutant Displays Qualitative Changes in de Novo Protein Synthesis Patterns during Maize Germination

The above results revealed that HSP101 might influence the translation of mRNAs during the germination process, in addition to its known role in resolving protein aggregates formed during heat stress conditions. Although the L10 mutant (*hsp101-m5::Mu1/hsp101-m5::Mu1*) line germinates, as well as the L10 WT (*Hsp101/Hsp101*) line, it displays phenotype of accelerated growth during the first 72 h of imbibition<sup>14</sup> (Supporting Information Figure S6). On the basis of this observation, HSP101 was previously proposed to act as negative regulator of root growth at the level of either cell elongation or cell division.<sup>14</sup> Since one of the metabolic processes required for optimal growth is the rate of protein synthesis, we tested the L10 mutant and WT inbred lines with short pulse (3 h) in vivo  $^{35}\text{S}$ -protein labeling on germinating maize embryos (21 h-imbibition). No global differences were observed in the protein labeling of mutant lines when compared to WT lines, for either quantitative (equal protein loaded) or qualitative (equal radioactivity loaded) changes (Supporting Information Figure S7). These results suggested that there were not gross changes in the overall translation level without HSP101. However, a small number of specific proteins that may be hard to visualize on one-dimensional gels may still be regulated by HSP101. To evaluate if small differences in the protein labeling pattern existed between the mutant and WT lines, 2-DE was performed (Figure 6). The fluorograms in the pI 4–7 range, from three replicate gels belonging to independent biological samples, revealed subtle changes in the label intensity of particular spots between the L10 mutant

(Figure 6D) and WT (Figure 6C) lines (spots highlighted with an arrow on each gel). Interestingly, the corresponding Coomassie stained protein patterns (circled spots on Figure 6A,B corresponding to arrows in both Figure 6C,D) did not show differences. Some of the labeled spots were not detected by Coomassie staining suggesting that they represent proteins of very low abundance.

On the other hand, a comparison between Coomassie stained gels of 24 h-imbibed embryos showed differences in the intensity of other spots not reflected in the  $\text{S}^{35}$ -protein patterns. These appear highlighted by an arrow in panels A and B of Figure 6. Coomassie stained-spot differences were reproducible in three biological replicates at the same imbibition time without the in vivo-labeling procedure (Supporting Information Figure S8) and were identified by MS (Table 2 and Supporting Information Table S2 and Figure S9). After 24 h of imbibition, a single isoform of HSP16.9A-CI (spot 29) was observed only in the *hsp101* mutant, whereas different isoforms of HSP16.9A-CI (spot 13) and RAB28 were only observed in the WT (Table 2). Additional proteins found in these spots contained 40S ribosomal protein S18 (only in the *hsp101* mutant), whereas HSP17.5-CII and an isoform of HSP16.9A-CI (spot 27) were observed only in the WT (Supporting Information Table S2).

### DISCUSSION

Chaperones of the HSP100 family have been identified in bacteria, fungi and plants.<sup>31</sup> Plant HSP101 is required for basal and induced thermotolerance and has an important role as a disaggregase during heat stress.<sup>17</sup> Additionally, it has been documented as translational regulator of specific mRNAs.<sup>18–20</sup> In maize, HSP101 is highly expressed during embryogenesis

and seed maturation and remains present at almost constant levels during the first 72 h of imbibition even in the absence of stress.<sup>13,14</sup> Although maize null *hsp101* mutant caryopses are completely viable in the absence of heat stress, they display enhanced primary root growth during the first 3 days of germination. This leads to the proposal that HSP101 may have a role in the stabilization and/or translation of proteins regulating root growth during germination and seedling establishment.<sup>14,15</sup> In this study, we showed by comparative proteomic analysis that, in the absence of HSP101, particular protein level alterations take place in the maize embryo at the mature quiescent stage and during germination. Such changes result from both, protein stability and expression alterations, and correlate with the observed phenotype of root growth.

Several chaperones that could act as translation factors have been reported. For example, in *Drosophila*, the interaction of HSP90-Cap with eIF4F suggests that these two proteins mediate the localization and/or translation of specific mRNAs during development.<sup>32</sup> Conversely, the possibility of HSP90 contributing to the folding of proteins involved in the localization and/or translation of mRNAs could not be discarded. In another study, coimmunoprecipitation of HSP70, HSC70, polyA binding protein (PABP), and eIF4G was observed in immunoprecipitation experiments of the degradation factor that binds AU rich (ARE) sequences, AUF1, indicating these chaperones are coupled to mRNA degradation/stabilization machinery.<sup>33</sup> More recent work determined that HSC70, HSP40, eIF4F, and PABP stabilize the ARE-mRNA BIM, preventing its degradation, thereby regulating the expression of BIM, an activator of cell death in hematopoietic progenitor cells to control the number of blood cells.<sup>34</sup> HSP27, a small heat shock protein, has been involved in translation inhibition by preventing eIF4F assembly under thermal shock conditions through binding and sequestering eIF4G in insoluble heat stress granules.<sup>35</sup> In addition, wheat HSP101 has the ability to enhance translation of mRNAs carrying particular sequences at their 5'UTR.<sup>19</sup>

In a previous analysis, we found that maize HSP101 is present in CAP-binding complexes in mature dry embryo,<sup>11</sup> supporting the idea that it may be required to stabilize particular translation factors and/or mRNAs required for translation reinitiation upon imbibition and during germination. Here, we found that in the absence of HSP101, eIF(iso)4G increased in total and CAP-bound extracts, whereas eIF(iso)4E remained unaltered (Figures 3 and 4). In addition, during early caryopsis imbibition, HSP101 colocalized with translation initiation complexes of the embryo in a ribosome-dependent manner, supporting its role during translation (Figure 5). Furthermore, de novo synthesis of several proteins, not identified in this study, was altered in the *hsp101* mutant as shown by short pulse-labeling during embryo imbibition (Figure 6, panels C and D). These results demonstrate that HSP101 is involved in protein synthesis regulation during germination and suggest that the observed proteome alterations in its absence are due to both its role in translation regulation and its function as disaggregase of unwanted protein complexes during embryo maturation and germination.

Several of the identified proteomic changes in the *hsp101* mutant embryos represent chaperone family proteins (HSP70, CPN60A, HSP20, HSP17.4, HSP17.5, HSP16.9A, HSP16.9B, HSP16.9C and HSP16.9D). Five of these chaperones showed increased levels (HSP70, CPN60A, HSP20, HSP17.5, and some isoforms of HSP16.9A), whereas five others decreased

(HSP17.4, an isoform of HSP16.9A, HSP16.9B, HSP16.9C, and HSP16.9D). The adjustment of the chaperone system was expected to compensate for the absence of HSP101. Although the mechanism of protein disaggregation by HSP101 is not yet fully understood, a model has been proposed where sHSP initially become part of the large protein aggregates, thus, facilitating their solubilization by HSP100/Clp hexamers into a form recognizable by the HSP70 chaperone.<sup>36–39</sup> In another model, HSP100/ClpB first breaks the sHSP-containing large aggregates into smaller fragments that are further processed by HSP70.<sup>40</sup> In both these models, an increase of HSP70 levels in the absence of HSP101 would be expected to compensate for the greater amount of large protein aggregates. In addition, this protein could also participate in translation regulation together with HSP101.

A group of small chaperones (sHSPs) showed important changes in the absence of HSP101. These proteins of usually 10–43 kDa belong to a superfamily of chaperones that are defined by a conserved carboxy-terminal domain of about 90 amino acids, referred to as the  $\alpha$ -crystallin domain<sup>41</sup> and constitute by far the most complex and diverse HSP group. The activated subunits of sHSPs have the ability to bind protein substrates when released from an oligomer and within an oligomeric structure.<sup>42</sup> It has been shown that HSP100/HSP70-dependent disaggregation and refolding of polypeptides present in aggregates containing sHSPs proceeds more efficiently than in aggregates formed in their absence.<sup>37–39,43</sup> Therefore, an increase of sHSPs is expected to assist in more efficient protein disaggregation.

Interestingly, several HSP16.9 proteins (HSP16.9A, HSP16.9B, HSP16.9C, HSP16.9D and HSP16.9E) some of which represent different gene products or alleles of the same gene, displayed differential accumulation between WT and *hsp101* mutant embryos, at the dry and 24 h-imbibed stages (Tables 1 and 2, Supporting Information Tables S1 and S2). The crystallographic structure of wheat HSP16.9 has been solved<sup>44</sup> indicating that a dimer forms the basic building block, which further assembles into a 12-mer consisting of two trimers of dimers. In solution, wheat HSP16.9 can dissociate into smaller oligomeric states in a temperature dependent manner. On the basis of this observation, it is likely that heat-induced dissociation of sHSP oligomers expose the hydrophobic patches buried in the oligomeric interface, resulting in binding and stabilization of denatured proteins.<sup>42,44</sup> In a proteomic study of barley heat response, six isoforms of a 16.9 kDa sHSP were distinguished<sup>45</sup> but their particular role in the disaggregation mechanism is unknown. Here, we identified four HSP16.9A isoforms showing differential embryo accumulation patterns in the presence and absence of maize HSP101 (Table 2). While one isoform with experimental *pI* of 6.08 was preferentially found in the WT after 24 h of caryopsis imbibition, isoforms with *pI* of 5.95, 6.07, and 6.7–6.8 were identified only in the mutant mature embryo (0 h). After 24 h of imbibition, the mutant embryos accumulated only the 6.7–6.8 *pI* isoform. Although the predicted *pI* for all HSP16.9 accessions identified in this analysis was 6.77, this value was only observed in the mutant at both 0 and 24 h of imbibition. These findings are interpreted to suggest that HSP16.9 may suffer post-translational modifications and that certain isoforms act in concert with HSP101 for protein disaggregation during maize embryo maturation and germination, while others accumulate in the mutant to assist disaggregation in the absence of HSP101.



The absence of HSP101 in maize has been correlated with root phenotypes during the first 72 h of caryopsis imbibition.<sup>14,15</sup> Particularly, enhanced primary root growth and precocious emergency of nodal roots from the coleoptilar node were observed. Hence, it was hypothesized by these reports that, in the presence of HSP101, an inhibitor of root growth might accumulate during embryo maturation and persist early into germination. On the other hand, alterations in specific tissue distribution of phytohormones (cytokinin and auxin) may also account for disturbances in root architecture.<sup>46</sup> Auxin (indole acetic acid; IAA) and cytokinin (*cis*-zeatin; *c-Z*) have antagonistic effects on root growth. While the distribution of auxin toward the apical meristem at the root tip and particular spots in the differentiation zone promotes cell cycle activation and lateral root initiation, cytokinin counteracts its effect.<sup>47</sup>

Recently, a proteomic analysis of dissected root specific cortical parenchyma and stele tissues identified the distribution of enzymes involved in both auxin and cytokinin metabolism of the maize young (36 h after imbibition) seedling.<sup>46</sup> This report indicated that tissue-specific inactivation of *c-Z* by glucosylation and possibly degradation are required to permit auxin's action on growth and lateral root emergency. Interestingly, several enzymes showing enhanced accumulation in the *hsp101* mutant were related to the cytokinin metabolism. One of them was the UDP-glucosyl transferase BX9 (increased in the mutant), a key enzyme in benzoxazinoid secondary metabolism, which catalyzes the interconversion of DIMBOA (benzoxazinoid-2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin) to its glucosylated form DIMBOA-Glc.<sup>48</sup> Although benzoxazinoids are primarily related to plant defense,<sup>49</sup> an important nexus between these metabolites and cytokinin was recently described.<sup>46,50</sup> Other enzymes increased in the *hsp101* mutant were phosphoglucosyltransferase, adenosine kinase (ADK), and the member of the NUDIX hydrolase family, all of them related to BX9 and the cytokinin metabolism.<sup>50–54</sup>

Additional evidence suggests a positive correlation between the cytokinin content and heat tolerance in creeping bentgrass. Upon exogenous application of cytokinins, heat tolerance improves in creeping bentgrass.<sup>55</sup> Particularly, the effects of exogenously applied zeatin riboside (ZR), a synthetic cytokinin, result in the enhancement of some sHSP and HSP60.<sup>56</sup> These data are consistent with the known heat sensitivity of the *hsp101* mutant.<sup>14,15</sup>

Actin levels were enhanced in *hsp101* mutant embryos (Table 1). In *Arabidopsis*, actin plays essential roles during germination and root growth.<sup>57,58</sup> In maize, actin arrays suffer rearrangements and their abundance increases within cells located in the postmitotic region of the root apex. These changes are associated with the transition from cell proliferation in the meristem to the cell elongation and differentiation states found in the more mature parts of the root.<sup>59</sup> Interestingly, actin decreased in the coleoptilar node of the *rtcs* mutant unable to initiate nodal roots.<sup>60</sup> Thus, increases in the actin levels in the *hsp101* mutant are consistent with the fast growth of its primary root and with its precocious nodal root phenotype.<sup>14,15</sup>

Overall, the proteomic analysis of maize *hsp101* mutant embryos indicates that the lack of an important disaggregase such as HSP101 causes readjustments in the chaperone machinery, alterations in enzymes involved in the cytokinin metabolism and actin levels. The readjustments in the chaperone machinery probably aims to contend with the

protein aggregates accumulated in the mutant embryo. The observed root phenotypes in *hsp101* mutants might be due to altered cytokinin and actin levels as indicated by this analysis. However, further experiments are needed to evaluate whether active cytokinins actually change at particular tissues within the growing seedling (i.e., the primary root, the coleoptilar node, etc.). On the other hand, HSP101 may affect the translation of particular mRNAs during early germination also contributing to the observed root phenotype. Our work underlines the role of HSP101 during early steps of protein synthesis *in vivo* and *in planta*, expanding previous evidence supporting this idea that was obtained using yeast and plant heterologous systems.<sup>18–20</sup> Further analysis should aim to identify the mRNAs whose translation is regulated by HSP101 in maize.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

Table S1, additional protein identifications of differentially expressed proteins from comparing *hsp101* mutant (*hsp101-m5::Mu1/hsp101-m5::Mu1*) to wild type (*Hsp101/Hsp101*) at the stage of mature dry embryo using SEQUEST search algorithms; Table S2, additional protein identifications of preferentially accumulated in *hsp101* mutant (mut) or wild-type (WT) quiescent (0 h) and 24 h-imbibed (24 h) maize embryos; Figure S1, mass spectrometry annotation of PepNovo and MSBlast results; Figure S2, representative 2-DE analysis of total proteins extracted from L10 mutant (*hsp101/hsp101*) and L10 WT (*Hsp101/Hsp101*) mature dry embryos; Figure S3, resolution of low molecular weight proteins extracted from L10 mutant (*hsp101/hsp101*) and L10 WT (*Hsp101/Hsp101*) mature dry embryos by 2-DE analysis; Figure S4; comparison of the Cap-binding complexes of two independent *hsp101* mutant alleles and their corresponding near-isogenic lines (L4 and L10) obtained from mature dry embryos; Figure S5, the comigration of HSP101 with translational fractions is affected by puromycin; Figure S6, the *hsp101* mutant displays accelerated seedling growth; Figure S7, *in vivo* protein-labeling patterns of L10 mutant (*hsp101/hsp101*) and L10 WT (*Hsp101/Hsp101*) embryos at 24 h of imbibition; Figure S8, representative 2-DE analysis of proteins extracted from 24 h-imbibed L10 mutant (*hsp101/hsp101*) and L10 WT (*Hsp101/Hsp101*) embryos; Figure S9, close-up of spots preferentially accumulated or absent in the 24 h-imbibed L10 mutant (*hsp101/hsp101*) embryos as compared to WT (*Hsp101/Hsp101*). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Dr. Tzvetanka Dimitrova Dinkova, Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México D.F., Mexico. Phone: +52 55 56225277. Fax: +52 55 56225329. e-mail: [cesy@unam.mx](mailto:cesy@unam.mx).

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants to T.D.D. (PAPIIT IN204309, ICYTDF PIUTE 10-55 and CONACYT 81708) and J.N.-S. (PAPIIT IN207402, IN209599 and CONACYT 78982).

P.E.L.-M. was awarded with a fellowship from CONACYT for the Ph.D. studies. The authors are thankful to Dr. Karen Browning for wheat eIF(iso)4F and eIF4F antibodies, and to Drs. Heriberto Torres and Baltazar Baltazar from Híbridos Pioneer de México S.A. de C.V. for the growth of L4 and L10 maize lines.

## REFERENCES

- (1) Kiesselbach, T. *The Structure and Reproduction of Corn*, 50th Anniversary ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, 1999.
- (2) Wobus, U.; Weber, H. Seed maturation: Genetic programmes and control signals. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1999**, *2* (1), 33–38.
- (3) Gutierrez, L.; Van Wuytswinkel, O.; Castelain, M.; Bellini, C. Combined networks regulating seed maturation. *Trends Plant Sci.* **2007**, *12* (7), 294–300.
- (4) Sanchez de Jimenez, E.; Aguilar, R. Protein synthesis patterns: relevance of old and new messenger RNA in germinating maize embryos. *Plant Physiol.* **1984**, *75*, 231–234.
- (5) Dinkova, T. D.; Marquez-Velazquez, N. A.; Aguilar, R.; Lazaro-Mixteco, P.; Sanchez de Jimenez, E. Tight translational control by the initiation factors eIF4E and eIF(iso)4E is required for maize seed germination. *Seed Sci. Res.* **2011**, *21*, 85–93.
- (6) Browning, K. S. Plant translation initiation factors: It is not easy to be green. *Biochem. Soc. Trans.* **2004**, *32*, 589–591.
- (7) Kaye, N. M.; Emmett, K. J.; Merrick, W. C.; Jankowsky, E. Intrinsic RNA binding by the eukaryotic initiation factor 4F depends on a minimal RNA length but not on the m7G cap. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (26), 17742–17750.
- (8) Sonenberg, N.; Hinnebusch, A. G. New modes of translational control in development, behavior, and disease. *Mol. Cell* **2007**, *28*, 721–729.
- (9) Joshi, B.; Lee, K.; Maeder, D. L.; Jagus, R. Phylogenetic analysis of eIF4E-family members. *BMC Evol. Biol.* **2005**, *5*, 48–68.
- (10) Dinkova, T. D.; Sanchez de Jimenez, E. Differential expression and regulation of translation initiation factors -4E and -iso4E during maize germination. *Physiol. Plant* **1999**, *107*, 419–425.
- (11) Lazaro-Mixteco, P. E.; Dinkova, T. D. Identification of proteins from Cap-binding complexes by mass spectrometry during maize (*Zea mays* L.) germination. *J. Mex. Chem. Soc.* **2012**, *56* (1), 36–50.
- (12) Wehmeyer, N.; Vierling, E. The expression of small heat shock proteins in seeds responds to discrete developmental signals and suggests a general protective role in desiccation tolerance. *Plant Physiol.* **2000**, *122* (4), 1099–1108.
- (13) Young, T. E.; Ling, J.; Geisler-Lee, C. J.; Tanguay, R. L.; Caldwell, C.; Gallie, D. R. Developmental and thermal regulation of the maize heat shock protein, HSP101. *Plant Physiol.* **2001**, *127* (3), 777–791.
- (14) Nieto-Sotelo, J.; Martinez, L. M.; Ponce, G.; Cassab, G. I.; Alagon, A.; Meeley, R. B.; Ribaut, J. M.; Yang, R. Maize HSP101 plays important roles in both induced and basal thermotolerance and primary root growth. *Plant Cell* **2002**, *14* (7), 1621–1633.
- (15) Lopez-Frias, G.; Martinez, L. M.; Ponce, G.; Cassab, G. I.; Nieto-Sotelo, J. Role of HSP101 in the stimulation of nodal root development from the coleoptilar node by light and temperature in maize (*Zea mays* L.) seedlings. *J. Exp. Bot.* **2011**, *62*, 4661–4673.
- (16) Hong, S. W.; Vierling, E. Hsp101 is necessary for heat tolerance but dispensable for development and germination in the absence of stress. *Plant J.* **2001**, *27* (1), 25–35.
- (17) Queitsch, C.; Hong, S. W.; Vierling, E.; Lindquist, S. Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in Arabidopsis. *Plant Cell* **2000**, *12* (4), 479–492.
- (18) Wells, D. R.; Tanguay, R. L.; Le, H.; Gallie, D. R. HSP101 functions as a specific translational regulatory protein whose activity is regulated by nutrient status. *Genes Dev.* **1998**, *12* (20), 3236–3251.
- (19) Ling, J.; Wells, D. R.; Tanguay, R. L.; Dickey, L. F.; Thompson, W. F.; Gallie, D. R. Heat shock protein HSP101 binds to the Fed-1 internal light regulatory element and mediates its high translational activity. *Plant Cell* **2000**, *12* (7), 1213–1227.
- (20) Gallie, D. R. The 5'-leader of tobacco mosaic virus promotes translation through enhanced recruitment of eIF4F. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30* (15), 3401–3411.
- (21) Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
- (22) Hajduch, M.; Ganapathy, A.; Stein, J. W.; Thelen, J. J. A systematic proteomic study of seed filling in soybean. Establishment of high-resolution two-dimensional reference maps, expression profiles, and an interactive proteome database. *Plant Physiol.* **2005**, *137* (4), 1397–419.
- (23) Houston, N. L.; Hajduch, M.; Thelen, J. J. Quantitative proteomics of seed filling in castor: comparison with soybean and rapeseed reveals differences between photosynthetic and non-photosynthetic seed metabolism. *Plant Physiol.* **2009**, *151* (2), 857–868.
- (24) Stevenson, S. E.; Chu, Y.; Ozias-Akins, P.; Thelen, J. J. Validation of gel-free, label-free quantitative proteomics approaches: applications for seed allergen profiling. *J. Proteomics* **2009**, *72* (3), 555–666.
- (25) Schnable, P. S.; Ware, D.; Fulton, R. S.; Stein, J. C.; Wei, F.; Pasternak, S.; Liang, C.; Zhang, J.; Fulton, L.; Graves, T. A.; Minx, P.; Reily, A. D.; Courtney, L.; Kruchowski, S. S.; Tomlinson, C.; Strong, C.; Delehaunty, K.; Fronick, C.; Courtney, B.; Rock, S. M.; Belter, E.; Du, F.; Kim, K.; Abbott, R. M.; Cotton, M.; Levy, A.; Marchetto, P.; Ochoa, K.; Jackson, S. M.; Gillam, B.; Chen, W.; Yan, L.; Higginbotham, J.; Cardenas, M.; Waligorski, J.; Applebaum, E.; Phelps, L.; Falcone, J.; Kanchi, K.; Thane, T.; Scimone, A.; Thane, N.; Henke, J.; Wang, T.; Ruppert, J.; Shah, N.; Rotter, K.; Hodges, J.; Ingenthron, E.; Cordes, M.; Kohlberg, S.; Sgro, J.; Delgado, B.; Mead, K.; Chinwalla, A.; Leonard, S.; Crouse, K.; Collura, K.; Kudrna, D.; Currie, J.; He, R.; Angelova, A.; Rajasekar, S.; Mueller, T.; Lomeli, R.; Scara, G.; Ko, A.; Delaney, K.; Wissotski, M.; Lopez, G.; Campos, D.; Braidotti, M.; Ashley, E.; Golsner, W.; Kim, H.; Lee, S.; Lin, J.; Dujmic, Z.; Kim, W.; Talag, J.; Zuccolo, A.; Fan, C.; Sebastian, A.; Kramer, M.; Spiegel, L.; Nascimento, L.; Zutavern, T.; Miller, B.; Ambrose, C.; Muller, S.; Spooner, W.; Narechania, A.; Ren, L.; Wei, S.; Kumari, S.; Faga, B.; Levy, M. J.; McMahan, L.; Van Buren, P.; Vaughn, M. W.; Ying, K.; Yeh, C. T.; Emrich, S. J.; Jia, Y.; Kalyanaraman, A.; Hsia, A. P.; Barbazuk, W. B.; Baucom, R. S.; Brutnell, T. P.; Carpita, N. C.; Chaparro, C.; Chia, J. M.; Deragon, J. M.; Estill, J. C.; Fu, Y.; Jeddelloh, J. A.; Han, Y.; Lee, H.; Li, P.; Lisch, D. R.; Liu, S.; Liu, Z.; Nagel, D. H.; McCann, M. C.; SanMiguel, P.; Myers, A. M.; Nettleton, D.; Nguyen, J.; Penning, B. W.; Ponnala, L.; Schneider, K. L.; Schwartz, D. C.; Sharma, A.; Soderlund, C.; Springer, N. M.; Sun, Q.; Wang, H.; Waterman, M.; Westerman, R.; Wolfgruber, T. K.; Yang, L.; Yu, Y.; Zhang, L.; Zhou, S.; Zhu, Q.; Bennetzen, J. L.; Dawe, R. K.; Jiang, J.; Jiang, N.; Presting, G. G.; Wessler, S. R.; Aluru, S.; Martienssen, R. A.; Clifton, S. W.; McCombie, W. R.; Wing, R. A.; Wilson, R. K. The B73 maize genome: Complexity, diversity, and dynamics. *Science* **2009**, *326* (5956), 1112–1115.
- (26) Conesa, A.; Gotz, S.; Garcia-Gomez, J. M.; Terol, J.; Talon, M.; Robles, M. Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* **2005**, *21* (18), 3674–3676.
- (27) Frank, A.; Pevzner, P. PepNovo: de novo peptide sequencing via probabilistic network modeling. *Anal. Chem.* **2005**, *77* (4), 964–973.
- (28) Junqueira, M.; Spirin, V.; Balbuena, T. S.; Thomas, H.; Adzhubei, I.; Sunyaev, S.; Shevchenko, A. Protein identification pipeline for the homology-driven proteomics. *J. Proteomics* **2008**, *71* (3), 346–356.
- (29) Vizcaino, J. A.; Cote, R.; Reisinger, F.; Barsnes, H.; Foster, J. M.; Rameseder, J.; Hermjakob, H.; Martens, L. The Proteomics Identifications database: 2010 update. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *38* (Database issue), D736–D742.
- (30) Mansilla, F.; Friis, I.; Jadidi, M.; Nielsen, K. M.; Clark, B. F.; Knudsen, C. R. Mapping the human translation elongation factor

