



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**INTERACCIÓN IN VIVO DE Hsp70 y Hsp101 CON COMPLEJOS
DE UNIÓN A CAP EN *ZEA MAYS* DURANTE LA GERMINACIÓN**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

KEVIN ARTURO DELGADO RODRÍGUEZ

DIRECTOR DE TESIS

TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA



MÉXICO, D.F. 21 de abril del año 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	Profesor:	Felipe Cruz García
VOCAL:	Profesor:	Euclides Avila Chávez
SECRETARIO:	Profesor:	Tzvetanka Dimitrova Dinkova
1er. SUPLENTE:	Profesor:	Patricia Coello Coutiño
2° SUPLENTE:	Profesor:	Aurora Lara Núñez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 103, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA

SUSTENTANTE:

KEVIN ARTURO DELGADO RODRÍGUEZ

Agradecimientos

[...]

También deseo agradecer especialmente a PAPIIT y PAIP por las partidas presupuestales otorgadas a los proyectos PAPIIT IN210912 y PAIP 50009118 por el financiamiento durante el proyecto.

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. ANTECEDENTES	7
2.1 Características estructurales del mRNA	7
2.2 El complejo de unión a <i>cap</i> eIF4F	11
2.3 Papel de eIF4F y eIFiso4F en la expresión diferencial de mRNAs específicos	13
2.4 Las proteínas de respuesta al estrés por choque de calor	17
2.4.1 HSP70	19
2.4.2 HSP101	22
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	27
3.1 Hipótesis	27
3.2 Objetivo general	27
3.3 Objetivos particulares	27
4. MATERIALES Y MÉTODOS	28
4.1 Material biológico	28
4.1.1 <i>Zea mays</i>	28
4.2 Métodos.	28
4.2.1 Germinación <i>ex terra</i> de <i>Zea mays</i>	28
4.2.2 Extracción de proteínas	28
4.2.3 Purificación por cromatografía de afinidad de complejos de unión a <i>cap</i>	29
4.2.4 Electroforesis desnaturizante de proteínas SDS-PAGE y transferencia a membrana de PVDF	29
4.2.5 Inmunodetección por <i>Western Blot</i>	30
5. RESULTADOS	32
5.1 Identificación de una proteína característica de los complejos de unión a <i>cap</i> : el factor proteico eIFiso4G se encuentra presente durante el inicio de la germinación	32
5.2 Presencia de HSP70 en complejos de unión a <i>cap</i> durante la germinación	35

5.3	HSP101 se encuentra ausente en complejos de unión a <i>cap</i> durante la germinación	36
6.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	39
7.	CONCLUSIONES	44
8.	PERSPECTIVAS	44
	BIBLIOGRAFÍA	45

Resumen

La traducción es un evento crucial en el proceso de expresión de la mayoría de genes descritos actualmente y la regulación de este evento, tanto a nivel general como específico, es un paso determinante en el proceso general de expresión genética de cualquier organismo. En plantas, las semillas son organismos completos que cuentan con la maquinaria suficiente para desarrollarse autónomamente y la germinación es una fase crítica que está sujeta a un estricto control traduccional. La semilla madura contiene moléculas de mRNA maduro que traduce antes de replicar y transcribir su DNA, dicho mRNA es traducido selectivamente durante la germinación. La capacidad de la semilla de traducir los mRNAs específicos que generen los productos que necesita la célula para desarrollarse adecuadamente refleja un control traduccional sumamente riguroso, cuyos mecanismos exactos se desconocen.

Recientemente en este laboratorio, se encontró que durante la germinación se encuentran presentes ciertas proteínas novedosas asociadas a los complejos que reclutan el mRNA y catalizan su unión con la subunidad ribosomal pequeña, los complejos de inicio de la traducción. Entre los péptidos encontrados figuran dos proteínas de choque térmico (HSP) de 70 kDa y la de 101 kDa cuyo papel en la regulación de la traducción es interesante abordar. Reportes previos han demostrado que HSP101 es capaz de estimular la traducción del virus del jaspeado de tabaco. Por otro lado, el silenciamiento específico de algunos miembros de la familia de HSP70 en *A. thaliana* genera resistencia a la infección por este virus, aunque se desconoce el mecanismo por el cual se genera la resistencia.

En este trabajo se describe la presencia de HSP 70 *in vivo* en los complejos de inicio de la traducción durante las primeras horas de germinación de semillas de *Zea mays*, si bien su presencia es máxima durante las primeras horas y decrece conforme avanza la germinación. Por otro lado, no fue posible encontrar a HSP101 interactuando con dichos complejos en las condiciones experimentales ensayadas.

Estos resultados sugieren que HSP70 cumple un rol dependiente del tiempo de desarrollo en la germinación y que la presencia de HSP101 en complejos de inicio puede no ser constante en todas las plantas.

1. Introducción

La regulación de la expresión genética en organismos eucariontes es un fenómeno excepcionalmente coordinado que asegura las características más fundamentales de cada organismo, como la diferenciación celular, el aprovechamiento de recursos y la respuesta a estímulos químicos y físicos.

La especialización de células es un rasgo sumamente importante de los organismos eucariontes, que les ha permitido desarrollar una amplia versatilidad de funciones economizando la cantidad de recursos que cada tejido debe invertir para conservar la viabilidad del organismo. La principal manera mediante la cual los organismos eucariontes han logrado esto es mediante la regulación de la expresión de genes específicos de un genoma que todas las células de un mismo organismo comparten.

La regulación de la expresión genética puede ser efectuada en cualquiera de las diversas fases por las cuales fluye la información genética, desde la selección de la secuencia de DNA genómico que se transcribe, hasta la modificación selectiva de las proteínas sintetizadas para alterar su actividad. Canónicamente, este flujo de información comienza cuando el DNA es leído por una polimerasa de RNA que transcribe la información almacenada en la hebra de doble cadena de DNA mediante la síntesis de una hebra de cadena sencilla de RNA. Este evento es un blanco primordial de la regulación de la expresión genética, que depende de la accesibilidad de las hebras de DNA a la polimerasa, lo cual es determinado por el mismo nivel de empaquetamiento del DNA y el reconocimiento de secuencias específicas por factores de transcripción que reclutan a la maquinaria transcripcional (Maniatis et al., 1987).

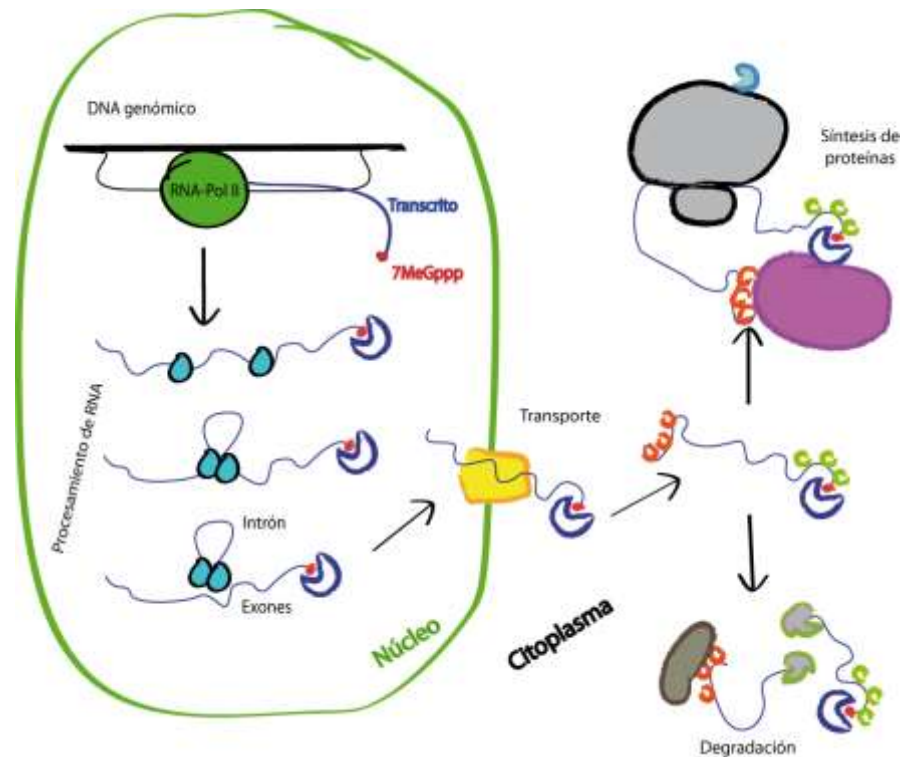


Figura 1. Flujo de información genética en una célula eucariote. El DNA eucariote, contenido en el núcleo, contiene los genes para sintetizar una proteína. Esta información es copiada en una molécula de RNA, la cual es procesada mediante cortes específicos (remoción de intrones) para suprimir secuencias con información no destinada a la síntesis de proteínas. Algunos factores proteicos se asocian a la molécula de RNA sintetizada y regulan el transporte de la molécula, así como su destino celular, ya sea la traducción activa en proteínas, el almacenamiento o la degradación de la molécula.

El transrito de RNA es entonces sometido a un proceso de maduración, en el cual sufre cortes específicos que eliminan intrones (secuencias características de eucariotes que se encuentran en la secuencia genómica, pero que no forman parte del mensaje final) y se seleccionan los exones que formarán parte del RNA maduro; también se agregan covalentemente estructuras que le otorgarán mayor estabilidad y optimizarán el reconocimiento de la molécula para hacer más eficiente su traducción (Figura 1). Una vez procesada la molécula, el RNA mensajero se asocia mediante interacciones débiles a

diversas proteínas y todos estos factores mediarán la exportación del RNA maduro al citoplasma y tendrán un papel muy importante en su destino.

El RNA mensajero maduro, mRNA, al ser exportado al citoplasma podría ser traducido en los ribosomas para realizar la síntesis de proteínas de forma inmediata, pero este proceso es otro importante blanco de regulación genética. El ensamblaje de ribosomas capaces de comenzar la traducción y el reclutamiento del complejo que transporta el mRNA hacia los ribosomas son los principales focos de regulación en el citoplasma. Este control puede ser afectado por la presencia (o ausencia) de nutrimentos, hormonas, sustancias tóxicas, oxidantes, presencia de patógenos, variaciones de temperatura, luz ultravioleta y muchos factores más (Ron, 2002; Holcik y Sonenberg, 2005).

La regulación traduccional, la que dirige el destino del mRNA en el citoplasma, evidentemente está encargada de brindar un control más fino con respecto a la situación inmediata en que se encuentra la célula al seleccionar los mRNAs que se traducen en mayor cantidad sobre otros que pueden resultarle innecesarios en alguna condición dada. Además hay situaciones en que la regulación traduccional es la única vía de seleccionar la información genética que se ha de expresar, como sucede en el desarrollo embrionario, momento en el que la célula contiene mRNAs sintetizados por el organismo madre y no realiza transcripción de su propio genoma (Kuersten y Goodwin, 2003).

A pesar del inmenso interés que estas cuestiones puedan despertar, es importante notar que la investigación de la regulación genética no debe ser un mero ejercicio intelectual, sino que debe ser al menos la base sobre la cual se pueda generar información útil al servicio de la sociedad.

En México, el maíz es el cultivo más importante, que desafortunadamente no se ha logrado desarrollar al ritmo que lo exige la demanda nutricional del país. Gran parte del maíz consumido en México es importado debido a la pobre producción obtenida en tierras nacionales. El estudio de los diversos factores involucrados en el desarrollo de la planta en cada etapa de su crecimiento puede generar información sumamente valiosa que podría ser usada en la obtención de variedades de maíz con características genéticas que resulten en una planta capaz de desarrollarse exitosamente en las condiciones del campo mexicano con la productividad necesaria para satisfacer las necesidades alimentarias del pueblo.

