



UNAM
POSGRADO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

IDENTIFICACIÓN DE LA REGIÓN
FUNCIONAL DEL IRES (*Internal Ribosome
Entry Site*) DEL RNAm DE LA PROTEÍNA
HSP101 DE MAÍZ

T E S I S:

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A:

BIOL. JIMÉNEZ GONZÁLEZ AUGUSTO SAMUEL

Tutor: Dra. Estela Sánchez de Jiménez

Comité Tutorial:

Dra. Blanca Hayde Ruiz Ordaz

Dr. Jorge Nieto Sotelo

MÉXICO, D. F. ENERO 2009





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.

ÍNDICE

DEDICATORIAS-----	III
AGRADECIMIENTOS-----	IV
ABREVIATURAS-----	VII
RESUMEN-----	VIII
1 INTRODUCCIÓN-----	1
1.1 ASPECTOS GENERALES DE LA SÍNTESIS DE LAS PROTEÍNAS-----	1
1.2 UN MECANISMO ALTERNO PARA LA SÍNTESIS DE LAS PROTEÍNAS----	6
1.3 REQUERIMIENTOS DE LOS FACTORES DE INICIO DE LA TRADUCCIÓN EN DIFERENTES IRES-----	10
1.4 IDENTIFICACIÓN DE LAS REGIONES IRES EN LA INICIACIÓN DE LA SÍNTESIS DE LAS PROTEÍNAS-----	12
2 JUSTIFICACIÓN-----	15
3 HIPÓTESIS-----	16
4 OBJETIVOS-----	17
4.1 OBJETIVO GENERAL-----	17
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS-----	17
5 DISEÑO EXPERIMENTAL-----	18
5.1 MATERIAL Y MÉTODOS-----	18
5.1.1 ELECCIÓN DE LA REGIÓN IRES-----	18
5.1.2 AMPLIFICACIÓN DE LAS REGIONES SELECCIONADAS-----	19
5.1.3 EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO POR MINIPREP-----	20
5.1.4 CONSTRUCCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES EN EL VECTOR BI-CISTRÓNICO pBIC-----	21
5.1.5 PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS COMPETENTES-----	22
5.1.6 TRANSFORMACIÓN BACTERIANA-----	23
5.1.7 PURIFICACION DE DNA PLASMIDICO POR MELTON PREP (MAXIPREP)-----	23

5.1.8 LINEARIZACION DEL PLASMIDO CON INSERTO-----	24
5.1.9 SINTESIS DE TRANSCRITOS SIN CAP-----	25
5.1.10 REACCIÓN DE TRADUCCIÓN <i>IN VITRO</i> -----	26
5.1.11 CUANTIFICACIÓN DE LA MARCA INCORPORADA A LAS PROTEÍNAS-----	26
5.1.12 ENTRECruzAMIENTO DEL RNA Y LOS FACTORES DE INICIO DE LA TRADUCCIÓN (<i>UV-CROSSLINKING</i>)-----	27
5.1.13 DETECCIÓN POR <i>WESTERN BLOT</i> DE LOS FACTORES DE INICIO DE LA TRADUCCIÓN QUE SE UNEN AL IRES <i>Hsp101</i> DEL MAIZ-----	28
5.1.14 LAVADO DE LA MEMBRANA PARA ELIMINAR A LOS ANTICUERPOS-----	29
6 RESULTADOS-----	30
6.1 ELECCIÓN DE LAS REGIONES IRES-----	30
6.2 PCR DE LAS REGIONES ESPECÍFICAS DEL 5'UTR <i>Hsp101</i> -----	35
6.3 CLONACIÓN EN pGEM-T <i>EASY</i> -----	36
6.4 PCR DE LAS TRANSFORMANTES DE pGEM + FRAGMENTOS DE IRES-----	37
6.5 CLONACIÓN EN pBIC-----	39
6.6 TRANSCRIPCIÓN <i>IN VITRO</i> -----	42
6.7 TRADUCCIÓN <i>IN VITRO</i> -----	42
6.8 ENTRECruzAMIENTO RNA-PROTEINA (<i>UV CROSSLINKING</i>) Y <i>WESTERN BLOT</i> -----	45
7 DISCUSIÓN-----	48
8 CONCLUSIONES-----	54
9 PERSPECTIVAS-----	55
10 BIBLIOGRAFÍA-----	56
11 ANEXO-----	62

DEDICATORIAS

A SAMUEL Y TERESA, las personas más importantes de mi vida, las cuales me han enseñado con su ejemplo y su dedicación a mejorar día con día para ser una mejor persona.

A NOÉ, porque aunque no seamos muy unidos, podemos confiar mutuamente el uno del otro, estando unidos en los buenos y malos momentos.

A WENDY, por las bromas, los enojos, los disgustos y los buenos momentos que pasamos, por ser parte de mi familia.

A ALEXIS, JENIFER Y DAVID, los pequeñitos de la casa, porque con ustedes discuto, nos reímos, nos ensuciamos, me peleo, nos queremos y pasamos grandes momentos juntos.

A DIOS, que cada día me llena de pruebas y de bendiciones, de retos y de felicidades, porque se que en cualquier prueba que tenga el esta conmigo y me guía por un buen camino.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 103 del conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Estela Sánchez de Jiménez.

Quisiera agradecer a la Dra. Estela Sánchez de Jiménez, por su excelente asesoría y su calidad humana durante la realización de este trabajo, porque gracias a ella se ha enriquecido mi vida profesional y personal, y la culminación de esta tesis es resultado del apoyo que me ha dedicado no solo como estudiante, también como persona.

Al comité tutorial, por la guía, su paciencia, las correcciones y comentarios que enriquecieron el trabajo durante su elaboración, el cual estuvo formado por:

Dr. Jorge Nieto-Sotelo	Instituto de Biotecnología, UNAM
Dra. Blanca Hayde Ruiz Ordaz	Instituto de investigaciones biomédicas, UNAM

A los revisores de tesis, por la paciencia que me dedicaron, sus observaciones y correcciones que enriquecieron el escrito.

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova,	Facultad de química, UNAM
Dr. Jorge Nieto Sotelo.	Instituto de Biotecnología, UNAM
Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Instituto Nacional de Nutrición
Dr. José Luís Reyes Taboada	Instituto de Biotecnología, UNAM
Dr. León Patricio Martínez Castilla	Facultad de química, UNAM

A CESY por el apoyo, sus consejos y la asesoría que me brindó para poder desarrollar este trabajo.

A PAULO, MARCE Y AMBAR, porque a pesar de la distancia y los compromisos, siempre han estado ahí para apoyarme, en especial en momentos desagradables de mi vida y se que siempre podré contar con su presencia y su amistad. LOS AMO.

A MARISOL, por las loqueras que hacemos juntos y mas que mi prima eres una súper amiga, gracias por el aprecio que me tienes.

A ANTONIO, ALEX Y GABRIEL, por ser mis grandes amigos y apoyarme en todo momento, saben que los aprecio mucho y siempre pueden contar conmigo.

A NORMA, por los ratos tan agradables que pasamos en el laboratorio, por escucharme en esos malos momentos, por tus consejos, y simplemente por ser mi amiga.

A ERIKA, por los buenos momentos en el laboratorio, por las erikadas tan graciosas que cometes, por escucharme en los malos momentos y por ser mi amiga.

A REBE, por nuestras pláticas, los momentos agradables, tus galletas, por ser una amiga inigualable.

A los compañeros de química: RAUL, SARA, VERO, CESAR DAVID, EDER, VALERIA, SUSANA, PEDRO, CARLOS, EDSON, CESAR, JULISSA, NAHOLI, MARTIN, ALEX, ERNESTO, LAURA, ADRIANA Y ALAN por todos los momentos que hemos pasado juntos durante estos años, ya que no solo son el mejor grupo de trabajo, también son el mejor grupo de amigos.

**SE AGRADECEN LOS APOYOS RECIBIDOS PARA LA REALIZACIÓN DE
ESTE TRABAJO A DGAPA, UNAM CON EL PROYECTO IN206207 Y A
CONACYT POR LA BECA OTORGADA DURANTE MI PERIODO DE
MAESTRÍA.**

ABREVIATURAS

ATP	Adenosín tri-fosfato
ADP	Adenosín di-fosfato
<i>cap</i>	Estructura m ⁷ G(5')pppN en el extremo 5' de los ARNm
CrPV	Virus de la parálisis del grillo
eIFs	Factores de inicio de la traducción eucarióticos
EMCV	Virus de la encefalomiocarditis
FMDV	Virus de la fiebre aftosa
GDP	Guanosín di-fosfato
GTP	Guanosín tri-fosfato
HCV	Virus de la hepatitis C
hnRNP	Ribonucleoproteína heteróloga nuclear
HSP101	Proteína de choque de calor de 101 kDa
IRES	Sitio interno para que entre el ribosoma
ITAFs	Factores IRES que actúan en <i>trans</i>
KDa	kilo Daltones
m ⁷ G(5')pppN	7-metil guanosín tri-fosfato
nts	nucleótidos
PTB	Proteína que se une a la cola de polipirimidinas.
PABP	Proteína que se une a la cola de poli-A
RRL	Lisado de reticulocitos de conejo
WGE	Extracto de gérmen de trigo
3'UTR	Región 3' no traducible
5'UTR	Región 5' no traducible

RESUMEN

La síntesis de las proteínas es un proceso complejo que requiere de numerosos factores de inicio de la traducción para reclutar al ribosoma a la región 5' no traducible (5'UTR) del RNAm. Entre ellos se encuentra el eIF4E, que se une a la estructura *cap*, localizada en el extremo 5' del RNAm, para poder reclutar a los demás eIFs y llevar a cabo la síntesis de las proteínas. Este proceso se denomina traducción dependiente de *cap*. En diferentes condiciones de estrés como infecciones virales, falta de alimento, agua o durante el estrés de calor, la traducción dependiente de *cap* es inhibida. Sin embargo, la célula necesita producir distintas proteínas que aseguren su supervivencia hasta que las condiciones cambien. En la mayoría de estos casos la síntesis de las proteínas se inicia por medio de un sitio distal o en el interior del RNAm que permite que el ribosoma "entre" o se asocie (IRES). El IRES es una secuencia de nucleótidos que forma una estructura secundaria, la cual recluta la maquinaria traduccional realizándose una traducción de manera independiente de *cap*. En este trabajo se estudió la región 5'UTR del RNAm *Hsp101* de maíz que posee un IRES. Se realizaron las siguientes construcciones pBIC-5 (control), pBIC-*Hsp101*+1 (construcción que parte del sitio +1 de transcripción), pBIC-*hsp*Δ17 (construcción a la que se cortaron 17 nucleótidos a partir del sitio +1 de transcripción) y pBIC-*hsp*Δ50 (construcción a la que se le cortaron 50 nucleótidos a partir del sitio +1 de transcripción). La construcción pBIC-*Hsp101*+1 mostró la mayor eficiencia de traducción, siendo al menos 3 veces mayor a la del control pBIC-5, lo que indica que el 5'UTR nativo del ARNm de *Hsp101* es afectado por secuencias ajenas y adicionales, como las que se encuentran en pBIC-5. También se observó que la secuencia de nucleótidos de toda la región 5'UTR es necesaria para impartir funcionalidad al IRES ya que al deletar 17 o 50 nts del extremo 5' la traducción fue 73 % y 78.5 % menor que la del control pBIC-5. Estudios preliminares nos permiten especular que eIF4A1, y posiblemente el eIF4G, son los factores que interaccionan en un sistema dependiente e independiente de *cap*. Sin embargo, se requiere realizar la interacción del IRES *hsp101* con un extracto proteico en condiciones independientes de *cap* para demostrar que factores de inicio de la traducción se unen al IRES bajo estas condiciones.

1 INTRODUCCION

1.1 ASPECTOS GENERALES DE LA SÍNTESIS DE LAS PROTEÍNAS

La regulación de la traducción y la frecuencia con la que los ARN mensajeros son traducidos, juegan un papel crítico en muchos procesos biológicos fundamentales, incluyendo el crecimiento celular, el desarrollo y la respuesta a las señales biológicas o estreses ambientales. Es así que dos transcritos que estén presentes en el citoplasma en idénticas cantidades, pueden ser traducidos con diferentes eficiencias produciendo cantidades diferentes de proteína (Mathews *et al.* 2000). Este fenómeno es debido, en parte, a que el ribosoma no se une al RNAm directamente. El inicio de la síntesis de las proteínas en organismos eucariontes es un proceso complejo, debido a la acción concertada de numerosas proteínas accesorias llamadas factores de inicio de la traducción eucarionte (eIFs) los cuales están involucrados en una serie de eventos reguladores que permiten el reclutamiento de la subunidad ribosomal 40S al RNAm (Hershey y Merrick 2000). Este paso de reclutamiento solamente se refiere a la fase de iniciación y puede ser definido como el proceso en que un iniciador especial de tRNA, tRNA-metionina, se une al sitio P del ribosoma, localizado en el codón de inicio correcto (Hershey y Merrick 2000).

En los organismos eucariontes el inicio de la traducción depende de dos eventos importantes. En el primero, se requiere de la estructura m7G(5')pppN (donde N puede ser cualquier nucleótido), ésta es una modificación nuclear presente en el extremo terminal 5' de los RNAm, mejor conocida como la estructura *cap*. Esta estructura *cap* sirve para realizar varias funciones importantes, entre ellas intervenir durante el "*splicing*", el transporte y la estabilización del RNAm, así como facilitar la unión de la subunidad ribosomal 40S al RNAm. La estructura *cap* es reconocida por el complejo de iniciación eIF4F (Fig. 1), el cual se encuentra compuesto por 3 factores de iniciación eIF4A, eIF4G y eIF4E (Dever, 1998; Gingras *et al.* 1999; Hershey y Merrick 2000; Komar y Hatzoglou 2005, Raught *et al.* 2000).

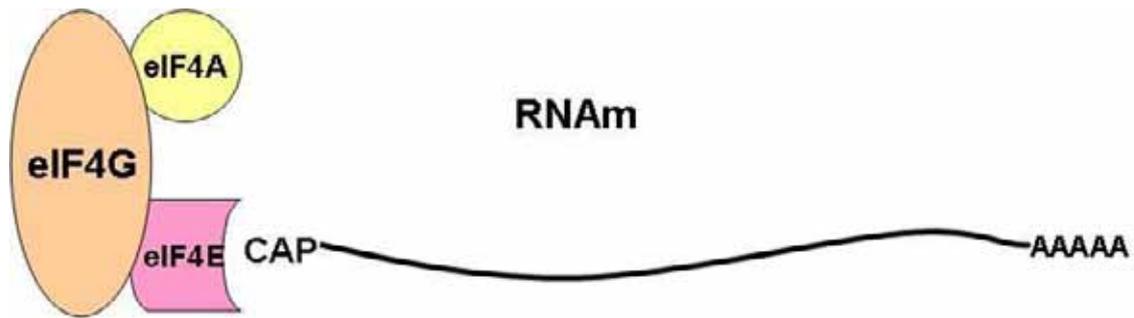


Figura 1: La unión del factor del inicio de la traducción eIF4E a la estructura *cap* del extremo 5'UTR del RNAm. El eIF4E se encuentra formando el complejo eIF4F junto con eIF4G y eIF4A.

De las proteínas que forman el complejo eIF4F, eIF4E es la proteína que se une a *cap*, por lo que es necesaria para el inicio de la traducción dependiente de *cap*. El eIF4A tiene las funciones de ATPasa y de RNA helicasa dependiente de ATP. Gracias a esta última se deshacen las estructuras secundarias de la región 5' UTR del RNAm, facilitando el barrido ribosomal. La actividad de esta helicasa aumenta fuertemente por la asociación de los factores eIF4B y eIF1A ya que estos realizan la hidrólisis del ATP a ADP proporcionando energía a la helicasa eIF4A.

Adicionalmente, se requiere del segundo evento importante que es la formación del complejo de preiniciación (Fig. 2), a través de la acción concertada del eIF2, el cual se une a el ARNt-met y al eIF3, que interactúa con la subunidad ribosomal 40S formando el complejo 43S (Dever, 1998; Gingras *et al.* 1999; Hershey y Merrick 2000; Raught *et al.* 2000).

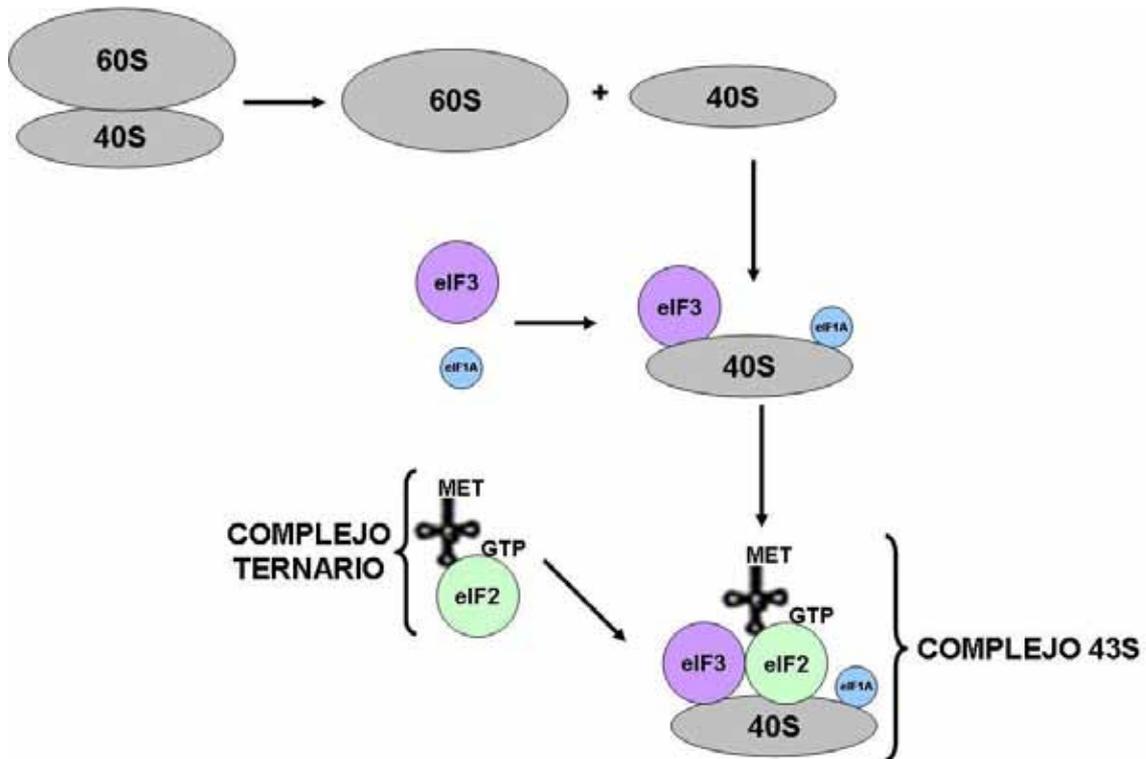


Figura 2: La formación del complejo 43S. Primero se separan las subunidades robosomales 60S y 40S. Posteriormente a la subunidad 40S se le unen eIF3, eIF1A y eIF2-tRNA-met-GTP (complejo ternario).

En los mamíferos, el eIF3 es un complejo multiprotéico formado por 13 subunidades diferentes que posee varias funciones entre las que se encuentran: unir a la subunidad ribosomal pequeña, apoyar a que el RNAm se una al ribosoma e impedir que las subunidades ribosomales 40S y 60S se asocien en ausencia del complejo ternario eIF2-GTP-RNAt-met (Hershey y Merrick 2000; Hinnebusch 2000; Hinnebusch 2006; LeFebvre *et al.* 2006; Masutani *et al.* 2007). El eIF4G es una proteína de gran tamaño, la cual le permite funcionar como proteína de andamio, a la cual se le unen varios factores como eIF3 (Fig. 3), eIF4E, eIF4A y la PABP (proteína que se une al poli-(A) del extremo 3' del RNAm) (Gingras *et al.* 1999; LeFebvre *et al.* 2006; Masutani *et al.* 2007; Von der Haar *et al.* 2004).

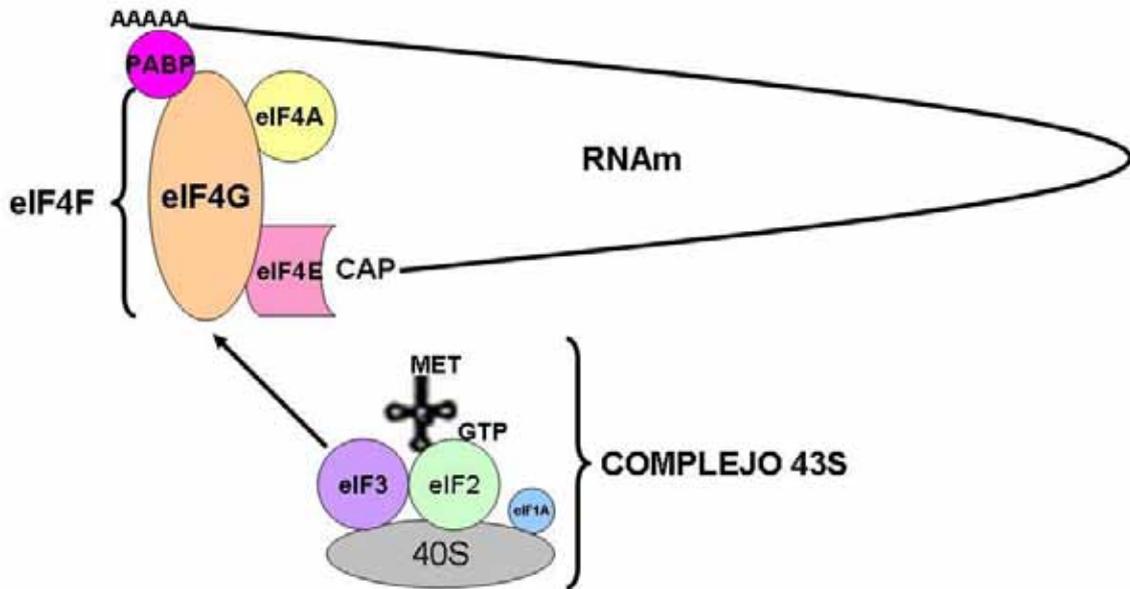


Figura 3: La formación del complejo 48S. El complejo 43S se une al complejo formado por eIF4F unido a el RNAm. La interacción se realiza por medio del eIF4G y el eIF3.