eEF1H complex using the yeast two-hybrid system. *Biochem. J.* **2002**, *365* (Pt 3), 669–676.

(31) Nieto-Sotelo, J.; Kannan, K. B.; Martinez, L. M.; Segal, C. Characterization of a maize heat-shock protein 101 gene, HSP101, encoding a ClpB/Hsp100 protein homologue. *Gene* **1999**, *230* (2), 187–195.

(32) Pisa, V.; Cozzolino, M.; Gargiulo, S.; Ottone, C.; Piccioni, F.; Monti, M.; Gigliotti, S.; Talamo, F.; Graziani, F.; Pucci, P.; Verrotti, A. C. The molecular chaperone Hsp90 is a component of the cap-binding complex and interacts with the translational repressor Cup during *Drosophila* oogenesis. *Gene* **2009**, *432* (1–2), 67–74.

(33) Laroia, G.; Cuesta, R.; Brewer, G.; Schneider, R. J. Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitin-proteasome pathway. *Science* **1999**, *284* (5413), 499–502.

(34) Matsui, H.; Asou, H.; Inaba, T. Cytokines direct the regulation of Bim mRNA stability by heat-shock cognate protein 70. *Mol. Cell* **2007**, *25* (1), 99–112.

(35) Cuesta, R.; Laroia, G.; Schneider, R. J. Chaperone hsp27 inhibits translation during heat shock by binding eIF4G and facilitating dissociation of cap-initiation complexes. *Genes Dev.* **2000**, *14* (12), 1460–1470.

(36) Ben-Zvi, A. P.; Goloubinoff, P. Review: Mechanisms of disaggregation and refolding of stable protein aggregates by molecular chaperones. *J. Struct. Biol.* **2001**, *135* (2), 84–93.

(37) Mogk, A.; Deuring, E.; Vorderwulbecke, S.; Vierling, E.; Bukau, B. Small heat shock proteins, ClpB and the DnaK system form a functional triade in reversing protein aggregation. *Mol. Microbiol.* **2003**, *50* (2), 585–595.

(38) Cashikar, A. G.; Duennwald, M.; Lindquist, S. L. A chaperone pathway in protein disaggregation. Hsp26 alters the nature of protein aggregates to facilitate reactivation by Hsp104. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (25), 23869–23875.

(39) Lee, U.; Wie, C.; Escobar, M.; Williams, B.; Hong, S. W.; Vierling, E. Genetic analysis reveals domain interactions of Arabidopsis Hsp100/ClpB and cooperation with the small heat shock protein chaperone system. *Plant Cell* **2005**, *17* (2), 559–571.

(40) Glover, J. R.; Lindquist, S. Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* **1998**, *94* (1), 73–82.

(41) Waters, E. R.; Lee, G. J.; Vierling, E. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *J. Exp. Bot.* **1996**, *47* (296), 325–338.

(42) Haslbeck, M.; Franzmann, T.; Weinfurter, D.; Buchner, J. Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12* (10), 842–846.

(43) Lee, G. J.; Vierling, E. A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. *Plant Physiol.* **2000**, *122* (1), 189–198.

(44) van Montfort, R. L.; Basha, E.; Friedrich, K. L.; Slingsby, C.; Vierling, E. Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8* (12), 1025–1030.

(45) Sule, A.; Vanrobaeys, F.; Hajos, G.; Van Beeumen, J.; Devreese, B. Proteomic analysis of small heat shock protein isoforms in barley shoots. *Phytochemistry* **2004**, *65* (12), 1853–1863.

(46) Saleem, M.; Lamkemeyer, T.; Schutzenmeister, A.; Madlung, J.; Sakai, H.; Piepho, H. P.; Nordheim, A.; Hochholdinger, F. Specification of cortical parenchyma and stele of maize primary roots by asymmetric levels of auxin, cytokinin, and cytokinin-regulated proteins. *Plant Physiol.* **2010**, *152* (1), 4–18.

(47) Werner, T.; Motyka, V.; Laucou, V.; Smets, R.; Van Onckelen, H.; Schmulling, T. Cytokinin-deficient transgenic Arabidopsis plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* **2003**, *15* (11), 2532–2550.

(48) von Rad, U.; Huttel, R.; Lottspeich, F.; Gierl, A.; Frey, M. Two glucosyltransferases are involved in detoxification of benzoxazinoids in maize. *Plant J.* **2001**, *28* (6), 633–642.

(49) Morant, A. V.; Jorgensen, K.; Jorgensen, C.; Paquette, S. M.; Sanchez-Perez, R.; Moller, B. L.; Bak, S. beta-Glucosidases as

detonators of plant chemical defense. *Phytochemistry* **2008**, *69* (9), 1795–1813.

(50) Frebortova, J. Function of plant defense secondary metabolite in cytokinin degradation. *Plant Signal Behav* **2010**, *5* (5), 523–525.

(51) Manjunath, S.; Lee, C. H.; VanWinkle, P.; Bailey-Serres, J. Molecular and biochemical characterization of cytosolic phosphoglucomutase in maize. Expression during development and in response to oxygen deprivation. *Plant Physiol.* **1998**, *117* (3), 997–1006.

(52) Moffatt, B. A.; Stevens, Y. Y.; Allen, M. S.; Snider, J. D.; Pereira, L. A.; Todorova, M. I.; Summers, P. S.; Weretilnyk, E. A.; Martin-McCaffrey, L.; Wagner, C. Adenosine kinase deficiency is associated with developmental abnormalities and reduced transmethylation. *Plant Physiol.* **2002**, *128* (3), 812–821.

(53) Bessman, M. J.; Frick, D. N.; O'Handley, S. F. The MutT proteins or “Nudix” hydrolases, a family of versatile, widely distributed, “housecleaning” enzymes. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (41), 25059–25062.

(54) Ogawa, T.; Ishikawa, K.; Harada, K.; Fukusaki, E.; Yoshimura, K.; Shigeoka, S. Overexpression of an ADP-ribose pyrophosphatase, AtNUDX2, confers enhanced tolerance to oxidative stress in Arabidopsis plants. *Plant J.* **2009**, *57* (2), 289–301.

(55) Zhang, X.; Ervin, E. H. Impact of seaweed extract-based cytokinins and zeatin riboside on creeping bentgrass heat tolerance. *Crop Sci.* **2008**, *48*, 364–370.

(56) Veerasamy, M.; He, Y.; Huang, B. Leaf senescence and protein metabolism in creeping bentgrass exposed to heat stress and treated with cytokinins. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **2007**, *132*, 467–472.

(57) Gilliland, L. U.; Pawloski, L. C.; Kandasamy, M. K.; Meagher, R. B. Arabidopsis actin gene ACT7 plays an essential role in germination and root growth. *Plant J.* **2003**, *33* (2), 319–328.

(58) Rahman, A.; Bannigan, A.; Sulaman, W.; Pechter, P.; Blancaflor, E. B.; Baskin, T. I. Auxin, actin and growth of the Arabidopsis thaliana primary root. *Plant J.* **2007**, *50* (3), 514–528.

(59) Baluska, F.; Vitha, S.; Barlow, P. W.; Volkmann, D. Rearrangements of F-actin arrays in growing cells of intact maize root apex tissues: a major developmental switch occurs in the postmitotic transition region. *Eur. J. Cell Biol.* **1997**, *72* (2), 113–121.

(60) Sauer, M.; Jakob, A.; Nordheim, A.; Hochholdinger, F. Proteomic analysis of shoot-borne root initiation in maize (*Zea mays* L.). *Proteomics* **2006**, *6* (8), 2530–2541.



# The Absence of Heat Shock Protein HSP101 Affects the Proteome of Mature and Germinating Maize Embryos

Pedro E. Lázaro-Mixteco,<sup>†</sup> Jorge Nieto-Sotelo,<sup>‡</sup> Kirby N. Swatek,<sup>§</sup> Norma L. Houston,<sup>§</sup> Guillermo Mendoza-Hernández,<sup>#</sup> Jay J. Thelen,<sup>§</sup> and Tzvetanka D. Dinkova<sup>\*,†</sup>

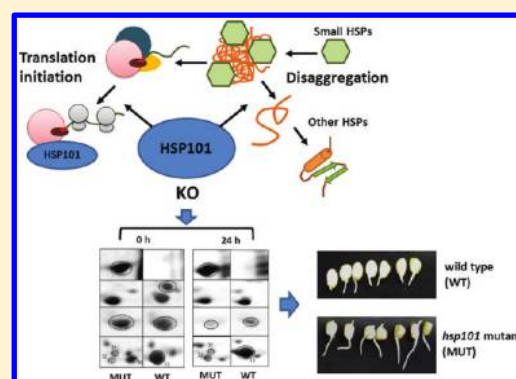
<sup>†</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, <sup>‡</sup>Jardín Botánico, Instituto de Biología, and <sup>#</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F., Mexico

<sup>§</sup>Interdisciplinary Plant Group and Division of Biochemistry, 109 Bond Life Sciences Center, University of Missouri—Columbia, Columbia, Missouri 65211, United States

## S Supporting Information

**ABSTRACT:** Maize heat shock protein HSP101 accumulates during embryo maturation and desiccation and persists at high levels during the first 24 h following kernel imbibition in the absence of heat stress. This protein has a known function in disaggregation of high molecular weight complexes and has been proposed to be a translational regulator of specific mRNAs. Here, a global proteomic approach was used to identify changes in the maize proteome due to the absence of HSP101 in embryos from mature-dry or 24 h-imbibed kernels. A total of 26 protein spots from the mature dry embryo exhibited statistically significant expression changes in the L10 inbred *hsp101* mutant (*hsp101-m5::Mu1/hsp101-m5::Mu1*) line as compared to the corresponding wild type (*Hsp101/Hsp101*). Additional six spots reproducibly showed qualitative changes between the mutant and wild-type mature and germinating embryos. Several chaperones, translation-related proteins, actin, and enzymes participating in cytokinin metabolism were identified in these spots by tandem mass-spectrometry (MS). The proteomic changes partially explain the altered root growth and architecture observed in young *hsp101* mutant seedlings. In addition, specific protein de novo synthesis was altered in the 24 h-imbibed mutant embryos indicating that maize HSP101 functions as both chaperone and translational regulator during germination. Supporting this, HSP101 was found as part of Cap-binding and translation initiation complexes during early kernel imbibition. Overall, these findings expose the relevance of maize HSP101 for protein synthesis and balance mechanisms during germination.

**KEYWORDS:** heat shock protein HSP101, polyribosomes, translation, plant proteomics, *Zea mays*



## INTRODUCTION

The mature maize kernel or caryopsis is a one-seeded fruit, in which the seed, composed of embryo (central axis surrounded by scutellum), endosperm, and remnants of seed coat and nucellus, is enclosed by the pericarp.<sup>1</sup> During the maturation process, the maize caryopsis decreases its relative water content until a quiescent metabolic state is achieved. This desiccation event allows the embryo survival and maintenance under a variety of conditions.<sup>2</sup> Along with other metabolic processes, protein synthesis has significant changes in the late stages of caryopsis development. Following the completion of seed storage protein accumulation, the levels of free amino acids, sugars, and degraded fatty acids, relevant for the supply of energy required during imbibition and germination phases, increase concomitantly with the desiccation tolerance of the caryopsis.<sup>3</sup> The mature caryopsis contains all the machinery required to initiate protein synthesis immediately upon imbibition, which at the very first stages of germination is supported exclusively by a pool of stored mRNAs.<sup>4</sup> This pool

largely contains transcripts that are required for germination, as well as mRNAs remaining from the caryopsis maturation process. At subsequent germination stages, other mRNAs are synthesized to facilitate root emergence.

Stored or newly transcribed mRNA pools are selectively translated at specific times in the course of development.<sup>5</sup> One regulatory mechanism for selective translation of mRNAs involves eukaryotic translation initiation factor (eIF) 4E that recognizes the Cap structure (7mGpppN, where N is any nucleotide) at the 5' end of mRNAs. This protein acts during translation initiation by formation of a complex with platform protein, eIF4G, which recruits 43S preinitiation complex formed by eIF3, ternary complex (eIF2-Met-tRNA<sup>Met</sup>-GTP), 40S ribosomal subunit, and other initiation factors.<sup>6</sup> The Cap-binding protein eIF4E has a highly conserved amino acid sequence in all organisms allowing for its direct contact with

Received: January 2, 2012

Published: April 30, 2012

the Cap structure.<sup>7</sup> eIF4G interacts with eIF4E through an YXXXXLΦ motif (where X is any amino acid and Φ is a hydrophobic residue) and stabilizes the interaction with the 5' Cap, forming an eIF4F-mRNA complex. The interaction between 5' Cap and the translational machinery is prevented by the binding of eIF4E to other cellular proteins through the same motif used for its interaction with eIF4G. By such means, cells can modulate either global translation levels, or specific mRNA recruitment.<sup>8</sup>

Multiple eIF4E family members have been identified in a wide range of organisms including plants, flies, mammals, frogs, birds, nematodes, and fish.<sup>9</sup> eIF4E family members show different Cap-binding affinities or altered interactions with eIF4G and other proteins, providing clues to their physiological roles. It has been suggested that each organism has at least one eIF4E that is ubiquitous and constitutively expressed to carry out basal translation levels, and that other family members are involved in specialized functions. In maize caryopses, the Cap-binding complex formed by eIF(iso)4E and eIF(iso)4G is predominant over eIF4E and eIF4G at the mature dry stage, but after 24 h of imbibition, both complexes are present at similar levels.<sup>10</sup> Recently, two proteins belonging to the heat shock protein (HSP) family, HSP101 and HSP70, were identified as interactors of the Cap-binding complexes in fully mature dry caryopses, but not in caryopses imbibed for 24 h.<sup>11</sup> This finding can be interpreted as evidence for a possible role of chaperones in the initiation of protein synthesis during caryopsis development.

The accumulation of many HSPs in the mature embryo is controlled during caryopsis development in a heat shock-independent manner.<sup>12,13</sup> Many HSPs appear before the onset of desiccation and are present several days after germination.<sup>12–15</sup> Although it has been suggested that HSPs may function in desiccation tolerance,<sup>14</sup> their role in the seed development and germination is not yet clear as these processes are normal in heat shock protein mutants.<sup>14–16</sup>

Plant HSP101 proteins are members of the ClpB protein subfamily that plays an important role in heat induced thermo-tolerance.<sup>17</sup> HSP101 accumulates during development of the maize caryopsis and usually disappears within the first 3 days after imbibition.<sup>14</sup> HSP101 localizes to the cytoplasm, the nucleus, and some nucleoli. During the first 3 days after caryopsis imbibition, maize *Hsp101* gene knockouts show increased primary root growth at optimal temperature<sup>14</sup> indicating that HSP101 may act as negative regulator of plant growth. HSP101 also inhibits nodal root development in maize seedlings grown in the dark and in seedlings stimulated by light or high temperature.<sup>15</sup>

In addition to its role as a chaperone, HSP101 has been proposed to function as a translational regulator. HSP101 binds to the omega (Ω) sequence found in the 5'-untranslated region (UTR) of tobacco mosaic virus (TMV) and to the internal light-regulatory element (iLRE) of ferredoxin mRNA enhancing the translation of reporter genes containing these sequences, when expressed in yeast or carrot protoplasts.<sup>18,19</sup> A current working model proposes that HSP101 enhances translation of 5' Ω or iLRE carrying mRNAs through its interaction with the translation initiation factors eIF4G and eIF3.<sup>18,20</sup>

As already mentioned above, HSP101 interacts with Cap-binding complexes in mature maize caryopses, but not in caryopses imbibed for 24 h.<sup>11</sup> This result substantiates the hypothesis that HSP101 has a supporting role in the initiation

of protein synthesis and/or in the early steps of folding of native protein structures during maize caryopsis development and perhaps caryopsis germination. To assess the relevance of HSP101 during protein accumulation in mature maize caryopses, the proteomes of wild-type and previously characterized *hsp101* knockout insertion mutant lines were analyzed. The results showed 26 differentially expressed protein spots ( $p < 0.05$ ) in the mature dry embryo with isoelectric points (pI) between 4 and 7. Additionally, six spots reproducibly showed qualitative changes between the mutant and wild-type mature and germinating embryo. Among them, several HSP family members, translation-related proteins, and enzymes of the cellular metabolism were found. During caryopsis germination, a differential distribution of HSP101 along sucrose polyribosomal gradients was observed between 0 and 24 h of imbibition. The global de novo protein synthesis during germination was not affected by the absence of HSP101; however specific proteins showed differential in vivo labeling or accumulation patterns in the *hsp101* mutant. Overall, these results indicate that HSP101 seems to play specific roles in protein synthesis that are reflected in the maize embryo proteome from mature and germinating caryopsis.

## ■ MATERIALS AND METHODS

### Plant Materials and Growth Conditions

Two previously reported maize (*Zea mays* L.) *hsp101* mutant alleles and their corresponding near-isogenic wild-type lines were used for proteomic analysis, m<sup>7</sup>GTP-Sepharose-binding assay and protein labeling with [<sup>35</sup>S]-methionine. These were the inbred lines L4, mutant (*hsp101-m2::Mu1/hsp101-m2::Mu1*), wild type (*Hsp101/Hsp101*); and L10, mutant (*hsp101-m5::Mu1/hsp101-m5::Mu1*), wild type (*Hsp101/Hsp101*). A Mexican landrace Tuxpeño, var. Chalqueño was used to analyze the HSP101 protein distribution along sucrose gradients. For all experiments involving germination, the maize caryopses were imbibed in wet cotton sheets in the dark at 28 °C in an incubator. The embryos were excised manually from either quiescent or 24-h-imbibed caryopses.

### Isolation of Total Proteins

All reagents were purchased from Sigma-Aldrich Quimica, Mexico, unless otherwise stated. Excised embryos (250 mg) were homogenized in 10 mL of buffer containing 50% [v/v] phenol, pH 8.8, 0.9 M sucrose, 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.4% [v/v] 2-mercaptoethanol, 100 mM Tris-HCl, pH 8.8, EDTA-free protease inhibitors (Complete, Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA) using a mortar and pestle. The homogenate was agitated for 30 min at 4 °C on a shaker. After a 15 min centrifugation at 10 000g and 4 °C, the phenol phase was removed and proteins were precipitated with 5 vol of ice-cold 0.1 M ammonium acetate in 100% methanol at –80 °C for 2 h. The protein pellet was recovered by 10 min centrifugation at 10 000g, washed twice in 10 mL of 0.1 M ammonium acetate in 100% methanol, twice in ice-cold 80% acetone, and once in 70% ethanol. The pellet was dried for 5 min at room temperature and resuspended immediately in 1 mL of isoelectrofocusing (IEF) buffer containing 8 M urea, 2 M thiourea, 4% (w/v) CHAPS, 2% (v/v) Triton X-100, 50 mM dithiothreitol (DTT), and EDTA-free Complete protease inhibitors. Insoluble matter was removed by centrifugation for 20 min at 18 000g. Protein concentration was determined in triplicate against a standard curve of bovine serum albumin



(BSA) using a protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA) based on a Bradford<sup>21</sup> modified procedure.