El análisis de la regulación traduccional puede brindar información útil sobre la resistencia de la planta a diferentes condiciones abióticas adversas, pues este tipo de regulación suele ser la primera en actuar ante tales retos. Por ejemplo, ante un aumento súbito de temperatura o en condiciones de limitación hídrica, condiciones propias de sequía, las primeras alteraciones en la vía de expresión genética clásica consisten en una inhibición generalizada de la traducción y el procesamiento de mensajeros inmaduros, antes de que se presenten cambios en procesos transcripcionales (Kaufman, 1999; Scheuner et al., 2001).

También hay casos diferentes a las condiciones de estrés en los que el control traduccional se convierte en el cuello de botella que debe atravesar un gen para lograr expresarse. Se sabe que durante la germinación de la semilla de maíz es muy importante el control de la expresión genética, pues el desarrollo correcto del eje embrionario establecerá la viabilidad de la plántula y posteriormente dará lugar a todos los órganos y estructuras que necesita la planta para sobrevivir. Durante las primeras horas del proceso de germinación, la semilla comienza a absorber agua y reactiva su maquinaria metabólica. Las proteínas almacenadas durante la maduración de la semilla se reactivan para comenzar a ejecutar las diversas

tareas que la célula en germinación necesita llevar a cabo (Figura 2). Una de estas tareas es la reparación del genoma que puede resultar dañado durante la deshidratación de la semilla, y una vez que se ha garantizado la calidad del DNA contenido en la célula, puede comenzar el proceso de transcripción para sintetizar nuevas proteínas. Es por esto que, durante la germinación, los procesos de traducción en la semilla comienzan antes de la transcripción de mRNAs nuevos (Bove et al., 2005). La semilla en su proceso de maduración es provista de un conjunto de mRNAs sintetizados durante el desarrollo y almacenados en la semilla seca. Durante la germinación algunos de estos son degradados y sólo una selección del conjunto inicial es traducida, algunos en etapas tempranas de la germinación y otros en estadios posteriores. Esto indica claramente que existe una traducción selectiva de mRNAs específicos durante las primeras horas de la germinación, momento en que la maquinaria transcripcional se encuentra inactiva, lo que implica que durante las primeras horas de la germinación, cruciales para el desarrollo de la planta, la semilla depende completamente de la regulación traduccional para asegurar una expresión genética adecuada.

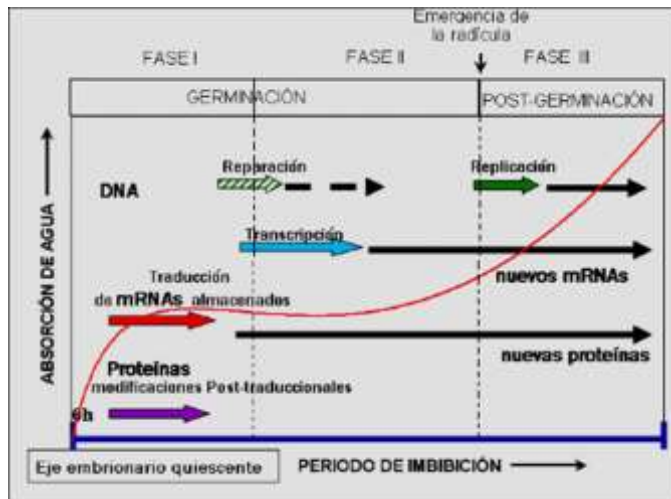


Figura 2. Eventos involucrados en la expresión genética durante la germinación de una semilla. Al comenzar el proceso de rehidratación de la semilla, el DNA entra en una fase de reparación para asegurar la integridad de la información almacenada, lo que obstaculiza los procesos transcripcionales; sin embargo, la síntesis de proteínas es crítica desde las primeras fases de absorción de líquidos. Evidentemente, la traducción en estas fases depende casi enteramente de las moléculas de RNA mensajero almacenadas en la semilla madura. Tomado y modificado de Bewley, 1997.

2. Antecedentes

2.1 Características estructurales del mRNA

Las moléculas de mRNA transcritas en el núcleo contienen una estructura *cap* en el extremo 5' de la cadena de ribonucleótidos. La estructura *cap* consiste en un residuo de guanosina metilada, principalmente en la posición 7 del heterociclo de purina, enlazado con el primer residuo de la cadena de RNA mediante un enlace trifosfato 5'-5' (7mGpppN). La estructura *cap* juega un papel crucial en la traducción de mRNAs, pues se ha observado que moléculas de mRNA sintetizadas artificialmente sin la estructura *cap* presentan una eficiencia de traducción mucho menor que la observada en mRNA con *cap* (Gallie, 2002). La estructura *cap* también juega un importante papel en el procesamiento de

la molécula de RNA inmadura, el transporte del mRNA del núcleo al citoplasma y su estabilidad posterior.

En el extremo 3', la mayoría de las moléculas de mRNA contienen una secuencia de 50 a 200 residuos de adenina consecutivas. Esta estructura, conocida como cola de poliA, también se ha encontrado involucrada en la localización, estabilidad y eficiencia de traducción del mRNA.

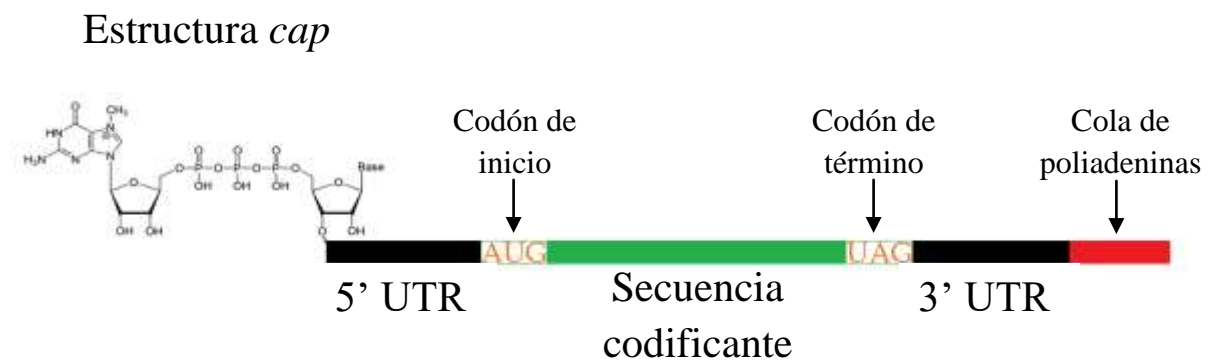


Figura 3. Representación esquemática de la estructura general de un RNA mensajero eucarionte. Además de contener la secuencia codificante de proteína delimitada por el codón de inicio y el codón de paro, la molécula de RNA generalmente contiene secuencias adicionales que flanquean a la región codificante. Estas secuencias son llamadas 'regiones no traducibles' 5' y 3' (5'UTR y 3' UTR), según la posición que ocupen.

Además de estas dos estructuras presentes en la gran mayoría de las moléculas de mRNA eucariontes, existen otros elementos dentro de la secuencia transcrita, principalmente en los extremos no traducidos (UTR, del término en inglés 'untranslated region') que modulan la eficiencia traduccional de la cadena de RNA (Figura 3). Estas estructuras son llamadas 'elementos reguladores en *cis*', pues actúan sobre la misma molécula que los contiene.

Entre los elementos *cis* se encuentran secuencias de nucleótidos específicas que pueden dar lugar a la formación de estructuras secundarias que a su vez podrían interactúan con

proteínas; secuencias que sin formar estructuras secundarias son reconocidas por proteínas reguladoras e incluso secuencias que interactúan directamente con el RNA ribosomal y dirigen la traducción de esta manera (Klausner y Harford, 1989).

La regulación traduccional puede estar mediada por una gran cantidad de tácticas celulares basadas en la interacción de secuencias específicas con otras biomoléculas:

Algunos mensajeros contienen secuencias capaces de interactuar directamente con el RNA ribosomal o algunos factores traduccionales, llamadas “sitios internos de entrada al ribosoma” o IRES, por sus siglas del inglés “Internal Ribosome Entry Site”, de manera que son capaces de comenzar su traducción sin necesidad de que se reconozca la estructura *cap* en el extremo 5' de la molécula de mRNA (Vagner et al., 2001). La descripción de este tipo de interacciones fue observada inicialmente en RNAs mensajeros de origen viral, pues como fue expuesto anteriormente, la traducción general, que es dirigida por el reconocimiento de *cap*, es inhibida en células sometidas no sólo a estrés abiótico, sino también en casos de infección. Al inhibirse la traducción de la mayoría de los RNAs mensajeros, tanto endógenos como exógenos de la célula, el mRNA viral se ve en la necesidad de lograr su traducción evitando la inactivación de la traducción dependiente de *cap*. La diversidad entre los mecanismos por los que cada IRES actúa es casi tan amplia como la diversidad viral: algunos mimetizan factores traduccionales y reclutan a la subunidad pequeña del ribosoma, e incluso hay algunas que mimetizan RNAs de transferencia para introducirse al ribosoma ensamblado (Spahn et al., 2001; Sasaki y Nakashima, 2000).

Si bien el descubrimiento de IRES se dio en mRNAs virales, la descripción de IRES en mRNAs celulares ha descubierto una nueva manera de regular la traducción de RNAs mensajeros necesaria en condiciones estresantes. Actualmente existen diversos estudios sobre numerosas proteínas de respuesta a estrés que son codificadas por RNAs mensajeros que contienen IRES, de manera que son expresadas aun cuando la traducción global es inhibida (Silver y Noble, 2012).

Otra forma de modular la traducción de RNAs mensajeros según el estado en que se encuentre la célula es con marcos cortos de lectura abiertos río arriba—uORF, de “upstream Open Read Frame”—a la secuencia que codifica para el producto principal. Ante la presencia de tales marcos de lectura, los ribosomas traducen primero dichas secuencias y no se realiza la traducción del ‘producto principal’ sino hasta que el estado de la célula permite la lectura del codón de inicio de dicho transcrito río abajo. La mayoría de los transcritos que presentan esta característica codifican para proteínas involucradas en el crecimiento y proliferación celular, por lo que su expresión puede ser favorecida cuando la célula se encuentra en un nivel energético alto y es posible invertir energía en tales procesos, aunque existen ejemplos de uORFs que no se rigen por este modelo de regulación fisiológica (Gray y Wickens, 1998).

Las formas de regulación descritas involucran la interacción de las secuencias propias del mRNA con factores traduccionales, consideradas como formas de regulación en *cis*. Formas de regulación en *trans* involucran la presencia de moléculas sintetizadas independiente para regular la expresión del mRNA. El caso más estudiado de regulación en *trans* es la debida a microRNAs, o miRNAs, que son secuencias de corta longitud, entre 19 y 24 nucleótidos, que interactúan con otras proteínas que usan el pequeño templado de

RNA para reconocer secuencias específicas del mensajero que hibriden en un grado satisfactorio con el miRNA (Cai et al., 2009). A consecuencia de este reconocimiento, la secuencia de mRNA blanco puede sufrir varios destinos, desde degradación mediada por cortes endonucleolíticos en el fragmento hibridado, arresto traduccional o incluso activación traduccional, dependiendo de la proteína a la que esté asociado el miRNA.

En los últimos años se han descrito un gran número de secuencias que estimulan o inhiben la traducción de mRNAs específicos cuyos productos proteicos tienen un rol importante en el desarrollo, diferenciación y adaptación de la célula. El conocimiento de estas secuencias puede ser una herramienta valiosa en la comprensión de la expresión celular en las diferentes condiciones de desarrollo.

2.2 El complejo de unión a *cap* eIF4F

El complejo proteico eIF4F (factor eucarionte de inicio 4F, por sus siglas en inglés) es el principal encargado de reclutar el mRNA eucarionte y mediante interacciones con otros factores de inicio montarlo en la subunidad pequeña del ribosoma, además de auxiliar en el reconocimiento del codón de inicio y así comenzar la traducción (Gingras et al., 1999). Este papel de eIF4F en el ensamblaje del complejo traduccional es un paso limitante en el flujo de información genética y, en consecuencia, un blanco importante de regulación de la traducción en eucariontes.