La mayoría de los RNAm eucariontes, con la notable excepción de los RNAm de las histonas, poseen una cola poli-adenilada en el extremo 3', la cual tiene tamaños que van de los de 50 a los 300 nts de largo. Esta poli-adenilación de los RNAm se realiza post-transcripcionalmente en el núcleo y después en el citoplasma (Imataka *et al.* 1998). A esta cola de poli-(A) se le unen múltiples PABPs, las cuales interaccionan con el eIF4G, provocando la circularización de los mensajes. El puente formado por el eIF4G y las PABPs une indirectamente a las regiones 5' y 3' del RNAm. De esta manera se explica el modelo de la circularización del ARNm y cómo se aumenta la eficiencia de la traducción mediante el reciclamiento de los ribosomas. (Kahvejian *et al.* 2001)

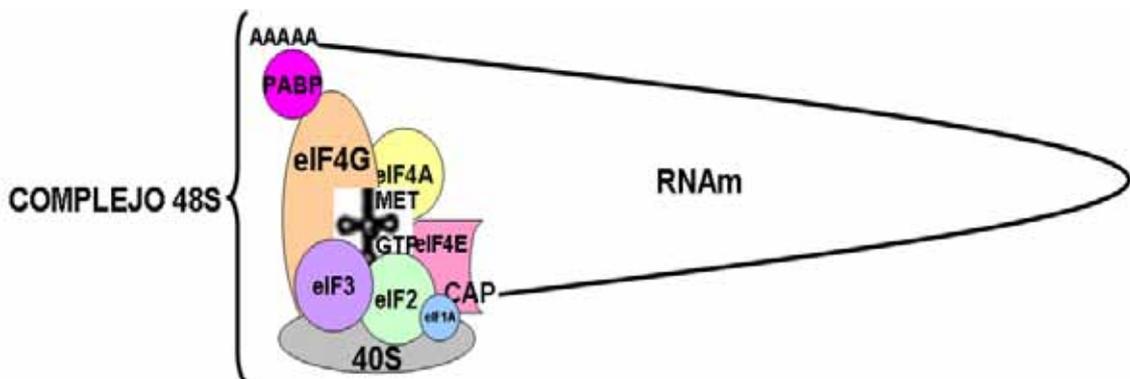


Figura 4: La formación del complejo 48S permite que el RNAm activado pueda ser barrido por el complejo ribosomal 48S.

La unión de la proteína eIF4E a la eIF4G es regulada en células eucariontes por una familia de proteínas, denominada 4E-BPs (4E *binding proteins*) que se unen al eIF4E cuando están desfosforiladas (Gingras *et al.* 1999; Hershey y Merrick 2000; Richter y Sonenberg 2005). Es interesante mencionar que no se han identificado 4E-BPs en plantas, aunque probablemente existan proteínas que realicen funciones similares.

El complejo ribosomal 48S, que se encuentra formado por 43S y por eIF4F (Fig. 4), es el encargado de reconocer el codón de inicio (AUG) ayudado por el anticodon del ARNt-met. Este complejo ribosomal activado 48S contiene el RNAm (Fig. 4) e inicia el escaneo del RNAm en la dirección 5' a 3' hasta localizar el codón de inicio por medio de los factores eIF1 y eIF1A. De ésta manera es posible colocar el primer tRNA-met en el marco abierto de lectura (ORF) (Fig. 5). El barrido ribosomal es un proceso que consume energía puesto que hidroliza al ATP a ADP (Pestova *et al.* 2000).

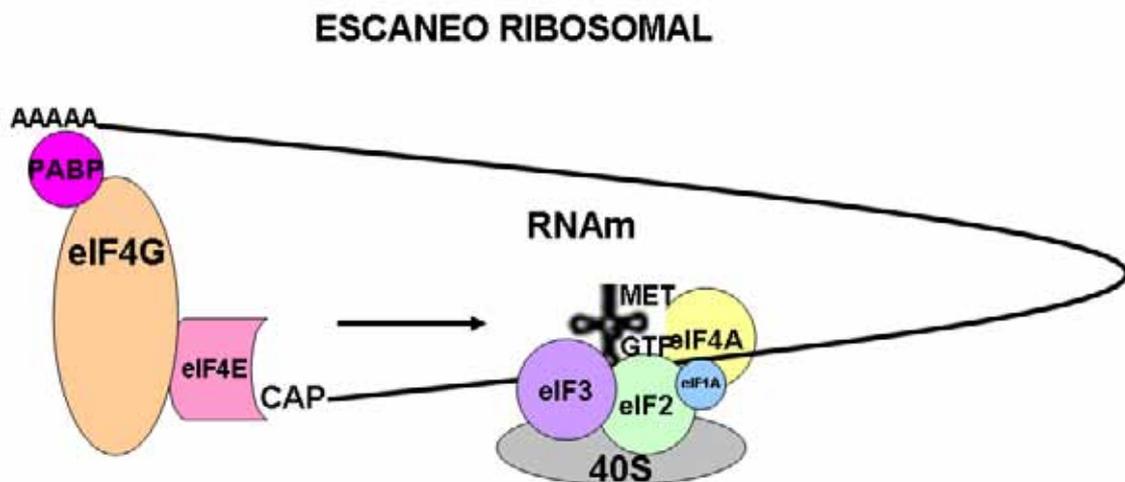


Figura 5: Durante el barrido o escaneo que realiza el ribosoma se requiere la ayuda de la RNAhelicasa eIF4A1 deshaciendo la estructura del RNAm hasta localizar al codón de inicio AUG.

Una vez localizado el codón de inicio el eIF5 induce la hidrólisis del GTP unido al eIF2, formando el eIF2-GDP y liberando a todos los factores de inicio de la traducción, quedando únicamente el tRNA-met en el sitio P de la subunidad ribosomal 40S. El complejo inactivo eIF2-GDP se recicla para volver a formar al eIF2-GTP por medio del eIF2B, que realiza el intercambio de GDP a GTP. Finalmente, el eIF5B media la unión de la subunidad ribosomal pequeña

40S a la subunidad grande 60S formando el complejo traduccionalmente activo 80S (Fig. 6), iniciando así la elongación de las proteínas (Pestota *et al.* 2000).

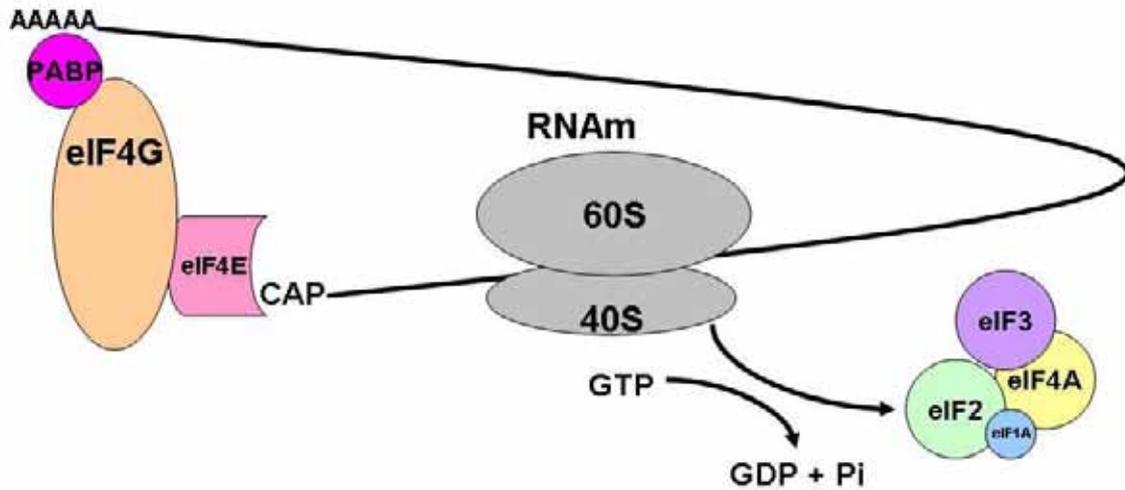


Figura 6: La hidrólisis de la molécula de GTP a GDP más Pi provoca la liberación de los factores de inicio de la traducción permitiendo que se una la subunidad ribosomal 60S para formar el complejo 80S.

Este es el mecanismo canónico que sigue la mayoría de los RNAm durante el inicio de la traducción de manera dependiente del *cap*.

1.2 UN MECANISMO ALTERNO PARA LA SÍNTESIS DE LAS PROTEÍNAS

En 1988 se descubrió que la traducción del RNAm de un picornavirus, que no poseía *cap*, estaba mediada por una estructura de RNA que permite el ensamblaje de la maquinaria traduccional en una posición cercana o directamente sobre el codón de inicio. A esta región del RNAm se le llamó “*internal ribosome entry site*” (IRES) o sitio interno de entrada para el ribosoma (Pelletier y Sonenberg 1988). Hoy se reconoce que los IRES constituyen un mecanismo alternativo para el inicio de la traducción reclutando la maquinaria traduccional de manera interna al RNAm, cercana al codón de inicio (Fig.7) con la ayuda de factores que reconocen al IRES y actúan en *trans* (ITAFs) (Jackson 2000; Spriggs *et al.* 2005). El descubrimiento de este mecanismo cambió la idea canónica de que la traducción sólo puede iniciarse de manera dependiente de *cap*.

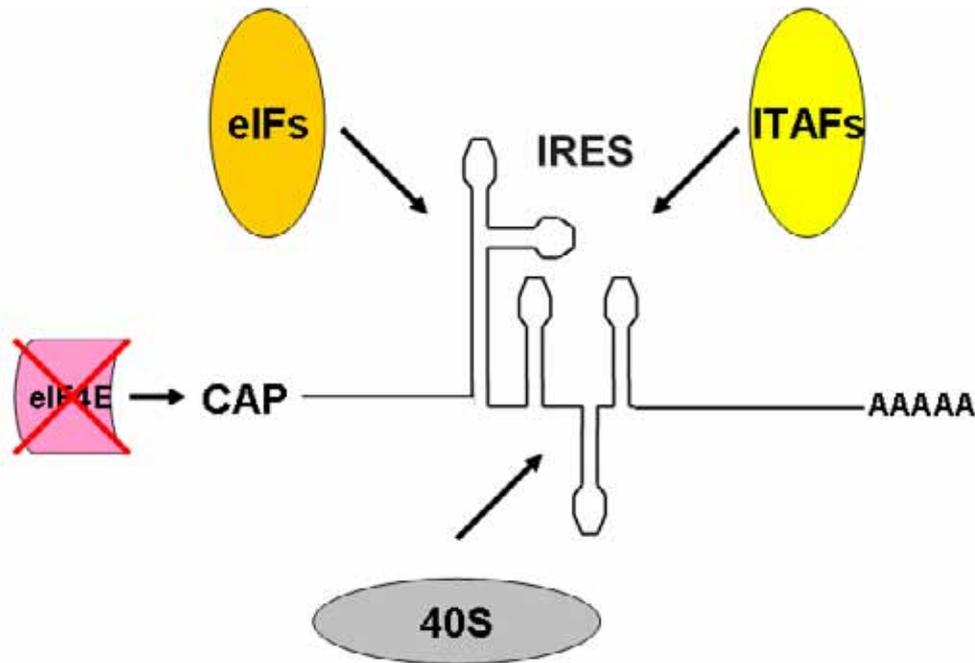


Figura 7: Esquemización de la traducción independiente de *cap*. Cuando no se pueden unir los eIFs por medio de la estructura *cap* para el reclutamiento del ribosoma al RNAm, los eIFs, ITAFs o la subunidad 40S pueden unirse a regiones internas del RNAm por medio del IRES.

Este mecanismo ha sido encontrado en algunos RNAm virales y también en los RNAm celulares de los eucariontes, en los cuales el inicio de la traducción es generalmente dependiente del reconocimiento de la estructura secundaria formada por la región 5' UTR del RNAm, que es la encargada de reclutar a la subunidad ribosomal 40S hacia una región cercana al codón de inicio (Belsham y Jackson 2000; Carter *et al.* 2000; Hellen y Sarnow 2001; Jackson 2000; Stoneley y Willis 2004). En general, la traducción de manera dependiente de IRES no requiere de la estructura *cap* ni de su reconocimiento por el eIF4E.

El inicio de la traducción mediado por los IRES es estrictamente dependiente de la integridad de su estructura. Pequeños cortes o inserciones, e incluso una sustitución en la cadena de nucleótidos en el elemento IRES, pueden reducir severamente o en, algunos casos, incluso aumentar su actividad (Fernández-Miragall y Martínez-Salas 2003, Martínez-Salas *et al.* 2002)

Los RNAm celulares que contienen IRES codifican para una variedad de proteínas tales como: factores de inicio de la traducción, factores de transcripción, oncogenes, factores de crecimiento, genes homeóticos y proteínas de supervivencia que son funcionales bajo situaciones de estrés (Graber y Holcik 2007, Martínez-Salas *et al.* 2001). Se conoce que los elementos IRES son activados por estímulos fisiológicos incluyendo, entre otros, la hipoxia, las lesiones vasculares, la limitación del suero, la radiación gama, así como los factores que inducen a la apoptosis, la interrupción del crecimiento, la angiogénesis, el estrés por calor (Holcik y Korneluk. 2000; Huez *et al.*, 1998; Stoneley *et al.*, 2000), o por infecciones virales (Martínez-Salas *et al.* 2001).

Las secuencias nucleotídicas de los IRES no tienen un grado de similitud que ayude a reconocer motivos conservados y que permita identificar sus secuencias funcionales. Los IRES poseen estructuras secundarias y terciarias que interactúan con los componentes de la maquinaria traduccional, así como con factores del inicio de la traducción e ITAFs, que atraen a los ribosomas para llevar a cabo el inicio de la traducción de manera independiente de *cap* (Cobbold *et al.* 2008; Hellen y Sarnow 2001; Stoneley y Willis 2004.).

Para localizar la secuencia nucleotídica que constituye un IRES se ha desarrollado una prueba bi-cistrónica estándar que permite ensayar su actividad (Fig. 8). Esta prueba consiste en la traducción de los marcos de lectura abiertos de dos genes reporteros (llamados cistrones) en medio de los cuales se inserta la secuencia putativa IRES que se requiere probar. El primer plásmido bi-cistrónico que fue desarrollado consta de las secuencias codificantes de la cinasa de timidina y de la cloranfenicol-acetil-transferasa y, entre los dos cistrones, la secuencia 5' UTR entera o parte de ella del virus del polio. El primer cistrón (cinasa de timidina) se traduce de manera dependiente de *cap*, mientras que el segundo cistrón (cloranfenicol-acetil-transferasa) permite evaluar el inicio interno de la traducción (Pelletier y Sonenberg 1988), cuando se somete a condiciones en donde no está disponible el complejo eIF4F unido al *cap* y a la PABP (condiciones independientes de *cap*).

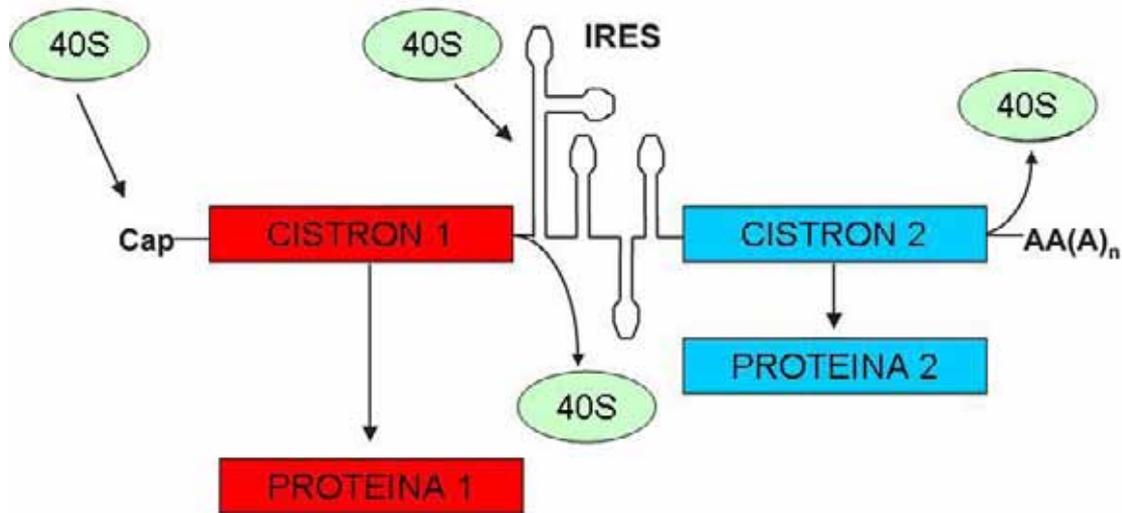


Figura 8: El sistema de traducción bi-cistrónico. En esta construcción, el primer cistrón se traduce de manera dependiente de *cap* y el segundo cistrón de manera dependiente del IRES o independiente de *cap*.

El sistema de expresión de los RNAm bi-cistrónicos es usado para demostrar que los elementos IRES permiten la iniciación de la traducción, en condiciones independientes de *cap*. Durante ciertas infecciones virales se inhibe la síntesis de las proteínas celulares, debido a que ciertas proteasas virales, como la Lb proteasa, cortan al eIF4G (Fig. 9), perdiéndose el sitio de unión al eIF4E y, por consiguiente, el reconocimiento de la estructura *cap* para el inicio de la traducción (Cuesta y Schneider 2000; Gradi *et al.* 1998).

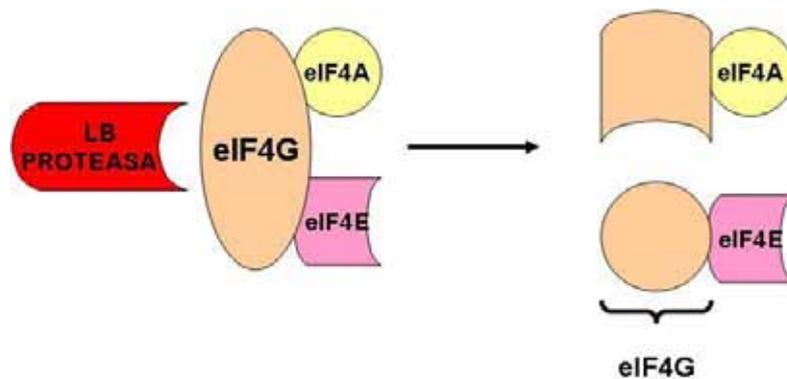


Figura 9: La Lb proteasa corta el eIF4G, creando una proteína eIF4G trunca no funcional, que pierde el sitio de unión con eIF4E.

Varios elementos celulares IRES son activados bajo condiciones de estrés durante las cuales generalmente se inhibe la traducción dependiente de *cap*. El inicio de la traducción dependiente de IRES proporciona una ventaja en estas condiciones, ya que permite la traducción de proteínas esenciales para la

adaptación o la supervivencia de las células (Graber y Holcik, 2007, Oltean y Banerjee 2005).

Durante el estado de estrés térmico en células de plantas, los niveles de síntesis de proteínas son alterados por dos razones, uno: por la eficiencia en que los mensajes son traducidos y dos: por la estabilidad del RNAm. La importancia de la traducción independiente de *cap*, es que al aplicar durante 15 min un choque térmico de 37°C a células de zanahoria, se ve alterada la síntesis de proteínas, disminuyendo severamente la traducción de todos los RNAs mensajeros que no codifican para proteínas de choque térmico, siendo degradados o almacenados para traducirse cuando las condiciones mejoren. Por el contrario los mensajes de *hsp* aumentan su eficiencia de traducción, si se aumenta gradualmente la temperatura del choque térmico hasta llegar a 45°C y también si se aumenta el tiempo de exposición a este, los mensajes de *hsp* se ven mayormente favorecidos no solamente en ser traducidos, sino que también aumenta su estabilidad prolongándose su vida media hasta 4 veces más (Gallie *et al.* 1995). Un periodo corto de estrés térmico, provoca un cambio en la reprogramación de la traducción, causado principalmente por una pérdida de la interacción funcional de la estructura *cap* con la cola de poli (A) (Gallie *et al.* 1995).

1.3 REQUERIMIENTOS DE LOS FACTORES DE INICIO DE LA TRADUCCIÓN EN DIFERENTES IRES

Las secuencias nucleotídicas de los IRES no poseen un grado de similitud entre sí que permita determinar una secuencia funcional. Por lo tanto, los requerimientos para iniciar la síntesis de proteínas son variados, estos requieren de diferentes eIFs o ITAF anteriormente mencionados, que ayudan al reclutamiento del ribosoma o pueden unirse directamente al ribosoma.

Se han hecho estudios en diferentes virus que han permitido explicar la forma de acción de los IRES con la maquinaria del inicio de la traducción. La formación del complejo 48S, en el virus de la encefalomiocarditis (EMCV), requiere a los factores canónicos de iniciación eIF4A, eIF4G, eIF2 y eIF3.

Además, requiere de la proteína de unión a la cola de polipirimidina (PTB) que es un ITAF. Los elementos IRES de otro grupo de picornavirus, poliovirus y rinovirus interactúan con diferentes ITAFs como son: La PCBP (hnRNP2), unr y PTB (hnRNP 1). Varios de los factores mencionados tienen motivos de unión a RNA y tienen múltiples interacciones con IRES al igual que una capacidad de formar dímeros entre ellos, parecidas a proteínas que actúan como chaperonas de RNA direccionando y/o estabilizan el plegamiento del RNA. (Martínez-Salas *et al.* 2001; Urwin *et al.* 2000). Ciertos IRES contienen varias repeticiones de la secuencia CCU , a la cual se le une la proteína PTB. En los IRES de c-myc, Mnt y MTG8a la unión de esta proteína estimula el inicio de la traducción de sus RNAm. Al ser este ITAF parte de la maquinaria de *splicing* se ha deducido que es un ITAF universal (Mitchell *et al.* 2005). Es posible que en las plantas se requieran de los mismos elementos de inicio de la traducción ó ITAFs ya mencionados ya que el IRES del EMCV se traduce exitosamente *in vitro* en extractos de germen de trigo, por lo que puede estar utilizando, para iniciar la traducción, los mismos elementos arriba mencionados en las plantas (Urwin *et al.* 2000). La formación del complejo 48S por el IRES del virus de la hepatitis C (HCV), y el IRES del virus de la fiebre clásica del cerdo (CSFV) requieren, para iniciar la traducción, sólo de los complejos eIF2-GTP-Met-tRNA_i, eIF3 y la subunidad 40S (Pestova *et al.* 1998). Se ha demostrado que el IRES del virus de la parálisis del grillo (CrPV) se une directamente al ribosoma 40S en condiciones *in vitro* y no requiere de eIFs. Este IRES mimetiza la estructura secundaria de un tRNA unido al eIF2+GTP del complejo ternario, iniciando la traducción del IRES CrPV como una elongación (Costantino y Kieft 2005; Wilson *et al.* 2000). Este virus presenta una función relacionada con el virus intestinal de *Plautia stali* (PSIV) un virus de insecto, que inicia la síntesis de proteínas en el codón CAA en ausencia de eIF2, que reconoce el codón AUG, reclutando un tRNA (Sasaki y Nakashima 2000; Yu *et al.* 2005).

La región 5' UTR del virus del jaspeado del tabaco (TEV) requiere del eIF4G para poder iniciar la traducción de su RNAm. Se ha observado que no es necesario ninguno de los siguientes factores para iniciar la traducción: eIF4E, eIFiso4E, eIF4A, o eIF4B. El IRES del TEV dirige la traducción

independiente de *cap* por un mecanismo que implica la dependencia de eIF4G (Gallie 2001).