### Isolation of Cap-Binding Proteins by m<sup>7</sup>GTP-Sepharose Affinity Chromatography

Sepharose bound to m<sup>7</sup>GTP was purchased from GE Healthcare (Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden), and equilibrated in Buffer A [20 mM HEPES, pH 7.6, 100 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 10% (v/v) glycerol, 0.1% (v/v) Triton X-100, 0.5 mM dithiothreitol] prior to use. For Cap-binding complexes purification, 2 g of excised embryos from mutant and wild-type (WT) L4 and L10 caryopses was used. Axes were pulverized to a fine powder in liquid nitrogen with a mortar and pestle. The powder was suspended in 15 mL of Buffer A containing Complete EDTA-free protease inhibitors. The extracts were clarified by centrifugation at 20 000g and 4 °C for 30 min. The supernatants were filtered through 8 layers of cheesecloth, 0.5 mL of m<sup>7</sup>GTP-Sepharose was added, and the mixture was incubated with gentle agitation for 1.5 h at 4 °C. The bead slurry was poured onto a 10 mL Column (Bio-Rad). The sepharose beads were washed first with 10 mL of Buffer A, and then with 10 mL of Buffer A including 0.1 mM GTP. The m<sup>7</sup>GTP-Sepharose-bound proteins were eluted with Buffer A containing 0.2 mM m<sup>7</sup>GTP in five fractions of 400 μL each. Fifty microliters of each fraction was resolved by 15% (w/v) SDS-PAGE and silver-stained.

### Analysis of Sucrose Gradient Fractions (Polyribosomes)

One gram of excised embryos from dry (0 h) or imbibed for 12 h (12 h) and 24 h (24 h) caryopses was used. The axes were pulverized to a fine powder with liquid nitrogen and mortar and pestle. The powder was suspended in 6 mL of lysis buffer containing 200 mM Tris-HCl, pH 8.5, 50 mM KAc, 25 mM MgAc, 2 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA), and 0.01 mg/mL cycloheximide. The extract was clarified by centrifugation at 20 000g for 15 min at 4 °C. The supernatant was layered onto 2 mL of sucrose cushion buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 20 mM KAc, 10 mM MgAc, 60% sucrose, and 0.01 mg/mL cycloheximide) and centrifuged at 50 000 rpm in a 75Ti rotor (Beckman Coulter, Mexico City, Mexico) for 3 h. The pellet was resuspended in 1 mL of lysis buffer and layered on 10–35% sucrose gradient containing 50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 20 mM KAc, 10 mM MgAc, and 0.01 mg/mL cycloheximide. The gradient was centrifuged in SW-40 rotor (Beckman) at 37 000 rpm for 2.5 h at 4 °C. Fractionation and absorptivity at 260 nm of the gradient was done using the Auto Densi-flow system (Labconco, Kansas City, MO) connected to Econo UV Monitor EM-1 (Bio-Rad). Seventeen fractions (0.7 mL each) were collected for each sample and the RNA integrity was determined by electrophoresis. Proteins in each fraction were precipitated with 12% trichloroacetic acid (TCA). The protein pellets were resuspended in 100 μL of distilled water, and 25 μL of each fraction was resolved by SDS-PAGE.

### Western Blotting

Thirty micrograms of total protein extract or equal volumes of either cap-binding complexes or sucrose gradient fractions were loaded on a 15% SDS-PAGE gel and transferred onto a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Millipore Corp., Billerica, MA). After briefly drying, the membrane was blocked with 5% (w/v) fat-free milk in phosphate-buffered saline (PBS) for 1 h. Blocked membranes were incubated overnight at 4 °C with primary antibodies. The membranes were incubated with the secondary antibody for 2 h after 3 washes with PBS and 1%

(v/v) Tween 20. Detection was performed with the Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore). The primary antibody dilutions were as follows: the maize anti-HSP101,<sup>14</sup> the universal anti-HSP70 (Agrisera, Vännäs, Sweden), and the *Arabidopsis thaliana* anti-eEF1b-β (Agrisera) were used at 1:1000 dilution; the wheat anti-eIF4F and anti-eIF(iso)4F (kindly donated by Karen S. Browning, University of Texas, Austin, TX) were used at 1:5000 dilution; the secondary antibody was used at 1:10 000 dilution.

### In Vivo Protein Labeling

Mutant and WT L4 and L10 caryopses were germinated for 21 h under the described conditions. Embryos were excised and placed in 2 mL of Murashige and Skoog media (MS) containing 150 μCi [<sup>35</sup>S]-methionine (Perkin-Elmer, Waltham, MA) and briefly vacuum infiltrated. Following incubation for 3 h with continuous agitation, the embryos were washed twice with label-free MS and total proteins were extracted. Clarified extracts (5 μL) were used for radioactivity incorporation estimation. The amount of total protein and radioactivity incorporated into proteins was calculated and SDS-PAGE was performed to detect quantitative (equal protein quantity loaded) and qualitative (equal radioactivity loaded) differences.

### Two-Dimensional Gel Electrophoresis

Isolated proteins were separated by two-dimensional (2D) gel electrophoresis as described elsewhere.<sup>22</sup> Briefly, 1 mg of total protein was brought up to 450 μL with IEF extraction buffer. IEF was performed in a Protean IEF cell unit (Bio-Rad) under the following conditions: active rehydration 50 V for 12 h, 100 V for 100 Vh, 500 V for 500 Vh, and 8000 V for 99 kVh. Following IEF, IPG strips were incubated in SDS equilibration buffer (1.5 M Tris-HCl, 6 M urea, 30% [v/v] glycerol, 5% [w/v] SDS) supplemented with 2% (w/v) DTT for 15 min, followed by incubation for 15 min in the same buffer supplemented with 2.5% (w/v) of iodoacetamide. IPG strips were briefly rinsed with SDS running buffer (25 mM Tris, 0.1% [w/v] SDS) and placed onto 12% acrylamide gels. Strips were then overlaid with 1% (w/v) agarose in SDS running buffer. The second-dimension SDS-PAGE was performed in a Ettan DALT 12 System (GE Healthcare) until the dye migrated off the gel. Following SDS-PAGE, gels were fixed with 50% methanol for 30 min and then, stained with Coomassie Colloidal (20% [v/v] ethanol, 1.6% [v/v] phosphoric acid, 8% [w/v] ammonium sulfate, 0.08% [w/v] Coomassie Brilliant Blue G-250) for at least 16 h. For S<sup>35</sup>-labeling analysis, after destaining, the gels were impregnated with Amplify, dried and exposed to an amplifier phosphor screen (GE Healthcare).

### MS Data Analysis and Protein Identification

Two-dimensional gels corresponding to three independent (different biological samples) trials were scanned using a ScanMaker 9800XL (Microtek, Carson, CA) (300 dpi; 16-bit grayscale pixel depth).<sup>23</sup> Scanned images were analyzed with ImageMaster 2D Platinum software version 6.0 (GE Healthcare) to detect, quantify, and match spots. To compensate for subtle differences in sample loading, gel staining, and destaining, the volume of each spot (i.e., spot abundance) was expressed as relative volume. Protein abundance was expressed as relative volume whereby the relative spot volume is each spot volume per total spot volume. Spots were analyzed further only if they were present in all biological samples. Spots were matched to a chosen reference gel and matched spots were termed spot groups. To identify statistically significant

**Table 1. Differentially Expressed Proteins Identified in Maize Embryos from Mature and Dry Caryopses of *hsp101* Mutant (*hsp101-m5::Mu1/hsp101-m5::Mu1*) vs. Wild Type (*Hsp101/Hsp101*) Using SEQUEST Search Algorithms**

protein ID <sup>a</sup>	spot no. <sup>b</sup>	accession <sup>c</sup>	expression ratio <sup>d</sup>	% protein coverage <sup>e</sup>	Xcorr <sup>f</sup>	no. of unique peptides <sup>g</sup>	total no. of peptide spectral matches <sup>h</sup>
Up-Regulated Proteins							
Heat shock protein 70 ( <i>Z. mays</i> ) <sup>3</sup>	24	GRMZM2G153815_P01	1.97	45.22	388.42	30	233
Phosphoglucosyl-transferase-cytoplasmic ( <i>Z. mays</i> ; EC:5.4.2.2) <sup>3‡</sup>	25	GRMZM2G109383_P02	1.49	28.62	146.36	23	88
RuBisCO large subunit-binding protein- $\alpha$ subunit ( <i>Z. mays</i> ) <sup>3‡</sup>	26	GRMZM2G434173_P01	2.86	40.68	332.98	29	203
UDP-glucosyl-transferase BX9 ( <i>Z. mays</i> ; EC:2.4.1.0) <sup>3‡</sup>	23	GRMZM2G161335_P01	1.55	36.72	157.55	16	104
Actin-1 ( <i>Z. mays</i> ) <sup>3‡</sup>	22	GRMZM2G126010_P01	1.65	56.1	235.05	16	88
Succinyl-CoA ligase, beta-chain ( <i>Z. mays</i> ) <sup>3‡</sup>	20	GRMZM2G064695_P04	1.59	26.24	98.95	14	62
Adenosine kinase ( <i>Z. mays</i> ; EC:2.7.1.0; EC:2.7.1.20) <sup>2‡</sup>	21	GRMZM2G540538_P01	1.91	43.57	185.67	12	48
Embryonic protein DC-8 ( <i>Z. mays</i> ) <sup>3‡</sup>	6	GRMZM2G063287_P01	1.27	55.42	440.2	32	245
Embryonic protein DC-8 ( <i>Z. mays</i> ) <sup>3‡</sup>	5	GRMZM2G063287_P01	2.56	48.46	195.42	23	112
6-Phosphoglucono-lactonase domain containing protein ( <i>Z. mays</i> ; EC:3.1.1.31) <sup>3</sup>	17	GRMZM2G148769_P01	2.07	37.69	73.54	12	46
Embryonic protein DC-8 ( <i>Z. mays</i> ) <sup>3‡</sup>	8	GRMZM2G371375_P01	3.08	27.71	82.01	10	52
Globulin-1 s allele precursor ( <i>Z. mays</i> ) <sup>2‡</sup>	11	GI 75140005	1.21	24.67	236.35	14	75
HSP20 Class IV heat shock protein precursor ( <i>Z. mays</i> ) <sup>2</sup>	12	GRMZM2G331701_P01	1.44	53.11	168.2	15	52
Dehydrin ( <i>Hordeum vulgare</i> )*	18	GI 226500940	2.48	5.09*	99.0*	-	-
Down-Regulated Proteins							
Elongation factor 2 ( <i>Z. mays</i> ) <sup>3‡</sup>	1	GRMZM2G040369_P01	0.47	39.34	275.77	26	122
Vicilin-like embryo storage protein ( <i>Z. mays</i> ) <sup>3‡</sup>	2	GRMZM2G067919_P02	0.4	36.91	334.46	25	202
Cupin protein family ( <i>Oryza sativa japonica</i> ) <sup>3‡</sup>	3	GRMZM2G078441_P01	0.71	13.23	242.93	16	138
Aldose Reductase ( <i>Z. mays</i> ) <sup>1‡</sup>	19	GRMZM2G059314_P01	0.57	29.13	111.13	12	33
Adenosine kinase ( <i>Z. mays</i> ; EC:2.7.1.0; EC:2.7.1.20) <sup>1‡</sup>	7	GRMZM2G540538_P01	0.27	32.46	131.04	9	36
Cupin protein family ( <i>O. sativa japonica</i> ) <sup>2</sup>	9	GRMZM2G078441_P01	0.61	17.27	250.56	12	74
Cupin protein family ( <i>O. sativa japonica</i> ) <sup>2‡</sup>	10	GRMZM2G078441_P01	0.63	24.09	420.54	18	115
Vicilin-like embryo storage protein ( <i>Z. mays</i> ) <sup>2</sup>	15	GRMZM2G067919_P02	0.63	22.16	262.1	15	69
HSP16.9D Class I heat shock protein 1 ( <i>Z. mays</i> ) <sup>2‡</sup>	13	GRMZM2G437100_P01	0.28	30.32	76.27	4	14
Globulin-1 s allele precursor ( <i>Zea mays</i> ) <sup>1‡</sup>	4	Gi 75140005	0.53	54.67	609.12	24	182
Globulin-1 s allele precursor ( <i>Z. mays</i> ) <sup>2</sup>	16	Gi 75140005	0.72	22.44	169.53	11	53
HSP17.4 Class I Heat shock protein 3 ( <i>Z. mays</i> ) <sup>2</sup>	14	AC208204.3_FGT006	0.81	28.93	85.42	4	29

<sup>a</sup>Asterisk (\*) indicates protein identified using PepNovo and MS BLAST sequence similarity searches. Numbers (1–3) indicate whether the protein identification was from (1) the wild-type, (2) *hsp101* mutant, or (3) both (*hsp101* mutant and wild-type) samples. Double dagger (‡) indicates protein spots with more than one protein identification. <sup>b</sup>Spot number associated with the wild-type reference gel. <sup>c</sup>Accession number from maize Unigene or NCBI protein database. <sup>d</sup>Expression ratio (*hsp101* knockout/wild type) determined from the average relative volume of each spot. <sup>e</sup>Average or identified, percent protein coverage from SEQUEST search algorithms. <sup>f</sup>Average or identified, combined Protein Xcorr values from SEQUEST search algorithms. <sup>g</sup>Represents the peptide unique identifiers of all master proteins from all protein groups. All were identified with high confidence. <sup>h</sup>Displays the total number of peptide spectrum matches (PSMs) from peptide unique identifiers.

expression changes between matched wild-type and mutant spot groups, a two-sample test was performed. Each spot group with a *t*-value greater than 2.78 which determines a statistical significance of *p* < 0.05 was considered for significant protein expression changes between the mutant and wild-type maize samples. Spot identification criteria were as follows: (1) present in 3 of 3 gels in wild-type and mutant subclasses; (2) present in both wild-type and mutant reference gels; (3) *t*-value greater than 2.78. According to these three criteria, 26 spots were picked from a chosen reference gel of the wild-type and mutant samples for MS analysis (Table 1 and Supporting Information Table S1). Spots present or absent in the mutant versus wild-type comparison or changed in their accumulation at the 24 h-imbibed stage were subjected to qualitative analysis using three independent (different biological samples) replicate 2D gels. Those spots reproducibly detected in only the mutant or only

the wild-type samples were chosen for protein identification by MS (Table 2 and Supporting Information Table S2).

For the protein spots listed in Table 1 and Supporting Information Table S1, the mass spectrometry (MS) analysis was performed similarly to previous report.<sup>24</sup> Protein samples treated with trypsin were lyophilized for 4 h at 30 °C. Samples were resuspended in 50  $\mu$ L of 0.1% formic acid and centrifuged at 1000 rpm for 10 min. Digested protein (10  $\mu$ L) samples were analyzed on a LTQ Proteome X linear ion (Thermo Fisher, San Jose, CA). Before mass spectrometry analysis, peptides were concentrated with C<sub>8</sub> Captraps (Michrom Bioresources, Auburn, CA) and separated by a C<sub>18</sub> column using a 20 min acetonitrile (ACN) gradient 3%–97% solvent B (100% ACN in 1% (v/v) formic acid), in solvent A (0.1% (v/v) formic acid).

**Table 2. Proteins Preferentially Accumulated in Maize Embryos Isolated from Mature Dry (0 h) or Imbibed for 24 h (24 h) Caryopses from *hsp101* Mutant (mut) or Wild-Type (WT)**

protein (species)/AC <sup>a</sup>	spot no.	spot presence <sup>b</sup>	MASCOT score <sup>c</sup>	sequence coverage (%) <sup>d</sup>	M <sub>r</sub> predicted/ M <sub>r</sub> gel	pI predicted/ pI gel	no. unique peptides	emPAI <sup>e</sup>
0 h								
HSP16.9A class I heat shock protein 1 ( <i>Z. mays</i> )/ ACG36285	29	2	759	68	16.9/16.7	6.77/6.7	13	1.97
HSP16.9B class I heat shock protein 1 ( <i>Z. mays</i> )/ ACG31332	28	1	613	71	16.9/17.0	6.77/5.55	12	4.5
HSP16.9A class I heat shock protein 1 ( <i>Z. mays</i> )/ ACG36285	30	2	1110	71	16.9/16.0	6.77/6.07	36	4.13
HSP17.5 class II heat shock protein ( <i>Z. mays</i> )/ NP_001105705	31	2	410	49	17.5/17.0	5.56/5.92	5	1.88
HSP16.9A class I heat shock protein 1 ( <i>Z. mays</i> )/ ACG36285	32	2	405	67	16.9/15.9	6.77/5.95	24	3.28
HSP16.9C class I heat shock protein 1 ( <i>Z. mays</i> )/ ACG48548	13	1	1107	57	17.1/17.2	6.77/5.8	23	9.45
24 h								
HSP16.9A class I heat shock protein 1 ( <i>Z. mays</i> )/ ACG36285	29	2	893	66	16.9/16.7	6.77/6.8	12	5.15
abscisic acid-responsive gene rab28 ( <i>Z. mays</i> )/ CAA41854	27	1	1204	82	27.7/38.7	4.9/4.6	23	5.18
HSP16.9A class I heat shock protein 1 ( <i>Z. mays</i> )/ ACG36285	13	1	857	75	16.9/16.1	6.77/6.08	20	5.15

<sup>a</sup>Accession number from the maizesequence.org database. <sup>b</sup>Indicates whether the protein identification was from a given spot in wild type (1) or *hsp101* mutant (2), respectively. <sup>c</sup>Probability based MASCOT score is defined as  $-10 \times \log(p)$ , where  $p$  is the probability that the observed match is a random event. Scores >43 indicate identity or extensive homology ( $p < 0.05$ ). Protein scores are derived from ions scores as a nonprobabilistic basis for ranking protein hits. <sup>d</sup>Percentage of protein coverage by peptide sequencing. <sup>e</sup>Exponentially Modified Protein Abundance Index (emPAI) for estimation of absolute protein amount is equal to  $10^{\text{PAI}} - 1$ , which is proportional to protein content in a protein mixture.

Digested peptides were separated by using a 10 cm fused silica nanospray needle (360  $\mu\text{m}$  outer diameter, 150  $\mu\text{m}$  inner diameter; Polymicro Technologies, Phoenix, AZ) packed with "Magic C18" (200  $\text{\AA}$ , 5  $\mu\text{m}$  particles; Michrom Bioresources) in 95% methanol. This nanospray needle was equilibrated for 2 h at 200 nL/min with 1 h 97:3 mix of solvent B to solvent A, then 30 min 50:50 B/A mix, and finally a 30 min 3:97 B/A mix. Dynamic exclusion was enabled using a 5 repeat count, 30 s repeat duration, exclusion list size 50, and 30 s exclusion duration. The scan range was set between 300 and 2000  $m/z$ . Data dependent MS/MS scans were collected for the eight most intense parent ions. The nanospray column was held at ion sprays of 2.1 kV and a flow rate of 200  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

Raw files were searched using SEQUEST via Proteome Discoverer 1.3.339 (ThermoFisher Scientific) against the Unigene maize database (Zmays\_166\_peptide,<sup>25</sup>) supplemented with NCBI maize entries (106 114 total entries, downloaded Sept. 2011) that had been concatenated to a randomized database as a decoy. SEQUEST parameters were set up accordingly: (1) mass type = average precursor and fragment, (2) peptide tolerance = 1000 ppm, (3) fragment ion tolerance = 1 atomic mass unit, (4) maximum peptides considered = 500, (5) maximum peptides output = 10, (6) ion series = b and y ions, (7) enzyme = trypsin, (8) maximum missed cleavage sites = 2. Additionally, peptide modifications parameters were the following: (1) post-translation modifications per peptide = 4, (2) fixed modification of cysteine = carboamidomethylation (+57), (3) variable modification of methionine = oxidation (+16). Mass Spec Format files generated from SEQUEST were filtered using the following settings: (1) peptide confidence = high; (2) Minimal Xcorr for charge state = +1:1.5, +2:2, +3:2.5, +4:3.0, +5:3.1, +6:3.2, +7:3.3, >+7:3.4; (3) protein = minimum of 2 peptides per protein. Proteins identifications were consensus if they were assigned as the same protein accession in both wild-type and

*hsp101* mutant samples. If protein assignments were different, the protein with the highest combined Xcorr value in either wild-type or mutant maize samples was reported. For spots with more than one protein identification, the proteins with lower Xcorr value are listed in Supporting Information Table S1. Protein sequences and their accession numbers were uploaded into the Blast2GO program<sup>26</sup> for gene annotation. Blast2GO default settings were used for blast, mapping, and annotation searches.

To identify the differential expressed protein (spot no. 18) that had not been identified using SEQUEST searches, DTA files generated by BioWorks (version 3.3.1) from both maize wild-type and *hsp101* mutant were subjected to batch de novo sequencing using the PepNovo program.<sup>27</sup> De novo sequencing and MS-BLAST searches were performed similarly to previous report,<sup>28</sup> with the threshold for high scoring segment pairs set at 64. Other parameters used in the MS-BLAST searches included: (1) application of the default filter, (2) application of LC-MS/MS presets, and (3) 1 unique peptide. Using the PepNovo program and MS-BLAST searches, hits with the highest value were considered to be significant and resulted in protein identifications (Supporting Information Figure S1).

All the proteomic data were uploaded to the Proteomics Identifications database (PRIDE<sup>29</sup>) with the accession number 20434-20485.

For the identifications listed in Table 2 and Supporting Information Table S2, the protein spots were excised from the Coomassie stained 2D gels, and destained with 50% (v/v) methanol 5% (v/v) acetic acid for 12 h. The destained gels were washed with deionized water, soaked for 10 min in 100 mM ammonium bicarbonate, cut into small pieces, completely dehydrated with 100% acetonitrile, and vacuum-dried. In-gel digestion was performed by adding 30  $\mu\text{L}$  of modified porcine trypsin solution containing 20 ng/ $\mu\text{L}$  (Promega, Madison, WI) in 50 mM ammonium bicarbonate followed by overnight



incubation at room temperature. Peptides were extracted with 50% (v/v) acetonitrile and 5% (v/v) formic acid twice for 30 min each time with sonication. The volume of the extracts was reduced by evaporation in a vacuum centrifuge and then adjusted to 20  $\mu\text{L}$  with 1% (v/v) formic acid.