El complejo eIF4F es un heterotrímero formado por las subunidades eIF4A, eIF4G y eIF4E (Figura 4). eIF4A es una helicasa de RNA dependiente de ATP que desenrolla estructuras secundarias del mRNA, eIF4E reconoce la estructura *cap* en el extremo 5' del mRNA y eIF4G es una proteína de elevado peso molecular que contiene sitios de unión para eIF4E,

eIF4A, eIF3, y la proteína de unión a cola de poli A, PABP (Cheng y Gallie, 2007). La modulación de la actividad de este complejo por diferentes vías de señalización ha sido un tema de intensa investigación (Kozak, 2005).

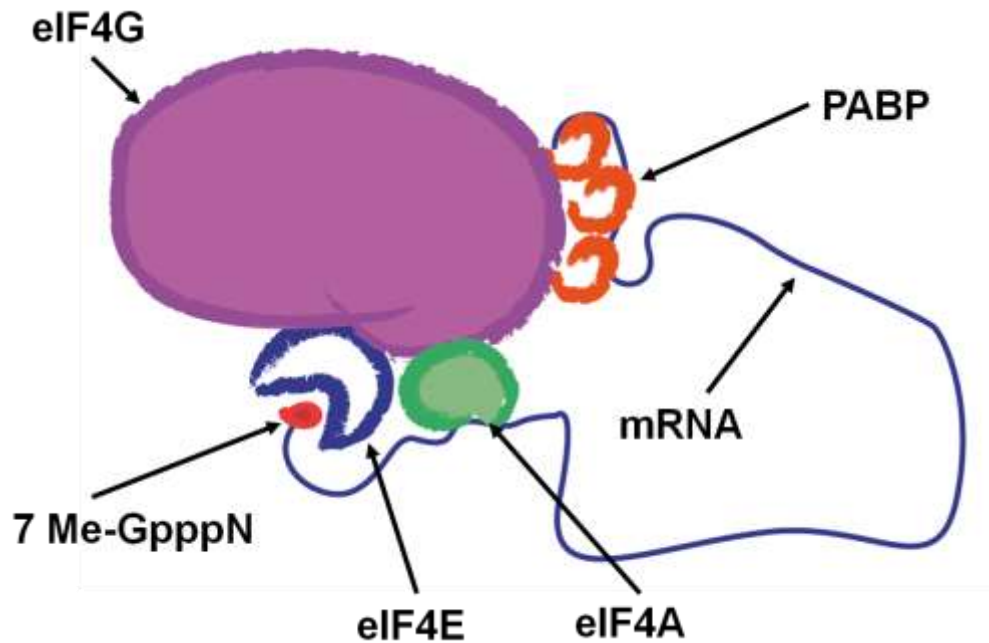


Figura 4. Representación esquemática del complejo eIF4F. El complejo eIF4F se compone principalmente de tres subunidades y se encarga de reclutar al RNA mensajero (mRNA) para comenzar su traducción. Cada subunidad realiza una tarea específica para lograr el inicio de la traducción: eIF4G es una proteína con múltiples sitios de interacción proteína-proteína y sirve como un andamio sobre el cual se colocan otras proteínas (como PABP), eIF4A es una helicasa que desenrolla el mRNA con el fin de facilitar la búsqueda del codón de inicio, eIF4E se une directamente con el mRNA al reconocer directamente la estructura *cap* en su extremo 5'.

El complejo eIF4F, dada su importante función, está sujeto a una estricta regulación. Tanto eIF4G como eIF4E son blancos de modificaciones postraduccionales, que puede aumentar o disminuir la avidéz de su interacción. En mamíferos existen proteínas que se unen fuertemente a eIF4E e impiden su interacción con eIF4G (Dever, 2002). Estos mecanismos

claramente tienen un efecto sobre la regulación global del inicio de la traducción, pero no necesariamente explican la regulación a nivel de la selección específica de mRNAs para la traducción. En plantas, eIF4G y eIF4E tienen isoformas cada una y forman dos complejos diferentes: eIF4F y eIF(iso)4F (Patrick y Browning, 2012). Las isoformas eIF4E y eIFiso4E tienen la capacidad de reconocer diferentes estructuras *cap* según el grado de metilación que presentan los ligandos, así como diferentes longitudes y estructuras en regiones 5'UTR, características que apoyan una capacidad de reconocer mRNAs específicos (Martínez-Silva et al., 2012).

En maíz existen tres proteínas que pueden reconocer la estructura *cap* y reclutarla para iniciar la traducción: eIF4E, eIFiso4E y un homólogo de eIF4E-HP de mamíferos, llamada nCBP que a diferencia de la isoforma de mamíferos, es capaz de interactuar con eIF4G.

2.3 Papel de eIF4F y eIFiso4F en la expresión diferencial de mRNAs específicos

La búsqueda de diferencias en la expresión genética en *Zea mays* mediadas por una regulación a nivel de la traducción de mRNA durante el proceso de germinación, derivó en estudios que buscaban determinar la composición específica de los complejos traduccionales en distintos estadios de la germinación. Trabajos previos mostraron que en las primeras etapas de la germinación la abundancia relativa de eIF4E y eIFiso4E variaba con respecto al tiempo. La cantidad de eIFiso4E presente en la semilla seca es mayor que la de eIF4E, pero al comenzar la imbibición y progresar el proceso de germinación, eIFiso4E se mantiene constante, mientras que la concentración de eIF4E aumenta (Dinkova y Sánchez de Jiménez, 1999).

La menor concentración de la isoforma 4E en la semilla seca y durante las primeras horas de la germinación parece indicar que la traducción al inicio de la germinación depende casi exclusivamente de la acción de iso4E y que este factor podría ser el encargado de reconocer las moléculas de mRNA que deben ser traducidas en las primeras horas de la germinación. La posibilidad de un ‘reconocimiento indirecto’ surge en principio debido a que este factor, iso4E, interacciona principalmente no con el factor 4G, sino con su isoforma eIFiso4G, que es capaz de comenzar la traducción, lo que sugiere interacciones con diferentes proteínas que aquellas con las que interactúa eIF4G. Esas diferentes proteínas podrían reconocer moléculas específicas de RNA según la secuencia o estructura secundaria del ácido nucleico y así seleccionar mRNAs que contengan determinados motivos secuenciales o estructurales para formar los complejos de preinicio de la traducción, lo que evidentemente aumentaría las posibilidades de que dicho mensajero sea traducido ante aquellos que no presenten dichas características adicionales.

Bajo la hipótesis de que la composición de los complejos es diferencial en función del tiempo de germinación y que dicha composición influye en los patrones traduccionales de los mRNA observados en el embrión de maíz, se realizaron experimentos de traducción *in vitro* (Dinkova et al., 2011; Figura 5). En estos experimentos se utilizaron los factores eIF4E o eIFiso4E recombinantes (Figura 5a) o los complejos de unión a *cap* purificados de ejes embrionarios de semillas secas (0 h) y de semillas germinantes (24 h) con extracto de germen de trigo previamente depletado de dichos complejos (Figura 5b). Esto podría indicar que la traducción al inicio de la germinación depende mayoritariamente de la acción de eIFiso4E y que este factor podría ser el encargado de dirigir la selección de moléculas de mRNA que deben ser traducidas en las primeras horas de la germinación. El

factor eIFiso4E interacciona con eIFiso4G y no con eIF4G. Los factores eIF4G y eIFiso4G son proteínas de anclaje sobre las que se reclutan diversas proteínas involucradas en el inicio de la traducción, así como algunas otras proteínas reguladoras que podrían desempeñar un papel en la selección de RNAs mensajeros basada en el reconocimiento de motivos específicos de RNA. Esto sugiere que cada complejo, integrado por distintos factores, interactúa con diferentes proteínas, por lo que de esta manera podría seleccionar indirectamente los mRNAs que serán traducidos preferencialmente en cada etapa del desarrollo.

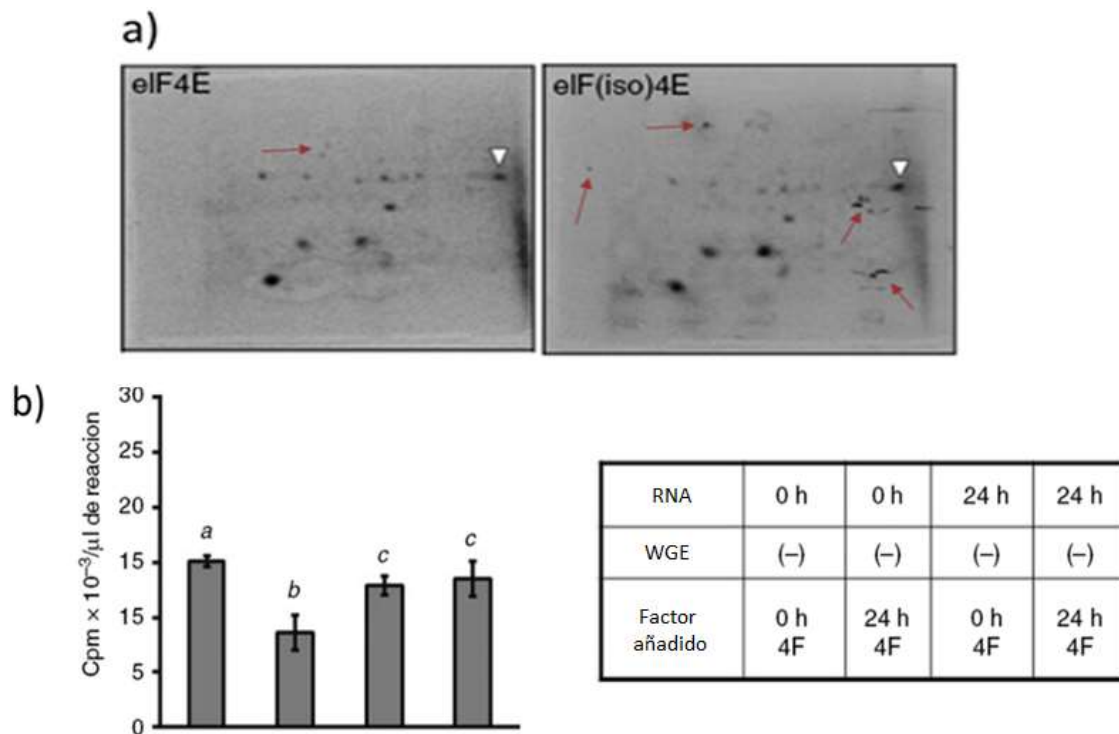


Figura 5. Ensayos de traducción *in vitro* con diferentes isoformas de factores de unión a cap. a) Análisis de traducción *in vitro* con RNA almacenado en semillas secas en presencia de complejos que contienen eIF4E o eIFiso4E. b) Evaluación de la traducción global usando combinaciones de los complejos purificados a diferentes horas con RNA total obtenido a esas horas (Dinkova et al., 2011).

La capacidad del complejo eIF4F (compuesto de eIF4E y eIF4G) y de eIFiso4F (que comprende eIFiso4E y eIFiso4G) de interactuar con distintas proteínas fue abordado, tomando en cuenta las observaciones previas, mediante un análisis proteómico de los complejos de unión a *cap* presentes en ejes embrionarios de semillas secas y en ejes imbebidos en agua durante 24 horas. Dicho análisis mostró que en ejes secos hay una mayor cantidad de proteínas interactuando con los complejos de unión a *cap*, además de que dichas proteínas son diferentes a las observadas a 24 horas (Tabla 1; Lázaro-Mixteco y Dinkova, 2012).

Estas observaciones sugieren que los complejos eIFiso4F y eIF4F interactúan con un conjunto diferente de proteínas durante la germinación y apoyan la hipótesis de que la regulación traduccional durante las primeras horas de la germinación de maíz es ejercida en parte por la composición de los complejos que reclutan al RNA mensajero. Entre las proteínas identificadas como diferenciales en complejos de unión a *cap* durante la germinación, llamaron la atención algunas que presentaban funciones regulatorias mediante interacciones con RNA.