1.4 IDENTIFICACIÓN DE LAS REGIONES IRES EN LA INICIACIÓN DE LA SÍNTESIS DE LAS PROTEÍNAS

Como se mencionó anteriormente, las secuencias nucleotídicas de los IRES no son similares, lo que impide obtener secuencias consenso que sirvan para identificarlos en los 5'UTR de los RNAm. En el trabajo de Joshi-Barve y colaboradores, en 1992 se transfectaron células HeLa con RNAm antisentido para los factores eIF4E y eIF4G γ . Esto redujo los niveles de expresión de ambas proteínas, de esta manera se logró la inhibición del inicio de la traducción dependiente de *cap*. Como consecuencia de esta inhibición observaron, además, el aumento en la síntesis de diferentes proteínas entre las que identificaron a las proteínas de choque térmico: HSP90, HSP70, HSP65 y HSP27. El aumento en la síntesis de estas proteínas, de manera independiente de *cap*, pudo deberse al reclutamiento de la maquinaria traduccional por medio de una estructura IRES presente en la región 5'UTR de los RNAm de las proteínas de choque de calor.

Bajo condiciones de estrés durante el inicio de la germinación, en los ejes embrionarios del maíz se pueden traducir de manera independiente de *cap* varios RNAm. Uno de ellos es el RNAm de *Hsp101* que codifica a una proteína de choque térmico (Dinkova *et al.* 2005). Las HSPs (Heat shock proteins) son sintetizadas bajo condiciones de estrés térmico en el maíz y en otras especies de plantas. La proteína HSP101 del maíz, que tiene un peso molecular de 101 KDa, se localiza en el citoplasma y en el núcleo, siendo un componente esencial de diversas actividades celulares, entre las cuales, se encuentran la desagregación de los agregados protéicos, la termotolerancia inducida y el control de la elongación de la raíz primaria (Nieto-Sotelo *et al.* 2002).

Para identificar la presencia de un IRES en *Hsp101* Dinkova y colaboradores (2005) utilizaron un sistema animal (lisado de reticulocitos de conejo, [RRL]) y uno vegetal (extracto de germen de trigo, [WGE]) para realizar

una traducción *in vitro* de construcciones bi-cistrónicas CAT/LUC, entre las cuales se introdujo la región 5'UTR del RNAm de la proteína HSP101 del maíz. Estos experimentos indicaron que ésta región 5' UTR posee una actividad IRES, demostrada por la traducción independiente de *cap* cuando el eIF4G es cortado por la proteasa Lb. La síntesis de la proteína HSP101 aumenta su expresión en condiciones de estrés térmico, la cual confiere resistencia a las células en estas condiciones.

En otros organismos también se encuentran RNAm que codifican para proteínas de choque térmico, los cuales poseen actividad IRES. Hernández y colaboradores (2004) aplicaron un choque térmico a embriones de *Drosophila*, con lo cual disminuyo la cantidad del factor eIF4G, obteniendo un sistema de traducción independiente de *cap*, posteriormente, realizaron un perfil polisomal en donde encontraron que el RNAm de *hsp70* unido a ribosomas aumento, lo que indica que el transcrito de *hsp70* puede traducirse de manera independiente del eIF4G o independiente de *cap*, ya que contiene un IRES que inicia su traducción en condiciones de estrés de calor.

Los nucleótidos que proporcionan la actividad IRES pueden formar parte o componer la totalidad de la región 5'UTR, para lo cual, Runtsova y colaboradores, en el 2003, intentaron delimitar la secuencia mínima del IRES *hsp70* de humano, para lo cual realizaron pequeños cortes a la región 5'UTR y los insertaron en una construcción bi-cistrónica utilizando a la luciferasa de *Renilla* (*RLUC*) como primer cistrón y a la luciferasa de luciérnaga (*FLUC*) como segundo cistrón. Las construcciones se transfectaron en las células TE671 y fueron evaluadas funcionalmente. Demostraron que la región 5'UTR del mensajero de *hsp70* de humano posee una estructura IRES funcional. Los autores sugirieron que la actividad IRES de la región 5' UTR requiere que toda la secuencia de dicha región 5' UTR se mantenga íntegra, ya que si se le corta un pequeño fragmento, disminuye la eficiencia de la traducción independiente de *cap*. Por lo anterior, no pudieron cortar la secuencia que forma la estructura del IRES del RNAm *hsp70* de humano.

Los experimentos de inserciones de fragmentos de la región 5'UTR de RNAm con actividad IRES en construcciones bi-cistronicas, se han vuelto una prueba estándar para identificar la secuencia nucleotídica que proporciona esta actividad. Gan y colaboradores (1998) realizaron cortes progresivos en el RNAm que codifica para eIF4G de humano en la dirección 5' a 3'. La región 5'UTR de este gen tiene una longitud de 357 nucleótidos, y las moléculas resultantes las insertaron en una construcción bi-cistrónica, donde el primer cistrón fue *CAT* y el segundo *LUC*. Estas construcciones las transfectaron en las células K562 para evaluar la actividad IRES. Los resultados mostraron una actividad máxima en la construcción que tenía 101 nucleótidos, pero también hubo una actividad detectable en la de 81 nucleótidos.

Oltean y Banerjee (2005) identificaron el IRES de la región 5' UTR del RNAm de la metionina sintasa (MS), mediante construcciones bi-cistrónicas *CAT/LUC* entre las que insertaron fragmentos de la región 5' UTR del RNAm de la MS que tiene un tamaño de 394 bases. El IRES fue localizado realizando cortes en la dirección 5' a 3'. Indicaron que el tamaño del IRES es de 71 bases, demostrando que no necesariamente toda la región 5' UTR interviene en la actividad del IRES.

2 JUSTIFICACIÓN

La traducción de ciertos RNAm mediada por IRES puede ayudar a la síntesis de las proteínas de supervivencia durante algún estado de estrés celular, y éste mecanismo de traducción independiente de *cap* proporciona una ventaja en la síntesis de estas proteínas sobre la síntesis dependiente de *cap* en condiciones de estrés. La proteína HSP101 de maíz es una chaperona que aumenta su expresión durante el estrés por calor. Dado que los IRES no poseen similitud en sus secuencias, para determinar la región funcional del IRES en el transcrito de *Hsp101* es necesario conocer la secuencia nucleotídica mínima con actividad de IRES y con el potencial de iniciar la traducción durante el choque de calor en el maíz.

3 HIPÓTESIS

La región 5' UTR del RNAm *Hsp101* del maíz contiene un IRES que da inicio a la traducción de manera independiente de *cap*, por lo que al hacer cortes en esta región, se comprometerá su estructura y la funcionalidad del IRES, pudiéndose delimitar la secuencia de nucleótidos necesaria para el inicio de la traducción independiente de *cap* del RNAm *Hsp101*.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar la región mínima de la secuencia de nucleótidos que proporcione una actividad IRES en la región 5' UTR del transcrito *Hsp101* del maíz y definir su estructura secundaria funcional hipotética.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar la actividad IRES en versiones completas y deletadas de la región 5' UTR del RNAm de la proteína HSP101 del maíz.
- Predecir la estructura secundaria del IRES del RNAm *Hsp101* mediante métodos bioinformáticos.
- Identificar los factores que se unan al IRES *Hsp101* que posiblemente contribuyan al inicio de la traducción.

5 DISEÑO EXPERIMENTAL

5.1 MATERIAL Y MÉTODOS

5.1.1 ELECCIÓN DE LA REGIÓN IRES

No existe una regla para elegir cuales nucleótidos deben ser deletados para poder identificar la región funcional de un IRES en su región 5'UTR. Para realizar esta elección, se infirieron las posibles estructuras secundarias de la región 5' UTR del RNAm de *Hsp101*, analizando dichas estructuras de los diferentes fragmentos de la región 5' UTR, empleando el programa Mfold (<http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/rna-form1.cgi>), con las condiciones establecidas por dicho programa, diseñado por el Dr. Zuker del Instituto Politécnico Rensselaer (Zuker 2003). Primero se retiraron dos nucleótidos, (hsp101 Δ 2) y después de esta, se le retiraron progresivamente 3 nucleótidos (hsp101 Δ 5, hsp101 Δ 8, hsp101 Δ 11, hsp101 Δ 14, hsp101 Δ 17, hsp101 Δ 20, hsp101 Δ 23, hsp101 Δ 26, hsp101 Δ 29, hsp101 Δ 32, hsp101 Δ 35, hsp101 Δ 38, hsp101 Δ 41, hsp101 Δ 44, hsp101 Δ 47 y hsp101 Δ 50) del extremo 5' desde el sitio más 1 de la transcripción. Hay varios reportes que mencionan que es más importancia para la función de los IRES la estructura secundaria que poseen, más que su secuencia (Martínez-Salas *et al.* 2002; Fernández-Miragall *et al.* 2003; Martínez-Salas *et al.* 2005), por lo cual, se revisaron las estructuras secundarias hipotéticas predichas por el programa para identificar cuáles son las que presentan un mayor cambio en su forma con respecto a la estructura secundaria hipotética de pBIC-5, aquellas secuencias con mayor cambio fueron elegidas para ser examinadas y analizar si pueden iniciar la traducción de manera independiente de *cap*, con lo cual se pudo identificar que nucleótidos forman parte de la región funcional del IRES de *hsp101* de maíz. Es importante señalar que se utilizó la construcción pBIC-5 como control, ya que se ha observado que posee actividad de IRES (Dinkova *et al.* 2005). Sin embargo, pBIC-5 posee 60 nucleótidos extras que pertenecen al promotor en el extremo 5' antes del sitio +1 de inicio de la transcripción (Fig. 21), que no están presentes en a la región 5'UTR de *Hsp101* (Dinkova *et al.* 2005; Nieto-Sotelo *et*

al., 1999). Por lo cual también se eligió la región *hsp101+1* la cual posee toda la secuencia 5'UTR del gen de *hsp101* de maíz, para analizar si estos nucleótidos extras se encuentran involucrados en la actividad IRES que posee pBIC-5.

5.1.2 AMPLIFICACIÓN DE LAS REGIONES SELECCIONADAS DEL 5'UTR DE *Hsp101*

Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar por medio de PCR las regiones del 5' UTR del ARNm de *Hsp101* elegidas después de ser analizadas con el programa Mfold. Se les adicionó la secuencia GAGCTC, reconocida por la enzima de restricción *Sst I*, para ser insertados en el sitio correspondiente del vector bi-cistrónico (pBIC). Este vector contiene el cDNA con los ORFs de dos genes reporteros, el de la cloranfenicol-acetil-transferasa (CAT) y el de la luciferasa de luciérnaga (LUC). Dicho plásmido fue donado por la Dra. Encarnación Martínez-Salas de la Universidad Autónoma de Madrid, España.

Todos los oligonucleótidos que se usaron para amplificar las regiones IRES y crear las construcciones con las cuales se trabajó, poseen una TM de 65 °C, no forman homodímeros con ellos mismos, ni forman heterodímeros con el otro oligonucleótido de la reacción. Sus secuencias son: *Hsp101+1* sentido 5' CGAGCTCGCACAACATTTCAACCAGA 3'; antisentido RV101* 5' AGCAGCCATGAATCCGGACAACCTCTCGAGC 3'; sentido *hsp101-A* 5' GAGCTCGAAACACTAGCCGAAGCAA 3' y sentido *hsp101-B* 5' GAGCTCCACCTGGTGGGATCATCTC 3'.

Las reacciones de PCR se realizaron en una mezcla de reacción conteniendo 2.5 µl de amortiguador 10X, 1.5 µl de MgCl₂ 50 mM, 1µl de oligonucleótidos 10mM, 1 µl de mezcla de desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 10 mM, 0.25 µl de la polimerasa recombinante de ADN Taq (INVITROGEN # CAT. 10342-020), x ul de una solución de pXE101 (xg/µl), mas agua estéril para alcanzar un volumen final de 25 µl. Para amplificar *Hsp101+1* se usó el par *hsp101+1* sentido y RV101*; para *hsp101Δ17* se

usaron hsp101-A y RV101*; para *hsp101Δ50* se usaron hsp101-B y RV101*. La mezcla de reacción se colocó en un termociclador GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems). Los tiempos y las temperaturas utilizados fueron de 5 min a 95°C (desnaturalización) para el primer paso seguido de 30 ciclos con el siguiente perfil de temperaturas: 30 seg a 95°C (desnaturalización), 30 seg a 60°C (hibridación) y 1 min a 72°C (extensión). Al ciclo final se le adicionaron dos temperaturas: la primera de 7 min a 72°C y la segunda a 4 °C, por tiempo indefinido.

Para amplificar las regiones elegidas, se utilizó como templado de DNA al plásmido pXE101, que posee el cDNA de *Hsp101* del maíz (Dinkova *et al.*, 2005). El inserto de cDNA en pXE101 contiene 60 bases río arriba del sitio +1 de la transcripción del gen *Hsp101*, el UTR 5' de *Hsp101*, el ORF completo de *Hsp101* y por último las 279 bases del UTR 3' seguidas de una cola de poli-(A) de 15 bases. El plásmido pXE101 fue proporcionado por el Dr. Jorge Nieto del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis, en un gel de agarosa a una concentración de 1.5%. Posteriormente, las bandas de los productos deseados se purificaron con QIAquick Gel Extraction KIT (QIAGEN # cat. 28704) y las muestras se concentraron al vacío en el aparato *Speed Vac*. Finalmente, se realizó una nueva electroforesis para determinar la eficiencia de la purificación. Posteriormente, las muestras se ligaron al plásmido de clonación pGEM con el pGEM-T *Easy Vector System* (PROMEGA # CAT. A1360) para que de estos plásmidos se liberasen las regiones elegidas y pudiesen ser clonadas con el plásmido bi-cistrónico.

5.1.3 EXTRACCIÓN DEL DNA PLASMÍDICO POR MINIPREP

De cada una de las 5 cepas transformantes (que contienen el plásmido recombinante de pGEM, donde se encuentran los fragmentos de IRES de *Hsp101*) se inoculó una asada en 5 ml de medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron durante toda la noche a 37 °C a 250 rpm. Al iniciar la extracción del DNA plasmídico se puso la solución III (60ml de Ack

5M, 11.5 ml de ácido acético, 28.5 ml de agua) en hielo. Por otra parte se centrifugaron las células bacterianas arriba mencionadas a 3000 rpm durante 5 min en tubos eppendorf, se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 100 μ l de la solución I (glucosa 50 mM, Tris HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8) y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Después se agregaron 200 μ l de la solución II (NaOH 0.2 N, SDS al 1%, la cual debe ser preparada al momento), se mezcló por inversión y se incubó durante 5 min en hielo. Posteriormente se agregaron 150 μ l de la solución III fría, se mezcló por inversión y se incubó durante 10 min en hielo. Los tubos se centrifugaron durante 10 min a 14000 rpm a 4°C, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo tomando nota de los volúmenes transferidos y se le agregó 0.1 volúmenes de Tris-HCl 1M pH 8 y 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), mezclándose con un vortex durante 15 seg. Acto seguido, las mezclas se centrifugaron durante 5 min a 14000 rpm a 4°C y se recuperaron las fases acuosas, a las cuales se les agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto frío, se agitaron por inversión y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. Los tubos se centrifugaron durante 10 min a 14000 rpm a 4°C, se desecharon los sobrenadantes y se lavó con 0.5 ml de etanol al 70%. Las muestras se dejaron secar y se resuspendieron en 50 μ l de agua estéril.

5.1.4 CONSTRUCCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES EN EL VECTOR BI-CISTRÓNICO pBIC.

Para clonar los fragmentos del 5' UTR de *Hsp101* en el plásmido bicistrónico pBIC se llevó a cabo una reacción de digestión con 1 μ g de los plásmidos recombinantes pGEM. Para liberar el inserto del 5' UTR de *Hsp101* se utilizó 5 U de la enzima *Sst I* (Invitrogen # CAT 15222-011) a un volumen final de reacción de 30 μ l. La mezcla se incubó a 37°C durante 3 h, posteriormente, se corrió una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%. Se purificaron las bandas correspondientes a los fragmentos del IRES con el QIAquick Gel Extraction KIT (QIAGEN # CAT. 28704), se concentraron al vacío en el aparato *Speed Vac* y se corrió una nueva electroforesis para determinar la eficiencia de la purificación.

Para retirar el IRES del FMDV, el vector de clonación pBIC se digirió, con 5 U de la enzima *Sst*I a 37°C durante 3 h en un volumen final de 30 µl. Posteriormente, para evitar su recircularización, se desfosforiló el vector agregando a la reacción anterior 1 U de fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP de INVITROGEN # CAT. 18009-019). La mezcla de reacción fue analizada en un gel de agarosa al 1 %. El vector se purificó con el *QIAquick Gel Extraction KIT* (QIAGEN # cat. 28704). La muestra se concentró con el *Speed Vac* y se realizó una nueva electroforesis para observar la eficiencia de la purificación.

La reacción de ligación se llevó a cabo en un volumen final de 10 µl con 1 µg del vector pBIC sin IRES (pBICΔ) y con 3 µg de los fragmentos del 5' UTR de *Hsp101*, a una relación masa/masa vector:inserto de 1:3 usando 0.5 U de la ligasa de DNA T4 (INVITROGEN # CAT 15224-017) durante toda la noche a 16°C. Los plásmidos recombinantes de pBIC generados se usaron para transformar la cepa DH5α de *Escherichia coli*.

5.1.5 PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS COMPETENTES

Se inoculó una asada de *E. coli* DH5α en 50 ml de medio LB y se incubó durante toda la noche a 37°C con una velocidad de agitación de 250 rpm. De este cultivo se tomaron 4 ml para inocular 400 ml de medio LB y se incubó a 37°C con agitación a 250 rpm hasta que el medio alcanzó una absorbancia de 0.375 a una D.O. de 590 nm. Posteriormente, se formaron alícuotas de 50 ml y se mantuvieron en hielo durante 10 min. Las alícuotas se centrifugaron 7 min a 3000 rpm (CENTRIFUGA GS-15R y el rotor F2402 ambos de BECKMAN) a 4°C, se eliminó el sobrenadante y las pastillas se resuspendieron en 10 ml de la solución fría de CaCl₂ (CaCl₂ 100 mM, 15% glicerol) fría. Posteriormente la mezcla se centrifugó durante 5 min a 2500 rpm (CENTRIFUGA GS-15R y el rotor F2402 ambos de BECKMAN) a 4°C, se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 10 ml de la solución CaCl₂ fría y las células se mantuvieron durante 30 min en hielo. Las alícuotas se centrifugaron durante 5 min a 2500 rpm (CENTRIFUGA GS-15R y el rotor F2402 ambos de

BECKMAN) a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 2 ml de CaCl₂ frío. Se separaron alícuotas de 200µl en tubos eppendorf estériles e inmediatamente se congelaron con N₂ líquido y se guardaron a -72°C.

5.1.6 TRANSFORMACIÓN BACTERIANA

Para transformar la cepa DH5α de *E. coli* se tomaron 10 ng de la ligación de pBIC con cada uno de los fragmentos del IRES (*Hsp101+1*, *hsp101Δ17* y *hsp101Δ50*) y se agregaron a una alícuota de 200µl de células competentes y se mantuvieron en hielo durante 10 min. Después se les dió un choque térmico de 42°C durante 2 min, se adicionó 1 ml de medio LB y se incubó durante 1 h a 37°C con agitación a 250 rpm. Posteriormente, las células se extendieron en cajas de Petri con agar LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron toda la noche a 37°C.

Para comprobar la clonación exitosa del plásmido deseado, se realizó una reacción de PCR (condiciones arriba mencionadas) con el DNA de las células transformantes para identificar a la clona que capturó el plásmido.

5.1.7 PURIFICACION DE DNA PLASMIDICO POR MELTON PREP (MAXIPREP)

Para obtener una cantidad grande de plásmidos recombinantes las células transformantes se crecieron en 50 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml) durante toda la noche a 37°C a 250 rpm. Para extraer el plásmido se separó el cultivo en dos tubos corex de 30 ml y se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 5 ml de NaCl 10 mM. Las células se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min a 4°C. La pastilla se resuspendió en 0.6 ml de solución amortiguadora de lisis (Tris 25 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8, sacarosa al 15%, lisozima a 2mg/ml) y se incubó durante 20 min en hielo. Posteriormente, se agregó 1.2 ml de la solución de lisis (NaOH 0.2 M, SDS 1%), se mezcló suavemente y se incubó 10 min en hielo. Después se adicionó 0.75 ml de NaAc 3M, se mezcló

suavemente y se incubó 20 min en hielo. Los tubos se centrifugaron durante 15 minutos a 7000 rpm a 4°C. El sobrenadante se transfirió a otro tubo, al cual se le agregaron 5 µl de RNAsa A 100 mg/ml (SIGMA # CAT. R 6513) y se incubó durante 30 min a 37°C. Se le agregó 1 volumen de fenol-cloroformo (25:24) y se agitó suavemente, se centrifugó 10 min a 7000 rpm a 4°C, se recuperó la fase acuosa y se repitió 2 veces el lavado con fenol-cloroformo. La fase acuosa se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Las muestras precipitadas se centrifugaron durante 10 min a 8500 rpm a 4°C, se eliminó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 0.5 ml de etanol al 70%. La pastilla se resuspendió en 168 µl de H₂O estéril, se transfirió a un tubo eppendorf y se le agregaron 32 µl de NaCl 5 M, se mezcló bien y se le agregaron 200 µl de PEG 8000 al 13% y se dejó incubando toda la noche a 4°C. Al día siguiente los tubos eppendorf se centrifugaron 10 min a 14000 rpm a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente para eliminar todo el PEG posible. La pastilla se lavó con 0.5 ml de etanol al 70%, se centrifugó 5 min a 14000 rpm a 4°C y el tubo se dejó invertido hasta que el etanol se secó. Se resuspendió la pastilla en 50 µl de H₂O, se tomó 1 µl de la muestra y se diluyó en 99 µl de H₂O y se cuantificó su absorbancia a 260 nm.

5.1.8 LINEARIZACION DEL PLASMIDO CON INSERTO

Se linearizó el plásmido mediante digestión con la enzima de restricción apropiada. Para los insertos dentro de pBIC (pBIC-5, *Hsp101+1*, *hsp101Δ17* y *hsp101Δ50*) se utilizó *Hpa I* (INVITROGEN # CAT. 15208-028). Para el plásmido con el cDNA de la proteasa Lb se utilizó la enzima *XbaI* (INVITROGEN # CAT. 15226-012). Para linearizarlo se digirieron 10 µg de DNA plasmídico purificado por Melton prep en un volumen de reacción final de 30 µl durante 3 h a 37°C. Se verificó el avance de la digestión corriendo 1 µl de reacción en un gel de agarosa al 1%, mientras el DNA estaba en hielo. Una vez que la digestión se había completado, se diluyó la reacción con H₂O tratada con DEPC hasta alcanzar un volumen de 100 µl y se extrajo con 1 volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó en un vortex durante 1 min y se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min a 4°C. La fase acuosa se

recuperó y se le agregó 1 volúmen de “chisam” (fenol:cloroformo 25:24), se agitó en un vortex durante 1 min y se centrifugó a 14000 durante 5 min a 4°C. La fase acuosa se recuperó y el DNA se precipitó con 0.1 volúmenes de NaAc 3M pH 5.2 y 2 volúmenes de etanol absoluto. Se almacenó a –72°C durante 30 min y se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min a 4°C. La pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min a 4°C. Se dejó secar el precipitado y la pastilla se resuspendió a una concentración final de 1µg/µl con H₂O tratada con DEPC a temperatura ambiente.

