



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



---

---

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

**“ANÁLISIS DE PROTEÍNAS DE UNIÓN A  
eIF4F Y eIF(iso)4F PRESENTES DURANTE  
LA GERMINACIÓN EN MAÍZ”**

**T E S I S**

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

**PRESENTA**

**Q.A. PEDRO EDUARDO LÁZARO  
MIXTECO**

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA**

**MÉXICO, D.F.**

**ENERO, 2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dr. Tzvetanka Dimitrova Dinkova en laboratorio 103 de la facultad de química conjunto "E" en la Universidad Nacional Autónoma de México.

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

Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez

Dra. Adela Rodríguez Romero

Se reconoce la colaboración al grupo de investigación de la Dra. Estela Sánchez Quintanar por sus sugerencias en los seminarios conjuntos.

Este proyecto recibió apoyo del proyecto 46339 y por el PAPIIT IN208006.

Durante los estudios de maestría gocé de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

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

Presidente	Dra. Estela Sánchez Quintanar
Vocal	Dr. Jorge Nieto Sotelo
Secretario	Dra. Helena Porta Ducoing
Suplente	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres
Suplente	Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez

## **DEDICATORIA**

Con especial cariño dedico este trabajo a mis padres: Eduardo Lázaro y Margarita Mixteco; por su paciencia y por guiarme en los momentos más difíciles y claves de mi vida. A mis hermanos, por su protección y su apoyo durante mi vida profesional, que al igual que a mis padres admiro y respeto.

A la Universidad Veracruzana que es mi Alma Máter, en donde pase momentos muy felices, donde descubri mi pasión por la química y el gusto por la ciencia y la que me proporcionó los conocimientos necesarios para enfrentarme a un posgrado.

A toda mi gente que ha creído en mi, brindandome su confianza y su apoyo.

## **AGRADECIMIENTOS**

Con estas líneas quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que me han ayudado y acompañado en la realización de este trabajo:

En primer lugar a mi directora de tesis, la doctora Cesy, por que gracias a su asesoría durante mi estancia en la maestría fueron años muy enriquecedores en mi vida profesional y por que esta tesis ha sido resultado de su dedicación y apoyo.

A mis compañeros de laboratorio con los que compartí momentos muy gratos durante la maestría: A Valeria, Norma, Ingrid, Carlos, Edson, César Aguirre, Naholi, Augusto, Sara, Verónica, Susana, Adriana, César David y a todos los que se han ido incorporando al laboratorio; por sus grandes consejos, animos y por los bueno momentos dentro y fuera del laboratorio que me han hecho sentir como en casa.

A todo el pueblo de México por sus impuestos.

## CONTENIDO

<b>I. Introducción</b> .....	1
<b>II. Resumen</b> .....	3
<b>III. Antecedentes</b> .....	5
<b>III.1 La germinación del maíz</b> .....	5
III.1.1 La estructura y función de la semilla.....	6
III.1.2 El proceso de germinación.....	7
III.1.3 La respiración.....	9
III.1.4 El movimiento de reservas.....	10
III.1.5 La terminación de la germinación.....	10
III.1.6 La síntesis de DNA.....	11
III.1.7 La síntesis de proteínas y RNA durante la germinación.....	11
<b>III.2 El proceso de traducción</b> .....	12
III.2.1 El inicio de la traducción.....	15
<b>III.2.2 Algunos factores que regulan el inicio de la traducción</b> .....	17
<b>III.2.2.1 El factor eIF4E</b> .....	17
III.2.2.1.1 Conservación de la secuencia de eIF4E.....	18
III.2.2.1.2 Clasificación de los miembros de la familia eIF4E.....	19
III.2.2.1.3 eIF4E y su exportación nuclear.....	20
III.2.2.1.4 Degradación de eIF4E.....	21
<b>III.2.2.2 El factor eIF4G</b> .....	21
III.2.2.2.1 Estructura y función de eIF4G.....	22
III.2.2.2.2 Otras funciones de eIF4G.....	26
III.2.2.3 El factor eIF4A.....	27
III.2.2.4 Los factores eIF4B y eIF4H.....	30
III.2.2.5 El factor eIF3.....	31
III.2.2.6 La proteína de unión a poli(A).....	34
III.2.2.7 Los factores eIF2 y eIF2B.....	36
III.2.3 Mecanismos de regulación de la traducción.....	37
III.2.3.1 Regulación por fosforilación.....	38
III.2.3.2 Regulación por 4E-BPs.....	38