Tabla 1. Proteínas identificadas por espectrometría de masas LC/MS/MS en complejos de unión a *cap* en ejes embrionarios de semillas imbebidas por 0 y 24 horas. *Proteínas de las que se han reportado interacciones regulatorias con mRNA.

0 h	24 h
HSP101 *	---
CBP80	CBP80
eIF3c	---
---	ATECP63
eIF4isoG	---
---	Vicilina
LOX1	LOX1
HSP70 *	---

LBL1 *	---
BIP2 *	---
eIF4A	eIF4A
eEF1 α	eEF1 α
Subunidad 6S de proteasoma 26S	Subunidad 6S de proteasoma 26S
3-fosfogliceratocinasa	---
Actina	---
Alcohol deshidrogenasa	---
Fructosa-bifosfato aldolasa	---
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	---
Malato deshidrogenasa	---
eIFiso4E	eIFiso4E
Globulina 2	Globulina 2
eIF4E	eIF4E

Las interacciones con RNA de estas proteínas son variadas en función y naturaleza. HSP101 interactúa con el extremo 5'UTR del RNA policistrónico del virus del mosaico del tabaco y facilita su inicio de la traducción en plantas (Gallie, 2002). Las proteínas HSP70 y BIP2 interactúan con secuencias específicas del extremo 3'UTR de diversos RNAs mensajeros eendógenos y así evitan la degradación de dichos mRNAs en mamíferos (Zimmer et al., 2001). LBL1 es parte de la vía de biogénesis de tasiRNA (trans-acting small interfering RNA) y es crucial para el establecimiento de la polaridad de hojas en plantas de maíz (Nogueira et al., 2007).

2.4 Las proteínas de respuesta al estrés por choque de calor

Las proteínas de choque térmico tienen diversas funciones celulares y comparten el papel de reducir la cantidad de proteínas con plegamientos aberrantes dentro de la célula. La característica de 'responsivas al choque térmico' es un epíteto usado por costumbre histórica, pues fue ante este tipo de estrés que fueron identificadas por primera vez (Schlesinger, 1990). Actualmente se sabe que este tipo de proteínas se encuentran involucradas en una gran cantidad de respuestas celulares, como la respuesta al estrés oxidativo, al estrés de retículo endoplásmico, a infecciones virales, a la presencia de

metales pesados e incluso a bajas temperaturas y helada (Wang et al., 2004). En plantas, las proteínas de choque térmico, o HSPs por sus siglas en inglés (Heat Shock Proteins), son subdivididas en 5 familias, diferenciadas por su peso molecular: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 y sHSP (de “small Heat Shock Proteins”) (Al-Whaibi, 2011).

La familia de HSP100 está conformada por proteínas cuya función es la de desagregar cúmulos voluminosos de proteínas desnaturalizadas. Para lograr esto, las integrantes de esta familia se agrupan en multímeros de 6 a 8 miembros cuyas subunidades trabajan en conjunto para desagregar las proteínas desnaturalizadas mediante el consumo de ATP (Gallie et al., 2002). A pesar de presentar una ocasional actividad proteolítica, la actividad de desagregasa no está asociada a la actividad proteolítica de la proteína, pues muchas de las veces, los péptidos desagregados son plegados a su forma nativa/activa por proteínas con actividad de chaperona sin pérdidas en su estructura primaria (Squires y Squires, 1992).

Las familias HSP90, HSP70 y HSP60 son ‘verdaderas chaperonas’, es decir, proteínas que dirigen el plegamiento de distintas ‘proteínas cliente’ que dependen de ellas para obtener distintas estructuras supramoleculares. Su capacidad de otorgar diferentes conformaciones a otras proteínas les permite facilitar el transporte de péptidos a través de membranas al exponer residuos hidrofóbicos a la cara exterior de la proteína y regresarlos al interior terminado el transporte (Young et al., 2003). Esta actividad dependiente de ATP es una característica bastante útil de estas familias de proteínas, por lo que integrantes de ellas generalmente son expresados de forma constitutiva. A pesar de sus similitudes, las familias son separadas entre sí debido a que generalmente se asocian a diferentes eventos celulares: la familia de HSP90 se asocia a fenómenos de señalización celular y respuesta a patógenos;

la de HSP70, a la respuesta ante estreses abióticos; la de HSP60, al desarrollo y mantenimiento de componentes mitocondriales (Emelyanov, 2002).

Las proteínas pequeñas de choque térmico, o sHSP, componen una diversa familia de proteínas que tienen como función monitorear el estado del plegamiento de diversos factores proteicos. Independientes del uso de ATP, su tarea se basa en el reclutamiento de otras proteínas de choque térmico con el fin de desagregar y renaturalizar proteínas con plegamientos deficientes o en dirigir la degradación de los péptidos desnaturalizados (Ehrnsperger et al, 2000).

El modo de acción cooperativo de las HSPs no es un comportamiento casual (Wegele et al., 2004). Se han observado diversas interacciones específicas entre ellas en condiciones particulares, se sabe por ejemplo que HSP70 y HSP101 interactúan a 24°C en ausencia de proteínas desnaturalizadas y, que al aumentar la temperatura, HSP70 interactúa principalmente con HSP90 y HSP60 (Zhang y Guy, 2005). Este tipo de interacciones específicas, sensibles al estado fisiológico de la célula, sugiere una compleja red de interacciones dinámicas favorecidas o inhibidas por diferentes cofactores que regulan la actividad de estas proteínas además de las proteínas que son capaces de reconocer. Este complejo comportamiento de las HSPs dificulta discernir el papel que juega cada proteína en los distintos complejos en los que puede estar localizada, la naturaleza de la interacción que las une en cada estado fisiológico y las consecuencias a nivel celular de la formación de tales complejos.

2.4.1 HSP70

La familia de proteínas de HSP70 no sólo se encuentra ampliamente distribuida en todos los reinos, sino además tiene un alto grado de conservación entre sus miembros. En los

últimos años ha emergido amplia evidencia que indica que los miembros de esta familia tienen funciones alternas a la resistencia a estrés, como el transporte de péptidos a través del sistema reticular, el importe selectivo de enzimas a lisosomas o el plegamiento correcto de péptidos nacientes, además de que se ha demostrado que el homólogo en *Escherichia coli* puede desempeñar un papel de helicasa. Estructuralmente, la proteína se conforma principalmente de un dominio de unión a péptidos desnaturalizados en el extremo carboxílico—el cual puede ser considerado como el ‘dominio activo’ que realiza las funciones de plegamiento de proteínas cliente (Figura 6)—, un dominio de unión a nucleótidos con función de ATPasa y una corta región desordenada que sirve como puente entre los dos dominios principales y ayuda a la proteína a adquirir diferentes conformaciones en función de la molécula con la cual se encuentre interactuando (Gołas et al., 2012).

En la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, la familia de HSP70 está constituida por 14 genes que codifican para 20 proteínas (Sung et al., 2001), todas las cuales se han visto involucradas en diversas respuestas a estrés, como aumento o disminución en la temperatura, toxicidad por metales pesados o especies reactivas de oxígeno y respuesta inmune contra patógenos.

En maíz no se cuenta con un registro preciso de las proteínas que forman parte de esta familia, pero se han descritos parálogos presentes en citosol (HSP70), retículo endoplásmico (BIP2), mitocondria (mtHSP70) y cloroplastos (ct-HSP70), todos ellos codificados en el genoma nuclear (Bates et al., 1994). Asociadas a complejos de unión a *cap* se han observado tanto HSP70 como BIP2.



Figura 6. Representación esquemática de HSP70. La proteína se compone de un dominio de unión a nucleótidos y de un dominio de unión a péptidos mal plegados. La estructura de bisagra que une ambos dominios sirve como regulador conformacional, alterando la estructura tridimensional de cada dominio cuando el contrario reconoce su ligando (Gołas et al., 2012).

HSP70 tiene una localización primordialmente citoplasmática, aunque se ha reportado que presenta interacciones específicas con proteínas nucleares involucradas con el ciclo celular y el procesamiento de mRNAs (Milarski y Morimoto, 1986), así como interacciones directas con RNAs mensajeros maduros. Esta última interacción es particular con RNAs mensajeros que contienen secuencias específicas ricas en residuos de adenina y uracilo en su extremo 3' (Henics et al., 1999). Estas secuencias (Figura 7), llamadas “elementos ricos en AU” (ARE por sus siglas en inglés), se encuentran presentes en transcritos cuyos productos se han relacionado con la proliferación celular y les confieren mayor susceptibilidad a degradación, mecanismo que sirve de control para mantener una baja traducción de dichos RNAs mensajeros (Gingerich et al., 2004). La interacción de HSP70

con la secuencia ARE aumenta la estabilidad del transcrito, su vida media y por lo tanto su eficiencia traduccional.

En líneas celulares cancerígenas se ha observado consistentemente una sobreexpresión de HSP70 (Nylandsted et al., 2000). La presencia de HSP70 se correlaciona con la sobreproducción de diversos factores procancerígenos y, por consiguiente, con un crecimiento y proliferación celular desmedidos. Actualmente, HSP70 se monitorea en mamíferos como un indicador de prognosis en cáncer, aunque se desconoce la cadena de causalidad de esta correlación (Cho et al., 2012).

I	1814	CCUAAGCAGUAAGCGUAUUUAGGUUAAUGCAGUUU	1848
II	4720	UGUAUUUAUCCACUAUUUUGCAUUUAAAUGAUACAUAAGAUUAAAAAUUUAAAAC	4780
III	928	CUCCCUUCUCCAGUUCUGGAAUUUACAGGCACAAUACA	967
IV	1773	ACCAGGGAUUUUUUAUUUAAUUAUCUUGAACCCACAUUUUAAUAUA	1822
I Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2			
II Estrogen-related receptor gamma			
III Transcriptional factor AUF-like 3			
IV Sp110 nuclear body protein			

Figura 7. Segmentos de secuencias 3'UTR de genes humanos que contienen elementos tipo ARE.

2.4.2 HSP101

La proteína HSP101 es una proteína de choque térmico de 101 kDa análoga a la proteína ClpB de *Escherichia coli*. ClpB es una enzima con papel proteolítico, que en la bacteria auxilia en la degradación de péptidos dañados (Squires y Squires, 1992). Bacterias mutantes carentes de esta enzima presentan problemas de crecimiento en condiciones de

alta temperatura, causados en su mayoría por una acumulación tóxica de proteínas desnaturalizadas. Este fenómeno indica que el papel de ClpB en la resistencia a altas temperaturas es la degradación de péptidos mal plegados. HSP101, nombre que la proteína recibe en eucariontes, sólo se ha encontrado en levaduras y plantas superiores, y en ambos órdenes demostrado *in vivo* la capacidad de la proteína de otorgar termotolerancia aun cuando no se ha observado una clara actividad proteolítica (Young et al., 2001).

HSP101 es una proteína multimérica, la cantidad de monómeros que integran al multímero varía en cada organismos, con 6 o 7 monómeros conformando la enzima en la mayoría de los casos. Cada monómero incluye dos sitios de unión a nucleótidos y uno de unión a proteínas, así como un dominio de oligomerización. Mutaciones en el sitio de oligomerización resultan en individuos con una mayor sensibilidad a choques de calor, mientras que mutaciones en los sitios de unión a nucleótidos no presentan dicha hipersensibilidad.

En plantas, se ha encontrado que HSP101 es un factor de susceptibilidad a la infección por el virus del jaspeado del tabaco (TMV) y algunos virus relacionados (Gallie, 2002). A nivel molecular, se ha encontrado que HSP101 estimula la traducción del genoma de TMV mediante la interacción directa con la secuencia líder del extremo 5', denominada secuencia Ω , y reclutando al factor eIF4G (Gallie, 2002). Al investigar la relevancia fisiológica de esta interacción en la planta, se encontró que en *Pisum sativum* existe al menos un gen (*Fed-1*) con una secuencia en su extremo 5' muy similar a la secuencia Ω y se demostró que existe una relación positiva entre la concentración de HSP101 y la eficiencia de la traducción de mRNAs que contienen el extremo no traducible de *Fed-1* (Ling, Wells, Tanguay, Dickey, Thompson, & Gallie, 2000).