5.1.9 SINTESIS DE TRANSCRITOS SIN CAP

Se realizó la reacción de transcripción *in vitro* con 5 µg de ADN plasmídico linearizado (*Hsp101+1*, *hsp101Δ17*, *hsp101Δ50* o la proteasa Lb) en un volúmen de 100 µl y se incubó durante 60 min a 37°C con la polimerasa de RNA T7 (PROMEGA # CAT. P2077), de acuerdo a Schernborn (1998). Posteriormente, se agregaron 5 µl de la DNAsa RQ (PROMEGA # CAT. M6101) y se incubó durante 15 min a 37°C. Se extrajo con 1 volúmen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó por inversión durante 1 min. Se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min a 4°C. La fase acuosa se extrajo con 1 volúmen de “chisam” (cloroformo: alcohol isoamílico 24:1), se agitó por inversión durante 1 min y se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min a 4°C. La fase acuosa se recuperó y el RNA se precipitó con 0.5 volúmenes de NH₄Ac 7.5M y 2 volúmenes de etanol absoluto incubándose toda la noche a –72°C.

Al siguiente día la fase acuosa recuperada se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min a 4°C. El precipitado se resuspendió en 100 µl de NH₄Ac 2.5 M, se añadieron 100 µl de etanol absoluto y se incubó a –72°C durante 1.5 h. Se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 20 µl de H₂O tratada con DEPC. Se tomó una alícuota de 1 µl para calcular la concentración de RNA mediante la estimación de su absorbancia a 260 nm. La muestra se almacenó a –72°C, para posteriormente ser utilizada en la traducción *in vitro*.

5.1.10 REACCIÓN DE TRADUCCIÓN *IN VITRO*

La traducción de los mensajes (*pBIC-5*, *Hsp101+1*, *hsp101Δ17* y *hsp101Δ50*) se llevó a cabo *in vitro* en el sistema animal RRL (lisado de reticulocitos de conejo de PROMEGA # CAT. L4960) en una reacción final de 25 μ l que contuvo 17.5 μ l de RRL, 0.1 μ g de RNAm transcrito *in vitro* al que no se le añadió el análogo de la estructura *cap* y 10 μ Ci [35 S] metionina (actividad específica de 555 MBq ml⁻¹; Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia). La reacción de traducción se incubó durante 1 h a 37°C, se tomó 1 μ l de la reacción a tiempo 0 y también cuando terminó la reacción. Ambas alícuotas se colocaron sobre un papel filtro para cuantificar la incorporación de metionina radioactiva. Con el sobrante de la reacción (23 μ l) se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%. El gel se secó y se expuso en una pantalla de fósforo para obtener la fluoruografía en un Phosphorimager (Personal Molecular Imagen FX de BIORAD). La imagen resultante se analizó con el programa Quantity One (BIO-RAD) (Dinkova *et al.* 2005).

Para generar un sistema RRL independiente de *cap* se utilizó el mensaje de la proteasa Lb del FMDV (virus de la fiebre aftosa). La proteasa Lb corta específicamente a la proteína eIF4G e interrumpe la actividad del complejo eIF4F en la traducción dependiente de *cap* (Gingras, *et al.* 1999). Se preincubó el RRL con 50 ng de transcrito de la proteasa Lb durante 15 minutos para realizar un buen corte del eIF4G e inhibir la traducción dependiente de *cap* (Dinkova *et al.* 2005), y después se le agregaron 100 ng de RNA mensajeros bi-cistrónicos con las diferentes regiones de IRES, en un volumen final de 25 μ l y se siguió el mismo procedimiento arriba mencionado.

5.1.11 CUANTIFICACIÓN DE LA RADIOACTIVIDAD INCORPORADA A LAS PROTEÍNAS

Para cuantificar la eficiencia de incorporación de la [35 S]-metionina a las proteínas, se tomaron los papeles filtro con la reacción de traducción a tiempo 0 y a tiempo de 1 h. Se dejaron secar y se les lavó con ácido tricloro-acético

(TCA) al 10% durante 15 min con agitación constante (100 ml para cada 10 papeles), se eliminó el TCA al 10% y los papeles filtro se colocaron en TCA al 5% (100 ml para 10 papeles) y se hirvieron durante 10 min. Concluído este tiempo, se agregó hielo en el interior del vaso para enfriar, se decantó el líquido y se lavaron los papeles con 500 ml de H₂O desionizada. Se eliminó el agua y se lavaron los papeles durante 10 min cada vez con etanol absoluto agitando constantemente, se eliminó el etanol y se lavaron durante 15 min con acetona al 100% agitando constantemente. Se eliminó la acetona y los papeles filtro se dejaron secar por completo.

Para cuantificar la marca radioactiva, se agregaron a los viales 5 ml de líquido de centelleo (PPO-Tolueno) y se colocaron en un contador de centelleo LS6000IC (BECKMAN) para estimar el número de cuentas radioactivas por min (CPM). Posteriormente, se agregaron los papeles filtro a cada uno de los viales y se colocaron en el contador de centelleo, para registrar las CPM y saber la incorporación de la marca a las proteínas.

5.1.12 ENTRECruzamiento DEI RNA A LOS FACTORES DE INICIO DE LA TRADUCCION (UV-CROSSLINKING)

Para realizar el entrecruzamiento se realizó una transcripción *in vitro* del IRES, utilizando rUTP marcado con [³²P] (actividad específica 9.25 MBq ml⁻¹; Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia). Para obtener únicamente el transcrito del IRES, se utilizó la construcción pGEM101+1. Se incubó al RNAm marcado (100 000 cpm) en un ensayo de *uv-crosslinking* en un volumen final de reacción de 16 µl que contenía: HEPES-KOH 10 mM pH 7.4, KCl 35 mM, MgCl 22.75 mM, glicerol al 10% y DTT 0.5 mM. La reacción se incubó durante 15 min a temperatura ambiente y después fue expuesta a luz UV (254 nm, UVC500, HOEFER) durante 30 min en hielo. Posteriormente se le agregó RNAsa A, a una concentración de 0.3 µg/µl durante 30 min a 37°C, para eliminar el RNA que no fue protegido por la proteína. Posteriormente, se corrió una electroforesis SDS-PAGE al 10% y cuando ésta terminó, se transfirieron las proteínas a una membrana, la cual se secó y fue expuesta a una pantalla de fósforo. La fluoruografía se realizó en un phosphorimager (Personal

Molecular Imagen FX de BIORAD) y se analizó con el programa *Quantity One* (BIORAD) (López de Quinto *et al.* 2001)

5.1.13 DETECCIÓN POR WESTERN BLOT DE LOS FACTORES DE INICIO DE LA TRADUCCIÓN QUE SE UNEN AL IRES *Hsp101* DEL MAIZ

Las proteínas obtenidas durante el experimento de *uv-crosslinking* se separaron por SDS-PAGE en una cámara modelo Mini PROTEAN 3 CELL de BIO RAD durante 2 h a 100 volts, y se transfirieron a una membrana Immobilon-P de MILLIPORE (# CAT. ipvh00010).

La membrana se mojó durante 1 min en metanol absoluto y posteriormente se mojó en agua para que se hidratara. En la cámara de electroforesis (sistema de transferencia húmedo Trans-Blot SD Cell de BIO RAD) se acomodaron en el siguiente orden: dos papeles filtro, la membrana, el gel y 2 papeles filtro, todo humedecido en amortiguador de transferencia (TRIS 55 mM, glicina 430 mM SDS 1 %, metanol al 20%) y la transferencia se realizó a 100 volts durante 1 h.

Al terminar la transferencia la membrana se secó antes de exponerse a una pantalla de fósforo. La fluorografía se realizó en un *Phosphorimager* (Personal Molecular Imagen FX de BIORAD) y se analizó con el programa *Quantity One* (BIORAD).

Una vez expuesta, la membrana se utilizó para realizar el *western blot*. Se mojó durante 1 min en metanol absoluto y posteriormente en agua destilada, hasta que quedó completamente hidratada. Posteriormente, la membrana se incubó con TBS-T 0.15 M pH 7.4 (NaCl 0.15 M, TRIS 50 mM, Tween al 0.1%), con leche en polvo al 5% y el anticuerpo primario. Los anticuerpos primarios fueron ya sea el anti-eIF2a (SC-7629), anti-eIF3 η (SC-16377), anti-eIF4A1 (SC-14211), anti-eIF4G (SC-9602) y anti-PABP (SC-18611) todos de *Santa Cruz Biotechnology* los cuales fueron obtenidos en el carnero. Se usaron a una dilución de 1:5000 con agitación a 4°C durante toda la noche. Después la membrana se lavó con TBS-T 0.15 M a temperatura

ambiente durante 15 min. Se eliminó el amortiguador y se lavó con TBS-T 1 M (NaCl 1 M, TRIS 50 mM, Tween 0.1%) a la temperatura ambiente durante 15 min y se eliminó el amortiguador. Finalmente se lavó por tercera vez con TBS-T 0.15 M a la temperatura ambiente durante 15 min. Al terminar los lavados se agregó el anticuerpo secundario anti-IgG de carnero obtenido en conejo (# CAT. 81-1620 de ZYMED) a una dilución de 1:5000 en TBS-T 0.15 M y leche al 5%. La incubación se realizó a la temperatura ambiente durante 2 h. Después de la incubación las membranas se lavaron 3 veces a la temperatura ambiente. Para el primer lavado se usó TBS-T 0.15 M durante 15 min, para el segundo TBS 1 M durante 15 min y para el último TBS-T 0.15 M durante 15 min. El revelado de las membranas se llevó a cabo en el cuarto oscuro. Se humedecieron con la mezcla de ECL de AMERSHAM BIOSCIENCES (# CAT. RPN2106), se colocaron dentro de un cassette, se cubrieron con *plastipack*, se apagó la luz y se colocó sobre la membrana una película de auto-radiografía marca KONICA MINOLTA (# CAT. 21943), exponiéndose durante 3 min. Posteriormente se colocó la película en el líquido revelador GBX de KODAK (# CAT 190 0943), se lavó en agua unos segundos y se colocó en el líquido fijador GBX de KODAK (# CAT. 190 1859). Se enjuagó en agua y se dejó escurriendo.

5.1.14 LAVADO DE LA MEMBRANA PARA ELIMINAR ANTICUERPOS.

Se colocó la membrana en amortiguador de lavado (2-mercaptoetanol 100 mM, SDS 2%, Tris-HCL 62.5 mM pH 6.7) y se incubó a 50°C durante 30 min en agitación. Posteriormente, la membrana se lavó con TBS-T 0.15 M a temperatura ambiente durante 15 min y se repitió la operación con otro anticuerpo.

6 RESULTADOS

6.1 ELECCION DE LAS REGIONES IRES

Con la finalidad de elegir los fragmentos de la región 5'UTR del RNAm *Hsp101* de maíz a los que se les estimaría la actividad de IRES, y dado que no existe una regla para elegir cuales nucleótidos deben ser deletados, para poder identificar la región funcional dentro de la secuencia 5'UTR, primero se obtuvieron las estructuras secundarias de los fragmentos IRES *Hsp101*. A la primera región se le retiraron dos nucleótidos (hsp101 Δ 2) y a las siguientes de de está se le retiraron progresivamente 3 nucleótidos (hsp101 Δ 5, hsp101 Δ 8, hsp101 Δ 11, hsp101 Δ 14, hsp101 Δ 17, hsp101 Δ 20, hsp101 Δ 23, hsp101 Δ 26, hsp101 Δ 29, hsp101 Δ 32, hsp101 Δ 35, hsp101 Δ 38, hsp101 Δ 41, hsp101 Δ 44, hsp101 Δ 47 y hsp101 Δ 50), estas secuencias fueron introducidas en el programa Mfold (<http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/rna-form1.cgi>), utilizándolo las condiciones establecidas. Las estructuras secundarias obtenidas se encuentran en el ANEXO en donde se pueden observar las alteraciones graduales en dichas estructuras al hacerles los cortes (Fig. 11 a 14, 33 a 47). Hay varios reportes que mencionan que es más importancia para la función de los IRES la estructura secundaria que poseen, más que su secuencia (Martínez-Salas *et al.* 2002; Fernández-Miragall *et al.* 2003; Martínez-Salas *et al.* 2005), por lo cual, se eligieron los fragmentos de las secuencias que generaron un mayor cambio en la estructura secundaria hipotética en comparación con la estructura secundaria hipotética de pBIC-5 (Fig. 11 a 14), la cual se ha comprobado que posee actividad IRES iniciando la traducción de manera independiente de *cap* (Dinkova *et al.* 2005). A continuación se muestran la elección de las estructuras secundarias hipotéticas que se forman cuando se les retira parte de la secuencia 5'.

La secuencia denominada pBIC-5 muestra la región 5'UTR de la secuencia nucleotídica de *Hsp101* (Fig. 10), su tamaño es de 206 nts y su ΔG correspondiente es de -41.64 Kcal/mol. Esta construcción posee 60 nts extras río arriba los cuales no pertenecen a la región 5'UTR propiamente dicha.

En el siguiente esquema (Fig. 10) se muestra la secuencia de nucleótidos de la región 5'UTR del RNAm *Hsp101* del maíz. Las flechas indican el primer nucleótido de cada construcción, así como, la nomenclatura correspondiente. Ya realizada la elección se diseñaron los oligonucleótidos específicos para hacer las amplificaciones de las regiones seleccionadas, que posteriormente fueron insertadas en pGEM.

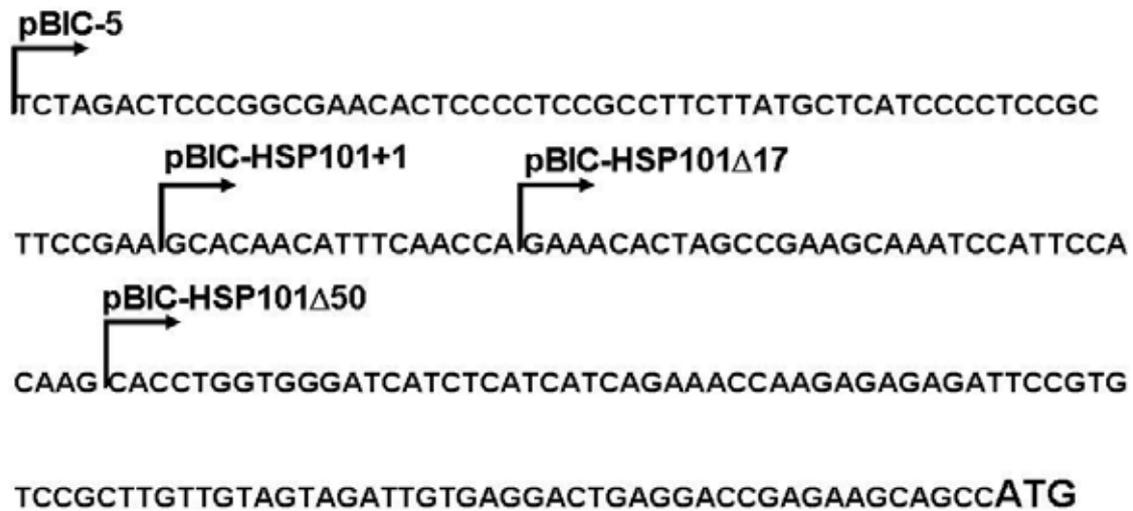


Figura 10: Secuencia de la región 5'UTR del RNAm de *Hsp101* de maíz. Las flechas muestran en qué nucleótido inicia cada fragmento seleccionado para identificar la secuencia funcional de este IRES.

Se tomó la estructura pBIC-5, como control ya que en trabajos anteriores (Dinkova *et al.* 2005) se comprobó que posee actividad de IRES. Esta región contiene 206 nts y forma una estructura secundaria de tipo "Y" la cual contiene varios loops y tiene un ΔG de -41.64 Kcal/mol, según el programa Mfold (Fig. 11).

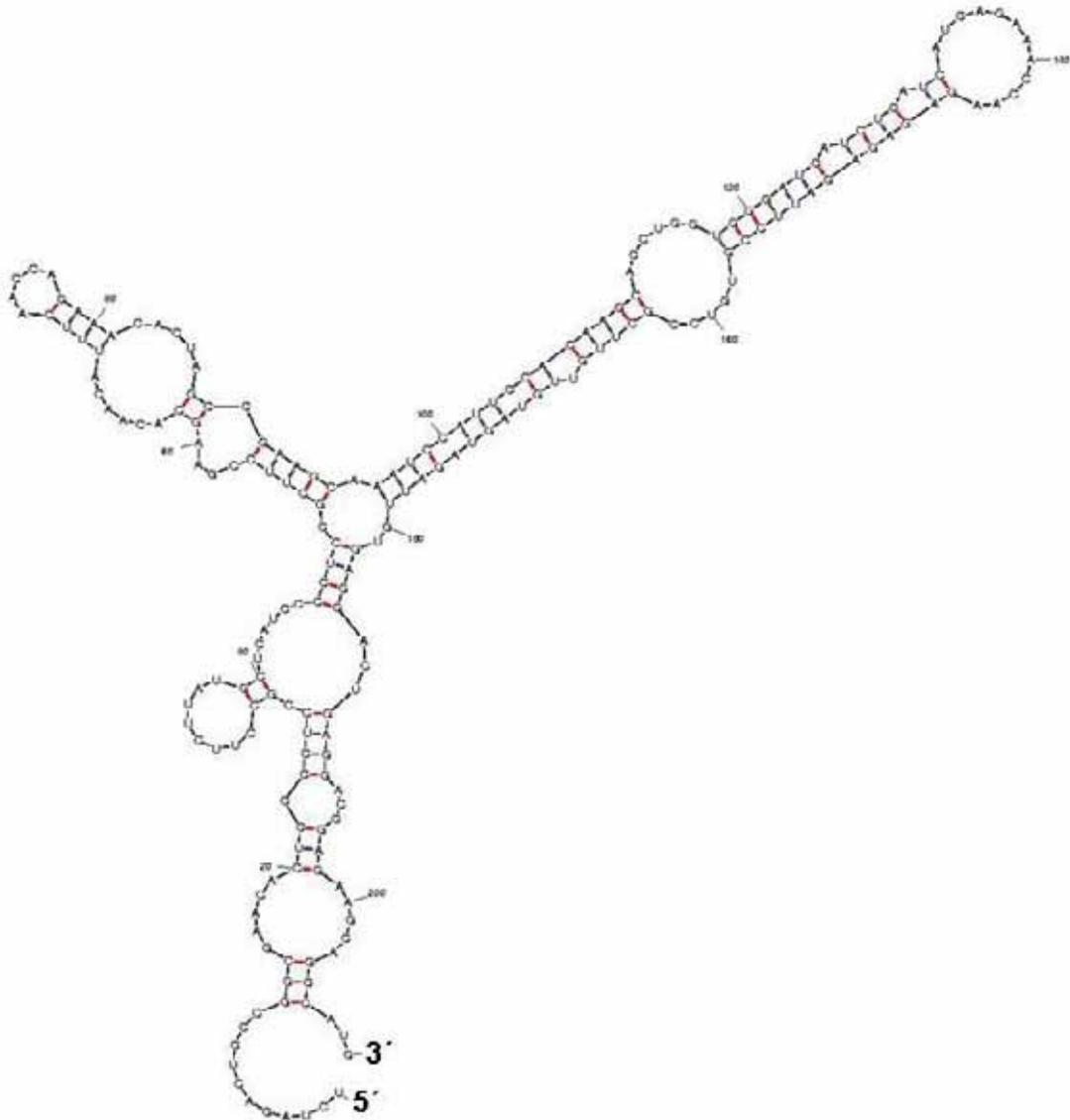


Figura 11: Estructura secundaria del IRES de la región 5' UTR del RNAm *Hsp101*. Esta región de 206 nucleótidos, tiene 60 nts (subrayados y en negritas) adicionales río arriba del sitio +1 de la transcripción (Fig. 10). El ΔG correspondiente es de -41.64 Kcal/mol.

La secuencia *Hsp101+1* contiene la región 5'UTR del RNAm de *Hsp101* (Fig. 10). Esta región tiene un tamaño de 146 nts y forma una estructura secundaria sencilla de tallo la cual contiene tres loops y un pequeño tallo-hasa en el extremo 5' y su ΔG correspondiente es de -27.07 Kcal/mol. La estructura pBIC-*Hsp101+1*, comprende toda la secuencia de la región 5'UTR sin los 60 nts extras que posee la secuencia pBIC-5 (Fig.12).



Figura 12: Estructura secundaria del fragmento *Hsp101+1* que consta del 5'UTR completo del RNAm *Hsp101* (sin los 60 nts sobrantes), con un tamaño de 146 nucleótidos. Su ΔG es de -27.07 Kcal/mol.

La secuencia *hsp101Δ17* es un fragmento de *Hsp101+1* al cual se le retiraron 17 nucleótidos del extremo 5' (Fig. 10). *pBIC-hsp101Δ17* tiene una estructura secundaria similar a *pBIC-hsp101+1*, formada por un tallo con 2

loops y sin el pequeño tallo-hasa de pBIC-*hsp101+1* Esta región contiene 129 y su ΔG es de -27.5 Kcal/mol (Fig. 13).

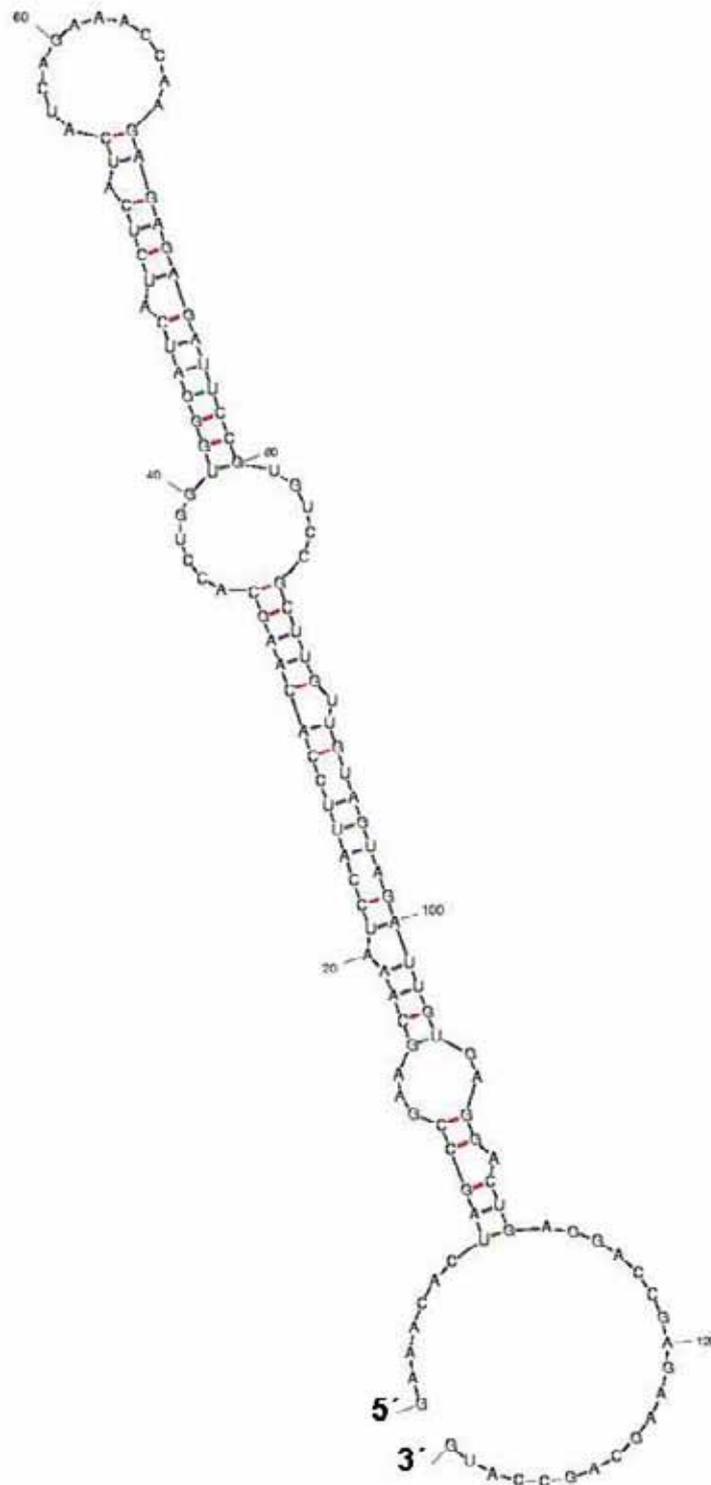


Figura 13: Estructura secundaria del fragmento *hsp101Δ17* que contiene 129 nucleótidos de la región 5'UTR y una ΔG de -27.5 Kcal/mol.