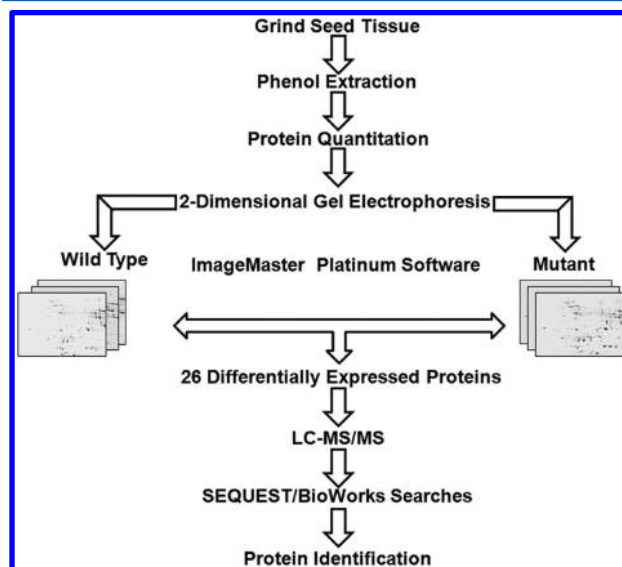
Mass spectrometric analysis of tryptic peptides was carried out using an integrated nano-LC–ESI–MS/MS system (quadrupole/time-of-flight, Synapt G2 High Definition mass spectrometer, Waters Corporation), equipped with a NanoLockSpray ion source. The instrument was coupled on-line to a NanoAcquity Ultra Performance liquid chromatograph (UPLC) (Waters Corporation). The binary solvent system used was 2% acetonitrile in Milli Q water with 0.1% formic acid (mobile phase A) and 98% acetonitrile in Milli Q water with 0.1% formic acid (mobile phase B). Samples were concentrated and desalted by injection onto a Symmetry C<sub>18</sub> UPLC trapping column (5  $\mu\text{m}$ , 180  $\mu\text{m}$   $\times$  20 mm, Waters Corporation) and washed with 100% mobile phase A at a flow rate of 15  $\mu\text{L}/\text{min}$ . After 3 min, the trap column was switched in-line with the analytical column. Peptides were separated on a BEH, C<sub>18</sub> UPLC column (1.7  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$   $\times$  100 mm, Waters Corporation) using a linear gradient to 40% B over a 30 min period, at a flow rate of 0.3  $\mu\text{L}/\text{min}$  followed by a 10 min rinse of 98% mobile phase B. The mass spectrometer was calibrated with a NaCsI solution and operated in ESI positive V-mode at a resolution of 10 000 full width at half height (fwhh). Spectra were acquired in automated mode using data-dependent acquisition (DDA). [Glu<sup>1</sup>] fibrinopeptide B solution (100 fmol/ $\mu\text{L}$ ) was infused through the reference sprayer of the NanoLockSpray source at a flow rate of 500 nL/min and was sampled at 30 s intervals during the acquisition. MS survey scans of 1 s over the  $m/z$  range 300–1600 were used for peptide detection followed by two MS/MS scans of 2 s each ( $m/z$  50–2000) of detected precursors. Collision energies were automatically adjusted based upon the ion charge state and the mass. The five most intensive precursor ions were interrogated per MS/MS switching event. Dynamic exclusion for 60 s was used to minimize multiple MS/MS events for the same precursor.

DDA raw data files were processed and converted to pkl files using ProteinLynx Global Server version 2.4 (PLGS) software (Waters Corporation). Pkl files were subsequently database searched by MASCOT search algorithm (Version 1.6b9, Matrix Science, London, U.K.) available at <http://www.matrixscience.com>). Searches were conducted using the *Other green plants* subset (696 476 sequences, 20110818) of the National Center for Biotechnology Information nonredundant database (NCBI nr, <http://www.ncbi.nih.gov>). Trypsin was used as specific protease, one missed cleavage was allowed with mass tolerances of 50 ppm and 0.05 Da for the precursor and fragment ion, respectively. Variable modifications included methionine oxidation and glutamine–asparagine deamination. Peptide matches with Mascot scores exceeding the 95% level of confidence were accepted as correct matches. Ion score is  $-10 \times \log(P)$  where  $P$  is the probability that the observed match is a random event. The threshold score in the above conditions was 52 for  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### The Absence of HSP101 Coincides with Particular Changes in the Proteome of Maize Mature Embryos

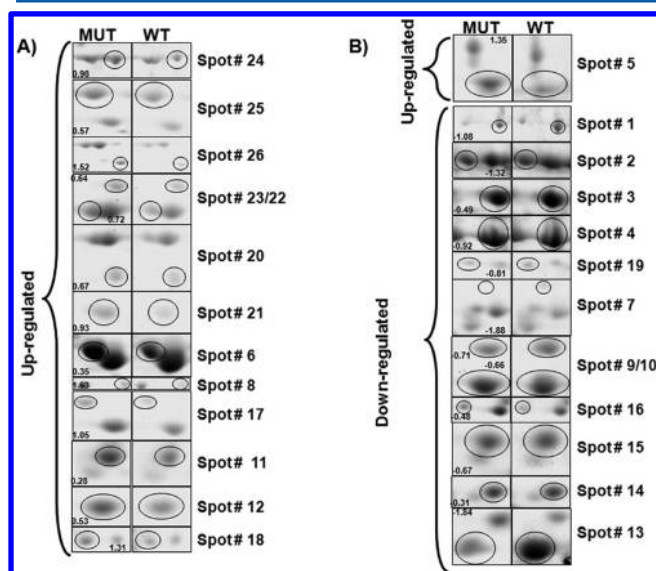
Proteins present in the dry and mature maize embryo accumulate during its development and provide part of the energy required to achieve a germination competitive state. To detect differentially expressed proteins during embryo maturation in the absence of HSP101, total proteins obtained from the L10 mutant (*hsp101-m5::Mu1/hsp101-m5::Mu1*) and the L10 WT (*Hsp101/Hsp101*) inbred lines were analyzed by 2-DE in biological triplicate as depicted in the workflowchart shown in Figure 1. Isoelectrofocusing of total protein was performed in a



**Figure 1.** Experimental approach for identifying differentially expressed proteins. Proteins were extracted by grinding tissues and phenol extraction methods. After total protein quantitation of both mutant and wild-type maize embryos, proteins were separated by 2-dimensional gel electrophoresis in biological triplicate. Gels for both wild-type and mutant were imaged, spot volumes quantified, and spot areas matched using ImageMaster Platinum Software. Spots that were present in 3 out of 3 gels in both wild-type and mutant subclasses, present in both wild-type and mutant reference gels, and spots with a  $t$ -value greater than 2.78 were considered statistically significant. A total of 26 differentially expressed proteins were identified by liquid chromatography tandem mass-spectrometry (LC–MS/MS) using both SEQUEST searches and de novo sequencing/MS BLAST sequence similarity searches.

$pI$  range of 4–7, as most proteins from mature embryo fall within this  $pI$  range (Supporting Information Figure S2). Separation between  $pI$  3 and 10 caused poor resolution of the majority of spots detected by Coomassie staining (data not shown). To identify differentially expressed 2-DE protein spots, all scanned images were analyzed with ImageMaster 2D Platinum software as described in the Material and Methods. Only spots present in all biological samples and with  $t$ -values greater than 2.78, representing a statistical significance ( $p < 0.05$ ) in the difference between the mutant and WT embryos, were considered. The 26 spots fulfilling these criteria were identified from reference gels (Supporting Information Figure S2) in each mutant and WT L10 inbred lines using SEQUEST or PepNovo and MS Blast similarity searches (Table 1). In several cases, a single spot rendered more than one protein identification. The highest Xcorr values corresponded to 12

proteins that were down-regulated and 14 that were up-regulated in the absence of HSP101 (Table 1). The proteins with lower Xcorr values are listed in Supporting Information Table S1. A detailed diagram of these spots with corresponding spot numbers and the expression  $\log_2$  ratios (up-regulated; positive and down-regulated; negative) is shown in Figure 2. All



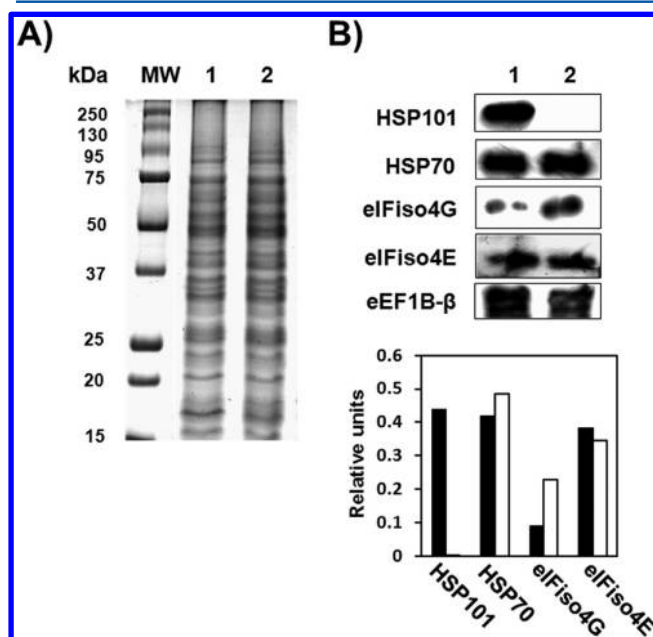
**Figure 2.** Differentially expressed protein spots between L10 *hsp101* mutant and *Hsp101* WT mature dry embryos. The 26 statistically significant spots are circled and the  $\log_2$  ratios (mutant/WT) are shown. (A) Up-regulated and (B) down-regulated.

of the shown changes were statistically significant at  $p < 0.05$  from three independent biological replicates. Additionally, there were spots present only in the mutant or in the WT that were qualitatively analyzed in three biological replicates for reproducibility (Supporting Information Figure S3) and were also identified by mass spectrometry (Table 2). Proteins with lower expression levels in embryos at the mature-dry stage in the *hsp101* mutant were chaperones HSP17.4-CI and HSP16.9D-CI, the translation elongation factor eEF2, vicilin-like storage proteins, cupin, aldose reductase, adenosine kinase, and the globulin-1 S allele (Table 1). In addition, some of the down-regulated spots also contained peptides matching HSP16.9E-CI, HSP17.8-CII, alcohol dehydrogenase I, the acidic ribosomal protein P0, cysteine synthase precursor I, pyridoxine biosynthesis protein ER1, glycine-rich protein 2, GSH reductase, and anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase (Supporting Information Table S1). Proteins showing increased expression levels in the *hsp101* mutant were chaperones HSP70, HSP20, and the Rubisco chaperonin CPN60A; phosphoglucomutase, the UDP-glucosyl transferase BX9, actin, adenosine kinase and other proteins related to cellular metabolism, the late embryogenesis abundant (LEA) protein DC-8, a dehydrin and the Globulin-1 S allele precursor (Table 1). In addition to the above changes, mature dry embryos from the *hsp101* mutant contained some proteins not present in the WT (Table 2). These included HSP17.5-CII and isoforms of HSP16.9A-CI with different  $pI$ 's (spots 29, 30, and 32 from Supporting Information Figure S2) identified with the highest MASCOT score. In contrast, HSP16.9B-CI and HSP16.9C-CI were only observed in the WT (Table 2). The spots where these proteins were identified contained additional

proteins listed in Supporting Information Table S2. The results shown above suggested that HSP101 affects the levels of several proteins stored in the maize mature embryo. This might be achieved through effects on protein synthesis, protein stability, or post-translational modifications.

### The Absence of HSP101 Modifies the Abundance of Proteins within Cap-Binding Complexes

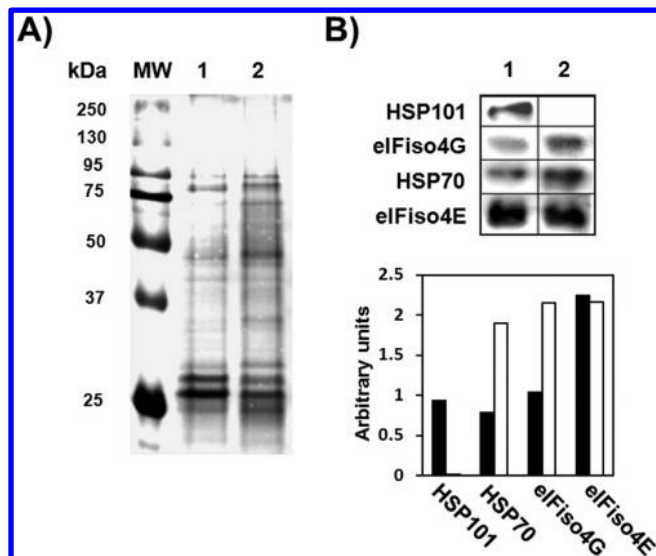
In a previous study, HSP101 was detected as a component of the Cap-binding complexes together with HSP70.<sup>11</sup> Therefore, its absence might affect some of the components within these complexes. To evaluate this, the L10 mutant (*hsp101-m5::Mu1/hsp101-m5::Mu1*) and the L10 WT (*Hsp101/Hsp101*) inbred lines were analyzed by immunoblots against proteins present in the Cap-binding complexes either from total (Figure 3) or affinity-purified (Figure 4) extracts. In the total



**Figure 3.** Western blot analysis of specific proteins in total extracts from L10 *hsp101* mutant and *Hsp101* WT mature dry embryos. Proteins were extracted from the mutant (2) and WT (1) quiescent embryos, separated on 12.5% SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane, and incubated with maize  $\alpha$ -HSP101-P15C, universal  $\alpha$ -HSP70, wheat  $\alpha$ -eIFiso4G, and  $\alpha$ -eIF(iso)4E antibodies, as well as maize  $\alpha$ -eEF1B- $\beta$ . (A) Coomassie Blue-stained gel and (B) immunoblots. Coomassie Blue-staining and  $\alpha$ -eEF1B- $\beta$  were used as loading controls. Densitometric analysis of the immunoblots is shown as units relative to eEF1B- $\beta$ .

extract, no HSP101 was observed in the mutant line, whereas HSP70 and eIF(iso)4E appeared at similar levels in both lines. However, in the  $m^7$ GTP-Sepharose-bound fraction, HSP70 was increased in the absence of HSP101. The eIF(iso)4G protein appeared increased in both the total and  $m^7$ GTP-bound fractions obtained from the L10 mutant (*hsp101-m5::Mu1/hsp101-m5::Mu1*).

Differences in the  $m^7$ GTP-purified complexes from WT and mutant embryos were detected even at the level of silver stained gels (Figure 4A) and were reproducibly observed in three different protein isolations as well as in an independent L4 mutant (*hsp101-m2::Mu1/hsp101-m2::Mu1*) and L4 wt (*Hsp101/Hsp101*) lines (Supporting Information Figure S4). Therefore, HSP101 might influence the stability and



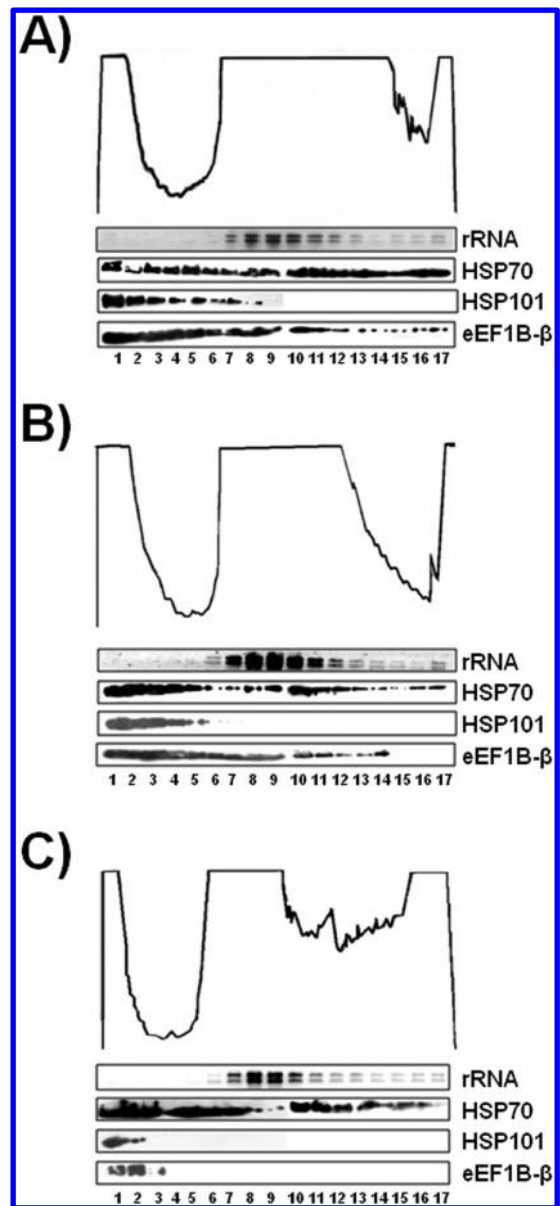
**Figure 4.** Specific protein changes in Cap-binding complexes from L10 mutant (*hsp101/hsp101*) and L10 WT (*Hsp101/Hsp101*) mature dry embryos. Total protein extracts from the mutant (2) and WT (1) quiescent embryos were incubated with  $m^7$ GTP-Sepharose, and after extensive washing, the bound proteins were eluted with a buffer containing 0.2 mM  $m^7$ GTP. Equal amount (50  $\mu$ L) of each eluate was resolved by 15% (w/v) SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane, and incubated with maize  $\alpha$ -HSP101-P15C, universal  $\alpha$ -HSP70, and wheat  $\alpha$ -eIFiso4G or  $\alpha$ -eIF(iso)4E antibodies. (A) Silver stained gel and (B) immunoblots. Densitometric analysis of the immunoblots is shown as arbitrary units.

composition of the Cap-binding complexes in the maize mature embryo. Also, according to previous findings, it could participate in these complexes as a translational regulator.<sup>19</sup>

#### The Distribution of HSP101 along Sucrose Gradient Fractions Is Differential during Maize Germination

To ask whether HSP101 forms part of the translation initiation complexes during maize germination, embryo extracts from 0 h-, 12 h-, and 24 h-imbibed caryopses were fractionated on continuous 10–35% density sucrose gradient (Figure 5). Proteins isolated from each fraction were detected by immunoblots. HSP101 was observed in fractions representing free ribonucleoproteins (1–3), translation initiation complexes (4–5), and monosomes (6–9), but not polyribosomes (10–17) in the 0 h- and 12 h-imbibed embryo extracts (Figure 5, panels A and B). In the extracts from 24 h-imbibed embryos (Figure 5C), HSP101 appeared fully displaced toward non-translational fractions (1–2). However, the HSP70 protein was located steadily along the sucrose gradient profile during maize germination which is consistent with its binding to nascent polypeptide chains to assist the folding of newly synthesized proteins inside the cells. The eEF1B- $\beta$  factor (31 kDa), which has a nucleotide exchange activity and binds to eEF1B- $\alpha$  (25 kDa) and eEF1B- $\gamma$  (51 kDa) to form the elongation factor eEF1B, was used as a control protein for the gradients. It appeared in low and high density fractions in the 0 h- and 12 h-imbibed embryos, and was fully displaced to lighter fractions in the 24 h-imbibed embryos (Figure 5C). This behavior is consistent with its recruitment to free ribonucleoprotein fractions to exchange GDP for GTP in eEF1A during active translation.<sup>30</sup>

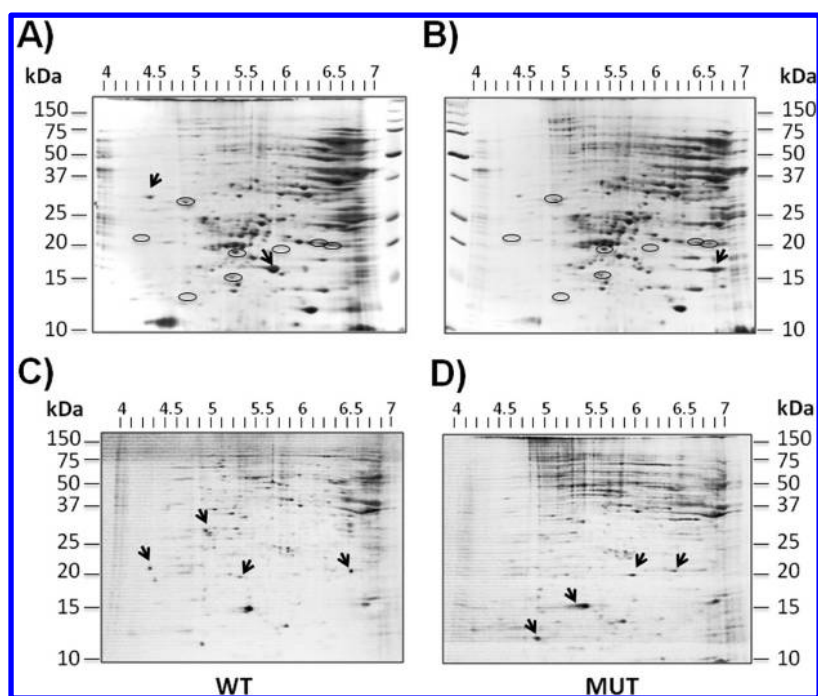
To confirm whether HSP101 was part of a translation complex in the 12 h-imbibed embryos, the extracts were treated



**Figure 5.** HSP101 differentially comigrates with translational fractions of polyribosome profiles depending on the caryopsis imbibition time. Polyribosome fractionation was performed on 10–35% sucrose gradients to gain better resolution of translation initiation complexes. All gradients were collected in 17 fractions and profiles were obtained at 260 nm. The rRNA distribution and integrity was determined by ethidium bromide staining of an agarose gel. Proteins were precipitated from each fraction with 12% trichloroacetic acid and resuspended in 60  $\mu$ L of H<sub>2</sub>O. One-fifth of the total volume was resolved by SDS-PAGE, blotted to PVDF membranes, and analyzed by immunoblotting with maize  $\alpha$ -HSP101, universal  $\alpha$ -HSP70, and maize  $\alpha$ -eEF1B- $\beta$  antibodies. (A) Mature dry embryos, (B) 12 h after caryopsis imbibition, and (C) 24 h after caryopsis imbibition.

with puromycin and EDTA to dissociate ribosomes and mRNAs, or with cycloheximide which freezes the translation complexes as they appear at the moment of separation (Supporting Information Figure S5). The results showed that HSP101 was shifted toward the lighter fractions in the presence of puromycin/EDTA similar to HSP70 and the rRNA indicating that it was part of complexes involved in translation, rather than other heavy ribosome-independent aggregates.