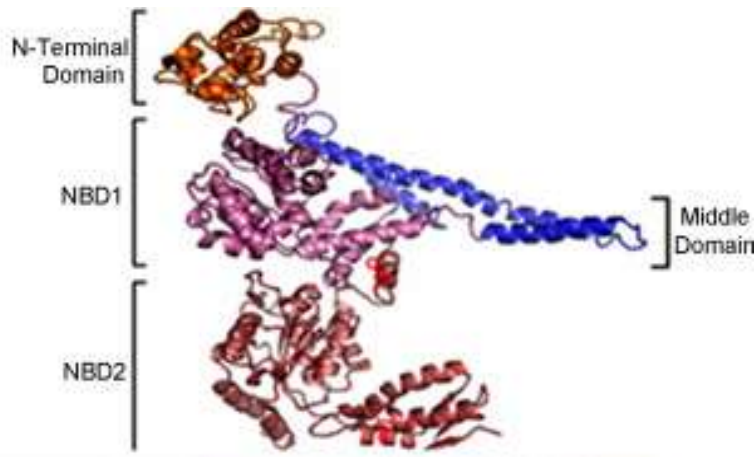


Figura 8. Representación esquemática de HSP101. La proteína se compone de dos dominios de unión a nucleótidos, un dominio intermedio que es fundamental para la oligomerización de la proteína y el dominio del extremo amino que interviene en la desagregación de proteínas, papel que sólo puede realizar cuando adopta su estructura cuaternaria correcta, que en el caso de la mayoría de las plantas es de hexámero (Cagliaria et al., 2011).

El estudio de líneas de plantas de maíz con mutaciones que nulifican la expresión de HSP101 muestra diferencias fenotípicas entre la mutante y una planta silvestre con el mismo fondo genético. Semillas de la planta mutante presentan un crecimiento acelerado en las primeras horas de la germinación, donde la elongación de la raíz y el meristemo es mucho más rápida que en la semilla silvestre (Nieto-Sotelo et al., 1999). El análisis de HSP101 en perfiles traduccionales indica que esta proteína probablemente está involucrada en procesos de traducción activa durante las primeras horas de la germinación, principalmente en el inicio de la traducción. Por otra parte, en la planta mutante de HSP101 hay una acumulación diferencial de proteínas en los embriones maduros de semillas secas con respecto a los embriones silvestres, entre las diferencias más notables se encuentra una mayor acumulación de HSPs de bajo peso molecular y enzimas involucradas en la vía de las citocininas (Lázaro-Mixteco et al., 2012).

Un análisis adicional, mediante el marcaje radiactivo de proteínas sintetizadas *de novo* en las semillas silvestres y mutantes durante la germinación, mostró un conjunto aun mayor de proteínas con expresión diferencial en ausencia de HSP101, las cuales no fue posible identificar con el enfoque adoptado. Este conjunto de proteínas representa a posibles RNAs mensajeros candidatos cuya traducción dependa directamente de HSP101 (Lázaro-Mixteco et al., 2012).

La presencia/ausencia de HSP70 y de HSP101 en complejos de inicio de la traducción puede deberse a su capacidad de reconocer secuencias de RNA específicas, propiedad que las volvería útiles en la selección de RNAs mensajeros específicos dependientes del estado de crecimiento de la planta. Esta idea conlleva a cuestionarse si la interacción de estas proteínas de choque térmico con los complejos de unión a *cap* se presentaría de manera dependiente de la etapa de germinación en que se encuentre la semilla.

3. Planteamiento del problema

Durante la germinación temprana de maíz se ha observado regulación preponderantemente a nivel traduccional. Existen isoformas de las proteínas presentes en los complejos encargados de reconocer el mRNA y comenzar su traducción en ribosomas; además, estas proteínas presentan afinidades diferentes por mRNAs específicos, tanto por interacciones directas como indirectas. Se ha observado que la acumulación de cada isoforma en los complejos de inicio de la traducción presenta comportamientos diferentes al avanzar el proceso de germinación, por lo que se ha propuesto que el cambio en las especies preponderantes que conforman estos complejos puede representar un método de selección de RNAs mensajeros durante la germinación. Las proteínas HSP70 y HSP101 se encuentran presentes en estos complejos de manera transitoria, además de que se ha reportado que ambas son capaces de regular la traducción de mRNAs específicos en otros sistemas.

4. Hipótesis y objetivos

4.1 Hipótesis

La presencia de HSP101 y HSP70 en complejos de unión a *cap* está restringida a un intervalo definido de la germinación del maíz para así contribuir en la selección de mRNAs implicados en el desarrollo temprano de la planta.

4.2 Objetivo general

Determinar si existe un intervalo específico durante la germinación del maíz en el cual HSP70 o HSP101 interaccionan con los complejos de unión a *cap*.

4.3 Objetivos particulares

- Obtener extractos de proteína total de ejes embrionarios de maíz en diferentes periodos de germinación.
- Purificar complejos de unión a *cap* de los diferentes tiempos de germinación.
- Determinar la presencia de HSP101 y HSP70 en los complejos de unión a *cap*.

5. Materiales y métodos

5.1 Material biológico

5.1.1 *Zea mays*

Para todos los experimentos, fueron utilizadas semillas de *Zea mays*, var. Chalqueño, compradas en Chalco el 27 de abril del 2012, excepto donde se indique lo contrario.

5.2 Métodos.

5.2.1 Germinación *ex terra* de *Zea mays*

Las semillas de *Zea mays* se desinfectaron mediante agitación vigorosa en una solución de NaClO 0.2% por 2 minutos. Después de la desinfección, las semillas se lavaron 5 veces en agua destilada con agitación vigorosa para eliminar los residuos del oxidante. Las semillas desinfectadas se colocaron en algodón húmedo y se cubrieron con otra capa de algodón húmedo. Diferentes lotes de semillas en algodón se incubaron a 29 °C durante 3, 6, 12, 18, 24 y 30 horas. Los ejes embrionarios fueron segados con un bisturí, congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -70 °C hasta su uso.

5.2.2 Extracción de proteínas

Los ejes embrionarios, tanto de semillas secas como de semillas incubadas, se congelaron con nitrógeno líquido y se molieron hasta obtener un polvo fino. El polvo obtenido se homogenizó en solución primaria (KCl 100 mM; HEPES 20 mM, pH=7.4; EDTA 0.2 mM; PMSF 0.5 mM; DTT 0.5 mM; glicerol 10% y una tableta inhibidora de proteasas Complete Ultra de Roche por cada 50 mL) adicionada con Triton X-100 1% con un dispersador durante 1 minuto. La dispersión obtenida se centrifugó a 3000 g y 4 °C durante 30 minutos

y se recuperó el sobrenadante. El clarificado obtenido se filtró y almacenó a -70 °C para su posterior uso.

5.2.3 Cuantificación de proteína en extractos totales

La cantidad de proteína presente en los extractos de proteína total fue estimada mediante la técnica de Bradford utilizando el reactivo Bio-Rad Protein Assay y realizando la curva patrón con un estándar primario de albúmina sérica bovina.

5.2.4 Purificación por cromatografía de afinidad de complejos de unión a *cap*

Del extracto de proteínas obtenido se tomó el volumen equivalente a 50 mg de proteína y se incubó con 500 µL de resina 7-Methyl-GTP Sepharose 4B (GE Healthcare™) en agitación durante 90 minutos. Al terminar la incubación, se colocó la mezcla de extracto con resina en una columna de cromatografía de 10 mL y se drenó el volumen excedente. La resina se sometió a un primer lavado con 5 mL de solución primaria. Después se efectuó un segundo lavado con 5 mL de solución primaria adicionada con GTP 0.1 mM. Por último, se eluyeron las proteínas de interés con 2 mL de solución primaria adicionada con 7Me-GTP 0.2 mM. Se colectó el último mililitro de cada lavado y la elución se fraccionó en 5 volúmenes de 400 µL. Todo el proceso se realizó a una temperatura máxima de 4 °C.

5.2.5 Electroforesis desnaturizante de proteínas SDS-PAGE y transferencia a membrana de PVDF

Las alícuotas con proteína total o purificada se analizaron mediante electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% de 1.5 mm de espesor y se transfirieron a membranas de PVDF en una cámara húmeda. El gel separador se preparó con 5.3 mL de TRIS 750 mM pH=8.8 adicionado con SDS 0.2%, 2.7 mL de

Acrilamida:Bisacrilamida 29:1 al 30%, 100 μ L de persulfato de amonio al 20% y 10 μ L de TEMED R.A. El gel concentrador se preparó con 830 μ L de agua purificada, 430 μ L de Acrilamida:Bisacrilamida 29:1 al 30%, 125 μ L de TRIS 250 mM pH=6.8 adicionado con SDS al 0.2 %, 30 μ L de persulfato de amonio al 20% y 3 μ L de TEMED. La cantidad de proteína de extractos totales cargada en el gel fue de aproximadamente 20 μ g por carril. En el caso de lavados y fracciones de proteínas eluidas con 7Me-GTP no se determinó con exactitud la concentración de proteínas debido a su baja concentración. En estos últimos casos se cargaron por igual alícuotas de 50 μ L de todas las fracciones y para todos los estadios de la germinación estudiados. El gel se sometió a un campo eléctrico de 120 V durante aproximadamente 150 minutos en una solución de glicina 200 mM con TRIS 25 mM y SDS 1%.

Las proteínas fueron transferidas de la matriz de poliacrilamida a membranas de PVDF activadas con metanol. La transferencia se realizó en una cámara húmeda con una solución de glicina 400 mM con TRIS 50 mM, metanol 10% y SDS 2%. La membrana en contacto directo con el gel fue sumergida en el medio y sometida a un campo eléctrico de 100 V durante 1 hora o a 35 mA durante toda la noche.

5.2.6 Inmunodetección por *Western Blot*

Las membranas obtenidas se bloquearon en una solución de PBS 1X con leche descremada que contenía una concentración de proteínas de aproximadamente 3 g/ 100 mL durante al menos 1 hora. Después la membrana fue incubada con agitación en una solución de anticuerpo que reconocía HSP70 (1:2000) [anticuerpo comercial distribuido por Agrisera NoCat. AS08 371], HSP101 (1:200) [suero obtenido por el Dr. Jorge Nieto del Jardín

Botánico del Instituto de Biología, UNAM], eIFiso4E (1:1000) [anticuerpo donado por la Dra. Karen Browning de The University of Texas at Austin] o eIFiso4G (1:1000) [anticuerpo donado por la Dra. Karen Browning de The University of Texas at Austin] durante 2 horas a temperatura ambiente o hasta 12 horas en refrigeración. Posteriormente, la membrana fue lavada 2 veces con PBS 1X adicionada con Tween-20 al 0.05% durante 10 minutos. La membrana fue entonces sometida a incubación con un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa (suero anti-IgG de conejo, 1:10000) durante 1 hora y luego se repitió el proceso de lavado. Las membranas se revelaron en placas fotográficas por quimioluminiscencia con el kit *Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate* de Millipore.