Por último se muestra la secuencia *hsp101Δ50*, que corresponde a un fragmento *Hsp101+1* al cual se le retiraron 50 nucleótidos (Fig. 10). La

estructura de pBIC-*hsp101*Δ50 tiene un tamaño de 96 nts y forma una estructura secundaria de tipo “Y inclinada”, la cual contiene 3 loops y su ΔG es de -18.98 Kcal/mol (Fig. 14).

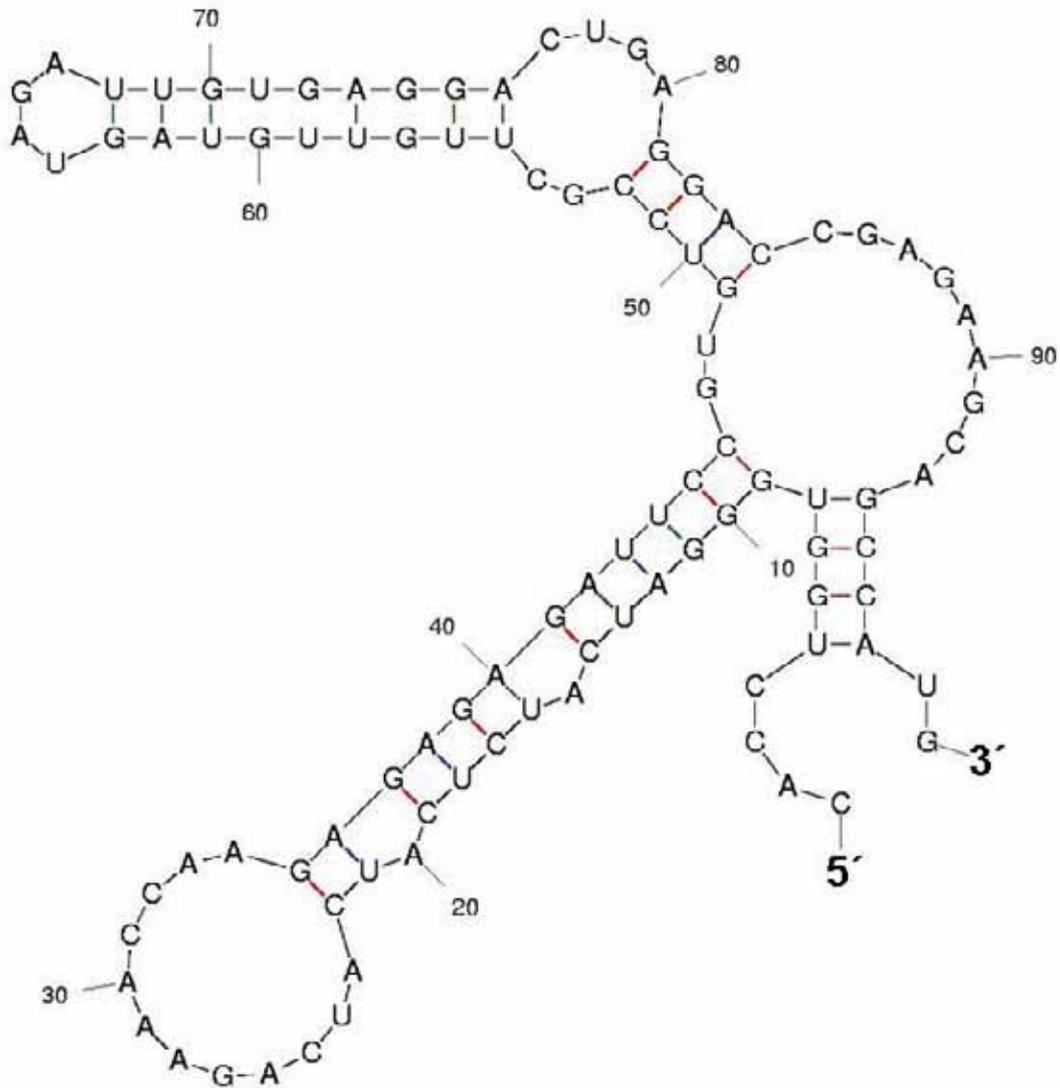


Figura 14: Estructura secundaria del fragmento *hsp101*Δ50 que contiene 96 nucleótidos de la región 5'UTR y una ΔG de -18.98 Kcal/mol.

6.2 PCR DE REGIONES ESPECÍFICAS DEL 5' UTR DEL RNAm *Hsp101*

En la figura 15 se muestran el inicio de las secuencias de los productos de la amplificación que se obtuvieron por medio de PCR de los fragmentos *Hsp101+1* con 146 nts, *hsp101*Δ17 con 129 nts y *hsp101*Δ50 con 96 nts. En la

secuenciación se observó que estas secuencias corresponden a los tamaños esperados

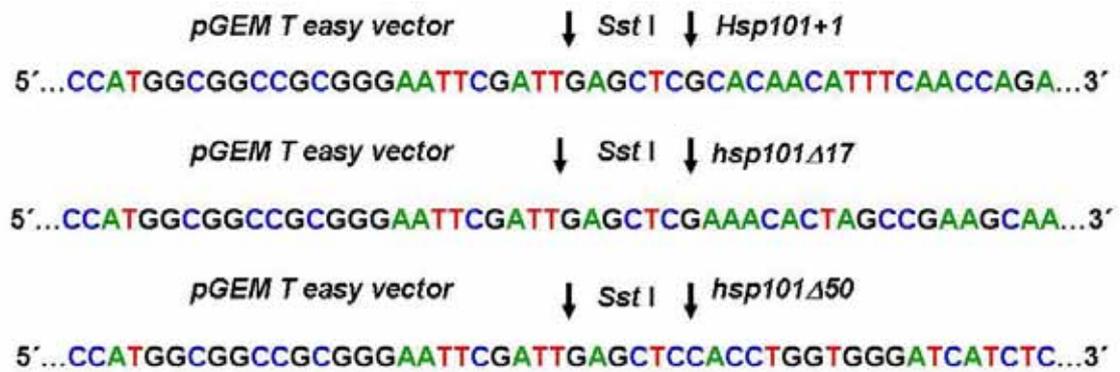


Figura 15: Fragmentos de las secuencias de las regiones amplificadas de las regiones del 5'UTR de *Hsp101* por medio de PCR. Se muestra el final del vector de pGEM, la secuencia que reconoce la encima Sst I y el inicio del fragmento de Hsp101+1, hsp101Δ17 y hsp101Δ50

Posteriormente cada banda fue purificada por separado para insertarla en el plásmido pGEM-T Easy, como se menciona a continuación.

6.3 CLONACIÓN EN EL VECTOR pGEM-T EASY

Las bandas correspondientes a los fragmentos de la región 5'UTR de *Hsp101* (Fig. 15) se cortaron y se purificaron por separado (ver Material y Métodos) y cada uno de los fragmentos se insertó dentro del plásmido pGEM. En la siguiente imagen (Fig. 16) se muestra el esquema circular de este plásmido, mostrando el detalle del *polylinker* donde fueron insertados los fragmentos de *Hsp101*. Este sitio interrumpe al gen *LacZ* que codifica a la β-galactosidasa por lo cual un inserto en la región produciría colonias blancas en presencia de Xgal e IPTG.

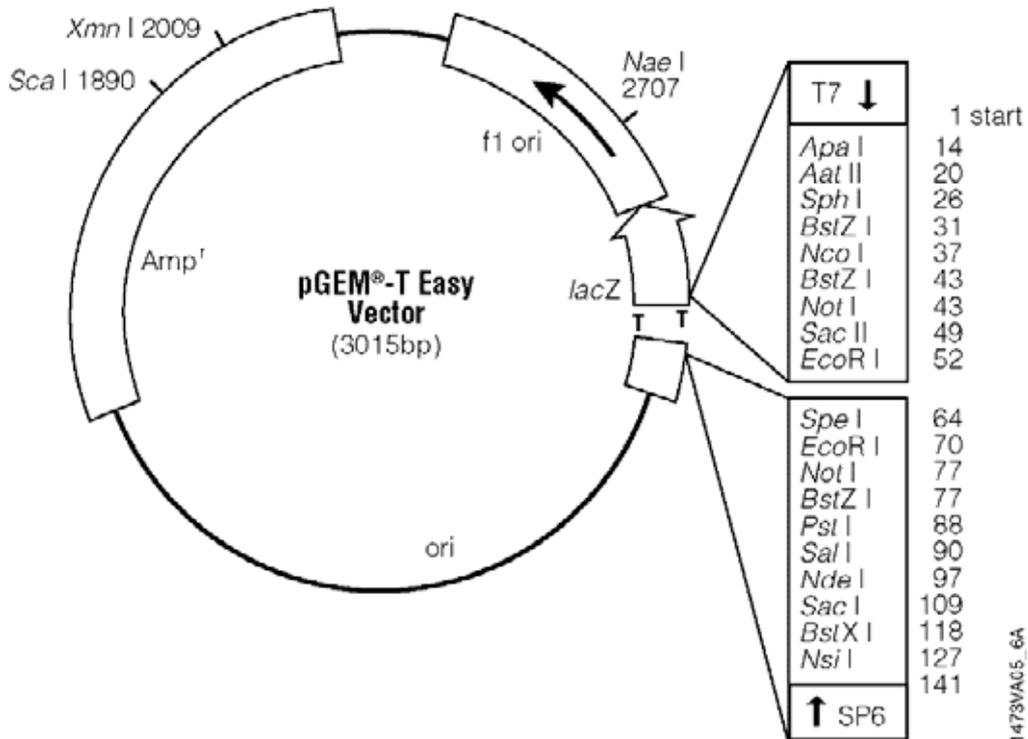


Figura 16: Mapa del vector de clonación pGEM-T EASY donde se muestra el “polylinker” en donde fueron insertados los fragmentos del IRES *Hsp101*. Se muestra el sitio de reconocimiento para las polimerasas de RNA T7 y SP6.

Los plásmidos recombinantes obtenidos fueron *Hsp101+1*, *hsp101Δ17* y *hsp101Δ50*. Estos plásmidos posteriormente se utilizaron para transformar células de *E. coli* (ver Material y Métodos) y las transformantes obtenidas fueron crecidas en un medio que contenía ampicilina, Xgal e IPTG y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

6.4 PCR DE LAS TRANSFORMANTES DE pGEM + FRAGMENTOS DE IRES

Después de la incubación de las células tratadas, se seleccionaron las transformantes con inserto al elegir las colonias blancas. Se purificaron los plásmidos por mini prep y con estos se realizó un PCR para confirmar si poseían el inserto del fragmento de *Hsp101* deseado dentro de pGEM.

En la figura 17 se muestra la amplificación que se obtuvo por medio de PCR del plásmido de pGEM*Hsp101+1*, demostrando que sí se insertó el fragmento deseado (carriles 1 a 7) Se utilizó a pBIC-5 como control positivo para amplificar el fragmento pGEM*Hsp101+1* (carril 8). Se seleccionó a la clona del carril 1 para continuar el trabajo.

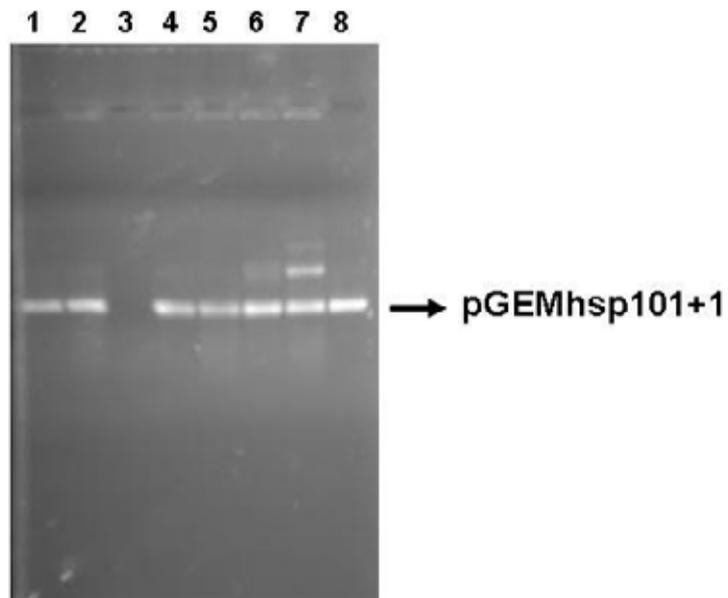


Figura 17: Productos de la reacción de PCR con DNA de las transformantes de *pGEMhsp101+1*. Carriles 1 al 7, cepas problemáticas; carril 8, control de la construcción pBIC-5.

En la figura 18 se muestran los productos de la amplificación que se obtuvieron por medio del PCR de las cepas transformadas con *pGEMhsp101Δ17*, observándose que sí se insertó el fragmento (carriles 1 a 7). Se utilizó a pBIC-5 como control positivo para amplificar el fragmento *pGEMhsp101Δ17* (carril 8). Se utilizó la clona del carril 1 para continuar el estudio.

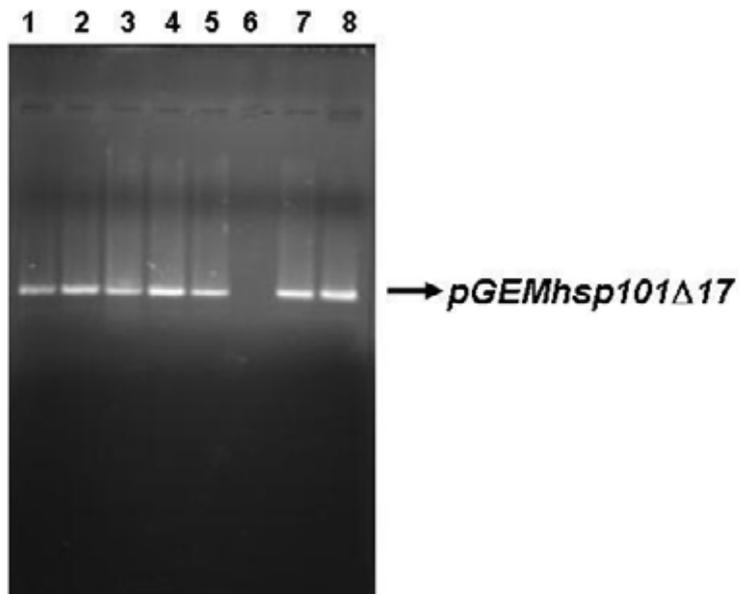


Figura 18: Productos de la reacción de PCR con DNA de las transformantes de *pGEMhsp101Δ17*. Carriles 1 al 7, cepas problemáticas; carril 8 control de la construcción pBIC-5.

En la figura 19 se muestra los productos de la reacción de PCR de las cepas transformadas con *pGEMhsp101Δ150*, demostrando que sí se insertó el

fragmento deseado (carriles 1 a 7) Se utilizó a pBIC-5 como control positivo para amplificar el fragmento pGEMhsp101Δ50 (carril 8). Se utilizó a la clona del carril 2 para continuar el trabajo.

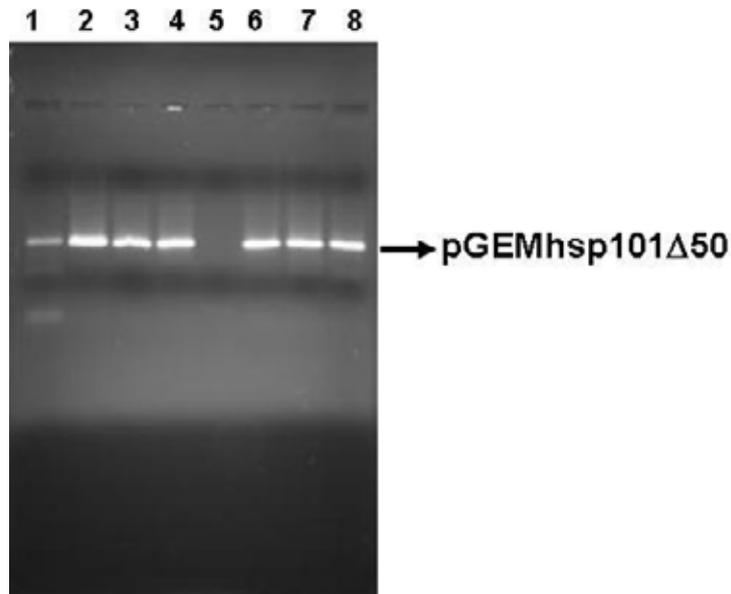


Figura 19: Productos de la reacción de PCR con DNA de las transformantes de pGEMhsp101Δ50. Carriles 1 al 7, cepas problemáticas; carril 8, control de la construcción pBIC-5.

6.5 CLONACIÓN EN pBIC

Para la clonación de los fragmentos IRES de *Hsp101* en pBIC fue necesario retirar el IRES del virus de la fiebre aftosa (FMDV), que se encontraba dentro de este plásmido para ser sustituido por las regiones IRES de *Hsp101*. La figura 20 representa el intercambio del IRES de FMDV por los fragmentos del IRES de *Hsp101*.

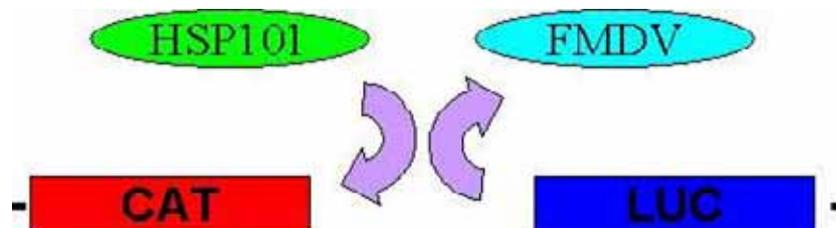


Figura 20: Representación esquemática de la clonación en el vector bi-cistrónico de expresión (pBIC) en el cual sale el IRES FMDV y entran los IRES de *Hsp101*.

En la figura 21 se muestra la representación esquemática de la construcción de los plásmidos recombinantes entre pBIC y los fragmentos del IRES de *Hsp101*.

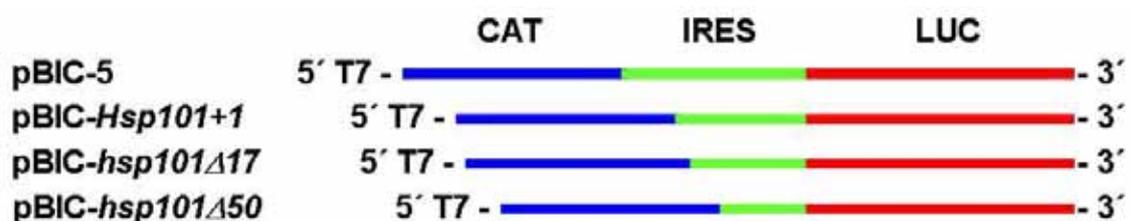


Figura 21: Representación esquemática de las construcciones bi-cistronicas. El plásmido pBIC-5 fue utilizado como control positivo. Las construcciones problema fueron insertadas entre la secuencia de los genes reporteros en el sentido del marco de lectura abierto de *Hsp101*.

No hay un marcador que nos diga cuales fueron las colonias transformantes que capturaron la construcción pBIC + fragmentos IRES de *Hsp101*, por lo que para identificarlas, se tomaron muestras de cepas al azar y se realizó una reacción de PCR con los plásmidos recombinantes y los oligonucleótidos específicos de cada construcción, y se mandaron a secuenciar para identificar que estuvieran en dirección 5' a 3'.

En la figura 22 se muestra el PCR correspondiente a la construcción de pBIC-*Hsp101*+1. Los carriles 1 al 7 son de cepas problema y el carril 8 se cargó con la muestra pBIC-5 como control. Se eligió a la clona del carril 5 para continuar el trabajo.

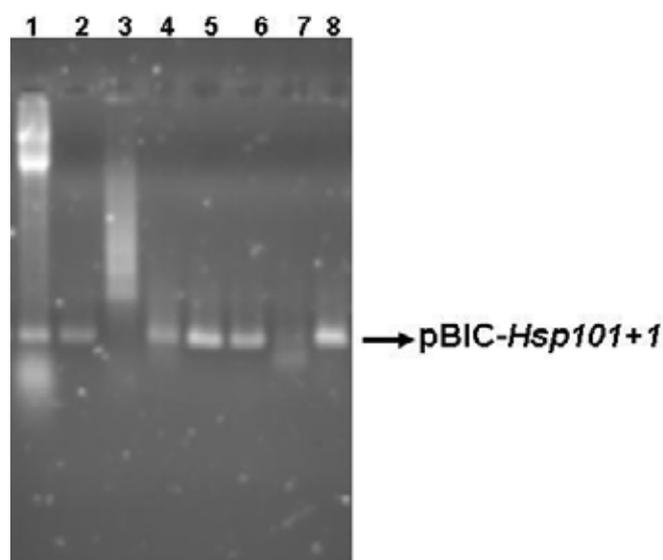


Figura 22: Se muestra la amplificación del inserto por PCR de las transformantes que tienen pBIC-*Hsp101*+1. Carril 1 al 7, cepas problema; carril 8, control con pBIC-5.

En la figura 23 se muestra el PCR correspondiente a la construcción pBIC-*hsp101*Δ17. Los carriles 1 al 7 son de cepas problema y el carril 8 contiene la muestra pBIC-5 como control. Se seleccionó a la clona del carril 3 para proseguir el estudio.