**Figure 6.** Comparative proteomic IEF/2-DE map of proteins extracted from L10 mutant (*hsp101/hsp101*) and L10 WT (*Hsp101/Hsp101*) embryos at 24 h of caryopsis imbibition. Embryos were excised from 21 h-imbibed caryopsis and incubated for three additional hours in the presence of [ $^{35}\text{S}$ ]-methionine for in vivo protein labeling. Phenol-extracted total proteins were separated first according to their pI on IPG strips pH 4–7 and in a second dimension according to their molecular masses on 15% SDS-PAGE. The gels were stained with colloidal Coomassie Blue G-250 and incubated with Amplify for fluorographic enhancement. (A) L10 WT and (B) L10 mutant Coomassie Blue-stained gels. (C) L10 WT and (D) L10 mutant fluorograph maps. Differential protein spots between the two genotypes at the level of either Coomassie Blue-staining or fluorography are highlighted with black arrows. Circles on (A) and (B) gels indicate the position of arrows shown in (C) and (D).

### The HSP101 Null Mutant Displays Qualitative Changes in de Novo Protein Synthesis Patterns during Maize Germination

The above results revealed that HSP101 might influence the translation of mRNAs during the germination process, in addition to its known role in resolving protein aggregates formed during heat stress conditions. Although the L10 mutant (*hsp101-m5::Mu1/hsp101-m5::Mu1*) line germinates, as well as the L10 WT (*Hsp101/Hsp101*) line, it displays phenotype of accelerated growth during the first 72 h of imbibition<sup>14</sup> (Supporting Information Figure S6). On the basis of this observation, HSP101 was previously proposed to act as negative regulator of root growth at the level of either cell elongation or cell division.<sup>14</sup> Since one of the metabolic processes required for optimal growth is the rate of protein synthesis, we tested the L10 mutant and WT inbred lines with short pulse (3 h) in vivo  $^{35}\text{S}$ -protein labeling on germinating maize embryos (21 h-imbibition). No global differences were observed in the protein labeling of mutant lines when compared to WT lines, for either quantitative (equal protein loaded) or qualitative (equal radioactivity loaded) changes (Supporting Information Figure S7). These results suggested that there were not gross changes in the overall translation level without HSP101. However, a small number of specific proteins that may be hard to visualize on one-dimensional gels may still be regulated by HSP101. To evaluate if small differences in the protein labeling pattern existed between the mutant and WT lines, 2-DE was performed (Figure 6). The fluorograms in the pI 4–7 range, from three replicate gels belonging to independent biological samples, revealed subtle changes in the label intensity of particular spots between the L10 mutant

(Figure 6D) and WT (Figure 6C) lines (spots highlighted with an arrow on each gel). Interestingly, the corresponding Coomassie stained protein patterns (circled spots on Figure 6A,B corresponding to arrows in both Figure 6C,D) did not show differences. Some of the labeled spots were not detected by Coomassie staining suggesting that they represent proteins of very low abundance.

On the other hand, a comparison between Coomassie stained gels of 24 h-imbibed embryos showed differences in the intensity of other spots not reflected in the  $\text{S}^{35}$ -protein patterns. These appear highlighted by an arrow in panels A and B of Figure 6. Coomassie stained-spot differences were reproducible in three biological replicates at the same imbibition time without the in vivo-labeling procedure (Supporting Information Figure S8) and were identified by MS (Table 2 and Supporting Information Table S2 and Figure S9). After 24 h of imbibition, a single isoform of HSP16.9A-CI (spot 29) was observed only in the *hsp101* mutant, whereas different isoforms of HSP16.9A-CI (spot 13) and RAB28 were only observed in the WT (Table 2). Additional proteins found in these spots contained 40S ribosomal protein S18 (only in the *hsp101* mutant), whereas HSP17.5-CII and an isoform of HSP16.9A-CI (spot 27) were observed only in the WT (Supporting Information Table S2).

### DISCUSSION

Chaperones of the HSP100 family have been identified in bacteria, fungi and plants.<sup>31</sup> Plant HSP101 is required for basal and induced thermotolerance and has an important role as a disaggregase during heat stress.<sup>17</sup> Additionally, it has been documented as translational regulator of specific mRNAs.<sup>18–20</sup> In maize, HSP101 is highly expressed during embryogenesis

and seed maturation and remains present at almost constant levels during the first 72 h of imbibition even in the absence of stress.<sup>13,14</sup> Although maize null *hsp101* mutant caryopses are completely viable in the absence of heat stress, they display enhanced primary root growth during the first 3 days of germination. This leads to the proposal that HSP101 may have a role in the stabilization and/or translation of proteins regulating root growth during germination and seedling establishment.<sup>14,15</sup> In this study, we showed by comparative proteomic analysis that, in the absence of HSP101, particular protein level alterations take place in the maize embryo at the mature quiescent stage and during germination. Such changes result from both, protein stability and expression alterations, and correlate with the observed phenotype of root growth.

Several chaperones that could act as translation factors have been reported. For example, in *Drosophila*, the interaction of HSP90-Cap with eIF4F suggests that these two proteins mediate the localization and/or translation of specific mRNAs during development.<sup>32</sup> Conversely, the possibility of HSP90 contributing to the folding of proteins involved in the localization and/or translation of mRNAs could not be discarded. In another study, coimmunoprecipitation of HSP70, HSC70, polyA binding protein (PABP), and eIF4G was observed in immunoprecipitation experiments of the degradation factor that binds AU rich (ARE) sequences, AUF1, indicating these chaperones are coupled to mRNA degradation/stabilization machinery.<sup>33</sup> More recent work determined that HSC70, HSP40, eIF4F, and PABP stabilize the ARE-mRNA BIM, preventing its degradation, thereby regulating the expression of BIM, an activator of cell death in hematopoietic progenitor cells to control the number of blood cells.<sup>34</sup> HSP27, a small heat shock protein, has been involved in translation inhibition by preventing eIF4F assembly under thermal shock conditions through binding and sequestering eIF4G in insoluble heat stress granules.<sup>35</sup> In addition, wheat HSP101 has the ability to enhance translation of mRNAs carrying particular sequences at their 5'UTR.<sup>19</sup>

In a previous analysis, we found that maize HSP101 is present in CAP-binding complexes in mature dry embryo,<sup>11</sup> supporting the idea that it may be required to stabilize particular translation factors and/or mRNAs required for translation reinitiation upon imbibition and during germination. Here, we found that in the absence of HSP101, eIF(iso)4G increased in total and CAP-bound extracts, whereas eIF(iso)4E remained unaltered (Figures 3 and 4). In addition, during early caryopsis imbibition, HSP101 colocalized with translation initiation complexes of the embryo in a ribosome-dependent manner, supporting its role during translation (Figure 5). Furthermore, de novo synthesis of several proteins, not identified in this study, was altered in the *hsp101* mutant as shown by short pulse-labeling during embryo imbibition (Figure 6, panels C and D). These results demonstrate that HSP101 is involved in protein synthesis regulation during germination and suggest that the observed proteome alterations in its absence are due to both its role in translation regulation and its function as disaggregase of unwanted protein complexes during embryo maturation and germination.

Several of the identified proteomic changes in the *hsp101* mutant embryos represent chaperone family proteins (HSP70, CPN60A, HSP20, HSP17.4, HSP17.5, HSP16.9A, HSP16.9B, HSP16.9C and HSP16.9D). Five of these chaperones showed increased levels (HSP70, CPN60A, HSP20, HSP17.5, and some isoforms of HSP16.9A), whereas five others decreased

(HSP17.4, an isoform of HSP16.9A, HSP16.9B, HSP16.9C, and HSP16.9D). The adjustment of the chaperone system was expected to compensate for the absence of HSP101. Although the mechanism of protein disaggregation by HSP101 is not yet fully understood, a model has been proposed where sHSP initially become part of the large protein aggregates, thus, facilitating their solubilization by HSP100/Clp hexamers into a form recognizable by the HSP70 chaperone.<sup>36–39</sup> In another model, HSP100/ClpB first breaks the sHSP-containing large aggregates into smaller fragments that are further processed by HSP70.<sup>40</sup> In both these models, an increase of HSP70 levels in the absence of HSP101 would be expected to compensate for the greater amount of large protein aggregates. In addition, this protein could also participate in translation regulation together with HSP101.

A group of small chaperones (sHSPs) showed important changes in the absence of HSP101. These proteins of usually 10–43 kDa belong to a superfamily of chaperones that are defined by a conserved carboxy-terminal domain of about 90 amino acids, referred to as the  $\alpha$ -crystallin domain<sup>41</sup> and constitute by far the most complex and diverse HSP group. The activated subunits of sHSPs have the ability to bind protein substrates when released from an oligomer and within an oligomeric structure.<sup>42</sup> It has been shown that HSP100/HSP70-dependent disaggregation and refolding of polypeptides present in aggregates containing sHSPs proceeds more efficiently than in aggregates formed in their absence.<sup>37–39,43</sup> Therefore, an increase of sHSPs is expected to assist in more efficient protein disaggregation.

Interestingly, several HSP16.9 proteins (HSP16.9A, HSP16.9B, HSP16.9C, HSP16.9D and HSP16.9E) some of which represent different gene products or alleles of the same gene, displayed differential accumulation between WT and *hsp101* mutant embryos, at the dry and 24 h-imbibed stages (Tables 1 and 2, Supporting Information Tables S1 and S2). The crystallographic structure of wheat HSP16.9 has been solved<sup>44</sup> indicating that a dimer forms the basic building block, which further assembles into a 12-mer consisting of two trimers of dimers. In solution, wheat HSP16.9 can dissociate into smaller oligomeric states in a temperature dependent manner. On the basis of this observation, it is likely that heat-induced dissociation of sHSP oligomers expose the hydrophobic patches buried in the oligomeric interface, resulting in binding and stabilization of denatured proteins.<sup>42,44</sup> In a proteomic study of barley heat response, six isoforms of a 16.9 kDa sHSP were distinguished<sup>45</sup> but their particular role in the disaggregation mechanism is unknown. Here, we identified four HSP16.9A isoforms showing differential embryo accumulation patterns in the presence and absence of maize HSP101 (Table 2). While one isoform with experimental *pI* of 6.08 was preferentially found in the WT after 24 h of caryopsis imbibition, isoforms with *pI* of 5.95, 6.07, and 6.7–6.8 were identified only in the mutant mature embryo (0 h). After 24 h of imbibition, the mutant embryos accumulated only the 6.7–6.8 *pI* isoform. Although the predicted *pI* for all HSP16.9 accessions identified in this analysis was 6.77, this value was only observed in the mutant at both 0 and 24 h of imbibition. These findings are interpreted to suggest that HSP16.9 may suffer post-translational modifications and that certain isoforms act in concert with HSP101 for protein disaggregation during maize embryo maturation and germination, while others accumulate in the mutant to assist disaggregation in the absence of HSP101.



The absence of HSP101 in maize has been correlated with root phenotypes during the first 72 h of caryopsis imbibition.<sup>14,15</sup> Particularly, enhanced primary root growth and precocious emergency of nodal roots from the coleoptilar node were observed. Hence, it was hypothesized by these reports that, in the presence of HSP101, an inhibitor of root growth might accumulate during embryo maturation and persist early into germination. On the other hand, alterations in specific tissue distribution of phytohormones (cytokinin and auxin) may also account for disturbances in root architecture.<sup>46</sup> Auxin (indole acetic acid; IAA) and cytokinin (*cis*-zeatin; *c-Z*) have antagonistic effects on root growth. While the distribution of auxin toward the apical meristem at the root tip and particular spots in the differentiation zone promotes cell cycle activation and lateral root initiation, cytokinin counteracts its effect.<sup>47</sup>

Recently, a proteomic analysis of dissected root specific cortical parenchyma and stele tissues identified the distribution of enzymes involved in both auxin and cytokinin metabolism of the maize young (36 h after imbibition) seedling.<sup>46</sup> This report indicated that tissue-specific inactivation of *c-Z* by glucosylation and possibly degradation are required to permit auxin's action on growth and lateral root emergency. Interestingly, several enzymes showing enhanced accumulation in the *hsp101* mutant were related to the cytokinin metabolism. One of them was the UDP-glucosyl transferase BX9 (increased in the mutant), a key enzyme in benzoxazinoid secondary metabolism, which catalyzes the interconversion of DIMBOA (benzoxazinoid-2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin) to its glucosylated form DIMBOA-Glc.<sup>48</sup> Although benzoxazinoids are primarily related to plant defense,<sup>49</sup> an important nexus between these metabolites and cytokinin was recently described.<sup>46,50</sup> Other enzymes increased in the *hsp101* mutant were phosphoglucosyltransferase, adenosine kinase (ADK), and the member of the NUDIX hydrolase family, all of them related to BX9 and the cytokinin metabolism.<sup>50–54</sup>

Additional evidence suggests a positive correlation between the cytokinin content and heat tolerance in creeping bentgrass. Upon exogenous application of cytokinins, heat tolerance improves in creeping bentgrass.<sup>55</sup> Particularly, the effects of exogenously applied zeatin riboside (ZR), a synthetic cytokinin, result in the enhancement of some sHSP and HSP60.<sup>56</sup> These data are consistent with the known heat sensitivity of the *hsp101* mutant.<sup>14,15</sup>

Actin levels were enhanced in *hsp101* mutant embryos (Table 1). In *Arabidopsis*, actin plays essential roles during germination and root growth.<sup>57,58</sup> In maize, actin arrays suffer rearrangements and their abundance increases within cells located in the postmitotic region of the root apex. These changes are associated with the transition from cell proliferation in the meristem to the cell elongation and differentiation states found in the more mature parts of the root.<sup>59</sup> Interestingly, actin decreased in the coleoptilar node of the *rtcs* mutant unable to initiate nodal roots.<sup>60</sup> Thus, increases in the actin levels in the *hsp101* mutant are consistent with the fast growth of its primary root and with its precocious nodal root phenotype.<sup>14,15</sup>

Overall, the proteomic analysis of maize *hsp101* mutant embryos indicates that the lack of an important disaggregase such as HSP101 causes readjustments in the chaperone machinery, alterations in enzymes involved in the cytokinin metabolism and actin levels. The readjustments in the chaperone machinery probably aims to contend with the

protein aggregates accumulated in the mutant embryo. The observed root phenotypes in *hsp101* mutants might be due to altered cytokinin and actin levels as indicated by this analysis. However, further experiments are needed to evaluate whether active cytokinins actually change at particular tissues within the growing seedling (i.e., the primary root, the coleoptilar node, etc.). On the other hand, HSP101 may affect the translation of particular mRNAs during early germination also contributing to the observed root phenotype. Our work underlines the role of HSP101 during early steps of protein synthesis *in vivo* and *in planta*, expanding previous evidence supporting this idea that was obtained using yeast and plant heterologous systems.<sup>18–20</sup> Further analysis should aim to identify the mRNAs whose translation is regulated by HSP101 in maize.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

Table S1, additional protein identifications of differentially expressed proteins from comparing *hsp101* mutant (*hsp101-m5::Mu1/hsp101-m5::Mu1*) to wild type (*Hsp101/Hsp101*) at the stage of mature dry embryo using SEQUEST search algorithms; Table S2, additional protein identifications of preferentially accumulated in *hsp101* mutant (mut) or wild-type (WT) quiescent (0 h) and 24 h-imbibed (24 h) maize embryos; Figure S1, mass spectrometry annotation of PepNovo and MSBlast results; Figure S2, representative 2-DE analysis of total proteins extracted from L10 mutant (*hsp101/hsp101*) and L10 WT (*Hsp101/Hsp101*) mature dry embryos; Figure S3, resolution of low molecular weight proteins extracted from L10 mutant (*hsp101/hsp101*) and L10 WT (*Hsp101/Hsp101*) mature dry embryos by 2-DE analysis; Figure S4; comparison of the Cap-binding complexes of two independent *hsp101* mutant alleles and their corresponding near-isogenic lines (L4 and L10) obtained from mature dry embryos; Figure S5, the comigration of HSP101 with translational fractions is affected by puromycin; Figure S6, the *hsp101* mutant displays accelerated seedling growth; Figure S7, *in vivo* protein-labeling patterns of L10 mutant (*hsp101/hsp101*) and L10 WT (*Hsp101/Hsp101*) embryos at 24 h of imbibition; Figure S8, representative 2-DE analysis of proteins extracted from 24 h-imbibed L10 mutant (*hsp101/hsp101*) and L10 WT (*Hsp101/Hsp101*) embryos; Figure S9, close-up of spots preferentially accumulated or absent in the 24 h-imbibed L10 mutant (*hsp101/hsp101*) embryos as compared to WT (*Hsp101/Hsp101*). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Dr. Tzvetanka Dimitrova Dinkova, Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México D.F., Mexico. Phone: +52 55 56225277. Fax: +52 55 56225329. e-mail: [cesy@unam.mx](mailto:cesy@unam.mx).

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants to T.D.D. (PAPIIT IN204309, ICYTDF PIUTE 10-55 and CONACYT 81708) and J.N.-S. (PAPIIT IN207402, IN209599 and CONACYT 78982).

P.E.L.-M. was awarded with a fellowship from CONACYT for the Ph.D. studies. The authors are thankful to Dr. Karen Browning for wheat eIF(iso)4F and eIF4F antibodies, and to Drs. Heriberto Torres and Baltazar Baltazar from Híbridos Pioneer de México S.A. de C.V. for the growth of L4 and L10 maize lines.

## REFERENCES

- (1) Kiesselbach, T. *The Structure and Reproduction of Corn*, 50th Anniversary ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, 1999.
- (2) Wobus, U.; Weber, H. Seed maturation: Genetic programmes and control signals. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1999**, *2* (1), 33–38.
- (3) Gutierrez, L.; Van Wuytswinkel, O.; Castelain, M.; Bellini, C. Combined networks regulating seed maturation. *Trends Plant Sci.* **2007**, *12* (7), 294–300.
- (4) Sanchez de Jimenez, E.; Aguilar, R. Protein synthesis patterns: relevance of old and new messenger RNA in germinating maize embryos. *Plant Physiol.* **1984**, *75*, 231–234.
- (5) Dinkova, T. D.; Marquez-Velazquez, N. A.; Aguilar, R.; Lazaro-Mixteco, P.; Sanchez de Jimenez, E. Tight translational control by the initiation factors eIF4E and eIF(iso)4E is required for maize seed germination. *Seed Sci. Res.* **2011**, *21*, 85–93.
- (6) Browning, K. S. Plant translation initiation factors: It is not easy to be green. *Biochem. Soc. Trans.* **2004**, *32*, 589–591.
- (7) Kaye, N. M.; Emmett, K. J.; Merrick, W. C.; Jankowsky, E. Intrinsic RNA binding by the eukaryotic initiation factor 4F depends on a minimal RNA length but not on the m7G cap. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (26), 17742–17750.
- (8) Sonenberg, N.; Hinnebusch, A. G. New modes of translational control in development, behavior, and disease. *Mol. Cell* **2007**, *28*, 721–729.
- (9) Joshi, B.; Lee, K.; Maeder, D. L.; Jagus, R. Phylogenetic analysis of eIF4E-family members. *BMC Evol. Biol.* **2005**, *5*, 48–68.
- (10) Dinkova, T. D.; Sanchez de Jimenez, E. Differential expression and regulation of translation initiation factors -4E and -iso4E during maize germination. *Physiol. Plant* **1999**, *107*, 419–425.
- (11) Lazaro-Mixteco, P. E.; Dinkova, T. D. Identification of proteins from Cap-binding complexes by mass spectrometry during maize (*Zea mays* L.) germination. *J. Mex. Chem. Soc.* **2012**, *56* (1), 36–50.
- (12) Wehmeyer, N.; Vierling, E. The expression of small heat shock proteins in seeds responds to discrete developmental signals and suggests a general protective role in desiccation tolerance. *Plant Physiol.* **2000**, *122* (4), 1099–1108.
- (13) Young, T. E.; Ling, J.; Geisler-Lee, C. J.; Tanguay, R. L.; Caldwell, C.; Gallie, D. R. Developmental and thermal regulation of the maize heat shock protein, HSP101. *Plant Physiol.* **2001**, *127* (3), 777–791.
- (14) Nieto-Sotelo, J.; Martinez, L. M.; Ponce, G.; Cassab, G. I.; Alagon, A.; Meeley, R. B.; Ribaut, J. M.; Yang, R. Maize HSP101 plays important roles in both induced and basal thermotolerance and primary root growth. *Plant Cell* **2002**, *14* (7), 1621–1633.
- (15) Lopez-Frias, G.; Martinez, L. M.; Ponce, G.; Cassab, G. I.; Nieto-Sotelo, J. Role of HSP101 in the stimulation of nodal root development from the coleoptilar node by light and temperature in maize (*Zea mays* L.) seedlings. *J. Exp. Bot.* **2011**, *62*, 4661–4673.
- (16) Hong, S. W.; Vierling, E. Hsp101 is necessary for heat tolerance but dispensable for development and germination in the absence of stress. *Plant J.* **2001**, *27* (1), 25–35.
- (17) Queitsch, C.; Hong, S. W.; Vierling, E.; Lindquist, S. Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in Arabidopsis. *Plant Cell* **2000**, *12* (4), 479–492.
- (18) Wells, D. R.; Tanguay, R. L.; Le, H.; Gallie, D. R. HSP101 functions as a specific translational regulatory protein whose activity is regulated by nutrient status. *Genes Dev.* **1998**, *12* (20), 3236–3251.
- (19) Ling, J.; Wells, D. R.; Tanguay, R. L.; Dickey, L. F.; Thompson, W. F.; Gallie, D. R. Heat shock protein HSP101 binds to the Fed-1 internal light regulatory element and mediates its high translational activity. *Plant Cell* **2000**, *12* (7), 1213–1227.
- (20) Gallie, D. R. The 5'-leader of tobacco mosaic virus promotes translation through enhanced recruitment of eIF4F. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30* (15), 3401–3411.
- (21) Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
- (22) Hajduch, M.; Ganapathy, A.; Stein, J. W.; Thelen, J. J. A systematic proteomic study of seed filling in soybean. Establishment of high-resolution two-dimensional reference maps, expression profiles, and an interactive proteome database. *Plant Physiol.* **2005**, *137* (4), 1397–419.
- (23) Houston, N. L.; Hajduch, M.; Thelen, J. J. Quantitative proteomics of seed filling in castor: comparison with soybean and rapeseed reveals differences between photosynthetic and non-photosynthetic seed metabolism. *Plant Physiol.* **2009**, *151* (2), 857–868.
- (24) Stevenson, S. E.; Chu, Y.; Ozias-Akins, P.; Thelen, J. J. Validation of gel-free, label-free quantitative proteomics approaches: applications for seed allergen profiling. *J. Proteomics* **2009**, *72* (3), 555–666.
- (25) Schnable, P. S.; Ware, D.; Fulton, R. S.; Stein, J. C.; Wei, F.; Pasternak, S.; Liang, C.; Zhang, J.; Fulton, L.; Graves, T. A.; Minx, P.; Reily, A. D.; Courtney, L.; Kruchowski, S. S.; Tomlinson, C.; Strong, C.; Delehaunty, K.; Fronick, C.; Courtney, B.; Rock, S. M.; Belter, E.; Du, F.; Kim, K.; Abbott, R. M.; Cotton, M.; Levy, A.; Marchetto, P.; Ochoa, K.; Jackson, S. M.; Gillam, B.; Chen, W.; Yan, L.; Higginbotham, J.; Cardenas, M.; Waligorski, J.; Applebaum, E.; Phelps, L.; Falcone, J.; Kanchi, K.; Thane, T.; Scimone, A.; Thane, N.; Henke, J.; Wang, T.; Ruppert, J.; Shah, N.; Rotter, K.; Hodges, J.; Ingenthron, E.; Cordes, M.; Kohlberg, S.; Sgro, J.; Delgado, B.; Mead, K.; Chinwalla, A.; Leonard, S.; Crouse, K.; Collura, K.; Kudrna, D.; Currie, J.; He, R.; Angelova, A.; Rajasekar, S.; Mueller, T.; Lomeli, R.; Scara, G.; Ko, A.; Delaney, K.; Wissotski, M.; Lopez, G.; Campos, D.; Braidotti, M.; Ashley, E.; Golsner, W.; Kim, H.; Lee, S.; Lin, J.; Dujmic, Z.; Kim, W.; Talag, J.; Zuccolo, A.; Fan, C.; Sebastian, A.; Kramer, M.; Spiegel, L.; Nascimento, L.; Zutavern, T.; Miller, B.; Ambrose, C.; Muller, S.; Spooner, W.; Narechania, A.; Ren, L.; Wei, S.; Kumari, S.; Faga, B.; Levy, M. J.; McMahan, L.; Van Buren, P.; Vaughn, M. W.; Ying, K.; Yeh, C. T.; Emrich, S. J.; Jia, Y.; Kalyanaraman, A.; Hsia, A. P.; Barbazuk, W. B.; Baucom, R. S.; Brutnell, T. P.; Carpita, N. C.; Chaparro, C.; Chia, J. M.; Deragon, J. M.; Estill, J. C.; Fu, Y.; Jeddeloh, J. A.; Han, Y.; Lee, H.; Li, P.; Lisch, D. R.; Liu, S.; Liu, Z.; Nagel, D. H.; McCann, M. C.; SanMiguel, P.; Myers, A. M.; Nettleton, D.; Nguyen, J.; Penning, B. W.; Ponnala, L.; Schneider, K. L.; Schwartz, D. C.; Sharma, A.; Soderlund, C.; Springer, N. M.; Sun, Q.; Wang, H.; Waterman, M.; Westerman, R.; Wolfgruber, T. K.; Yang, L.; Yu, Y.; Zhang, L.; Zhou, S.; Zhu, Q.; Bennetzen, J. L.; Dawe, R. K.; Jiang, J.; Jiang, N.; Presting, G. G.; Wessler, S. R.; Aluru, S.; Martienssen, R. A.; Clifton, S. W.; McCombie, W. R.; Wing, R. A.; Wilson, R. K. The B73 maize genome: Complexity, diversity, and dynamics. *Science* **2009**, *326* (5956), 1112–1115.
- (26) Conesa, A.; Gotz, S.; Garcia-Gomez, J. M.; Terol, J.; Talon, M.; Robles, M. Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* **2005**, *21* (18), 3674–3676.
- (27) Frank, A.; Pevzner, P. PepNovo: de novo peptide sequencing via probabilistic network modeling. *Anal. Chem.* **2005**, *77* (4), 964–973.
- (28) Junqueira, M.; Spirin, V.; Balbuena, T. S.; Thomas, H.; Adzhubei, I.; Sunyaev, S.; Shevchenko, A. Protein identification pipeline for the homology-driven proteomics. *J. Proteomics* **2008**, *71* (3), 346–356.
- (29) Vizcaino, J. A.; Cote, R.; Reisinger, F.; Barsnes, H.; Foster, J. M.; Rameseder, J.; Hermjakob, H.; Martens, L. The Proteomics Identifications database: 2010 update. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *38* (Database issue), D736–D742.
- (30) Mansilla, F.; Friis, I.; Jadidi, M.; Nielsen, K. M.; Clark, B. F.; Knudsen, C. R. Mapping the human translation elongation factor