6. Resultados

6.1 Identificación de una proteína característica de los complejos de unión a *cap*: el factor proteico eIFiso4G se encuentra presente durante el inicio de la germinación

El primer paso para verificar la correcta purificación de complejos de unión a *cap* durante la germinación fue evaluar la presencia de factores característicos de estos complejos. El factor eIFiso4G forma parte del complejo heterotrimérico eIFiso4F, ya que se asocia con el factor eIFiso4E, que es la proteína que interactúa directamente con la estructura *cap*. El método de purificación mediante cromatografía de afinidad tiene como blanco tanto a moléculas que interactúen directamente con el grupo de 7MeGTP, análogo de *cap*, que se encuentra unido covalentemente a la resina, como a proteínas que interactúen con dichas moléculas. Dependiendo de las condiciones de pH, salinidad y baja presencia de tensoactivos en la cromatografía fue posible recuperar no sólo a la proteína que interactúa con el grupo activo de la resina, sino también moléculas que interactúen con la proteína que se une al residuo de 7MeGTP. El factor eIFiso4G es una de las proteínas que interactúan fuertemente con eIFiso4E, especialmente en presencia de RNA, por lo que copurifica mediante la cromatografía de afinidad usada. La resina utilizada en la purificación de los complejos tiene como residuo ligando una molécula de 7MeGTP, la cual interacciona directamente con las proteínas eIF4E y eIFiso4E. La identificación de las proteínas de anclaje con quienes interaccionan directamente, eIF4G y eIFiso4G, puede servir como un control que asegura la purificación de complejos proteicos unidos al ligando (Figura 9).

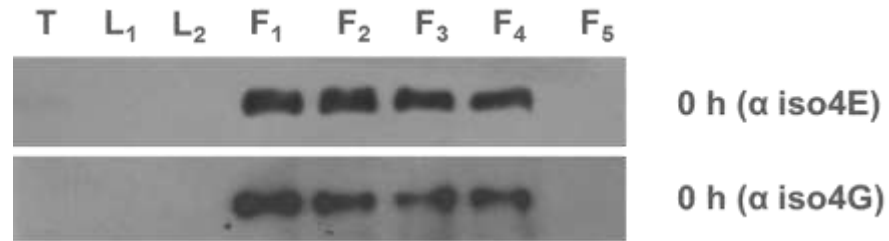


Figura 9. Purificación de proteínas presentes en la semilla seca asociadas a 7MeGTP. Inmunodetección con anticuerpos policlonales mediante Western Blot de factores de inicio de la traducción: T, extracto de proteína total; L1, lavado con solución primaria; L2, lavado con GTP; F1-4 fracciones de la elución obtenida con 7MeGTP. El anticuerpo anti-eIFiso4E se usó en una dilución de 1:2000, mientras el anti-eIFiso4G se usó 1:1000. La membrana se reveló con el kit *Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate* en placas fotográficas. Los extractos de proteína se obtuvieron de semillas secas.

Al realizar la inmunodetección de eIFiso4G (Figura 9), se puede notar que la proteína sólo fue detectable en las fracciones correspondientes a la elución con 7MeGTP. Esto podría significar que la proteína pudiera estar en concentraciones debajo de las detectables en el extracto de proteína total y/o que las condiciones experimentales garantizan que los lavados eliminan interacciones no específicas y en la elución se mantienen íntegros los complejos de unión a *cap*. En *Z. mays* existen dos isoformas de eIFiso4G (Patrick y Browning, 2012), las cuales pueden ser observadas en algunos tiempos de germinación. Sin embargo, es fácil observar que la concentración de la proteína varía durante los diferentes tiempos de germinación, de lo cual ya se tenía precedente (Dinkova y Sánchez de Jiménez, 1999). En la figura 10 se observa que la proteína presenta no sólo diferencias en su concentración relativa, sino que incluso el patrón de elución cambia, pues durante las primera etapas parece liberarse más fácilmente de la resina, y en tiempos más avanzados la proteína eluye en fracciones posteriores. Esto sugiere que la proteína a través de la que interacciona con el residuo de 7MeGTP (eIFiso4E) tiene una afinidad diferente por su sustrato, afinidad que es

dependiente del tiempo de germinación. Una posible explicación a este cambio en la afinidad es la presencia diferencial de moléculas que compitan por el residuo de 7MeGTP durante los diferentes tiempos de germinación, como eIF4E, nCBP o incluso proteínas que reconocen el *cap*, pero no participan en la traducción, como CBP80 (Gingras et al., 1999; Dinkova y Sánchez de Jiménez, 1999). Este cambio en la afinidad apoya la hipótesis de que la composición de los complejos es variable durante la germinación.

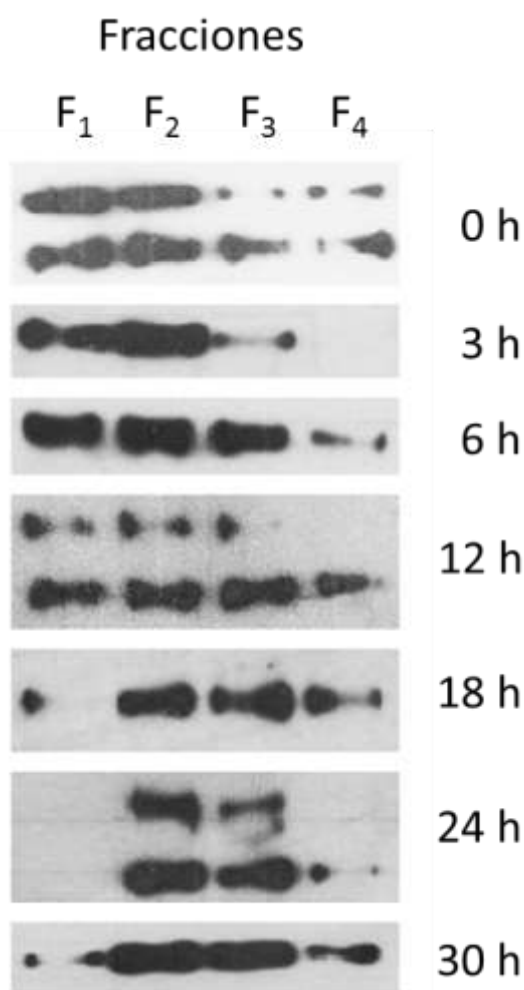


Figura 10. El factor eIFiso4G se encuentra presente a lo largo de la germinación en cantidades variables. Western Blot contra la proteína eIFiso4G. F1-4 indican la fracción de la elución obtenida. Se utilizaron 50 μ L de cada fracción obtenida en la cromatografía para resolver las proteínas mediante SDS-PAGE. Se indica el tiempo en horas después de comenzar la imbibición en que fue tomada cada muestra del que se realizó la purificación de proteínas. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF en una cámara húmeda mediante electrotransferencia. La membrana fue incubada con el anticuerpo anti-eIFiso4G a una concentración de 1:1000 durante 2 horas a temperatura ambiente y posteriormente en suero anti-IgG de conejo, concentración 1:10000 durante 1 hora. Las membranas se revelaron con el kit Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate en placas fotográficas.

La identificación de esta proteína sirve como un punto de control para asegurar que la cromatografía se lleva a cabo exitosamente, pues las proteínas que interactúan directamente con el

grupo 7-metilguanointrifosfato son eIF4E y EIFiso4E, mientras que eIFiso4G interactúa con estas proteínas y no con la resina *per se*. La detección de eIFiso4G permite suponer que en las fracciones eluidas se observan complejos proteicos. En algunos casos se observa la presencia de isoformas de diferente peso molecular y migración diferencial de la proteína.

6.2 Presencia de HSP70 en complejos de unión a *cap* durante la germinación

La proteína de choque térmico HSP70 se identificó previamente por espectrometría de masas en complejos de unión a *cap* en embriones secos (0 h) pero no en embriones germinantes (24 h) (Lázaro-Mixteco y Dinkova, 2012). Utilizando un análisis mediante Western Blot con anticuerpos que reconocen diferentes integrantes de la familia de HSP70 de *A. thaliana* se observó que a las 24 horas la proteína todavía es detectable en complejos de unión a *cap*. La concentración total de la proteína se mantiene constante a nivel celular, sin embargo su presencia en complejos de unión a 7MeGTP cae rápidamente al comenzar la imbibición y mantiene una presencia relativamente constante en los complejos durante las primeras 18 horas, decrece a 24 horas y ya no es detectable en tiempos posteriores como integrante de esos complejos.

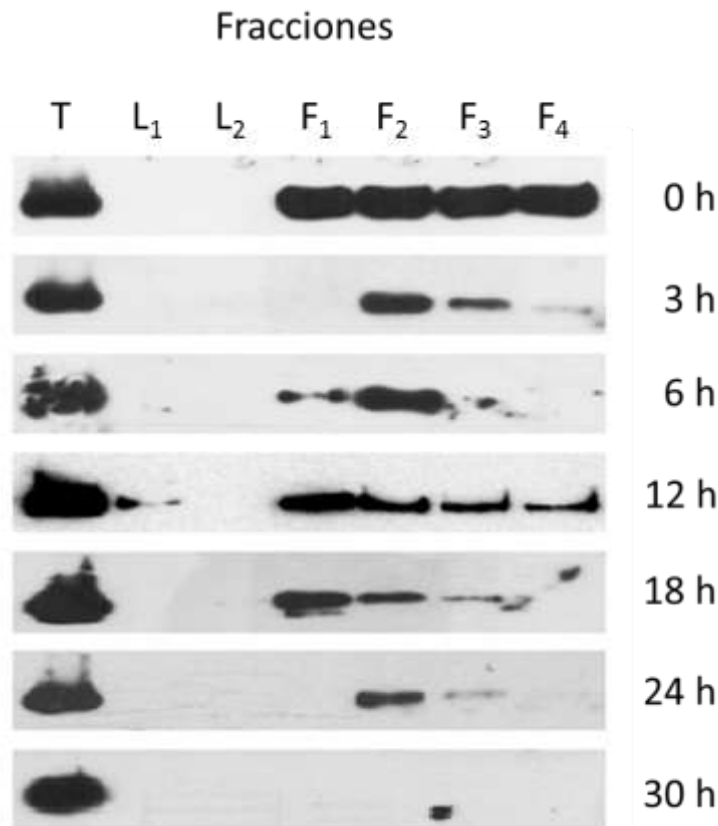


Figura 11. HSP70 tiene interacciones diferenciales con complejos de unión a *cap* en función del tiempo. Western Blot contra la proteína HSP70. T, extracto de proteína total; L1, lavado con solución primaria; L2, lavado con GTP; F1-4 fracciones de la elución obtenida con 7MeGTP. Se utilizaron 20 µg de proteína total, 30 µL de solución de lavado y 50 µL de cada fracción obtenida en la cromatografía para resolver las proteínas mediante SDS-PAGE. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF en una cámara húmeda mediante electrotransferencia. La membrana fue incubada con el anticuerpo anti-HSP70 a una concentración de 1:2000 durante 2 horas a temperatura ambiente y posteriormente en suero anti-IgG de conejo, concentración 1:10000 durante 1 hora. Las membranas se revelaron con el kit Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate en placas fotográficas. Cada experimento se realizó al menos 2 veces, se muestran imágenes de experimentos representativos.

Es importante notar que HSP70 mantiene una distribución en las fracciones cromatográficas similar a eIFiso4G; además, en las fracciones correspondientes a los complejos de unión a *cap*, su concentración es altamente variable: en la semilla seca HSP70 se encuentra muy abundante, mientras que una vez iniciada la germinación, su concentración disminuye drásticamente en dichas fracciones.

6.3 HSP101 se encuentra ausente en complejos de unión a *cap* durante la germinación

La proteína de choque térmico HSP101 fue detectada en fracciones correspondientes a complejos de unión a *cap* durante estudios previos. El presente trabajo utilizó semillas provenientes de la misma región de la que fueron colectadas las utilizadas en dichos estudios, pero en diferente época. Curiosamente, en el análisis de estas semillas la proteína sólo fue identificada en fracciones totales utilizando la misma metodología de purificación. Después de realizar 3 extracciones independientes (y purificaciones consecuentes) de los diferentes tiempos de germinación, no se observó la presencia de HSP101 en las fracciones correspondientes a los complejos de unión a *cap* (Figura 12). El anticuerpo utilizado reconoce el extremo amino de la proteína nativa de maíz, por lo que la señal detectada es muy específica. La proteína de choque térmico 101 tiene un nivel fluctuante durante los distintos tiempos evaluados, lo que puede explicarse por la naturaleza inducible de su expresión, contraria a la expresión constitutiva de HSP70. La figura 12 indica que la proteína no es detectada en fracciones eluidas, lo que sugiere que su asociación a los complejos de unión a *cap* no se presenta como un fenómeno recurrente durante la germinación.