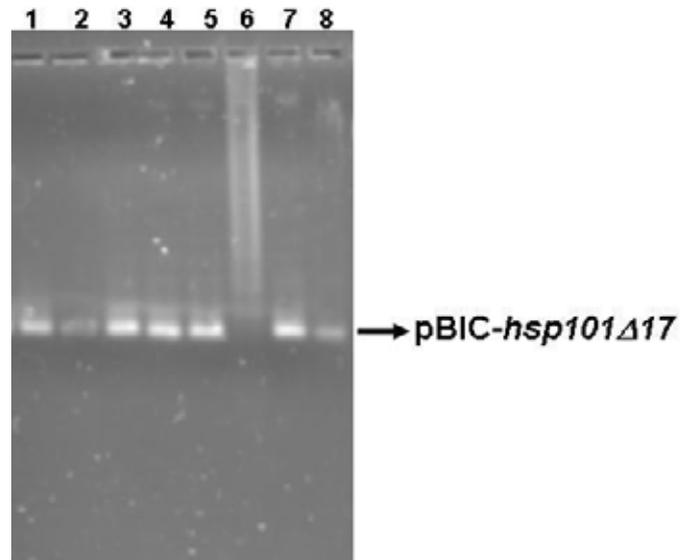


Figura 23: Se muestra el reconocimiento por PCR de las transformantes que tienen pBIC-*hsp101*Δ17. Carril 1 al 7 cepas problemas; carril 8, control con pBIC-5.

En la figura 24 se muestran los productos de la reacción de PCR correspondientes a la construcción de pBIC-*hsp101*Δ50. Los carriles 1 al 7 son de cepas problema y el carril 8 contiene la muestra pBIC-5 como control. Se utilizó a la clona del carril 5 para trabajar.

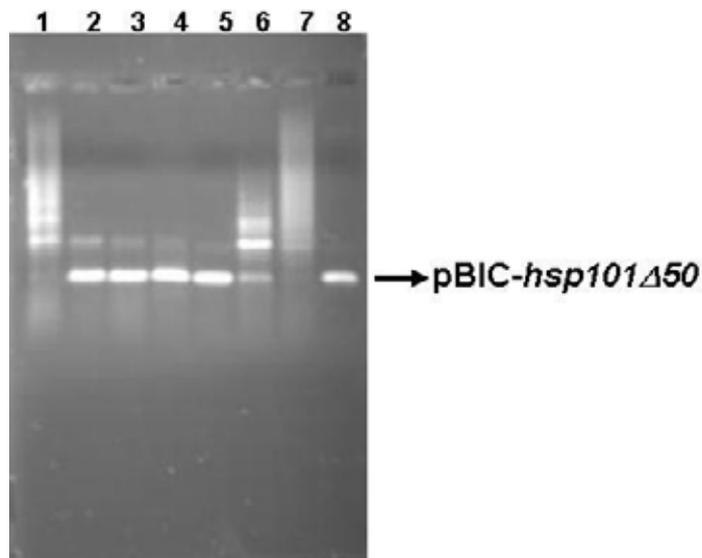


Figura 24: Se muestra el reconocimiento por PCR de las transformantes que tienen pBIC-*hsp101*Δ50. Carril 1 al 7, cepas problemas; carril 8, control con pBIC-5.

6.6 TRANSCRIPCIÓN *IN VITRO*

Para evaluar la funcionalidad como IRES de los plásmidos bi-cistrónicos, se linearizaron las construcciones pBIC-*Hsp101+1*, pBIC-*hsp101Δ17* y pBIC-*hsp101Δ50*, para después ser usados como molde para sintetizar el RNA utilizando a la polimerasa de RNA T7.

La figura 25 muestra los RNAm bi-cistrónicos recombinantes que fueron sintetizados, se aprecian las bandas correspondientes a los mensajes pBIC-*Hsp101+1*, pBIC-*hsp101Δ17* y pBIC-*hsp101Δ50*, (carril 1 al 4 respectivamente) y el mensaje para la proteasa lb (carril 5).

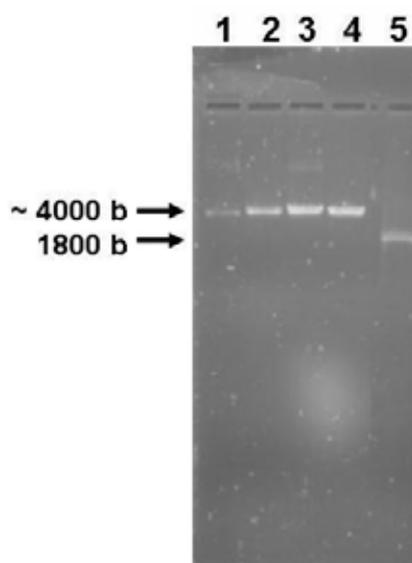


Figura 25: Se observa el resultado de la transcripción *in vitro* de los pBIC-recombinantes. Carril 1: pBIC-5, carril 2: pBIC-*Hsp101+1*, carril 3: pBIC-*hsp101Δ17*, carril 4: pBIC-*hsp101Δ50* y carril 5: lb proteasa.

6.7 TRADUCCIÓN *IN VITRO*

Los RNAs bi-cistrónicos que se sintetizaron anteriormente, se utilizaron para sintetizar proteínas de manera dependiente e independiente de *cap*, como se menciona en la sección de Material y Métodos.

Se realizaron 3 repeticiones de la traducción dependiente e independiente de *cap* de los RNAm. En la figura 26 se muestra la traducción de los mensajes bi-cistrónicos en donde se aprecian las bandas correspondientes

a la luciferasa (LUC) y a la cloranfenicol-acetil-transferasa (CAT) en la traducción dependiente de *cap* y las bandas de LUC y de la proteasa Lb en la traducción independiente de *cap*

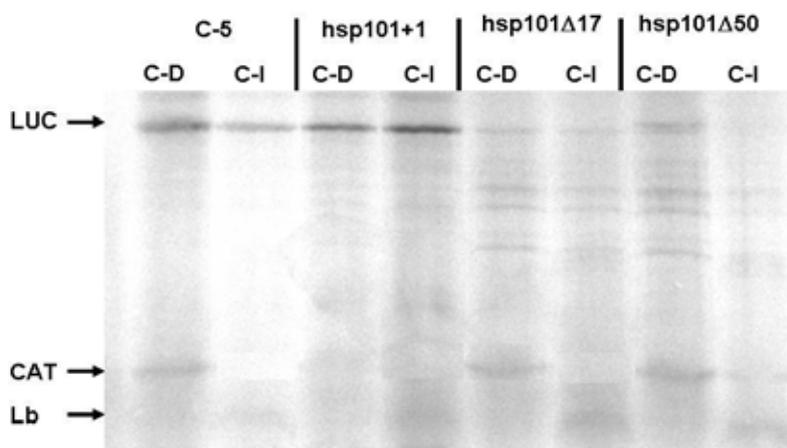


Figura 26: Se observa la traducción dependiente de *cap* (C-D) de los mensajes bi-cistronicos en el carril 1: pBIC-5 (control), en el carril 3: pBIC-*hsp101+1*, en el carril 5: pBIC-*hsp101Δ17*, en el carril 7: pBIC-*hsp101Δ50*. Los productos de las traducciones independientes de *cap* (C-I) se muestra en el carril 2: pBIC-5 (control): en el carril 4 pBIC-*Hsp101+1*, en el carril 6: pBIC-*hsp101Δ17* y en el carril 8: pBIC-*hsp101Δ50*.

Para comparar la eficiencia de las traducciones de las construcciones bi-cistronicas que tenían los distintos fragmentos del IRES de *Hsp101*, se cuantificaron sus productos (las proteínas CAT y LUC) por métodos densitométricos usando el programa *QUANTITY ONE* de BIO RAD. Los valores de la Tabla 1 muestran los resultados normalizados de la relación LUC/CAT teniendo como control al 100% el valor de pBIC-5.

	DEPENDIENTE DE CAP	DESVIACION ESTANDAR
pBIC-5	100.0	10.5
pBIC- <i>Hsp101+1</i>	78.1	9.0
pBIC- <i>hsp101Δ17</i>	18.6	3.2
pBIC- <i>hsp101Δ50</i>	29.5	2.3

Tabla 1: Valores normalizados de la relación de LUC/CAT en la traducción dependiente de *cap*.

En el siguiente histograma (Fig. 27) se observa cómo la traducción de la luciferasa dependiente de *cap* disminuye en 22%, 81% y 71% para pBIC-

Hsp101+1, pBIC-*hsp101Δ17* y en pBIC-*hsp101Δ50* respectivamente, con respecto al control pBIC-5.

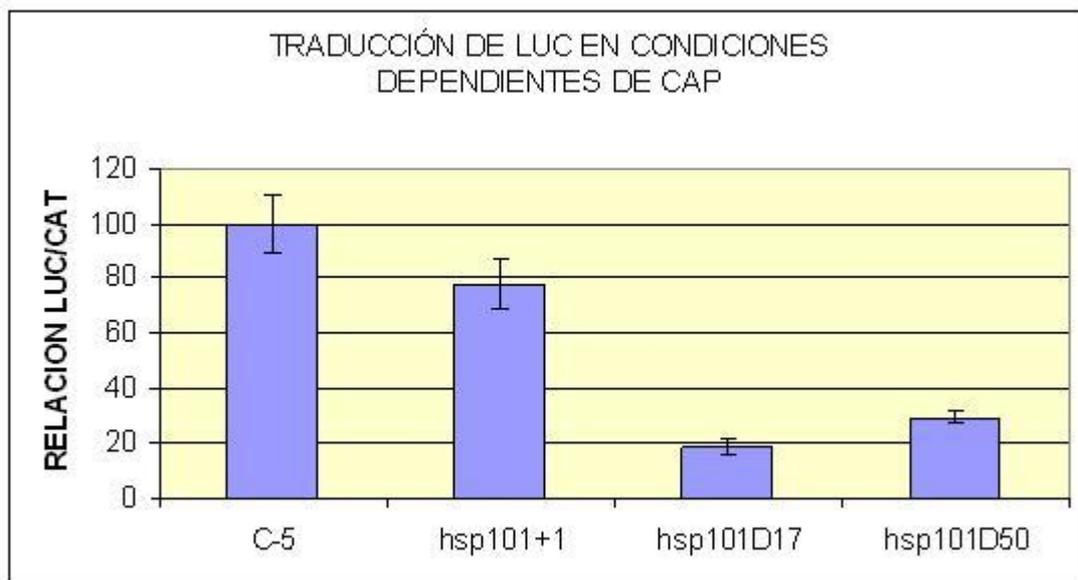


Figura 27: Histograma de la eficiencia relativa de la traducción dependiente de *cap* de las construcciones bi-cistrónicas

Los valores de la tabla 2 muestran los resultados normalizados de la traducción de LUC de manera independiente de *cap* teniendo como referencia a 100% que es el valor de pBIC-5.

	INDEPENDIENTE DE CAP	DESVIACION ESTANDAR
pBIC-5	100.0	19.5
pBIC- <i>Hsp101+1</i>	326.1	58.8
pBIC- <i>hsp101Δ17</i>	26.9	4.2
pBIC- <i>hsp101Δ50</i>	21.5	4.5

Tabla 2: Valores normalizados de la relación de LUC/CAT en la traducción dependiente de *cap*.

En el siguiente histograma (Fig. 28) se muestra la traducción independiente de *cap* donde las eficiencias de la traducción relativas a pBIC-5, fueron 3 veces mayores, cuatro veces menores y cinco veces menores para pBIC-*Hsp101+1*, pBIC-*hsp101Δ17* y pBIC-*hsp101Δ50* respectivamente. Los resultados indican que las construcciones pBIC-*hsp101Δ17* y pBIC-*hsp101Δ50*

ya no son funcionales. Por el contrario, pBIC-*Hsp101+1*, que tiene toda la región 5'UTR sin secuencias adicionales, se traduce mejor que pBIC-5 en condiciones independientes de *cap*.

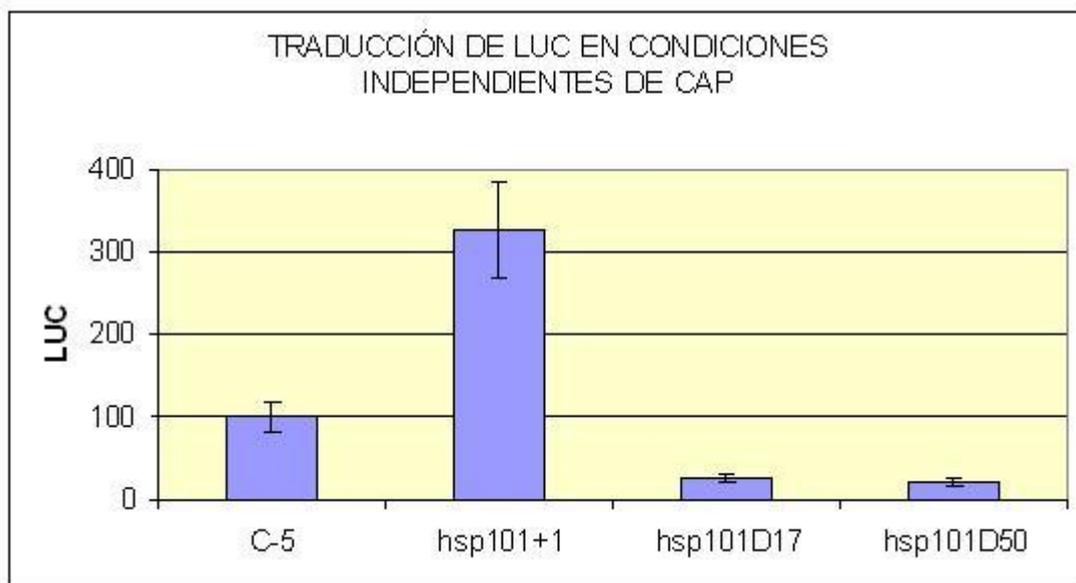


Figura 28: Histograma de la eficiencia de la traducción independiente de *cap* de las construcciones bi-cistrónicas

6.8 ENTRECruzamiento RNA-PROTEINA (UV CROSSLINKING) Y WESTERN BLOT

No se han propuesto modelos que indiquen el tipo de interacción que ocurre entre los factores de inicio de la traducción con los diversos IRES. Se quiso saber cuáles son los factores que específicamente intervienen en el inicio de la traducción del RNAm de *Hsp101*. Para este efecto se realizó un experimento de *UV-crosslinking* entre la región 5'UTR completa del RNAm *Hsp101* y las proteínas que intervienen en el proceso de iniciación de la traducción.

Para la realización del *UV-crosslinking* se sintetizó *in vitro* con la polimerasa de RNA T7, únicamente la región 5'UTR marcada con [³²P]-UTP. Para ello se utilizó el plásmido pGEM-*Hsp101+1* el cual fue linearizado con la enzima de restricción *SpeI* (Fig. 16).

El RNA marcado con [³²P]-UTP se mezcló en una solución de RRL, permitiendo la interacción del RNA con el extracto protéico, para después fijar los complejos con luz UV. Posteriormente se agregó RNAsa A para degradar el RNA que no estuviese protegido por las proteínas del extracto. Para llevar a cabo un estudio preliminar de las proteínas que podrían unirse al RNA se separó la reacción en geles de SDS-PAGE y se reconocieron las proteínas por medio de anticuerpos específicos.

En la figura 29 se muestra la flouorografía con los resultados de la interacción entre el sistema de lisado de reticulocitos de conejo y el transcrito de pBIC-5 y pBIC-*Hsp101+1* (bandas en los carriles 3 y 4). Como referencia se observa la migración del factor de inicio de la traducción eIF4A el cual fue identificado con un anticuerpo específico. Debido a que este factor tiene una migración similar a la proteína que forma el complejo con los RNA analizados, es un buen candidato de las proteínas que posiblemente se unan al 5' UTR del RNAm de *Hsp101* aunque no debemos descartar la posibilidad de que otras proteínas no identificadas y de tamaño similar se unan al IRES.

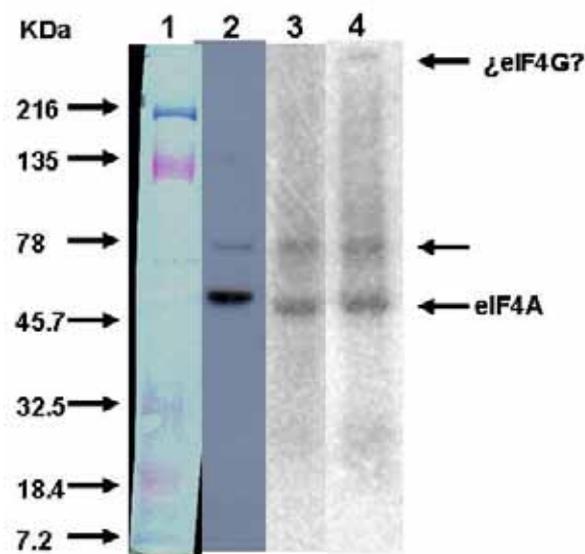


Figura 29: interacción RNA-PROTEINA. Carril 1: marcador peso molecular, carril 2: *western blot* con anticuerpo eIF4A1, carril 3: interacción de pBIC-5 con RRL, carril 4: interacción de pBIC-*Hsp101+1* con RRL.

Como el IRES del RNAm *Hsp101* es de maíz se quiso saber si se requieren los mismos factores en un sistema vegetal. Para esto se realizó un ensayo de entrecruzamiento con un extracto de germen de trigo. En la

flouorografía de la figura 30 se muestra la interacción entre el extracto del germen de trigo y el IRES de pBIC-5 y pBIC-*Hsp101+1* (carriles 3 y 4). También se observa la identificación del factor de inicio de la traducción eIF4A1, con un anticuerpo específico. La interacción entre los RNAs de los IRES pBIC-5 y pBIC-*Hsp101+1* con los componentes del germen de trigo, parecen ser más inespecífica, ya que se obtiene un mayor numero de bandas que cuando se realiza la interacción con RRL. Similarmente, el anticuerpo anti-eIF4A1 es muy inespecífico ya que no detecta exclusivamente a eIF4A1, como cuando se usa con el RRL, sino que aparece un mayor numero de bandas en el corrimiento del gel.

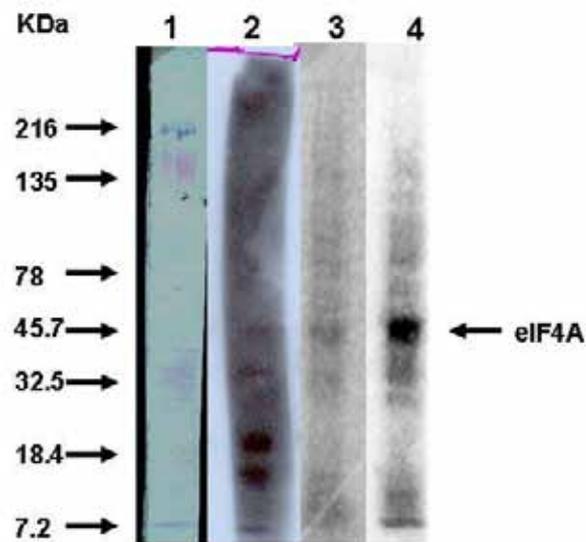


Figura 30: Interacción RNA-PROTEINA en el sistema de germen de trigo (WGE). Carril 1: marcador de peso molecular; carril 2: *western blot* con anticuerpo eIF4A1; carril 3: interacción de pBIC-5 con el WGE; carril 4: interacción de pBIC-*Hsp101+1* con el WGE.

7 DISCUSIÓN

Los IRES celulares no son similares ni en sus secuencias ni en sus estructuras secundarias, lo que dificulta delimitar cuál es la secuencia de la región 5'UTR que forma su región funcional. Para determinar la estructura de los RNAs, en especial de los IRES, se utilizan distintos procedimientos como por ejemplo: la cristalografía (Kieft *et al.* 2002), la resonancia magnética nuclear (Lukavsky *et al.* 2003; Phelan *et al.* 2004), las pruebas estructurales enzimáticas y químicas, así como los análisis mutacionales (Le Quesne *et al.* 2001). De igual manera, las posibles estructuras IRES pueden predecirse usando programas computacionales. El modelo actual sugiere que los IRES presentan patrones de apareamiento y plegamiento tridimensional que les permiten interactuar con los factores de inicio de la traducción. Diferentes secuencias de los UTR o de los microRNAs también forman estructuras secundarias muy estables que pueden confundirse con IRES, esto solo si en plantas los microRNAs se encuentran en el extremo 5'UTR de un gen. Por lo anterior los IRES putativos deben de ser validados experimentalmente por medio de las pruebas anteriormente mencionadas.

Un programa muy utilizado para predecir la estructura secundaria de los RNAs, se basa en un método comparativo el cual examina la covariación de varias secuencias homólogas para predecir la posición de la secuencia. Se considera a la covariación como el método más exacto de predicción de estructura secundaria, pero requiere de muchas secuencias con estructuras similares para hacer esto correctamente (Baird *et al.* 2006; Gutell *et al.* 2002). Este método para la predicción de estructuras terciarias a partir de secuencias primarias ha sido extensamente usado con los RNAr. La comparación de las estructuras secundarias de los RNAr y los datos cristalográficos de los ribosomas ha mostrado que los programas computacionales (<http://www.rna.icmb.utexas.edu/ANALISYS/COSB2002/>) que utilizan este método poseen una exactitud del 97%, al realizar una correlación con el Coeficiente de Correlación de Matthews (MCC), la cual se basa en comparar los falsos positivos y los falsos negativos de la estructura predicha computacionalmente y la obtenida de manera experimental (Gutell *et al.*

2002). A pesar de que este método tiene un alto el grado de exactitud, no puede ser utilizado para determinar la estructura secundaria de todos los IRES, ya que no hay reportadas muchas estructuras secundarias celulares y virales que permitan emplearlas para establecer un patrón de comparación.

En el caso de nuestro estudio con el IRES *Hsp101* y de otros IRES tanto celulares como virales, se utilizan otros métodos computacionales basados en predicciones termodinámicas de estabilidad de la estructura secundaria. Hay distintos programas que utilizan parámetros variables termodinámicos para predecir el apareamiento de las bases, la sobreposición de estos apareamientos y las contribuciones de los vecinos más cercanos, para calcular la estructura termodinámicamente más estable por el método de “energía libre mínima”. El programa más utilizado para predecir estructuras secundarias *de novo* es el Mfold, cuyo valor predictivo ha sido evaluado, tomando como ejemplo las subunidades ribosomales 16S y del 23S, obteniendo un promedio del 41% al ser analizado con el Coeficiente de Correlación de Matthews (Baird *et al.* 2006). El mismo programa, en comparación con el IRES del virus de la hepatitis C mostró una exactitud de 56% en su estructura secundaria con el mismo análisis (MCC) (Baird *et al.* 2006), Por lo tanto, aunque este programa (Mfold) no es tan exacto como el análisis de covarianza, sí nos permite dilucidar las estructuras secundarias que se forman en el RNA y se recomienda su uso ya que es la herramienta más exacta para predecir la estructura secundaria hipotética de los IRES *de novo*. Sin embargo, estas deben de ser corroboradas experimentalmente.