eEF1H complex using the yeast two-hybrid system. *Biochem. J.* **2002**, *365* (Pt 3), 669–676.

(31) Nieto-Sotelo, J.; Kannan, K. B.; Martinez, L. M.; Segal, C. Characterization of a maize heat-shock protein 101 gene, HSP101, encoding a ClpB/Hsp100 protein homologue. *Gene* **1999**, *230* (2), 187–195.

(32) Pisa, V.; Cozzolino, M.; Gargiulo, S.; Ottone, C.; Piccioni, F.; Monti, M.; Gigliotti, S.; Talamo, F.; Graziani, F.; Pucci, P.; Verrotti, A. C. The molecular chaperone Hsp90 is a component of the cap-binding complex and interacts with the translational repressor Cup during *Drosophila* oogenesis. *Gene* **2009**, *432* (1–2), 67–74.

(33) Laroia, G.; Cuesta, R.; Brewer, G.; Schneider, R. J. Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitin-proteasome pathway. *Science* **1999**, *284* (5413), 499–502.

(34) Matsui, H.; Asou, H.; Inaba, T. Cytokines direct the regulation of Bim mRNA stability by heat-shock cognate protein 70. *Mol. Cell* **2007**, *25* (1), 99–112.

(35) Cuesta, R.; Laroia, G.; Schneider, R. J. Chaperone hsp27 inhibits translation during heat shock by binding eIF4G and facilitating dissociation of cap-initiation complexes. *Genes Dev.* **2000**, *14* (12), 1460–1470.

(36) Ben-Zvi, A. P.; Goloubinoff, P. Review: Mechanisms of disaggregation and refolding of stable protein aggregates by molecular chaperones. *J. Struct. Biol.* **2001**, *135* (2), 84–93.

(37) Mogk, A.; Deuring, E.; Vorderwulbecke, S.; Vierling, E.; Bukau, B. Small heat shock proteins, ClpB and the DnaK system form a functional triade in reversing protein aggregation. *Mol. Microbiol.* **2003**, *50* (2), 585–595.

(38) Cashikar, A. G.; Duennwald, M.; Lindquist, S. L. A chaperone pathway in protein disaggregation. Hsp26 alters the nature of protein aggregates to facilitate reactivation by Hsp104. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (25), 23869–23875.

(39) Lee, U.; Wie, C.; Escobar, M.; Williams, B.; Hong, S. W.; Vierling, E. Genetic analysis reveals domain interactions of Arabidopsis Hsp100/ClpB and cooperation with the small heat shock protein chaperone system. *Plant Cell* **2005**, *17* (2), 559–571.

(40) Glover, J. R.; Lindquist, S. Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* **1998**, *94* (1), 73–82.

(41) Waters, E. R.; Lee, G. J.; Vierling, E. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *J. Exp. Bot.* **1996**, *47* (296), 325–338.

(42) Haslbeck, M.; Franzmann, T.; Weinfurter, D.; Buchner, J. Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12* (10), 842–846.

(43) Lee, G. J.; Vierling, E. A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. *Plant Physiol.* **2000**, *122* (1), 189–198.

(44) van Montfort, R. L.; Basha, E.; Friedrich, K. L.; Slingsby, C.; Vierling, E. Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8* (12), 1025–1030.

(45) Sule, A.; Vanrobaeys, F.; Hajos, G.; Van Beeumen, J.; Devreese, B. Proteomic analysis of small heat shock protein isoforms in barley shoots. *Phytochemistry* **2004**, *65* (12), 1853–1863.

(46) Saleem, M.; Lamkemeyer, T.; Schutzenmeister, A.; Madlung, J.; Sakai, H.; Piepho, H. P.; Nordheim, A.; Hochholdinger, F. Specification of cortical parenchyma and stele of maize primary roots by asymmetric levels of auxin, cytokinin, and cytokinin-regulated proteins. *Plant Physiol.* **2010**, *152* (1), 4–18.

(47) Werner, T.; Motyka, V.; Laucou, V.; Smets, R.; Van Onckelen, H.; Schmulling, T. Cytokinin-deficient transgenic Arabidopsis plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* **2003**, *15* (11), 2532–2550.

(48) von Rad, U.; Huttel, R.; Lottspeich, F.; Gierl, A.; Frey, M. Two glucosyltransferases are involved in detoxification of benzoxazinoids in maize. *Plant J.* **2001**, *28* (6), 633–642.

(49) Morant, A. V.; Jorgensen, K.; Jorgensen, C.; Paquette, S. M.; Sanchez-Perez, R.; Moller, B. L.; Bak, S. beta-Glucosidases as

detonators of plant chemical defense. *Phytochemistry* **2008**, *69* (9), 1795–1813.

(50) Frebortova, J. Function of plant defense secondary metabolite in cytokinin degradation. *Plant Signal Behav* **2010**, *5* (5), 523–525.

(51) Manjunath, S.; Lee, C. H.; VanWinkle, P.; Bailey-Serres, J. Molecular and biochemical characterization of cytosolic phosphoglucomutase in maize. Expression during development and in response to oxygen deprivation. *Plant Physiol.* **1998**, *117* (3), 997–1006.

(52) Moffatt, B. A.; Stevens, Y. Y.; Allen, M. S.; Snider, J. D.; Pereira, L. A.; Todorova, M. I.; Summers, P. S.; Weretilnyk, E. A.; Martin-McCaffrey, L.; Wagner, C. Adenosine kinase deficiency is associated with developmental abnormalities and reduced transmethylation. *Plant Physiol.* **2002**, *128* (3), 812–821.

(53) Bessman, M. J.; Frick, D. N.; O'Handley, S. F. The MutT proteins or “Nudix” hydrolases, a family of versatile, widely distributed, “housecleaning” enzymes. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (41), 25059–25062.

(54) Ogawa, T.; Ishikawa, K.; Harada, K.; Fukusaki, E.; Yoshimura, K.; Shigeoka, S. Overexpression of an ADP-ribose pyrophosphatase, AtNUDX2, confers enhanced tolerance to oxidative stress in Arabidopsis plants. *Plant J.* **2009**, *57* (2), 289–301.

(55) Zhang, X.; Ervin, E. H. Impact of seaweed extract-based cytokinins and zeatin riboside on creeping bentgrass heat tolerance. *Crop Sci.* **2008**, *48*, 364–370.

(56) Veerasamy, M.; He, Y.; Huang, B. Leaf senescence and protein metabolism in creeping bentgrass exposed to heat stress and treated with cytokinins. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **2007**, *132*, 467–472.

(57) Gilliland, L. U.; Pawloski, L. C.; Kandasamy, M. K.; Meagher, R. B. Arabidopsis actin gene ACT7 plays an essential role in germination and root growth. *Plant J.* **2003**, *33* (2), 319–328.

(58) Rahman, A.; Bannigan, A.; Sulaman, W.; Pechter, P.; Blancaflor, E. B.; Baskin, T. I. Auxin, actin and growth of the Arabidopsis thaliana primary root. *Plant J.* **2007**, *50* (3), 514–528.

(59) Baluska, F.; Vitha, S.; Barlow, P. W.; Volkmann, D. Rearrangements of F-actin arrays in growing cells of intact maize root apex tissues: a major developmental switch occurs in the postmitotic transition region. *Eur. J. Cell Biol.* **1997**, *72* (2), 113–121.

(60) Sauer, M.; Jakob, A.; Nordheim, A.; Hochholdinger, F. Proteomic analysis of shoot-borne root initiation in maize (*Zea mays* L.). *Proteomics* **2006**, *6* (8), 2530–2541.



# Identification of Proteins from Cap-Binding Complexes by Mass Spectrometry During Maize (*Zea mays* L.) Germination

Pedro E. Lázaro-Mixteco and Tzvetanka D. Dinkova\*

Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, México D.F. +52 55 56225277, cesy@unam.mx

*Dedicated to Dr. Estela Sánchez de Jiménez for her invaluable contributions to plant biochemistry*

Received January 5, 2011; accepted May 30, 2011

**Abstract.** This work describes the identification of components in the Cap-binding complexes in non-germinated and 24-h-imbibed seeds using mass spectrometry. This approach revealed new components particularly present in the non-germinated seed. Among these, two heat shock proteins, HSP101 and HSP70, were detected as well as several proteins involved in carbohydrate metabolism. Between the new components of maize Cap-binding complexes, several proteins contain a motif that identifies them as potential direct interactors with eIF4E or eIF(iso)4E. Together with the major abundance of eIF(iso)4E at this developmental stage, our findings indicate clear differences between the translation initiation complexes that are available for protein synthesis right upon water imbibition and those that are present once germination has been completed.

**Key words:** Cap-binding proteins, germination, eIF4E-binding motif, translation, *zea mays* L.

**Resumen.** En el presente trabajo se describe la identificación de componentes de los complejos de unión a Cap obtenidos de semillas de maíz sin germinar y embebidas en agua por 24 h utilizando espectrometría de masas. Mediante este procedimiento se encontraron nuevos componentes en los complejos de unión a Cap, presentes particularmente en las semillas sin germinar. Entre estos, se detectaron dos proteínas de choque térmico o chaperonas, HSP101 y HSP70, así como varias proteínas involucradas en metabolismo de carbohidratos. Entre los nuevos componentes de complejos de unión a Cap en maíz, varias proteínas presentan motivos de aminoácidos que los identifican como interactores directos potenciales de las proteínas eIF4E y eIF(iso)4E. Estos hallazgos indican que los complejos de inicio de la traducción difieren entre el inicio y término de la germinación de semillas de maíz, tanto por la abundancia de eIF(iso)4E como por su composición proteica.

**Palabras clave:** Germinación, motivo de unión a Eif4E, proteínas de unión a cap, traducción, *zea mays* L.

## Introduction

Translation of mRNAs in eukaryotes initiates through their 5' end Cap structure (7mGpppN, where N is any nucleotide). Eukaryotic translation initiation factor (eIF) 4E of 25 kDa directly binds to the Cap and to a platform protein of 200 kDa, eIF4G. eIF4G interacts with the multi-subunit complex eIF3 (12 subunits; more than 500 kDa) and brings together the mRNA and the 43S pre-initiation complex formed by eIF3, the ternary complex (eIF2-Met-tRNA<sup>Met</sup>-GTP), the 40S ribosomal subunit and other initiation factors [1]. eIF4G also recruits the RNA helicase eIF4A which unwinds secondary structures in the 5' untranslated region (5'UTR) of the mRNA during the scanning towards the initiation codon, and the poly(A) binding protein (PABP) allowing the mRNA circularization for efficient translation re-initiation. Translation is probably the most controlled event in protein synthesis and an important regulatory mechanism takes place during Cap recognition and the mRNA recruitment steps [2].

The Cap-binding protein eIF4E has a highly conserved amino acid sequence in all organisms allowing its direct contact with the Cap structure [3]. eIF4G interacts with eIF4E through an YXXXXLΦ motif (where X is any amino acid and Φ is a hydrophobic residue) and improves its union with the Cap, forming a stable eIF4F-mRNA complex [4, 5]. The interaction between Cap and the translational machinery is prevented by

the binding of eIF4E to other cellular proteins through the same motif used for its interaction with eIF4G. By such means cells could modulate either their global translation levels, or specific mRNA recruitment [6]. During the last few years it became evident that through binding to specific proteins and the Cap of mRNAs, eIF4E participates in the nucleo-cytoplasmic transport, translational repression, and turnover of mRNA.

Multiple eIF4E family members have been identified in a wide range of organisms that include plants, flies, mammals, frogs, birds, nematodes, and fish. These members have been classified into three families: eIF4E-I, eIF4E-II and eIF4E-III [7]. Some eIF4E family members have altered its Cap-binding affinities or the interaction with eIF4G and other proteins, providing clues to their physiological roles. It has been suggested that each organism has at least one eIF4E that is ubiquitous and constitutively expressed to carry out general translation, and that the other family members are involved in specialized functions [2]. In addition, other proteins that do not belong to the eIF4E family, but are able to bind the Cap and perform a particular function during the RNA metabolism have been described. Such is the case of the nuclear Cap-Binding Complex (CBC) which participates in protection of the newly synthesized transcripts and their export to the cytoplasm, the De-Capping protein S (DcpS) involved in mRNA degradation, and the Argonaute protein (AGO) in animals which is part of small RNA regulatory pathways (for review see [2]). Therefore,

the proteic components of a Cap-binding complex may vary, depending upon the cellular conditions, growth and developmental requirements.

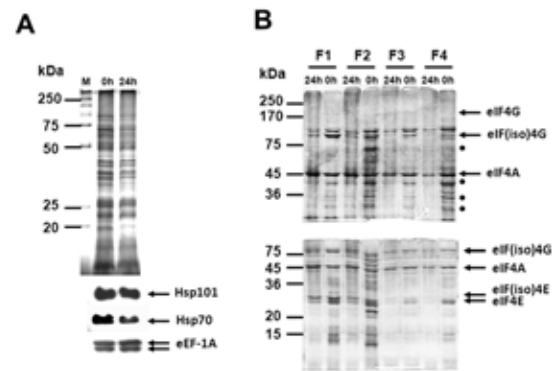
In plants, three eIF4E family members have been reported: eIF4E (ortholog of the mammalian eIF4E-1; class eIF4E-I) eIF(iso)4E (plant-specific; class eIF4E-I), and nCBP (novel Cap binding protein; class eIF4E-II). The eIF(iso)4E protein interacts with a particular eIF(iso)4G forming the unique plant eIF(iso)4F complex [8]. eIF4F and eIF(iso)4F complexes show selectivity in the recognition of mono and di-methylated Cap structures, as well as in *in vitro* translation of 5'UTR structured mRNAs. In most plant species, eIF(iso)4E shows about 50% amino acid identity with eIF4E and the relative abundance of each protein varies depending on the developmental stage and the plant tissue. In maize, the eIF(iso)4E protein is present at higher levels than eIF4E in non-germinated seeds [9]. The corresponding transcript is efficiently translated upon imbibition to maintain constant and high levels during the first 24 h of germination, whereas eIF4E levels increase toward germination completion. In addition, each Class I *Zea mays* eIF4E family member displays selective translational activity on the pool of mRNAs stored in the quiescent embryonic axes [10, 11].

Based on the above antecedents, in this work we aimed to identify the components of Cap-binding complexes at two particular developmental stages in maize: dry non-germinated (0h) and 24-h-imbibed germinated (24h) embryonic axes. Cap-binding proteins purified through affinity chromatography from 0h and 24h embryonic axes were separated on polyacrylamide gels, silver stained and identified by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS-MS). This approach revealed a differential composition in the Cap-binding complexes from the two developmental stages, suggesting new roles for proteins as potential partners of the eIF4E family members.

## Results and Discussion

### Cap-binding protein patterns in dry (0h) and 24-h-imbibed (24h) embryonic axes

Maize Cap-binding complexes were purified from dry "non-germinated" (0h) and 24-h-imbibed (24h) "germinated" embryonic axes through m<sup>7</sup>GTP-affinity chromatography. Equal amounts of total protein extracts were used for the m<sup>7</sup>GTP-purification (Fig. 1A). After recovery of the m<sup>7</sup>GTP-bound fractions, equal volumes of each eluted fraction (F1-F4) were separated on 10% or 15% denaturing polyacrylamide gels for protein resolution of 200-45 kDa (Fig. 1B, upper gel) and 45-15 kDa (Fig. 1B, lower gel), respectively. The silver stained protein patterns indicated several differences between 0h- and 24h- Cap-binding complexes. First, several proteins were preferentially detected in the m<sup>7</sup>GTP-eluted fractions from 0h and were absent or decreased in the 24h embryonic axes (Fig 1A, dotted bands). Second, although the Cap-binding proteins in these complexes previously identified as eIF4E and eIF(iso)4E by western blot [9] were observed in both, 0h- and 24h- embryonic axes, their distribu-

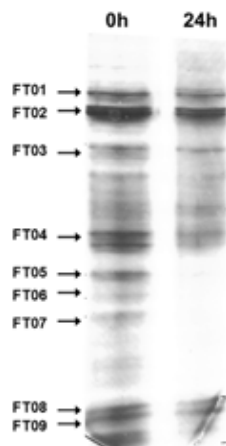


**Fig. 1.** Protein separation on denaturing polyacrylamide gels (SDS-PAGE) of maize Cap-binding complexes. (A) Total proteins were obtained from dry non-germinated (0h) and 24-h-imbibed germinated (24h) embryonic axes, quantified and resolved on 15% SDS-PAGE. The amounts of the heat shock proteins HSP101 and HSP70 as well as of the translation elongation factor (eEF) 1A, used as control to correct for protein loading, were analyzed by western blot with specific antibodies. (B) Equal amount of total protein extracts from 0h and 24h were incubated with m<sup>7</sup>GTP-Sepharose and the m<sup>7</sup>GTP-bound proteins were eluted in 5 fractions (200  $\mu$ l each) with 100  $\mu$ M m<sup>7</sup>GTP. Equal volume of the first four fractions (F1-F4) was separated using 10% (B, upper panel) or 15% (B, lower panel) SDS-PAGE and stained with silver. Arrows correspond to proteins known as components of the maize Cap-binding complexes. Dots indicate unidentified bands that differ between 0h and 24h complexes.

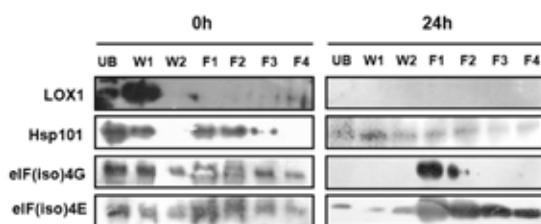
tion in each eluted fraction was different, being eIF4E more tightly bound to the m<sup>7</sup>GTP-Sepharose than eIF(iso)4E (Fig. 1B, fraction F4 from lower gel). On the other hand, eIF(iso)4E and its corresponding partner eIF(iso)4G were mostly present in fractions F1 and F2. Third, a doublet was present at the position of eIF(iso)4G, whereas by western blot usually only one band is detected for this protein (see Fig. 3). These results indicated that the composition and most importantly the affinity of the complexes bound to Cap vary between non-germinated and germinated maize seeds.