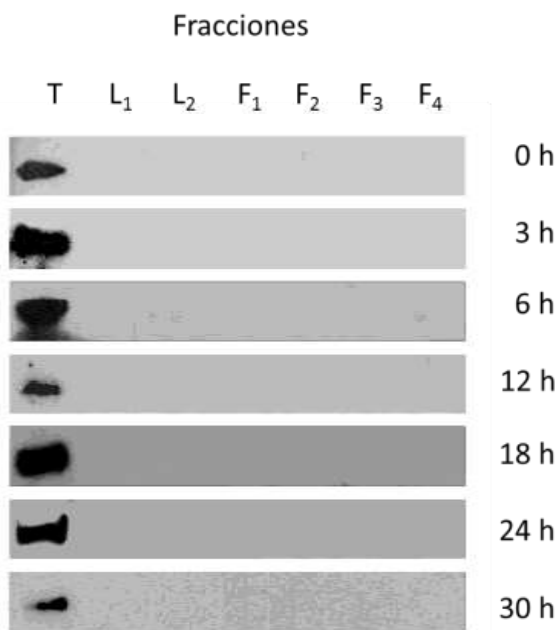


Figura 12. HSP101 no se encuentra interactuando con complejos de unión a *cap*. Western Blot contra la proteína HSP101. T, extracto de proteína total; L1, lavado con solución primaria; L2, lavado con GTP; F1-4 fracciones de la elución obtenida con 7MeGTP. La preparación de las membranas analizadas fue idéntica a la empleada en el análisis de HSP70. La membrana fue incubada con el anticuerpo anti-HSP101 a una concentración de 1:200 durante 2 horas a temperatura ambiente y posteriormente en suero anti-IgG de conejo, concentración 1:10000 durante 1 hora. Las membranas se revelaron con el kit Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate en placas

fotográficas. Cada experimento se realizó al menos 2 veces.

7. Discusión de resultados

En los ensayos de *Western Blot* de este trabajo, se utilizaron únicamente anticuerpos policlonales, lo que significa que en cada solución de anticuerpo existía una amplia variedad de anticuerpos con diferentes afinidades hacia diferentes epítopes de (al menos) una misma proteína, caso que se cumple en los anticuerpos que detectan al factor eIFiso4G. El anticuerpo utilizado para reconocer a la proteína HSP101 incluso fue desarrollado mediante la inmunización con solamente el extremo carboxilo terminal, por lo que la cantidad de epítopes reconocidos se limita a tal dominio. En el caso de los anticuerpos que detectan a HSP70, las inmunoglobulinas fueron obtenidas de conejos inoculados con diferentes parálogos de HSP70, la cual en realidad es una familia de proteínas inmensamente parecidas en secuencia y estructura tridimensional (Wisniewska et al., 2010).

La principal consecuencia de esto es la incertidumbre sobre cuál o cuáles son las isoformas de HSP70 en específico que se encuentran en los complejos de unión a *cap*. Si bien, todas las proteínas de la familia tienen una estructura similar que permite suponer que cualquiera puede llevar a cabo la interacción específica con RNA, el argumento es débil; en principio, la interacción HSP70-ARE fue descrita en animales y no en plantas. El experimento que sirve como antecedente a este trabajo identificó en complejos de unión a *cap* al menos a dos parálogos: HSP70-1 (citósólica, de expresión constitutiva) y BiP2 (isoforma de retículo endoplasmático) (Lázaro-Mixteco y Dinkova, 2012).

En *Sacharomyces cerevisiae*, Kar2p (proteína ortóloga a BiP2) se ha encontrado asociada al sistema señalizador de estrés de retículo (Okamura et al., 2000) mientras que no se ha reportado que interaccione con RNA *in vivo*. Sin embargo, *in vitro* se ha comparado su

capacidad de unirse a RNA con respecto a HSP70 y los resultados son interesantes: mientras mantiene cierta capacidad de unir RNA que contiene secuencias ARE, además es capaz de unir secuencias de RNA no reconocidas por HSP70 (Zimmer et al., 2001). En el trabajo citado, se probó además la capacidad de Hsp70, Hsc70 BiP y DnaK, el ortólogo de bacterias, de unirse a moléculas de RNA que contuvieran la secuencia ARE y se observó que todas las proteínas conservaban la capacidad de reconocer la molécula de RNA, aunque BiP y DnaK en menor medida que Hsp70 y Hsc70. Para demostrar la especificidad de la interacción se realizó un control en el que se evaluaba la interacción con la UTR 3' de α -globina, mensajero que también presenta alta inestabilidad a pesar de no contener motivos ARE y, por el contrario, es rica en citosinas. Si bien este resultado podría apuntar a que BiP pudiera estar involucrada en la selección de RNAs mensajeros específicos con secuencias diferentes, tal hipótesis no es abordada realmente debido al hallazgo de que la interacción ARE-BiP es interrumpida en presencia de secuencias de RNA de poliA.

La hipótesis de trabajo establecía que la presencia de HSP70 en los complejos de unión a *cap* sería durante una ventana temporal definida, lo que podría indicar que su presencia en los complejos de unión a *cap* podría contribuir a la capacidad de estos complejos de llevar a cabo funciones traduccionales específicas distintas.

La interacción de HSP70 con los complejos de unión a *cap* de maíz después de 24 horas de imbibición desaparece; sin embargo, es interesante notar que en ningún momento la presencia de la proteína en estos complejos es tan alta como a las 0 horas. Una posible explicación de esta observación puede ser que en semilla seca HSP70 funcione como chaperona molecular: cuando la semilla es sometida a estrés, el papel principal de HSP70 es auxiliar en el correcto plegamiento de sus proteínas cliente, las cuales pueden ser

integrantes de los complejos de unión a *cap*. Al avanzar la germinación, la célula recupera su estado de hidratación y el papel de HSP70 como chaperona molecular en estos complejos puede ya no ser tan necesario. Si el papel de HSP70 en dichos complejos fuera únicamente para rescatar el plegamiento de las proteínas integrantes del complejo, se esperaría que HSP70 desapareciera relativamente rápido después de la entrada de agua. Sin embargo, la presencia parece fluctuar ligeramente con un máximo entre las 6 y 12 horas, para mostrarse por última vez a las 24 horas en una abundancia claramente inferior.

En experimentos previos, se ha observado que en perfiles polisomales, HSP70 comigra con fracciones traduccionalmente activas (Lázaro-Mixteco et al., 2012). Esto puede representar ya sea un papel regulador en la traducción o un papel auxiliar en el plegamiento del péptido naciente sintetizado en el ribosoma. Si bien ambas posibilidades son factibles, llama la atención que la proteína cambie su presencia en los complejos de unión a *cap* durante la germinación. Dada su abundancia en estos complejos durante el inicio de la germinación y su desaparición después de las 24 horas de imbibición, una atractiva hipótesis que surge es que HSP70 se encuentra estabilizando algunos mRNAs dentro del conjunto de RNAs mensajeros almacenados y así favorecerlos traduccionalmente en estas etapas de desarrollo.

Previamente se ha descrito que tanto HSP70 como HSP101 interactúan libremente en el citoplasma y que su disociación ocurre en presencia de proteínas desnaturalizadas, lo cual ha sido propuesto como una forma de monitoreo del estado de plegamiento del proteoma citoplasmático. Desafortunadamente, se desconocen los detalles de dicha interacción, aunque se sabe que la interacción puede ser interrumpida mediante ATP, lo que sugiere que el sitio de reconocimiento podría ser alguno de los dominios de ATPasa de cualquiera de estas dos proteínas. Lo notable de dicha asociación es que la presencia de ambas proteínas

en los complejos de unión a *cap* puede deberse a que sólo una de ellas interactúe realmente con algún componente de los complejos mientras que la otra podría haberse detectado debido a que coeluye junto a la otra. De ser este el caso, al mejorar el estado energético de la célula y producir suficiente ATP durante la germinación, la interacción se pierde, por lo que ya no serían identificadas juntas en tiempos posteriores.

Por otra parte, no se puede descartar la posibilidad de que tanto HSP70 como HSP101 puedan estar realizando tareas independientes en los complejos estudiados. Cada una podría desempeñar su papel como chaperona, ya que los complejos podrían necesitar no sólo recuperar su plegamiento correcto, sino además de alguna desagregasa que depure su composición. Sin embargo, no debe ser desechada la posibilidad de que la presencia de una se deba únicamente a la presencia de la otra (Schlesinger, 1990).

Las expectativas de este trabajo se encontraban inicialmente puestas con mayor énfasis en la detección de HSP101 dado que mutantes de HSP101 presentaban un claro fenotipo en el desarrollo radicular de la planta durante la germinación (Nieto-Sotelo et al., 2002). Sin embargo, los resultados obtenidos han sido bastante inesperados.

En la metodología experimental, los anticuerpos utilizados para reconocer a HSP101 mostraron una mayor dificultad para la estandarización de la inmunodetección por lo que se realizaron múltiples réplicas de los ensayos de detección. Independientemente de este obstáculo, se logró una observación reproducible de la proteína en extractos totales, pero no fue detectada la señal en las fracciones correspondientes a los complejos de unión a *cap*. Esto resulta contradictorio con lo observado en lotes previos de semillas de maíz chalqueño e incluso en otra línea de maíz.

En *A. thaliana* se ha demostrado que la inducibilidad de HSP101 es de carácter evolucionable (Tonsor et al., 2008), es decir: la capacidad de la planta de producir HSP101 puede ser variable a través de las generaciones y dirigida por factores ambientales. En el estudio citado, diferentes ecotipos de *Arabidopsis* (ecotipos adaptados a distintos medios ambientales, variables en la altitud, temperatura media, humedad y fotoperiodo) presentaron diferentes respuestas en la inducción de HSP101 ante un mismo tratamiento de estrés por aumento de la temperatura. El hallazgo más interesante en dicho estudio fue que aquellos ecotipos más habituados a condiciones cálidas presentaban una menor inducibilidad de HSP101 como respuesta al estrés impuesto. Si bien este resultado puede parecer contradictorio, diversos estudios (Feder, 1999; Bettencourt et al., 2002) muestran que en un organismo expuesto a constante estrés térmico disminuye la capacidad de respuesta clásica de inducción generalizada de HSPs, por ser este un mecanismo de respuesta caro energéticamente y que dichos organismos contienden con el aumento de temperatura de maneras distintas a las que responde un organismo que no está tan habituado a dicho factor abiótico.

En el experimento realizado en esta tesis, se observa que HSP101 sigue produciéndose en la célula, pero es interesante notar que sus interacciones moleculares han cambiado, lo que abre la posibilidad de que algunos de sus roles también sean alterados debido a condiciones abióticas. Además existe la posibilidad de que la interacción de HSP101 con los complejos no sea una interacción directa, sino dependiente de otra proteína que pudiera tener un comportamiento similar al expuesto anteriormente y, en consecuencia, la interacción de HSP101 con dichos complejos no es observada.

8. Conclusiones

- La asociación de HSP70 con complejos de unión a *cap* es diferencial durante la germinación.
- La presencia de HSP101 en complejos de unión a *cap* es variable y posiblemente dependiente de la interacción del genotipo de la planta con el medio ambiente.