Los resultados del análisis con el programa Mfold de los fragmentos del UTR 5' del RNAm de *Hsp101* (Figuras 11 a 14) muestran variaciones tanto en sus estructuras secundarias como en los valores de ΔG . Se predice que la estructura secundaria más compleja es la de pBIC-5, mostrando una estructura tipo Y que es importante para la función en los IRES. Le y Maizal en 1997 obtienen esta conclusión al obtener estructuras tipo Y de manera bioinformática, al comparar los IRES de c-myc, Bip, y FGF. Sin embargo, se requiere de una comprobación experimental para asegurar que estas estructuras son funcionales. A diferencia del IRES pBIC-5, la estructura

secundaria de pBIC-*Hsp101+1* es más sencilla y está compuesta por una estructura de tallo-asa, parecida a la estructura de pBIC-*hsp101Δ17*. Incluso, ambas poseen un $-\Delta G$ muy similar (Fig. 12 y 13). A diferencia de estas construcciones la pBIC-*hsp101Δ50* (Fig. 14), al igual que pBIC-5, muestra una estructura parecida a Y, una ΔG de -18.98 Kcal/mol, que es menor al de las otras construcciones (pBIC-*Hsp101+1* y pBIC-*hsp101Δ17*). La construcción con la que se obtuvo la traducción independiente de *cap* más eficiente fue pBIC-*Hsp101+1*. Esto nos permite sugerir que los 60 nucleótidos extra de pBIC-5 estarían interfiriendo de una manera negativa con la funcionalidad del IRES de *Hsp101*. La construcción pBIC-*hsp101Δ17* es muy similar en estructura y en ΔG a pBIC-*Hsp101+1*. Pese a lo anterior, su eficiencia de traducción independiente de *cap* fué doce veces menor que la de pBIC-*Hsp101+1*. Este resultado demuestra que los 17 nucleótidos que se retiraron son indispensables para la eficiencia traduccional, independientemente de un cambio significativo en su estructura y estabilidad, por lo que el pequeño cambio hecho en la estructura de pBIC-*Hsp101+1* afecta de una manera negativa para el buen funcionamiento del IRES.

Si comparamos la eficiencia traduccional de pBIC-*hsp101Δ17* con la de pBIC-*hsp101Δ50* no hay un gran cambio en sus niveles de traducción independiente de *cap*, aunque sus estructuras secundarias (Fig. 13 y 14) y sus ΔG varíen mucho (-27.05 y -18.98, respectivamente). Los trabajos realizados con las regiones 5'UTR de *Hsp70*, tanto de *Drosophila* como de *Homo sapiens*, muestran un comportamiento similar al del 5' UTR de *Hsp101* ya que se requiere de la totalidad de sus secuencias 5'UTR para que sus IRES inicien la traducción de manera independiente de *cap*. Cuando se les retiran pequeñas secuencias, pierden del 75% al 95% de su funcionalidad (Rubtsova *et al.* 2003; Hernández *et al.* 2004). Lo anterior indica que las predicciones de estructura y/o de estabilidad de la molécula no bastan para predecir la funcionalidad de los IRES. Sin embargo, en el trabajo con *Hsp90* de *Drosophila* se muestra una estructura secundaria predicha con el mismo programa Mfold la cual posee una ΔG de -26.49 Kcal/mol, siendo una estructura sencilla formada por un tallo-asa. Este IRES puede amortiguar más eficientemente los cambios en su secuencia,

ya que al retirar la mitad del extremo UTR 5' la eficiencia de traducción independiente de *cap* disminuye en un 55% (Ahmed y Duncan 2004).

El mensaje de *hsp70* de humano además de traducirse de una manera dependiente de IRES, posee una secuencia que es complementaria con el ribosoma 18S (Yuhe y Schneider 2007), por lo cual puede unirse directamente a este IRES, lo que no se ha observado en los IRES de *Hsp70* y *Hsp90* de *Drosophila*, ni en el *Hsp101* de maíz.

Los trabajos realizados con los IRES de los RNAm de las proteínas HSP, anteriormente mencionados, permiten suponer que al ser de secuencias nucleotídicas cortas (100-150 nts), se requiere de la totalidad de su región 5'UTR para un buen inicio de la traducción. Las cuales podrían formar estructuras secundarias sencillas y altamente estables en donde los cambios mínimos de su estructura afectarían su funcionalidad.

A la fecha no se han descrito factores de inicio de la traducción o ITAFs que contribuyan a la funcionalidad del IRES de *Hsp101*, por lo que se realizó un entrecruzamiento entre este IRES y extractos protéicos de RRL y de WGE para identificarlos (Fig. 29 y 30). En el entrecruzamiento se demostró la interacción de los RNAs de las construcciones pBIC-5 y pBIC-*Hsp101+1* con una proteína cuyo peso molecular coincide con el eIF4A1, la helicasa del RNA. Además, pBIC-*Hsp101+1* también reconoció una proteína de alto peso molecular (220KDa), la cual podría ser eIF4G ya que coincide con su peso molecular. Esta proteína no es reconocida por pBIC-5, por lo que los 60 nucleótidos río arriba del 5'UTR de *Hsp101* podrían interferir con la interacción del IRES pBIC-5 y esta proteína la cual posiblemente es eIF4G. Esto también explicaría el aumento en la eficiencia en el inicio de la traducción de pBIC-*Hsp101+1* al interactuar directamente eIF4G con el IRES y reclutar la maquinaria traduccional más eficientemente.

La interacción de pBIC-5 y pBIC-*Hsp101+1* con el extracto de germen de trigo es inespecífica mostrando un perfil de unión más complejo con ambas construcciones. Sin embargo, una de las bandas observadas coincide con la de

eIF4A1 (Fig. 30), como ocurrió en el sistema de RRL (Fig. 29). No obstante, en el sistema WGE no se pudo distinguir la posible interacción con los factores eIF4G o eIFiso4G con pesos moleculares de 220 KDa y de 86 KDa respectivamente, como ocurrió en la interacción con RRL, en donde, se identificó una banda que posiblemente corresponda a eIF4G. Cuyo peso molecular es de 220 KDa, Aunque no fue reconocido por los anticuerpos, podríamos especular que posiblemente se trate de este factor por su pesos moleculares. Esto queda por demostrarse.

Cabe mencionar que los entrecruzamientos se realizaron con extractos proteicos que no fueron tratados con la Lb proteasa, la cual corta a eIF4G (Fig. 9) o empobrecidos en eIF4E para el caso de RRL, y de eIF4E y eIFiso4E para el caso de WGE (Browning 1996), por lo cual los resultados obtenidos en los entrecruzamientos son una mezcla de interacciones en condiciones dependientes e independientes de *cap*, por lo cual es necesario repetir los experimentos únicamente en condiciones independientes de *cap*.

¿Cómo es que el IRES del RNAm de *Hsp101* podría interactuar con los factores eIF4G y eIF4A1? Hay varios reportes que indican que los IRES interactúan con ambos factores de donde se puede inferir cómo podría ocurrir con *Hsp101*. Ciertos virus que poseen IRES producen proteasas que cortan al factor eIF4G (Fig. 9), inhibiendo a la traducción dependiente de *cap* (Haghighat *et al.*, 1996). Al ser cortado el eIF4G se pierden los sitios de interacción para eIF4E y PABP, en consecuencia el eIF4G solamente puede interactuar con eIF4A1 formando un complejo eIF4F inactivo. El IRES del EMCV requiere la región del núcleo de eIF4G junto con eIF4A (eIF4F inactivo) para formar el complejo 48S. Este complejo se une a un dominio JK del IRES del EMCV, siendo esta interacción necesaria para el inicio de la traducción. Además, eIF4A1 aumenta la afinidad de eIF4G por el IRES del EMCV, aumentando la eficiencia de la traducción (Lomakin *et al.* 2000). Varios picornavirus y otros virus, como el de la polio (PV) y el virus de la fiebre aftosa (FMDV), producen proteasas que cortan al eIF4G separando el sitio de interacción para eIF4E y la PABP del eIF4G, quedando los sitios de interacción

de eIF4A y eIF3. Los elementos IRES virales contienen secuencias altamente ordenadas en sus estructuras ya que estas son esenciales para su actividad.

Durante la fase G2/M los RNAm requieren poco o nada del factor eIF4F activo para el reclutamiento del ribosoma, algunos de los elementos IRES regulados en esta fase son el de la ornitina descarboxilasa, c-myc (Pyronnet *et al.* 2000) y la cinasa de proteínas p58 (Cornelis *et al.*, 2000) los cuales de igual manera pueden requerir eIF4F inactivo para su funcionamiento al igual que el IRES de *Hsp101*.

Durante la apoptosis, la caspasa 3 corta el eIF4GI en células apoptóticas de linfoma, generando un factor estable eIF4GI de 76 KDa al perder los sitios de unión para PABP y Mnk1, pero conservando los sitios para reconocer a eIF4A, eIF3 y eIF4E (Bushell *et al.*, 2000). De esta manera se puede iniciar la traducción de los RNAm que poseen IRES.

No se ha reportado cuáles son los factores requeridos por los IRES de *Hsp70* del humano ni de *Drosophila* para el inicio de la traducción, por lo que no podríamos anticipar qué otros factores podrían estar interaccionando con el RNAm de *Hsp101* para iniciar la traducción. En este trabajo proponemos que posiblemente eIF4A1 interacciona con el IRES *Hsp101*. Suponemos también que otra proteína que interacciona con el IRES *Hsp101*, probablemente sea eIF4G (Figura 29 y 30). Sin embargo, se necesitan realizar experimentos de secuenciación de las proteínas identificadas, para asegurar que se traten de los factores propuestos en este trabajo y experimentos de inmunoprecipitación para conocer si otros factores de inicio de la traducción o ITAFs participan en el inicio de la traducción de *Hsp101*. El RNAm de *Hsp70* de *Drosophila* aumenta su traducción en condiciones de estrés de calor y durante la apoptosis, formando complejos 43S, 48S y 80S (Hernández *et al.*, 2004). Se puede pensar que su IRES interacciona con eIF4A y eIF4G, sin hacerlo con eIF4E, ya que funciona en condiciones independientes de *cap*, que es cuando eIF4F se encuentra inactivo (sin eIF4E).

8 CONCLUSIONES

La estructura pBIC-5, contiene 60 nucleótidos adicionales al 5'UTR del RNAm de *Hsp101*, los cuales influyen de manera negativa en el inicio de la traducción independiente de *cap* de dicho mensaje.

Se requiere de la secuencia completa 5'UTR para que el inicio de la traducción independiente de *cap* del RNAm de *Hsp101* de maíz alcance la máxima eficiencia.

Existen proteínas que podrían interactuar con el IRES de *Hsp101* para el inicio de la traducción de manera dependiente ó independiente de *cap*, siendo buenos candidatos eIF4A y eIF4G.

Por lo anterior se propone el siguiente modelo (Fig. 31), con los posibles factores requeridos para que el IRES presente en el mensaje de *Hsp101* pueda iniciar la traducción de una manera independiente de *cap*.

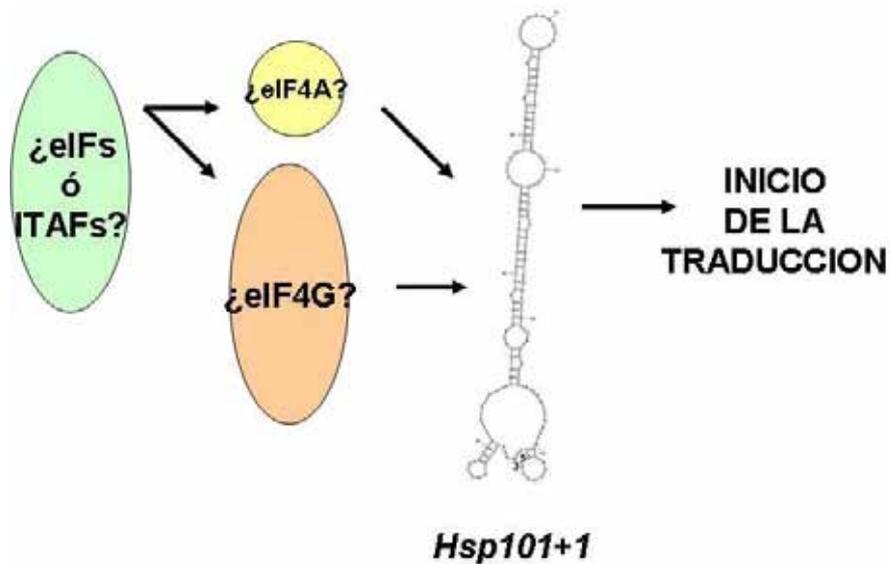


Figura 31: Modelo del inicio de la traducción de *Hsp101*. En el cual se requieren de la interacción directa de los factores eIF4A y eIF4G con el 5' UTR de *Hsp101*, y en donde posiblemente participen otros factores de inicio de la traducción y/o ITAFs que no interactúan directamente con el IRES pero sí con eIF4G y/o eIF4A para un óptimo inicio de la traducción de manera dependiente de *cap*.

9 PERSPECTIVAS

Al no ser exacta la predicción de la estructura secundario por medio de Mfold, se necesita obtener la estructura secundaria funcional del IRES *Hsp101+1*, de manera experimental, por lo que se requiere realizar pruebas como la Resonancia Magnética Nuclear (RMN), cristalografía con rayos X o pruebas enzimáticas con RNAsas para cadena sencilla o doble, con el fin de identificar qué nucleótidos del RNAm se encuentran apareados y cuáles no.

Otro aspecto que se requiere corroborar es si eIF4G y eIF4A son las únicas proteínas que se unen directamente al IRES *Hsp101+1* o hay otras de tamaños iguales que podrían estar uniéndose en condiciones independientes de *cap*, además, de saber cuáles son los factores de inicio de traducción y/o ITAFs que interaccionan con eIF4G y/o eIF4A y participan en la formación del complejo de inicio de la traducción independiente de *cap*.

También se necesita saber cuáles son las regiones o secuencias nucleotídicas del IRES *Hsp101+1* que interaccionan con eIF4G y eIF4A e identificar si éstas secuencias se encuentran conservadas en otros RNAs mensajeros pertenecientes a miembros de las proteínas de choque térmico.

10 BIBLIOGRAFIA

- Ahmed**, R. y **Duncan**, R. F. 2004. Translational regulation of Hsp90 mRNA: AUG-proximal 5'untranslated region elements essential for preferential heat shock translation. *J. Biol. Chem.* 26:49919-49930.
- Baird**, S. D., **Turcotte**, M., **Korneluk**, R. G. y **Holcik**, M. 2006. Searching for IRES. *RNA*. 12:1755-1785
- Belsham**, G. J. y **Jackson**, R. J. 2000. Translation initiation on picornavirus RNA en: *Translational Control of Gene Expression* (Sonenberg, N., Hershey, J. W. B., and Mathews, M. B., eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. pp. 869–900.
- Browning**, K. S. 1996. The plant translational apparatus. *Plant Mol. Biol.* 32:107-144
- Carter**, M. S., **Kuhn**, K. M. y **Sarnow**, P. 2000. Cellular internal Ribosome entry site elements and the use of cDNA microarrays in their investigation En: *Translational Control of Gene Expression* (Sonenberg, N., Hershey, J. W. B. y Mathews, M. B., eds), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY pp. 615–635
- Cobbold**, L. C., **Spriggs**, K. A., **Haines**, S. J., **Dobbyn**, H. H., **Hayes**, C., **de Moor**, C. H., **Lilley**, K. S., **Bushell**, M. y **Willis**, A. E. 2008. Identification of Internal Ribosome Entry Segment (IRES)-trans-Acting Factor for the Myc Family of IRES. *Mol. Cell. Biol.* 28: 40-49.
- Cornelis**, **Bruynooghe**, Y., **Denecker**, G., **Van Huffel**, S., **Tinton**, S. y **Beyaert**, R. 2000. Identification and characterization of a novel cell cycle-regulated internal ribosome entry site. *Mol. Cell.* 5:597-605.
- Costantino**, D. y **Kieft**, J. S. 2005. A preformed compact ribosome-binding domain in the cricket paralysis-like virus IRES RNAs. *RNA*. 11:332-343.
- Cuesta**, R., **Xi**, Q. y **Schneider**, R. J. 2000. Adenovirus-specific translation by displacement of kinase Mnk1 from cap-initiation complex eIF4F. *EMBO J.* 19: 3465–3474.
- Dinkova**, T. D., **Zepeda**, H., **Martínez-Salas**, E., **Martínez**, L. M., **Nieto-Sotelo**, J. y **de Jiménez**, E. S. 2005. Cap-independent translation of maize *Hsp101*. *Plant J.* 41(5):722-731.
- Dever**, T. E. 1999. Translation initiation: adept at adapting. *TIBS* 24: 398-403.
- Fernández-Miragall**, O. y **Martinez-Salas**, E. 2003. Structural organization of a viral IRES depends on the integrity of the GNRA motif. *RNA* 9:1333-1344.

- Gallie**, D. O. 2001. Cap-independent translation conferred by the 5' leader of tobacco etch virus is eukaryotic initiation factor 4G dependent. *J. Virol* 75(24):12141-12152.
- Gallie**, D. R. Caldwell, C. y Pitto, L. 1995. Heat shock disrupts cap and poly (A) tail function during translation and increases mRNA stability of introduced reported mRNA. *Plant Physiol.* 108:1703-1713
- Gan**, W., La Celle, M. y Rhoads, R. E. 1998. Functional characterization of the internal ribosome entry site of eIF4G mRNA. *J. Biol. Chem.* 273(9): 5006-5012
- Gingras**, A. C., Raught, B. y Sonenberg, N. 1999. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 913–963.
- Graber**, T. E. y Holcik, M. 2007. Cap-independent regulation of gene expression in apoptosis. *Mol. BioSyst.* 3:825-834.
- Gradi**, A., Imataka, H., Svitkin, Y. V., Rom, E., Raught, B., Morino, S. y Sonenberg, N. 1998. A novel functional human eukaryotic translation initiation factor 4G. *Mol. Cell. Biol.* 18: 334–342.
- Guttel**, R. R., Lee. J. C. y Cannone, J. J. 2002. The accuracy of ribosomal RNA comparative structure models. *Curr. Opin Structural Biol.* 12:301-310.
- Haghighat**, A., Svitkin, Y., Novoa, I., Kuechler., E., Skern, T. y Sonenberg, N. 1996. The eIF4G-eIF4E complex is the target for direct cleavage by the rhinovirus 2A proteinase. *J. Virol.* 70:8444-8450.
- Hellen**, C. U. y Sarnow, P. 2001. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev.* 15: 1593–1612.
- Hernandez**, G., Vázquez-Pianzola, P., Sierra, J. M. y Rivera-Pomar, R. 2004. Internal ribosome entry site drives cap-independent translation of reaper and heat shock protein 70 mRNAs in *Drosophila* embryos. *RNA.* 10:1783-1797.
- Hershey**, J. W. B. y Merrick, W. C. 2000. Pathway and mechanism of initiation of protein synthesis En: Sonenberg, N., Hershey, J. W. B., and Mathews, M. B., (eds), *Translational Control of Gene Expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY pp. 33–38
- Hinnebusch**, A. G. 2006. eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes. *Trends Biochem. Sci.* 31(10):553-562.
- Hinnebusch**, A. G. 2000. Mechanism and regulation of initiator methionyl-tRNA binding to ribosomes. Sonenberg, N. N., Hershey, J. W. B. y Mathews, M. B., (eds.). En *Translational Control of Gene Expression*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. NY, 185–243.

- Holcik**, M. y Korneluk, R. G. 2000. Functional characterization of the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) internal ribosome entry site element: role of La autoantigen in XIAP translation. *Mol. Cell. Biol.* 20: 4648-4657.
- Huez**, I., Creancier, L., Audigier, S., Gensac, M. C., Prats, A. C. y Prats, H. 1998. Two independent internal ribosome entry sites are involved in translation initiation of vascular endothelial growth factor mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 18: 6178-6190.
- Imataka**, H., Gradi A. y Sonenberg N. 1998. A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *Embo J* 17: 7480-7489.
- Jackson**, R. J. 2000. Comparative view of initiation site selection mechanisms En: Sonenberg, N., Hershey, J. W. B., and Mathews, M. B., (eds.), *Translational control of Gene Expression* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY pp. 127–183
- Joshi-Barve**, S., Benedetti, A. y de Rhoads, E. B. 1992. Preferential translation of heat shock mRNAs in HeLa cells deficient in protein synthesis initiation factors eIF-4E and eIF-4 gamma. *J. Biol. Chem.* 267(29):21038-21043.
- Kahvejian**. A., Roy. G, y Sonenberg N. 2001. The mRNA closed-loop model: The function of PABP and PABP-interacting proteins in mRNA translation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 66: 293-300.
- Kieft**. J. S., Zhou. K., Grech. A., Jubin, R. y Doudna, J. A. 2002. Crystal structure of an RNA tertiary domain essential to HCV IRES-mediated translation initiation. *Nature Structural Biol.* 5:371-374.
- Komar**, A. A, y Hatzoglo, M. 2005. Internal Ribosome Entry Site in cellular mRNA: Mystery of their existence. *J. Biol. Chem.* 25:23242-23428.
- Le**, S. Y. y Maizel, J. V. JR. 1997. A common RNA structural motif involved in the internal initiation of translation of cellular mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 25:362-369.
- LeFebvre**, A. K., Korneeva, N. L., Trutschl, M., Cvek, U., Duzan, R. D., Bradley, C. A., Hershey, J. W. y Rhoads, R. E. 2006. Translation initiation factor eIF4G-1 binds to eIF3 through the eIF3e subunit. *J. Biol. Chem.* 281:22917-22932
- Le Quesne**. J. P. C., Stoneley, M., Fraser, G. A. y Willis A. E. 2001. Derivation of Estructural Model for the c-myc IRES. *J. Mol. Biol.* 310:111-126.
- López de Quinto**, S., Lafuente, E. y Martínez-Salas, E. 2001. IRES interaction with translation initiation factors: Funtional characterization of novel RNA contacts with eIF3, eIF4B, and eIF4GII. *RNA* 7:1213-1226.

- Lomakin**, I. V., Hellen, C. U. T. y Pestova T. V. 2000. Physical Association of Eukaryotic Initiation Factor 4G (eIF4G) with eIF4A Strongly Enhances Binding of eIF4G to the Internal Ribosome Entry Site of Encephalomyocarditis Virus and Is Required for Internal Initiation of Translation. *Mol. Cell. Biol.* 16:6019-6029.
- Lukavsky**, P. J., Kim, I., Otto, G. A. y Puglisi, J. D. 2003. Structure of HCV IRES domain II determined by NMR. *Nature Structural Biol.* 12:1033-1038.
- Martínez-Salas**, E., López de Quinto, S., Ramos, R. y Fernández-Miragall, O. 2002. IRES elements: Features of the RNA structure contributing to their activity. *Biochim.* 84: 755-763.
- Martínez-Salas**, E., Ramos, R., La Fuente E. y López de Quinto, S. 2001. Functional interactions in internal translation initiation directed by viral and cellular IRES elements *J. General Virol*, 82: 973–984.
- Martínez-Salas**, E., Regalado, M. P. y Domingo, E. 1996. Identification of an essential region for internal initiation of translation in the aphthovirus internal ribosome entry site and implications for viral evolution. *J. Virol.* 70(2):992-998.
- Masutani**, M., Sonenberg, N., Yokoyama, S. y Imataka, H. 2007. Reconstitution reveals the functional core of mammalian eIF3. *EMBO J.* 26:3373-3383.
- Mathews**, M. B., Sonenberg, N. y Hershey, J. W. B. 2000. Origins and principles of translational control. En: Sonenberg N, Hershey J. W. B., Mathews MB (eds.) *Translational Control of gene expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, NY. 1-31.
- Mitchell**, S. A., Spriggs, K. A., Bushell, M., Evans, J. R., Stoneley, M., Le Quesne, J. P. C., Spriggs, R. V. y Willis, A. E. 2005. Identification of motif that mediates polypirimidine tract-binding protein-dependent internal ribosome entry. *Genes and Development.* 19:1556-1571.
- Nieto-Sotelo**, J., Kannan, K.B., Martínez, L.M. y Segal C. 1999. Characterization of a maize heat-chock protein gene, HSP101, encoding a ClpB/Hsp100 protein homologue. *Gene* 230: 187-195.
- [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(7):1621-33.
- Oltean**, S. y Banerjee, R. 2005. A B12-responsive internal ribosome entry site (IRES) Element in human methionine synthase *J. Biol. Chem.* 280(38):32662–32668.