### Protein identification in Cap-binding complexes from 0h and 24h embryonic axes

Several of the differential and conserved protein bands in the above purified Cap-binding complexes were selected for identification by mass spectrometry (Fig. 2; FT01-FT09). Proteins identified with the criteria of peptides with greater than 95% probability, and at least 2 identified peptides, are shown in Table 1. The complete information about the identified peptides is shown in Tables 2 (0h) and 3 (24h). The analysis aimed to identify members of the translation initiation machinery and any associated proteins that may have potential translational regulatory roles during maize germination. It is important to notice, that there were silver-stained bands in the gel shown in Figure 2 not selected for identification by mass spectrometry in this study. These may include proteins present at both germination stages, or preferentially found at 24h. From the present analysis, eIF4E, eIF(iso)4E, and eIF(iso)4G proteins were identified in bands corresponding to their expected molecular



**Fig. 2.** Protein selection for Mass spectrometry identification. The second fraction (F2) from 0h- and 24h- Cap-binding complexes elution was separated on 10% SDS-PAGE and stained with silver. The indicated bands (FT01-FT09) were cut from the gel and processed for mass spectrometry. This selection included only proteins between 200 and 25 kDa.



**Fig. 3.** Protein identification in maize Cap-binding complexes by immunoblotting. Non-germinated (0h) and germinated (24h) embryonic axes were used for the complexes purification. Equal volume of the first four fractions (F1-F4) of  $m^7$ GTP-eluate, as well as the  $m^7$ GTP-Sepharose unbound fraction (UB) and washes (W1, W2) were separated on 10% SDS-PAGE, transferred to PVDF membrane and detected with the corresponding antibody.

weight. Noticeably, eIF4E was detected with only one peptide in the 0h- and with three peptides in the 24h-sample, whereas eIF4G was not identified in any of the processed bands. This is in agreement with previous findings in our lab, showing that the eIF(iso)4F is the most abundant Cap-binding complex in the dry maize seed [9].

The upper band of the doublet found at 88 kDa, in both 0h- and 24h-embryonic axes, rendered the identification of the 80 kDa subunit of the nuclear Cap-binding complex CBC. Other translation factors, such as eIF3c, eIF4A, and eEF1A were also identified in bands that correspond to their reported molecular weight. According to the literature, these proteins are usually found in Cap-binding complexes from other organisms [12, 13]. The role of eIF3c and eIF4A is at the level of translation initiation, whereas eEF1A is the elongation factor that carries incoming aminoacylated tRNA to the A site of the ribosome. Since eIF4E and eIF4G proteins remain bound to the mRNA to allow efficient re-initiation of translation on a circularized mRNA, both initiation and elongation factors may be found within the Cap-binding complexes.

Recently, the protein degradation and synthesis machineries have been reported as complexes sharing several of their components [14]. In agreement, we found the 6A subunit of the 26S proteasome in the Cap-binding complex from 0h-embryonic axes. This protein is a component of the small subunit (19S) of the proteasome. According to the literature, several proteins from the eIF3 multisubunit complex may interact with proteins of the proteasome and are specifically targeted for degradation [14].

Interestingly, two heat shock proteins, HSP101 and HSP70, were identified as part of the Cap-binding complexes in the dry, but not in the 24-h-imbibed embryonic axes. These proteins were detected at similar levels in the total protein extracts from both samples (Fig. 1A), suggesting that a possible change of their interaction with components of the Cap-binding complex, instead of degradation, is taking place during maize germination. The chaperone HSP70 has been previously identified in Cap-binding complexes in *Drosophila melanogaster* [12]. This chaperone is usually associated with the polypeptide chains nascent from the ribosomal large subunit to assure correct folding early in protein synthesis. Its presence in the Cap-binding complex from 0h-embryonic axes may be indirect through the association with the nascent polypeptide chain or even more likely due to its requirement in assisting the folding of translation initiation factors. However, a closer look on the amino acid sequence of maize HSP70 revealed the YXXXXLΦ conserved motif of eIF4E interacting proteins (Table 4). This suggests that maize HSP70 may directly bind to eIF4E and regulate its function in mRNA recruitment. Supporting this, proteins from the HSP70 family have been shown to regulate translation and stability of mRNAs with AU-rich element (ARE) in their 3'UTRs [15]. However, the specific binding of HSP70 to any of the known Cap-binding translation factors must be further confirmed.

The other heat shock protein, HSP101, has been reported as a chaperone involved in disaggregation of large protein complexes and its expression is greatly induced under heat shock. Maize HSP101 is accumulated in the dry seed and is required to achieve thermotolerance in young germinating seedlings [16]. During the first 24 h after seed imbibition, its protein level remains unchanged, but after 72h of seed imbibition HSP101 is almost undetectable under normal temperature growth conditions (25-32 °C). Wheat HSP101 has been reported as translational regulator for specific mRNAs harboring particular sequences in their UTRs [17]. In maize, a null mutant for this chaperone displays accelerated root growth during germination under normal temperature conditions, but under heat shock, the successful seedling establishment is impaired [16]. Therefore, the presence of HSP101 in the 0h Cap-binding complexes may account for either protein disaggregation of translation factors needed to guarantee translation initiation of growth regulators as soon as the seed is imbibed, or for translation regulation of particular mRNAs during early germination.

Surprisingly, several proteins belonging to carbohydrate metabolic pathways were also detected in the 0 h-, but not in the 24 h- Cap-binding complexes. These included the 3-phos-

**Table 1.** Proteins identified by mass spectrometry as components of Cap-binding complexes in maize non-germinated (0 h) or germinated (24 h) seeds.

Band ID	Protein ID	NCBI Acc #	MW	MW <sub>obs</sub>	Number of peptides <sup>a</sup>		% Protein Coverage
					0h	24h	
FT1	Heat shock protein HSP101	GI4584957	101	100	10	—	13
	Component of the nuclear Cap-binding complex (CBC), CBP80	GI108708115	99	100	4	4	4
	Component of the eukaryotic translation initiation factor 3 complex, eIF3c	GI113535264	104	100	3	—	3
FT2	Eukaryotic translation initiation factor gamma isozyme, eIF(iso)4G	GI113564790	88	90	7	7	7
	Lipoxygenase 1	GI12620877	96	90	3	2	4
FT3	Heat shock protein Hsp70	GI123593	71	70	22	—	32
	Leafbladeless 1	GI111559385	68	70	4	—	6
	Endoplasmic reticulum member of HSP70 family, cBiPe2	GI1575128	73	70	3	—	6
FT4	ATP-dependent RNA helicase, eIF4A	GI2341061	47	45	27	16	49
	Eukaryotic elongation factor eEF1A	GI2282584	49	45	16	6	35
	Homolog of the subunit 6 of proteasome 26S	GI3024431	39	45	6	2	13
FT5	3-Phosphoglycerate kinase	GI28172915	32	40	17	—	61
	Actin	GI1498388	37	40	16	—	38
	Alcohol dehydrogenase 1	GI113359	41	40	6	—	16
FT6	Fructose biphosphate aldolase	GI113621	39	36	23	—	55
FT7	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	GI1184772	37	32	11	—	48
	Malate dehydrogenase	GI18202485	36	32	3	—	11
FT8	Eukaryotic translation initiation factor-4E isozyme, eIF(iso)4E	GI3342823	28	28	8	3	33
FT9	Eukaryotic translation initiation factor-4E, eIF4E	GI3342821	26	26	—	3	14

<sup>a</sup> Only peptides with greater than 95% probability were considered. The shaded portion indicates proteins that were detected by mass spectrometry in the 0h but not the 24h Cap-binding complexes.

phoglycerate kinase, fructose biphosphate aldolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, malate dehydrogenase and alcohol dehydrogenase1. According to the number of identified peptides for each of these proteins (Table 1), they appear as abundant in the Cap-binding complexes. One possibility might be that their synthesis is stopped during the desiccation process and hence they may co-purify as nascent polypeptides within translation complexes. On the other hand, they may form part of aggregates together with translation factors. Although translational functions for these proteins have not been described yet, in a recent work reporting the yeast translosome several metabolic enzymes co-purified with the eIF3 translation complex [18]. In addition, the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase has been associated to nuclear RNA export [19]

suggesting that metabolic enzymes may have additional functions within protein synthesis. The presence of actin as part of the Cap-binding complexes is not unexpected, since translation complexes are bound to the cytoskeleton of the cell and this protein has been found as critical for normal protein synthesis in mammalian cells [20].

Maize Lipoxygenase 1 (LOX1) and the trans-acting siRNA (tasiRNA) biogenesis-related protein Leafbladeless 1 (LBL1) are not abundant proteins in the maize seed and were as well detected in the Cap-binding complexes of dry seeds (Table 1; FT02 and FT03). A member from the Lipoxygenase family, the *Arabidopsis thaliana* LOX2, was previously reported as eIF(iso)4E binding protein that contains a putative conserved YXXXXLΦ motif [21], whereas LBL1 has been found as meri-

**Table 2.** Peptide information for Cap-binding complexes obtained from maize embryonic axes at 0h of germination.

Protein name	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	Number of unique peptides	Percentage of total spectra	Percentage sequence coverage
heat shock protein 101	gi 4584957,gi 4928488	101,115.4	10	0.130%	13.0%
Peptide sequence	Best peptide identification probability	Best mascot ion score	Best mascot identity score	Peptide start index	Peptide stop index
ALVVAQLSAR	95.0%	70.6	32.2	372	382
DLVMQEVK	95.0%	42.6	31.6	742	749
GDVPSNLLDVR	95.0%	58.4	32.2	229	239
IVRGDVPSNLLDVR	93.3%	26.0	31.1	226	239
LQMKDVAVR	95.0%	44.6	32.3	780	788
NNPVLIGEPGVK	95.0%	51.3	31.3	203	215
QAITGASGGDGAAGDSFER	95.0%	141.0	32.1	48	66
SDILIQVPSSTR	95.0%	50.5	32.0	877	889
VQLDSQPEEIDNLER	95.0%	53.8	31.0	406	420
VVGQTEAVSAVAEAVLR	95.0%	73.9	31.2	572	588
Protein name	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	Number of unique peptides	Percentage of total spectra	Percentage sequence coverage
eIF3c	gi 113535264,gi 113610340	106,143.0	3	0.0474%	3.31%
Peptide sequence	Best peptide identification probability	Best mascot ion score	Best mascot identity score	Peptide start index	Peptide stop index
ELLAQGVQQR	95.0%	89.9	46.1	599	609
VEQLTFLTR	95.0%	46.9	45.7	280	288
VMAQLGLCAFR	95.0%	63.1	45.4	567	577
Protein name	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	Number of unique peptides	Percentage of total spectra	Percentage sequence coverage
CPB80	gi 108708115,gi 113548568	98,875.3	4	0.0593%	4.15%
Peptide sequence	Best peptide identification probability	Best mascot ion score	Best mascot identity score	Peptide start index	Peptide stop index
AENMQPVDR	95.0%	46.3	46.3	301	309
ISNMDMECR	95.0%	64.5	45.8	398	406
LLSNLAIVK	95.0%	42.6	46.4	603	611
VFVQEVLER	95.0%	65.9	46.1	443	451
Protein name	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	Number of unique peptides	Percentage of total spectra	Percentage sequence coverage
eIF(iso)4G	gi 113564790 dbj BAF15133.1	88,477.2	7	0.228%	6.82%
Peptide sequence	Best peptide identification probability	Best mascot ion score	Best mascot identity score	Peptide start index	Peptide stop index
AQVGPTPALIK	95.0%	40.2	45.5	192	202
DQLELR	95.0%	41.5	46.8	80	86
INDTYFIQMK	95.0%	58.0	45.9	413	422
LTGPDQEMER	95.0%	52.0	46.1	326	335
RINDTYFIQMK	95.0%	42.9	45.5	412	422
SNNWVPR	92.9%	39.1	46.8	446	452
SWDNIREAK	92.9%	38.4	46.0	157	165



Table 2. Continue.

Protein name	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	Number of unique peptides	Percentage of total spectra	Percentage sequence coverage
lipoxigenase	gi 12620877 gb AAG61118.1	96,461.0	3	0.0570%	3.59%
Peptide sequence	Best peptide identification probability	Best mascot ion score	Best mascot identity score	Peptide start index	Peptide stop index
AITQGIIPAVR	95.0%	33.6	31.0	277	287
MSDFLGYSIK	95.0%	35.1	31.9	267	276
TITLDDVPGR	95.0%	34.3	31.4	125	134
Protein name	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	Number of unique peptides	Percentage of total spectra	Percentage sequence coverage
cBiPe2	gi 1575128 gb AAC49899.1	73,068.8	2	0.0158%	6.33%
Peptide sequence	Best peptide identification probability	Best mascot ion score	Best mascot identity score	Peptide start index	Peptide stop index
DAGVIAGLNVAR	95.0%	44.4	31.1	190	201
IINEPTAAAIAYGLDK	95.0%	81.0	32.1	202	217
IINEPTAAAIAYGLDKK	95.0%	89.3	31.0	202	218
ITPSWVAFTDSER	95.0%	48.3	31.2	66	78
Protein name	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	Number of unique peptides	Percentage of total spectra	Percentage sequence coverage
HSP70	gi 123593 sp P11143	70,586.9	22	0.332%	31.6%
Peptide sequence	Best peptide identification probability	Best mascot ion score	Best mascot identity score	Peptide start index	Peptide stop index
ARFEELNMDLFR	95.0%	55.8	31.1	304	315
ATAGDTHLGGEDFDNR	95.0%	47.0	32.3	225	240
DAGVIAGLNVMR	95.0%	86.2	32.6	162	173
DISGNPR	93.3%	28.3	32.0	256	262
EIAEAYLGSTIK	95.0%	75.3	31.3	131	142
FEELNMDLFR	95.0%	61.7	31.1	306	315
IINEPTAAAIAYGLDK	95.0%	81.0	32.1	174	189
IINEPTAAAIAYGLDKK	95.0%	89.3	31.0	174	190
ITITNDKGR	95.0%	45.1	31.8	503	511
LSKEEIEK	95.0%	34.9	32.1	512	519
MDKSSVHDVVLVGGSTR	95.0%	69.7	31.0	330	346
MKEIAEAYLGSTIK	95.0%	57.7	30.5	129	142
MVNHVQEFK	95.0%	32.1	30.9	241	250
NALENYAYNMR	94.8%	28.6	31.6	542	552
NAVVTVPAYFNDSQR	95.0%	33.2	30.3	143	157
NKITITNDKGR	61.2%	21.0	31.6	501	511
NQVAMNPTNTVFDKAK	95.0%	87.1	31.6	59	73
NQVAMNPTNTVFDKAKR	95.0%	70.1	32.3	59	74
QFAAEEISSMVLIK	95.0%	81.7	31.1	115	128
SSVHDVVLVGGSTR	95.0%	78.2	31.8	333	346
TTPSYVGFDTTER	95.0%	61.1	30.8	39	51
VEIANDQGGR	95.0%	58.5	32.6	28	38

Table 2. Continue.

Protein name	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	Number of unique peptides	Percentage of total spectra	Percentage sequence coverage
leafbladeless1	gi 111559385 gb ABH10613.1	67,735.0	3	0.0237%	5.89%
Peptide sequence	Best peptide identification probability	Best mascot ion score	Best mascot identity score	Peptide start index	Peptide stop index
ELAALLEEELSR	95.0%	80.9	31.5	232	243
GTSVLPAGEQFGK	95.0%	31.2	31.6	245	257
NGPGAIDWYK	95.0%	39.4	31.6	201	210
NGSTSKVVK	94.4%	29.4	32.6	156	164
Protein name	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	Number of unique peptides	Percentage of total spectra	Percentage sequence coverage
eIF-4A	gi 2341061 gb AAB67607.1	46,964.7	27	1.25%	48.8%
Peptide sequence	Best peptide identification probability	Best mascot ion score	Best mascot identity score	Peptide start index	Peptide stop index
DELTLEGIK	95.0%	41.3	31.8	247	255
DIIMR	81.0%	24.8	32.7	320	324
ELAQQIEK	95.0%	43.5	32.0	120	127
FGRKGVAINFVTR	95.0%	38.1	31.2	374	386
FMNKPVR	95.0%	37.5	33.2	235	241
GIVPFCK	95.0%	31.9	32.2	71	77
GIYAYGFEKPSAIQQR	95.0%	59.8	31.2	55	70
GLDVIQQAQSGTGK	95.0%	35.5	32.6	78	91
GVAINFVTR	95.0%	66.2	31.8	378	386
ILASGVHVVVGTPGR	95.0%	43.0	32.3	155	169
IQVGVFSATMPPEALEITR	95.0%	30.3	30.2	215	233
IQVGVFSATMPPEALEITRK	95.0%	53.6	30.9	215	234
KGVAINFVTR	95.0%	57.7	32.0	377	386
KVDWLTDK	95.0%	39.9	32.3	292	299
MFVLDEADEMLSR	95.0%	95.4	31.7	186	198
MLFDIQK	95.0%	40.7	30.8	391	397
QFYVNVDKEDWK	95.0%	50.8	30.5	256	267
QSLRPDNIK	95.0%	33.2	30.7	177	185
RDELTLEGIK	95.0%	52.6	31.1	246	255
RKVDWLTDK	95.0%	43.0	32.2	291	299
RQSLRPDNIK	87.1%	26.0	32.4	176	185
VDWLTDK	81.2%	24.4	32.3	293	299
VFDMLR	95.0%	29.8	31.9	170	175
VFDMLRR	84.2%	24.4	31.6	170	176
VHACVGGTSVR	95.0%	50.9	31.8	140	150
VLITDLLAR	95.0%	67.5	32.1	333	342

Table 2. Continue.

Protein name	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	Number of unique peptides	Percentage of total spectra	Percentage sequence coverage
eE1alpha	gi 1321656 dbj BAA08249.1	49,215.7	7	0.107%	15.0%
Peptide sequence	Best peptide identification probability	Best mascot ion score	Best mascot identity score	Peptide start index	Peptide stop index
EVSSYLK	54.4%	19.2	31.3	173	179
IGGIGTVPVGR	95.0%	41.2	31.7	244	254
QTVAVGVIK	95.0%	31.8	31.6	419	427
STNLDWYK	95.0%	34.4	32.0	205	212
STTTGHLIYK	95.0%	33.1	31.6	21	30
YDEIVKEVSSYLK	77.9%	23.5	32.1	167	179
YYCTVIDAPGHRDFIK	95.0%	33.7	30.4	85	100
Protein name	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	Number of unique peptides	Percentage of total spectra	Percentage sequence coverage
actin	gi 1498388 gb AAB40105.1	37,136.2	16	0.530%	37.8%
Peptide sequence	Best peptide identification probability	Best mascot ion score	Best mascot identity score	Peptide start index	Peptide stop index
AGFAGDDAPR	95.0%	43.0	31.8	1	10
AVFPSIVGRPR	95.0%	60.3	31.4	11	21
CDVDIRK	95.0%	30.4	32.3	267	273
DAYVGDEAQS	95.0%	48.9	32.1	33	43
DAYVGDEAQS	95.0%	56.1	31.5	33	44
DLTDSL	95.0%	44.7	32.2	166	173
EITALAPSS	95.0%	33.5	31.1	298	308
GILTLK	74.6%	24.5	33.7	45	50
GYSFTT	95.0%	29.5	32.4	179	188
GYSFTT	95.0%	31.5	32.2	179	192
IKVVAPP	95.0%	32.7	30.4	309	317
LAYVALDYDQ	93.8%	27.1	30.8	198	213
LDLAGR	65.4%	23.0	33.7	160	165
LDLAGRDLT	95.0%	59.3	31.6	160	173
SYELPDGQVIT	95.0%	98.5	30.8	221	236
VVAPP	94.6%	29.7	33.0	311	318
Protein name	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	Number of unique peptides	Percentage of total spectra	Percentage sequence coverage
265 proteasome regulatory particle triple-A ATPase subunit1	gi 11094190 dbj BAB17624.1	47,665.1	2	0.0481%	5.87%
Peptide sequence	Best peptide identification probability	Best mascot ion score	Best mascot identity score	Peptide start index	Peptide stop index
FDDGVGGDNEVQR	95.0%	62.8	45.6	278	290
SVCTEAGMYAIR	81.1%	36.4	45.8	380	391
Protein name	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	Number of unique peptides	Percentage of total spectra	Percentage sequence coverage
265 proteasome regulatory complex ATPase RPT3	gi 42602319 gb AAS21759.1	38,811.9	2	0.0171%	6.32%
Peptide sequence	Peptide identification probability	Best mascot ion score	Best mascot identity score	Peptide start index	Peptide stop index
ADTLDPALLR	95.0%	31.4	30.8	244	253
GVLLYGPPGTGK	95.0%	38.9	30.9	131	142

Table 2. Continue.

Protein name	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	Number of unique peptides	Percentage of total spectra	Percentage sequence coverage
cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPC2	gi 1184772 gb AAA87578.1	36,524.1	15	0.307%	48.1%
Peptide sequence	Best peptide identification probability	Best mascot ion score	Best mascot identity score	Peptide start index	Peptide stop index
AASFNIIPSSSTGAAK	95.0%	53.5	31.7	203	217
AGIALNDHFIK	95.0%	73.3	30.6	301	311
GASYEEIKK	95.0%	27.9	31.3	254	262
GIMGYVEEDLVSTDFTGDSR	95.0%	94.1	31.0	274	293
HSDIALKDSK	95.0%	41.1	31.0	58	67
IGINGFGR	95.0%	45.7	31.8	6	13
KVVVISAPSK	95.0%	41.1	31.6	120	128
LTGMSFR	72.5%	21.3	32.1	230	236
LVSWYDNEWGYSNR	95.0%	43.0	30.1	312	325
SSIFDAK	95.0%	27.6	30.3	294	300
TLLFGEKPVTVFGIR	95.0%	44.4	32.3	68	82
VLPELNGK	95.0%	27.3	31.2	222	229
VPTVDVSVVDLTVR	95.0%	61.3	31.6	237	250
VVDLIR	73.3%	21.2	31.8	326	331
YDTVHGQWK	95.0%	33.9	32.4	49	57
Protein name	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	Number of unique peptides	Percentage of total spectra	Percentage sequence coverage
Fructose-bisphosphate aldolase, cytoplasmic isozyme	gi 113621 sp P08440 ALF_MAIZE	38,587.0	23	0.346%	54.6%
Peptide sequence	Best peptide identification probability	Best mascot ion score	Best mascot identity score	Peptide start index	Peptide stop index
ALQASTLK	95.0%	35.8	33.0	299	306
ANSEATLGTYK	95.0%	36.4	31.1	328	338
AWAGKVENLEK	95.0%	53.1	32.2	307	317
CAYVTETVLAACYK	95.0%	70.9	31.5	197	210
DGKPFVDVLK	95.0%	31.9	32.4	85	94
EGGVLPGIK	95.0%	35.4	31.2	95	103
EGGVLPGIKVDK	95.0%	46.3	31.6	95	106
GDAAADTESLHVK	95.0%	34.8	31.6	339	351
GILAADESTGTIGK	95.0%	75.1	30.9	25	38
GILAADESTGTIGKR	95.0%	81.5	32.3	25	39
GTIEVVGTDK	95.0%	64.5	32.4	107	116
GTIEVVGTDKETTQGHDDLGR	95.0%	58.4	31.0	107	129
IGPNEPSQLAIDLNAQGLAR	95.0%	69.6	30.1	149	168
KPWSLSFSFGR	95.0%	32.8	31.5	288	298
KVTPEVIAEYTVR	95.0%	36.7	32.5	237	249
LSSINVENVEENR	95.0%	74.2	32.1	40	52
LSSINVENVEENRR	95.0%	43.5	31.8	40	53
NAAYIGTPGK	95.0%	46.3	31.5	15	24
RLSSINVENVEENRR	83.0%	24.7	31.9	39	53
TKDGKPFVDVLK	95.0%	36.8	31.0	83	94
VDKGTIEVVGTDK	95.0%	43.3	31.2	104	116
VTPEVIAEYTVR	95.0%	73.2	31.9	238	249
YYEAGAR	95.0%	31.3	33.0	133	139

Table 2. Continue.