9. Perspectivas

Ante la expresión variable de HSP101, es necesario comparara la presencia de HSP101 en semillas de plantas que hayan crecido en diferentes condiciones y que provengan de distintos fondos genéticos para determinar con mayor precisión la naturaleza de la asociación de HSP101 con los complejos de unión a *cap*. La investigación sobre las diferentes causas que generan la asociación de la proteína con diferentes componentes celulares podría generar un conocimiento más profundo de la respuesta celular al ambiente, no sólo ante estreses agudos, sino también a estreses ambientales sostenidos. Este trabajo abre la puerta a la pregunta de si la expresión de HSP101 y su actividad dentro de la célula es resultado de la interacción entre la variabilidad genética con el medio ambiente. Una forma de evaluar esto podría ser mediante el análisis de complejos de unión a *cap* purificados de semillas que se hayan desarrollado en diferentes condiciones ambientales.

Por otro lado, dada la posibilidad de que HSP70 interactúe con secuencias específicas de RNA y tenga un papel como regulador traduccional dependiente de la etapa de desarrollo se propone profundizar en el papel regulador de HSP70 mediante el reclutamiento de mRNAs específicos que se encuentren en traducción activa.

Bibliografía

- Al-Whaibi, M. H. (2011). Plant heat-shock proteins: A mini review. *Journal of King Saud University*, 23, 139-150.
- Bates, E., Vergne, P., & Dumas, C. (1994). Analysis of the cytosolic hsp70 gene family in *Zea mays*. *Plant Molecular Biology*, 25(5), 909-916.
- Bettencourt, B., Kim, I., Hoffmann, A., y Feder, M. (2002). Response To Natural And Laboratory Selection At The *Drosophila* Hsp70 Genes. *Evolution*, 56(9), 1796–1801.
- Bewley, J. (1997). Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell*, 9, 1055-1066.
- Bove, J., Lucas, P., Godin, B., Ogé, L., Jullien, M., y Grappin, P. (2005). Gene expression analysis by cDNA-AFLP highlights a set of new signaling networks and translational control during seed dormancy breaking in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Molecular Biology*, 57(4), 593-612.
- Cagliaria, T., da Silvaa, V., Borgesc, J., Prandoa, A., Tasica, L., y Ramo, C. (2011). Sugarcane Hsp101 is a hexameric chaperone that binds nucleotides. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49(5), 1022–1030.
- Cai, Y., Yu, X., Hu, S., y Yu, J. (2009). A Brief Review on the Mechanisms of miRNA Regulation. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 7(4), 147–154.
- Cheng, S., y Gallie, D. (2007). eIF4G, eIFiso4G, and eIF4B Bind the Poly(A)-binding Protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(35), 25247–25258.
- Cho, H.-S., Shimazu, T., Toyokawa, G., Daigo, Y., Maehara, Y., Hayami, S., y otros. (2012). Enhanced HSP70 lysine methylation promotes proliferation of cancer cells through activation of Aurora kinase B. *Nature Communications*, 3(1072), 1-10.
- Dever, T. E. (2002). Gene-Specific Regulation by General Translation Factors. *Cell*, 108, 545–556.
- Dinkova, T. D., y Sánchez de Jiménez, E. (1999). Differential expression and regulation of translation initiation factors -4E and -iso4E during maize germination. *Physiologia Plantarum*, 107(4), 419-425.
- Dinkova, T., Márquez-Velázquez, N., Aguilar, R., Lázaro-Mixteco, P., y Sánchez de Jiménez, E. (2011). Tight translational control by the initiation factors eIF4E and eIF(iso)4E is required for maize seed germination. *Seed Science Research*, 21(2), 85-93.
- Ehrnsperger, M., Gaestel, M., y Buchner, J. (2000). Analysis of Chaperone Properties of Small Hsp. En J. Walker, y S. Keyse, *Stress Response* (Vol. 99, págs. 421-429). Humana Press.

- Emelyanov, V. (2002). Phylogenetic relationships of organellar Hsp90 homologs reveal fundamental differences to organellar Hsp70 and Hsp60 evolution. *Gene*, 299(1-2), 125-133 .
- Feder, M., y Hofman, G. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and Ecological Physiology. *Annual Review of Physiology*, 61, 243-282.
- Gallie, D. R. (2002). The 5'-leader of tobacco mosaic virus promotes translation through enhanced recruitment of eIF4F. *Nucleic Acid Research*, 30(15), 3401-3411.
- Gallie, D., Fortner, D., Peng, J., y Puthoff, D. (2002). ATP-dependent Hexameric Assembly of the Heat Shock Protein Hsp101 Involves Multiple Interaction Domains and a Functional C-proximal Nucleotide-binding Domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(42), 39617–39626.
- Gingerich, T. J., Feige, J.-J., y LaMarre, J. (2004). AU-rich elements and the control of gene expression through regulated mRNA stability. *Animal Health Research Reviews*, 5(1), 49-63.
- Gingras, AC., Raught, B., y Sonenberg, N. (1999). eIF4 INITIATION FACTORS: EFFECTORS OF mRNA RECRUITMENT TO RIBOSOMES AND REGULATORS OF TRANSLATION. En *Annual Reviews of Biochemistry* (Vol. 68, págs. 913–963).
- Gołas, E., Maisuradze, G. G., Senet, P., Ołdziej, S., Czaplewski, C., Scheraga, H. A., y otros. (2012). Simulation of the Opening and Closing of Hsp70 Chaperones by Coarse-Grained Molecular Dynamics. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 1750–1764.
- Gray, N., y Wickens, M. (1998). Control of translation initiation in animals. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 14, 399-458.
- Henics, T., Nagy, E., Ju Oh, H., Csermely, P., von Gabain, A., y Subject, J. R. (1999). Mammalian Hsp70 and Hsp110 Proteins Bind to RNA Motifs Involved in mRNA Stability. *Journal of Biological Chemistry*, 274(24), 17318–17324.
- Holcik, M., y Sonenberg, N. (2005). Translational control in stress and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6, 318-327.
- Kaufman, R. (1999). Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes & Development*, 13, 1211-1233.
- Klausner, R., y Harford, J. (1989). cis-trans models for post-transcriptional gene regulation. *Science*, 246(4932), 870-872.
- Kozak, M. (2005). Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*, 361, 13-37.

- Kuersten, S., y Goodwin, E. (2003). The power of the 3' UTR: translational control and development. *Nature Reviews Genetics*, 4, 626-637.
- Lázaro-Mixteco, P. E., y Dinkova, T. D. (2012). Identification of Proteins from Cap-Binding Complexes by Mass Spectrometry During Maize (*Zea mays* L.) Germination. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 56(1), 36-50.
- Lázaro-Mixteco, P. E., Nieto-Sotelo, J., Swatek, K. N., Houston, N. L., Mendoza-Hernández, G., Thelen, J. J., y otros. (2012). The Absence of Heat Shock Protein HSP101 Affects the Proteome of Mature and Germinating Maize Embryos. *Journal of Proteome Research*, 11, 3246–3258.
- Ling, J., Wells, D., Tanguay, R., Dickey, L., Thompson, W., y Gallie, D. (2000). Heat Shock Protein HSP101 Binds to the Fed-1 Internal Light Regulatory Element and Mediates Its High Translational Activity. *The Plant Cell*, 12, 1213–1227.
- Maniatis, T., Goodbourn, S., y Fischer, J. (1987). Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science*, 236(4806), 1237-1245.
- Martínez-Silva, A., Aguirre-Martínez, C., Flores-Tinoco, C., Alejandri-Ramírez, N., y Dinkova, T. (2012). Translation Initiation Factor AtelF(iso)4E Is Involved in Selective mRNA Translation in *Arabidopsis thaliana* Seedlings. *PLoS ONE*.
- Milarski, K. L., y Morimoto, R. I. (1986). Expression of human HSP70 during the synthetic phase of the cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83, 9517-9521.
- Nieto-Sotelo, J., Kannan, K. B., Martínez, L. M., y Segal, 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., Martínez, L., Ponce, G., Cassab, G., Alagón, A., Meeley, R., y otros. (2002). Maize HSP101 Plays Important Roles in Both Induced and Basal Thermotolerance and Primary Root Growth. *The Plant Cell*, 14, 1621–1633.
- Nogueira, F., Madi, S., Chitwood, D., Juarez, M., y Timmermans, M. (2007). Two small regulatory RNAs establish opposing fates of a developmental axis. *Genes y Development*, 21, 750-755.
- Nylandsted, J., Brand, K., y Jäättelä, M. (2000). Heat Shock Protein 70 Is Required for the Survival of Cancer Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 926, 122–125.
- Okamura, K., Kimata, Y., Higashio, H., Tsuru, A., y Kohno, K. (2000). Dissociation of Kar2p/BiP from an ER Sensory Molecule, Ire1p, Triggers the Unfolded Protein Response in Yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 279(2), 445-450.
- Patrick, R. M., y Browning, K. S. (2012). The eIF4F and eIFiso4F Complexes of Plants: An Evolutionary Perspective. *Comparative and Functional Genomics*, 2012:287814.

- Ron, D. (2002). Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *Journal of Clinical Investigation*, 10(110), 1383–1388.
- Sasaki, J., y Nakashima, N. (2000). Methionine-independent initiation of translation in the capsid protein of an insect RNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(4), 1512-1515.
- Scheuner, D., Song, B., McEwen, E., Liu, C., Laybutt, R., Gillespie, P., y otros. (2001). Translational Control Is Required for the Unfolded Protein Response and In Vivo Glucose Homeostasis. *Molecular Cell*, 7(6), 1165–1176.
- Schlesinger, M. (1990). Heat Shock Proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(21), 12111-12114.
- Silver, J., y Noble, E. (2012). Regulation of survival gene hsp70. *Cell Stress and Chaperones*, 17, 1-9.
- Spahn, C., Kieft, J., Grassucci, R., Penczek, P., Zhou, K., Doudna, J., y otros. (2001). Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit. *Science*, 291(5510), 1959-1962.
- Squires, C., y Squires, C. (1992). The Clp Proteins: Proteolysis Regulators or Molecular Chaperones? *Journal of Bacteriology*, 174(4), 1081-1085.
- Sung, D. Y., Vierling, E., y Guy, C. L. (June de 2001). Comprehensive Expression Profile Analysis of the Arabidopsis Hsp70 Gene Family1. *Plant Physiology*, 126, 789–800.
- Tonsor, S., Scott, C., Boumaza, I., Liss, T., Brodsky, J., y Vierling, E. (2008). Heat shock protein 101 effects in *A. thaliana*: genetic variation, fitness and pleiotropy in controlled temperature conditions. *Molecular Ecology*, 17, 1614–1626.
- Vagner, S., Galy, B., y Pyronnet, S. (2001). Irresistible IRES. *EMBO reports*, 2(10), 893-898.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., y Altman, A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*, 9(5), 244–252.
- Wegele, H., Müller, L., y Buchner, J. (2004). Hsp70 and Hsp90—a relay team for protein folding. En *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (Vol. 151, págs. 1-44). Springer Berlin Heidelberg.
- Wisniewska, M., Karlberg, T., Lehtio, L., Johansson, I., Kotenyova, T., Moche, M., y otros. (2010). Crystal Structures of the ATPase Domains of Four Human Hsp70 Isoforms: HSPA1L/Hsp70-hom, HSPA2/Hsp70-2, HSPA6/Hsp70B', and HSPA5/BiP/GRP78. *PLoS ONE*, 5(1), e8625.
- Young, J., Hoogenraad, N., y Hartl, F. (2003). Molecular Chaperones Hsp90 and Hsp70 Deliver Preproteins to the Mitochondrial Import Receptor Tom70. *Cell*, 112(1), 41–50.

- Young, T. E., Ling, J., Geisler-Lee, J., Tanguay, R. L., Caldwell, C., y Gallie, D. R. (2001). Developmental and Thermal Regulation of the Maize Heat Shock Protein, HSP101. *Plant Physiology*, 127, 777–791.
- Zhang, C., y Guy, C. L. (2005). Co-immunoprecipitation of Hsp101 with cytosolic Hsc70. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43, 13-18.
- Zimmer, C., von Gabain, A., y Henics, T. (2001). Analysis of sequence-specific binding of RNA to Hsp70 and its various homologs indicates the involvement of N- and C-terminal interactions. *RNA*, 7, 1628–1637.