- Pelletier**, J. y **Sonenberg**, N. 1988. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334: 320–325.
- Pestova**, T. V., **Shatsky**, I. N., **Fletcher**, S. P., **Jackson**, R. J. y **Hellen**, C. U. T. 1998. A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes and Development* 12:67-83.
- Pestova**, T. V., **Lomakin**, I. B., **Lee**, J. H., **Choi**, S. K., **Dever**, T. E. y **Hellen**, C. U. 2000. The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature*. 403 (67):332-335.
- Phelan**, M., **Banks**, R. J., **Conn**, G. y **Ramesh**, V. 2004. NMR studies of the structure and Mg²⁺ binding properties of a conserved RNA motif of EMCV picornavirus IRES element. *Nucleic Acids Res.* 32:201-209.
- Raught**, B., **Gingras**, A. C. Y **Sonenberg**, N. 2000. Regulation of ribosomal recruitment in eukaryotes. En: **Sonenberg**, N., **Hershey**, J. W. B. y **Mathews**, M. B. *Translational Control of Gene Expression* (eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 245-294.
- Richter**, J. D. y **Sonenberg**, N. 2005. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature*. 433: 477-480.
- Rubtsov**, M. P., **Sizova** D. V., **Dimitriev**, S. E. **Ivanov**, D. S., **Prassolov**, V. S. y **Shatsky**, S. N. 2003. Distinctive properties of the 5'-untranslated region of human Hsp70 mRNA. *J. Biol. Chem.* 278(25): 22350-22356.
- Sasaki**, J. y **Nakashima**, N. 2000. Methionine-independent initiation of translation in the capsid protein of an insect RNA virus. *Proc. Nat. Acad. Scie. USA* 97: 1512-1515.
- Schenborn**, E. T. 1998. Transcription in vitro using bacteriophage RNA polymerase. En: *methods in molecular biology: RNA Isolation and Characterization protocols* (Rapley, R. y Manning, D. L. eds.). New Jersey: Humana press Inc. 209-227
- Spriggs**, K. A., **Bushell**, M., **Mitchell**, S. A. y **Willis**, A. E. 2005. Internal ribosome entry segment-mediated translation during apoptosis: the role of IRES-trans-acting factors. *Cell Death Differ.*12:585-591.
- Stoneley**, M., **Chappell**, S. A., **Jopling**, C. L., **Dickens**, M., **MacFarlane**, M. y **Willis**, A. E. 2000. c-Myc protein synthesis is initiated from the internal ribosome entry segment during apoptosis. *Mol.Cell. Biol.* 20: 1162-1169.
- Stoneley**, M. y **Willis**, A. E. 2004. Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression. *Oncogene*. 23, 3200–3207

- Urwin.** P., Yi L, Martin. H., Atkinson H, y Gilmartin P. M. 2000. Funtional characterization of the EMCV IRES in plants. *Plant J.* 24(5): 583-589.
- Von der Haar.** T., Gross, J. D., Wagner, G. y McCarthy, J..E. 2004. The mRNA cap-binding protein eIF4E in post-transcriptional gene expression. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11: 503–511.
- Wilson,** J. E., Pestova, T. V., Hellen, C. U. T. y Sarnow, P. 2000. Initiation of protein synthesis from the A site of the ribosome. *Cell* 102: 511-520.
- Yueh,** A. y Schneider, R. J. 2007. Translational by ribosome shunting on adenovirus and hsp70 mRNA facilitated by complementarity to 18S rRNA. *Genes and development.* 14:414-421
- Zuker,** M. 2003. Mfold wed server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31:3406-3415

11 ANEXO

Estructuras secundarias predichas por el programa Mfold (Fig. 12 a 14, 33 a 47), de la región 5'UTR deletadas (ver Material y Métodos), de las cuales se eligieron a las secuencias pBIC-5 (Fig. 11), secuencia control, a la cual se le ha comprobado actividad IRES y posee una estructura en forma de "Y". También se eligió la secuencia HSP101+1 (Fig. 12), ya que no posee los 60 nucleótidos extras, que no pertenecen a la región 5'UTR de *hsp101* y posee una estructura en forma de tallo y hasa. Y se eligieron las secuencias *hsp*Δ17 (Fig. 13), que forma una estructura sencilla de tallo y hasa la cual es muy distinta a la estructura en forma de "Y" que tiene pBIC-5, y *hsp*Δ50 (Fig. 14), cuya estructura cambia de sencilla de tallo y hasa a una estructura más compleja en forma de "Y".

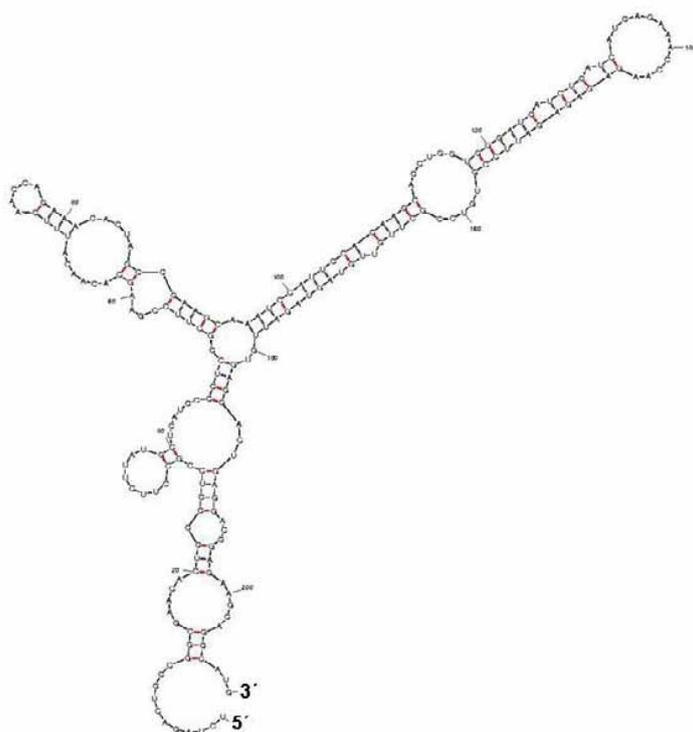


Figura 11: Estructura secundaria del IRES de la región 5' UTR del RNAm *Hsp101*. Esta región de 206 nucleótidos, tiene 60 nts (subrayados y en negritas) adicionales río arriba del sitio +1 de la transcripción (Fig. 10). El ΔG correspondiente es de -41.64 Kcal/mol

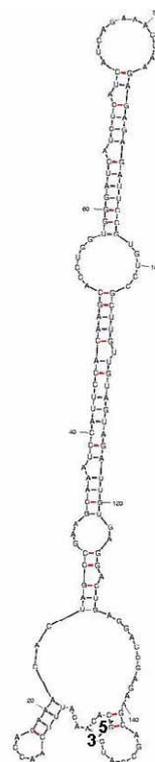


Figura 12: Estructura secundaria del fragmento *Hsp101+1* que consta del 5'UTR completo del RNAm *Hsp101* (sin los 60 nts sobrantes), con un tamaño de 146 nucleótidos. Su ΔG es de -27.07 Kcal/mol.



Figura 33: Estructura secundaria del fragmento *hsp101Δ2* que contiene 144 nucleótidos de la región 5'UTR y una ΔG de -27.90 Kcal/mol.



Figura 34: Estructura secundaria del fragmento *hsp101Δ5* que contiene 141 nucleótidos de la región 5'UTR y una ΔG de -27.90 Kcal/mol.



Figura 35: Estructura secundaria del fragmento *hsp101Δ8* que contiene 138 nucleótidos de la región 5'UTR y una ΔG de -27.60 Kcal/mol.

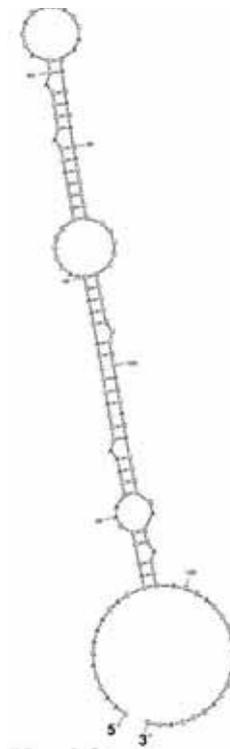


Figura 36: Estructura secundaria del fragmento *hsp101Δ11* que contiene 135 nucleótidos de la región 5'UTR y una ΔG de -27.50 Kcal/mol.

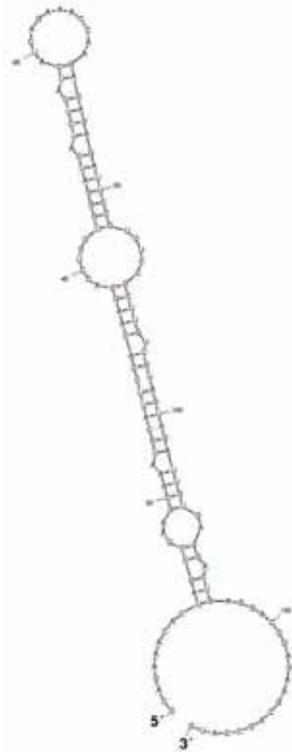


Figura 37: Estructura secundaria del fragmento *hsp101Δ14* que contiene 132 nucleótidos de la región 5'UTR y una ΔG de -27.50 Kcal/mol.

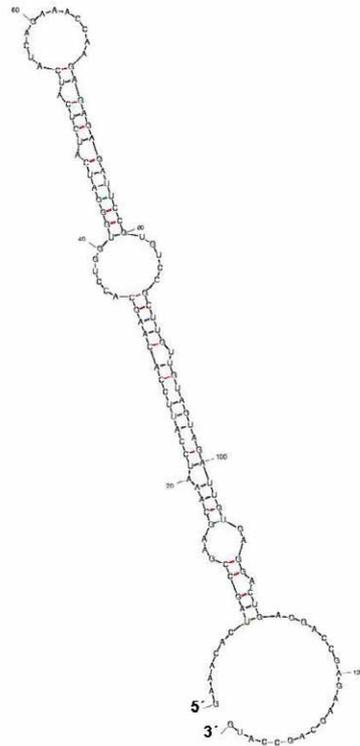


Figura 13: Estructura secundaria del fragmento *hsp101Δ17* que contiene 129 nucleótidos de la región 5'UTR y una ΔG de -27.50 Kcal/mol.

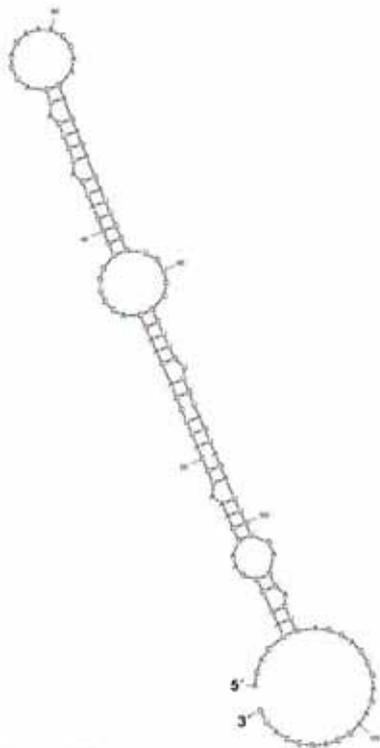


Figura 38: Estructura secundaria del fragmento *hsp101Δ20* que contiene 126 nucleótidos de la región 5'UTR y una ΔG de -27.50 Kcal/mol.

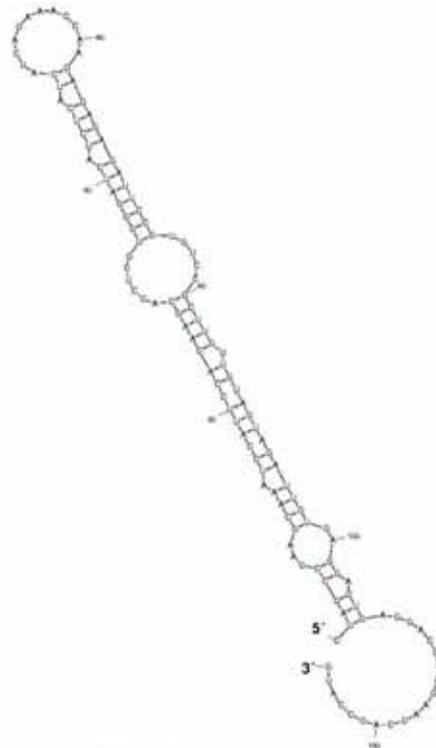


Figura 39: Estructura secundaria del fragmento *hsp101Δ23* que contiene 123 nucleótidos de la región 5'UTR y una ΔG de -27.50 Kcal/mol.

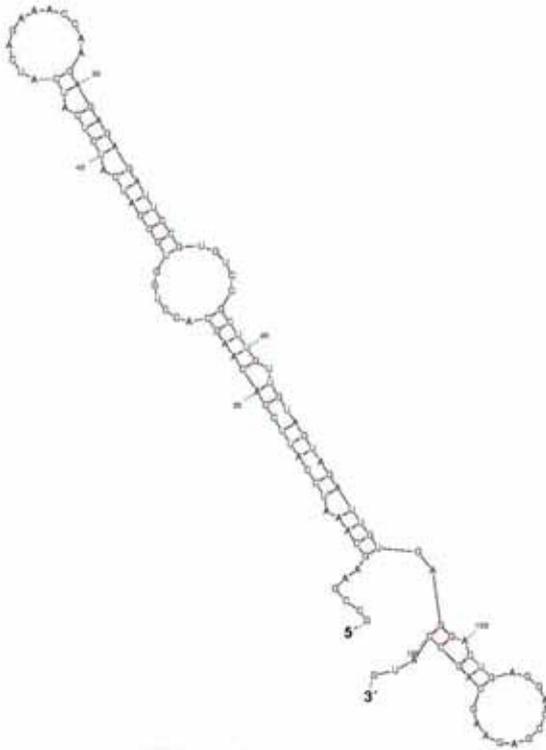


Figura 40: Estructura secundaria del fragmento *hsp101Δ26* que contiene 120 nucleótidos de la región 5'UTR y una ΔG de -26.0 Kcal/mol.

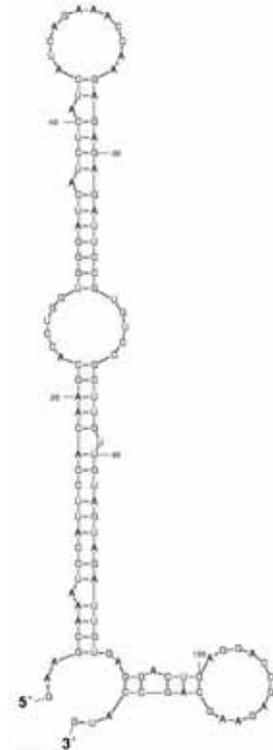


Figura 41: Estructura secundaria del fragmento *hsp101Δ29* que contiene 117 nucleótidos de la región 5'UTR y una ΔG de -26.0 Kcal/mol.

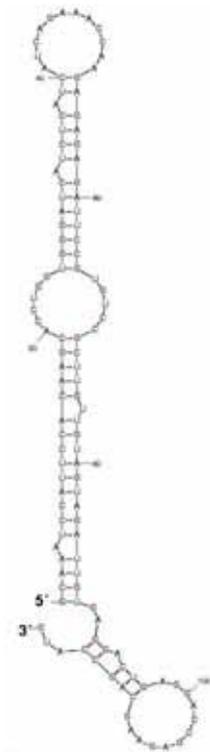


Figura 42: Estructura secundaria del fragmento *hsp101Δ32* que contiene 114 nucleótidos de la región 5'UTR y una ΔG de -25.70 Kcal/mol.



Figura 43: Estructura secundaria del fragmento *hsp101Δ35* que contiene 111 nucleótidos de la región 5'UTR y una ΔG de -24.90 Kcal/mol.

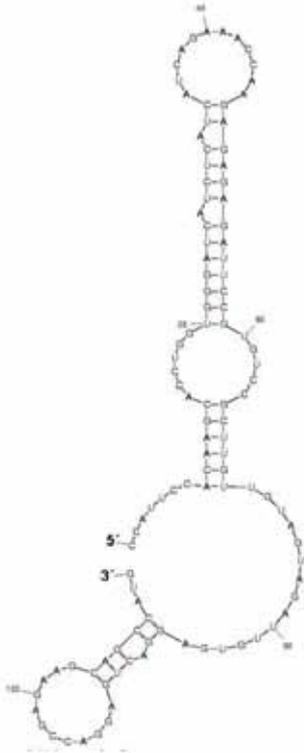


Figura 44: Estructura secundaria del fragmento *hsp101Δ38* que contiene 108 nucleótidos de la región 5'UTR y una ΔG de -22.10 Kcal/mol.

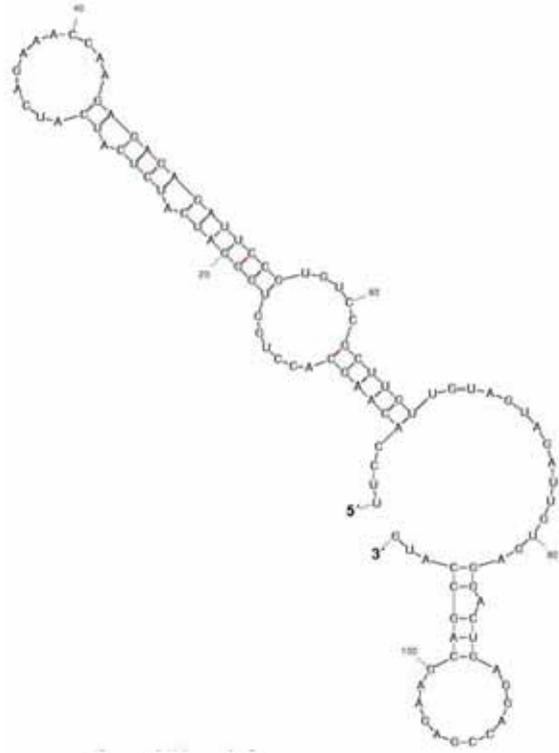


Figura 45: Estructura secundaria del fragmento *hsp101Δ41* que contiene 105 nucleótidos de la región 5'UTR y una ΔG de -22.10 Kcal/mol.

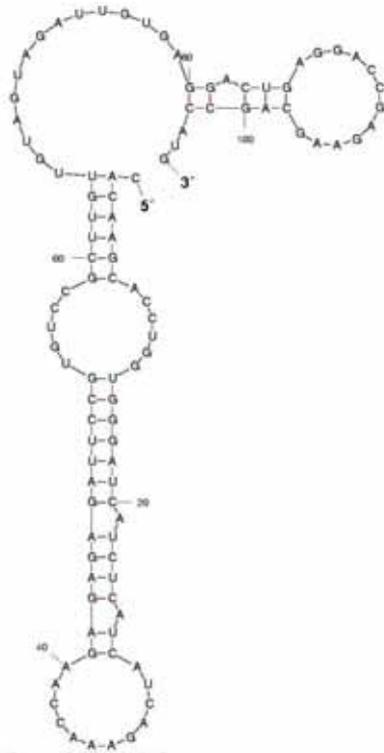


Figura 46: Estructura secundaria del fragmento *hsp101Δ44* que contiene 102 nucleótidos de la región 5'UTR y una ΔG de -22.10 Kcal/mol.

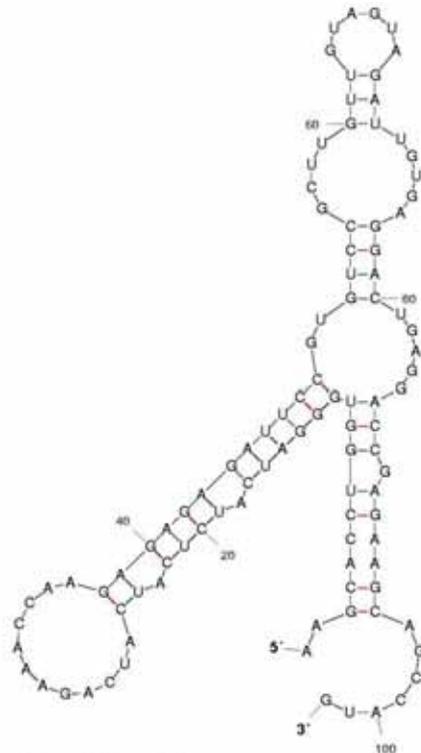


Figura 47: Estructura secundaria del fragmento *hsp101Δ47* que contiene 99 nucleótidos de la región 5'UTR y una ΔG de -20.33 Kcal/mol.

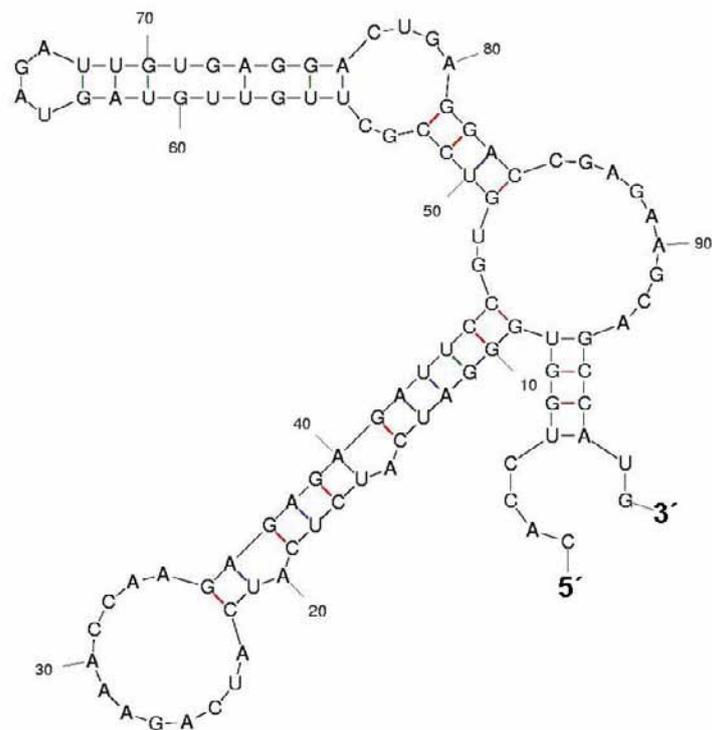


Figura 14: Estructura secundaria del fragmento *hsp101Δ50* que contiene 96 nucleótidos de la región 5'UTR y una ΔG de -18.98 Kcal/mol.