Protein name	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	Number of unique peptides	Percentage of total spectra	Percentage sequence coverage
Malate dehydrogenase, cytoplasmic	gi 18202485 sp Q08062 MDHC_MAIZE	35,571.4	3	0.0225%	11.1%
Peptide sequence	Best peptide identification probability	Best mascot ion score	Best mascot identity score	Peptide start index	Peptide stop index
LNVQVSDVK	95.0%	27.7	31.6	172	180
MELVDAAFPLLK	95.0%	45.6	30.3	56	67
VLVVANPANTNALILK	95.0%	49.2	30.2	127	142
Protein name	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	Number of unique peptides	Percentage of total spectra	Percentage sequence coverage
Cytosolic 3-phosphoglycerate kinase	gi 28172915 gb AAO32643.1	31,608.4	17	0.311%	61.2%
Peptide sequence	Best peptide identification probability	Best mascot ion score	Best mascot identity score	Peptide start index	Peptide stop index
AKGVSLLLPTDIVVADK	83.0%	24.3	31.8	186	202
ELDYLVGAVANPK	95.0%	82.7	31.4	105	117
FAAGTEAIAK	95.0%	54.6	31.0	258	267
FAAGTEAIAKK	95.0%	31.1	31.6	258	268
FYKEEEKNEPEFAK	95.0%	51.4	31.1	49	62
GVSLLLPTDIVVADK	95.0%	64.2	30.3	188	202
GVTTIIGGGDSVAAVEK	95.0%	101.0	32.0	277	293
IGVIESLLAK	95.0%	48.1	32.4	133	142
KLAEITTTK	95.0%	44.9	32.5	268	276
KPFAAIVGGSK	95.0%	68.3	31.8	118	128
LAAALPEGGVLLLENVR	95.0%	62.7	31.3	32	48
LAELTTK	95.0%	29.5	32.3	269	276
LASVADLYVNDAFGTAHR	95.0%	35.2	30.1	64	81
TFNEALDTTK	95.0%	37.4	31.4	233	242
TVIWNQPMGVFEFEK	95.0%	47.9	30.9	243	257
YLKPAVAGFLMQK	95.0%	30.9	30.7	92	104
YSLKPLVPR	95.0%	42.6	31.8	1	9
Protein name	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	Number of unique peptides	Percentage of total spectra	Percentage sequence coverage
eIF(iso)4E	gi 6016335 sp O81482 IF4E2_MAIZE	24,086.1	8	0.328%	33.3%
Peptide sequence	Best peptide identification probability	Best mascot ion score	Best mascot identity score	Peptide start index	Peptide stop index
AGVEPKWEDPECANGGK	95.0%	62.1	31.6	102	118
GDKLALWTR	95.0%	50.5	32.1	162	170
ITYTFHDDSK	95.0%	35.2	32.4	195	204
LSGNADFHLFK	95.0%	48.7	31.9	91	101
SGAAWGTSLK	95.0%	39.4	31.2	58	67
SGAAWGTSLKK	95.0%	44.5	32.0	58	68
TASNEAVQVNIGK	95.0%	79.9	31.4	171	183
TASNEAVQVNIGKK	95.0%	34.2	31.5	171	184

**Table 3.** Peptide information for Cap-binding complexes obtained from maize embryonic axes at 24h of germination.

Protein name	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	Number of unique peptides	Percentage of total spectra	Percentage sequence coverage
CBP80	gi 108708115 gb ABF95910.1	98,875.3	5	0.284%	5.42%
Peptide sequence	Best peptide identification probability	Best mascot ion score	Best mascot identity score	Peptide start index	Peptide stop index
AENMQPVDR	91.9%	42.9	46.5	301	309
ISNMDMECR	95.0%	51.2	46.0	398	406
LLSNLAIVK	95.0%	45.9	45.7	603	611
SFTHLITVLER	72.9%	32.8	45.9	548	558
VFVQEVLER	95.0%	56.6	46.0	443	451
EEEQGGGGQKSR	55.4%	14.4	30.6	337	349
Protein name	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	Number of unique peptides	Percentage of total spectra	Percentage sequence coverage
eIF(iso)4G	gi 113564790 dbj BAF15133.1	102,217.1	7	0.268%	6.39%
Peptide sequence	Best peptide identificaton probability	Best mascot ion Score	Best mascot ion score	Peptide start index	Peptide stop index
AEVPWSAR	57.5%	30.4	46.7	190	197
AQVGPTPALIK	95.0%	43.5	45.4	179	189
DQLELR	95.0%	45.9	47.0	67	73
INDTYFIQMK	95.0%	79.6	45.9	400	409
LTGPDQEMER	95.0%	67.2	46.0	313	322
RINDTYFIQMK	95.0%	53.8	45.6	399	409
TVSLLEEYFGIR	92.5%	40.6	45.4	632	643
Protein name	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	Number of unique peptides	Percentage of total spectra	Percentage sequence coverage
eIF-4A	gi 2341061 gb AAB67607.1	46,964.7	16	0.291%	36.5%
Peptide sequence	Best peptide identification probability	Best mascot ion score	Best mascot ion score	Peptide start index	Peptide stop index
ALGDYLGVK	95.0%	31.7	31.4	131	139
DELTLEGIK	95.0%	46.1	31.8	247	255
ELAQQIEK	76.2%	22.6	31.6	120	127
FGRKGVAINFVTR	91.6%	25.6	30.7	374	386
GIYAYGFEKPSAIQQR	95.0%	39.0	31.2	55	70
GLDVIQQAQSGTGK	95.0%	100	32.6	78	91
GVAINFVTR	95.0%	47.5	32.3	378	386
ILASGVHVVVGTTPGR	95.0%	76.5	31.8	155	169
IQVGVFSATMPPEALEITR	95.0%	82.2	30.2	215	233
KGVAINFVTR	95.0%	54.0	32.5	377	386
KVDWLTDK	95.0%	38.0	32.3	292	299
MFVLDEADEMLSR	95.0%	74.0	32.0	186	198
MLFDIQK	95.0%	29.9	30.8	391	397
QSLRPDNIK	76.8%	21.6	30.5	177	185
RDELTLEGIK	95.0%	54.7	31.6	246	255
VLITDLLAR	95.0%	32.7	32.1	333	342

**Table 3.** Continue.

Protein name	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	Number of unique peptides	Percentage of total spectra	Percentage sequence coverage
eEF1alpha	gi 1321656 dbj BAA08249.1	49,272.7	6	0.162%	13.0%
Peptide sequence	Best peptide identification probability	Best mascot ion score	Best mascot identity score	Peptide start index	Peptide stop index
ARYDEIVK	95.0%	34.5	32.0	165	172
IGGIGTVPVGR	95.0%	67.4	32.0	244	254
QTVAVGVK	95.0%	36.9	31.6	419	427
STNLDWYK	95.0%	34.0	32.3	205	212
STTTGHLIYK	95.0%	43.1	31.6	21	30
YYCTVIDAPGHR	95.0%	59.6	32.5	85	96
Protein name	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	Number of unique peptides	Percentage of total spectra	Percentage sequence coverage
eIF4E	sp O81481 IF4E1_MAIZE	24,452.8	3	0.332%	13.8%
Peptide sequence	Best peptide identification probability	Best mascot ion score	Best mascot identity score	Peptide start index	Peptide stop index
IAIWTK	90.8%	31.7	33.6	167	172
LIVGADFHCfk	95.0%	40.6	31.7	94	104
NAANEAAQVSIGK	95.0%	68.8	32.4	173	185
Protein name	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	Number of unique peptides	Percentage of total spectra	Percentage sequence coverage
eF(iso)4E	gi 6016335 sp O81482 IF4E2_MAIZE	24,086.1	3	0.251%	11.1%
Peptide sequence	Best peptide identification probability	Best mascot ion score	Best mascot identity score	Peptide start index	Peptide stop index
SGAAWGTSLK	95.0%	32.5	31.2	58	67
TASNEAVQVNIGK	95.0%	58.6	31.4	171	183
TASNEAVQVNIGKK	95.0%	51.8	31.9	171	184



**Table 4.** Alignment of eIF4E Binding Motifs present in eIF4E Binding Proteins reported for Plants (*At* = *Arabidopsis thaliana*, *Zm* = *Zea mays*)<sup>a</sup>. Underlined amino acids correspond to the consensus sequence.

Protein	amino acid sequence	Reference
AteIF(iso)4GI	YTREQLL	[27]
AteIF(iso)4GII	FSREEIL	[27]
ZmeIF(iso)4G	YTRDQLL	this work
AtLOX2	YRKEELE	[21]
AtBTF3	STLKRIG	[28]
ZmLOX1	YRDDEL <u>R</u> (1) YATRTLF (2)	this work
ZmLBL1	YMDLELE	this work
ZmHSP70	YSCVGLW	this work
Consensus	YXXXXLΦ	

stem specific protein involved in small RNA mediated gene silencing and abaxial/adaxial leaf fate definition [22]. Therefore, we searched the sequence of maize LOX1 and LBL1 for the YXXXXLΦ motif to find whether these are also potential eIF4E or eIF(iso)4E binding proteins. The analysis showed that both proteins presented the conserved motif (Table 4). Since eIF(iso)4G also uses this amino acid sequence to bind eIF(iso)4E and integrate a functional translation initiation complex on the mRNA, the presence of potential eIF(iso)4E binding proteins in the 0h Cap-binding complexes indicates that eIF(iso)4E may be a part of ribonucleoprotein particles not involved in translation initiation at this developmental stage.

#### HSP101 and LOX1 presence in the Cap-binding complexes from dry and 24-h-imbibed maize seeds

To test whether some of the newly identified proteins in Cap-binding complexes are indeed specifically eluted from the m<sup>7</sup>GTP-chromatography, western blot with available antibodies was performed with extended washes before the specific elution with the m<sup>7</sup>GTP ligand (Fig. 3). While the LOX1 protein was mostly detected in the first washes (W1) of the column, a small quantity was specifically retained and eluted with the ligand in the last fractions (F2-F4) from dry (0h) embryonic axes. This protein was not detected in the 24-h-imbibed axes neither in total protein extracts nor in the Cap-bound fractions, indicating that it is probably particularly expressed during seed maturation. A significant amount of HSP101 was also specifically retained in the column, but eluted in the first three fractions upon the ligand addition (F1-F3), when non-germinated embryonic axes were used. Interestingly, the protein was also detected in the 24-h-imbibed embryonic axes elution fractions, although to a lesser levels. This could correlate to previous data in wheat, where HSP101 was reported to bind to eIF4G and eIF3, but not to eIF4E proteins [23]. On the other hand, the elution pattern of LOX1 was similar to that observed for eIF(iso)4E, indicating a possible direct binding between these

two proteins. These results support the notion that eIF(iso)4E, which is the major Cap-binding translation initiation factor in the dry non-germinated maize seed, forms different multiprotein complexes to regulate selective mRNA translation upon the germination onset.

## Conclusions

The analysis of Cap-binding complexes at two different germination stages in the maize seeds indicated differential composition that may correlate with the translational requirements and regulatory mechanisms operating to achieve the appropriate protein synthesis patterns at each developmental stage. New components of the Cap-binding complexes in non-germinated seeds include the chaperones HSP101 and HSP70 as well as the lipoxygenase LOX1 and leafbladeless LBL1. HSP70, LOX1 and LBL1 are candidates to interact with members of the eIF4E family through an YXXXXLΦ motif.

## Experimental

### Material and Methods

#### Plant material

Maize (*Zea mays* L) seeds of a Mexican land race Tuxpeño, var. Chalqueño, were used for all experiments. Seeds were germinated by water imbibition on moisturized cotton, in the dark, at 25 °C. Embryonic axes were manually excised from either dry (0h) or 24-h-imbibed (24h) seeds.

#### Cap-binding complexes purification

Cap-binding complexes were purified by m<sup>7</sup>GTP-Sepharose affinity chromatography as previously reported [9], with some modifications. Briefly, 2.5 g of axes were macerated in liquid nitrogen and suspended in 25 mL Buffer "A" consisting of: 20 mM HEPES, pH 7.6; 100 mM KCl; 0.2 mM EDTA; 10 % glycerol; 1 % Triton X-100; 0.5 mM DTT; and Complete<sup>TM</sup>, EDTA free protease inhibitors (Complete<sup>TM</sup>, Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA, USA). The extract was clarified by 30 min centrifugation at 15,000 rpm and 4 °C in a Sorvall J-20 rotor. The supernatant was filtered through eight layers of cheesecloth and the protein amount was quantified. Approximately, 20 mg of total protein was incubated with 0.5 mL of m<sup>7</sup>GTP-Sepharose (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) for one h at 4 °C. The slurry was poured onto a 10 mL Column (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA) and the resin was washed with 5 mL of Buffer "A", followed by 5 mL of Buffer "A" including 0.1 mM GTP. The bound proteins were eluted with 1 mL of Buffer "A" containing 100 μM m<sup>7</sup>GTP (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis MO, USA) in 5 fractions of 200 μL each. To assess more-specific binding, washes with Buffer "A" were extended to 10 mL (20 bed volumes) divided in 5 mL each.

## Electrophoresis and protein staining

Proteins from the purified Cap-binding complexes were resolved on either 10% or 15% (w/v) denaturing polyacrylamide (SDS-PAGE) gels. The silver staining procedure used was compatible with mass spectrometry analysis [24].

## Mass spectrometry

The in-gel digest and mass spectrometry experiments were performed by the Proteomics platform of the Eastern Quebec Genomics Center, Quebec, Canada. Tryptic digestion was performed on a MassPrep liquid handling robot (Waters, Milford, USA) according to the manufacturer's specifications and to the protocol of [24] with the modifications suggested by [25]. Briefly, proteins were reduced with 10 mM DTT and alkylated with 55 mM iodoacetamide. Trypsin digestion was performed using 105 mM of modified porcine trypsin (Sequencing grade, Promega, Madison, WI, USA) at 58°C for 1h. Digestion products were extracted using 1% formic acid, 2% acetonitrile followed by 1% formic acid, 50% acetonitrile. The recovered extracts were pooled, vacuum centrifuge dried and then resuspended into 8 µL of 0.1% formic acid and 4 µL were analyzed by mass spectrometry.

Peptide samples were separated by online reversed-phase (RP) nanoscale Capillary liquid chromatography (nanoLC) and analyzed by electrospray mass spectrometry (ES MS/MS). The experiments were performed with a Thermo Surveyor MS pump connected to a LTQ linear ion trap mass spectrometer (ThermoFisher, San Jose, CA, USA) equipped with a nanoelectrospray ion source (ThermoFisher). Peptide separation took place on a PicoFrit column BioBasic C18, 10 cm x 0.075 mm internal diameter (New Objective, Woburn, MA, USA), with a linear gradient from 2-50% solvent B (acetonitrile, 0.1% formic acid) in 30 min, at 200 mL/min (obtained by flow-splitting). Mass spectra were acquired using a data dependent acquisition mode using Xcalibur software version 2.0. Each full scan mass spectrum (400 to 2000 m/z) was followed by collision-induced dissociation of the seven most intense ions. The dynamic exclusion (30 sec exclusion duration) function was enabled, and the relative collisional fragmentation energy was set to 35%.

## Protein Identification

All MS/MS samples were analyzed using Mascot (Matrix Science, London, UK; version 2.2.0). Mascot was set up to search the ncbi\_Zea\_mays\_20071004 database (10,023 entries) assuming the digestion enzyme non-specific. Mascot was searched with a fragment ion mass tolerance of 0.50 Da and a parent ion tolerance of 2.0 Da. Iodoacetamide derivative of cysteine was specified as a fixed modification and oxidation of methionine was specified as a variable modification. Scaffold (version 3.0, Proteome Software Inc., Portland, OR) was used to validate MS/MS based peptide and protein identifications. Peptide identifications were accepted if they could be established at greater than 95.0% probability as specified by the Peptide Prophet

algorithm [26] and contained at least 2 identified peptides. Proteins that contained similar peptides and could not be differentiated based on MS/MS analysis alone were grouped to satisfy the principles of parsimony.

## Immunoblotting

For immunodetection, proteins were blotted onto a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Millipore Corp., Billerica, MA, USA), which was blocked with 5% (w/v) milk and incubated with the primary antibody for 2 h at room temperature. After several washes in Phosphate Saline Buffer (PBS), the membrane was incubated for 1 h with the appropriate secondary antibody at a 1:5000 dilution. Detection was performed with Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore Corp.). Primary antisera dilutions were as follows: antibodies against wheat eIF(iso)4E and eIF(iso)4G were kindly donated by Karen S. Browning, University of Texas, Austin, USA and were used at 1:5000 dilution; antibody against maize Hsp101 was kindly donated by Jorge Nieto-Sotelo, Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Mexico and used at 1:1000 dilution; antibody against bean LOX2 was kindly donated by Helena Porta, Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Mexico and used at 1:100 dilution.

## Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support from Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, México, IN204309 and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México, 81708. We wish to thank Dr. Karen S. Browning (University at Austin, Texas), Dr. Jorge Nieto-Sotelo and Dr. Helena Porta (Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México) for antibody donations.

## References

1. Jackson, R. J.; Hellen, C. U.; Pestova, T. V. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 113-127.
2. Rhoads, R. E. *J Biol Chem.* **2009**, *284*, 16711-16715.
3. Goodfellow, I. G.; Roberts, L. O. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2008**, *40*, 2675-2680.
4. Mayberry, L. K.; Allen, M. L.; Dennis, M. D.; Browning, K. S. *Plant Physiol.* **2009**, *150*, 1844-1854.
5. Kaye, N. M.; Emmett, K. J.; Merrick, W. C.; Jankowsky, E. *J Biol Chem.* **2009**, *284*, 17742-17750.
6. Sonenberg, N.; Hinnebusch, A. G. *Mol Cell.* **2007**, *28*, 721-729.
7. Joshi, B.; Lee, K.; Maeder, D. L.; Jagus, R. *BMC Evol. Biol.* **2005**, *5*, 48-68.
8. Browning, K. S. *Biochemical Society Transactions.* **2004**, *32*, 589-591.
9. Dinkova, T. D.; Sanchez de Jimenez, E. *Physiol. Plant.* **1999**, *107*, 419-425.
10. Dinkova, T. D.; Aguilar, R.; Sanchez de Jimenez, E. *In The Biology of Seeds: Recent Research Advances* (Nicolas, G., Bradford, K. J., Come, D. and Pritchard, H. W., eds.). **2003**, pp. 181-189, CAB International.

11. Dinkova, T. D.; Marquez-Velazquez, N. A.; Aguilar, R.; Lazaro-Mixteco, P.; Sanchez de Jimenez, E. *Seed Science Research*. **2011**, 21, 85-93.
12. Hernandez, G.; Altmann, M.; Sierra, J. M.; Urlaub, H.; Diez del Corral, R.; Schwartz, P.; Rivera-Pomar, R. *Mech. Dev.* **2005**, 122, 529-543.
13. Fierro-Monti, I.; Mohammed, S.; Matthiesen, R.; Santoro, R.; Burns, J. S.; Williams, D. J.; Proud, C. G.; Kassem, M.; Jensen, O. N.; Roepstorff, P. *J Proteome Res.* **2006**, 5, 1367-1378.
14. Cabrera, R.; Kleifeld, O.; Scheliga, J. S.; Glickman, M. H.; Chang, E. C.; Wolf, D. A. *Mol Cell.* **2009**, 36, 141-152.
15. Laroia, G.; Cuesta, R.; Schneider, R. J. *Science* **1999**, 284, 499-502.
16. Nieto-Sotelo, J.; Martinez, L. M.; Ponce, G.; Cassab, G. I.; Alagon, A.; Ribaut, J. M.; Yang, R. *Plant Cell.* **2002**, 14, 1621-1633.
17. Ling, J.; Wells, D. R.; Tanguay, R. L.; Dickey, L. F.; Thompson, W. F.; Gallie, D. R. *Plant Cell.* **2000**, 12, 1213-1227.
18. Sha, Z.; Brill, L.M.; Cabrera, R.; Kleifeld, O.; Scheliga, J.S.; Glickman, M.H. Chang, E.C.; Wolf, D.A. *Mol Cell.* **2009**, 36, 141-152.
19. Sirover, M.A. *J Cell Biochem.* **2005**, 95, 45-52.
20. Stapulionis, R.; Kolli, S.; Deutscher, M.P. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 24980-24986.
21. Freire, M. A.; Tourneur, C.; Granier, F.; Camonis, J.; El Amrani, A.; Browning, K. S.; Robaglia, C. *Plant Mol. Biol.* **2000**, 44, 129-140.
22. Timmermans, M.C.; Schultes, N.P.; Jankovsky, J.P.; Nelson, T. *Development.* 1998, 125, 2813-2823.
23. Gallie, D. R. *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, 3401-3411.
24. Shevchenko, A.; Wilm, M.; Vorm, O.; Mann, M. *Analytical Chemistry.* **1996**, 68, 850-858.
25. Havlis, J.; Thomas, H.; Sebela, M.; Shevchenko, A. *Analytical Chemistry.* **2003**, 75, 1300-1306.
26. Keller, A.; Nesvizhskii, A.; Kolker, E.; Aebersold, R. *Analytical Chemistry.* **2002**, 74, 5383-5392.
27. Lellis, A. D.; Allen, M. L.; Aertker, A. W.; Tran, J. K.; Hillis, D. M.; Harbin, C. R.; Caldwell, C.; Gallie, D. R.; Browning, K. S. *Plant Mol. Biol.* **2010**, 64, 249-263.
28. Freire, M. A. *Gene* **2005**, 345, 271-277.