<b>III.3 Miembros de la familia eIF4E en plantas.....</b>	<b>41</b>
<b>III.4 Expresión de eIF4E y eIF(iso)4E durante la germinación del maíz.....</b>	<b>41</b>
<b>III.5 Interacción de eIF4E de plantas con proteínas diferentes de eIF4G.....</b>	<b>42</b>
<b>IV. Hipótesis.....</b>	<b>44</b>
<b>V. Objetivos.....</b>	<b>44</b>
<b>V.1 Objetivo General.....</b>	<b>44</b>
<b>V.2 Objetivos Particulares.....</b>	<b>44</b>
<b>VI. Materiales y Métodos.....</b>	<b>45</b>
VI.1 Sistema biológico.....	45
VI.2 Método de purificación de los complejos eIF4F y eIF(iso)4F de ejes de maíz.....	45
<b>VI. 3 Detección de los complejos eIF4F y eIF(iso)4F por SDS-PAGE y <i>western blot</i>.....</b>	<b>46</b>
VI.3 .1 Electroforesis SDS-PAGE y transferencia.....	46
VI.3 .2 Tinción con plata.....	46
VI.3 .3 <i>Western blot</i> .....	47
VI.3 .4 Obtención de anticuerpos anti-eIF4E de maíz.....	47
<b>VI.4 Análisis de péptidos mediante LC/MS/MS.....</b>	<b>48</b>
<b>VII. Resultados.....</b>	<b>49</b>
VII .1 Estandarización del método de extracción de eIF4F y eIF(iso)4F.....	49
VII.2 Purificación de los complejos eIF4F y eIFiso4F de maíz.....	53
VII.3 Comparación de bandas diferenciales de 0 y 24 h de germinación.....	54
<b>VIII. Análisis de bandas proteicas diferenciales por LC/MS/MS.....</b>	<b>56</b>
<b>IX. <i>Western blot</i> para proteínas identificadas en los complejos eIF4F y eIF(iso)4F.....</b>	<b>61</b>
<b>X. Discusión.....</b>	<b>64</b>
<b>XI. Conclusiones.....</b>	<b>73</b>
<b>XII. Perspectivas.....</b>	<b>73</b>
<b>XIII. Apéndice I.....</b>	<b>74</b>
<b>XVI.Glosario de términos.....</b>	<b>85</b>
<b>XV. Bibliografía.....</b>	<b>86</b>

## I. Introducción

La síntesis de proteínas o traducción es el proceso anabólico mediante el cual se forman las proteínas a partir de los aminoácidos acorde a la secuencia de codones del mRNA. La traducción tiene lugar en los ribosomas del citoplasma celular. Los aminoácidos son transportados por el RNA de transferencia (tRNA) y son llevados hasta el RNA mensajero (mRNA), en dónde se aparean por complementariedad de bases. Una vez finalizada la síntesis de una proteína, el mRNA puede ser leído de nuevo.

El inicio de la traducción en plantas requiere el reconocimiento de la estructura *cap* ( $7\text{mGpppN}$ ) presente en los mRNAs por cualquiera de las proteínas eIF4E o eIF(iso)4E, que forman parte de los complejos heterotriméricos eIF4F y eIF(iso)4F, respectivamente. En otros organismos la actividad del complejo eIF4F está regulada por estímulos fisiológicos a través de reguladores negativos que unen al factor eIF4E (4E-BPs) mediante una secuencia YXXXXLØ (donde X es cualquier aminoácido y Ø un aminoácido hidrofóbico) e inhiben la formación del complejo eIF4F. Actualmente, se han identificado múltiples proteínas diferentes de las 4E-BPs que pueden o no usar la secuencia común de enlace a eIF4E y participan en la regulación traduccional de mensajeros específicos (Revisado por Gingras *et al.* 2004).

Recientemente, Joshi y colaboradores (2005) sugirieron una agrupación de eIF4E en tres clases acorde a la conservación de los residuos localizados en la posición equivalente a trp43 y trp56 de eIF4E1 humano en más de 200 especies (Joshi *et al.* 2005). La clase 1 corresponde a eIF4E1, contiene el residuo triptófano en todas las posiciones. La clase 2 corresponde a eIF4E2, posee un residuo de tirosina en lugar de triptófano en la posición 43 y un residuo hidrofóbico (phe o leu) en la posición 56. La clase 3 corresponde a eIF4E3 contiene un residuo de triptófano en la posición 43 y un residuo de cisteína/tirosina en lugar de triptófano en la posición 56. Los factores eIF4E y eIF(iso)4E de plantas pertenecen a la clase 1.

En estudios anteriores en maíz, se encontró que, en estado quiescente del eje embrionario, los niveles del factor eIF(iso)4E son mayores en comparación con eIF4E y durante la germinación los niveles de eIF4E aumentan a partir de las 12 horas, hasta alcanzar niveles iguales a eIF(iso)4E. La proporción de estos factores pareciera regular la traducción selectiva de mRNAs en este proceso (Dinkova *et al.* 2000 y Sánchez de Jiménez, 1997). Hasta el momento, no se han identificado proteínas tipo 4E-BPs que se unan a las isoformas de eIF4E en plantas y regulen el inicio de la traducción. Sin embargo, se han identificado proteínas que interaccionan con las distintas isoformas del factor eIF4E en *Arabidopsis thaliana* mediante análisis de doble híbrido (Freire *et al.* 2000; Freire, 2005). En estos trabajos se encontró que la Lipoxigenasa 2 *cloroplástica* (AtLOX2) y una proteína similar al factor asociado al polipéptido naciente (AtBTF3) unen a eIF4E/eIF(iso)4E mediante una secuencia similar al de los 4E-BPs. Sin embargo, no se conoce su papel *in vivo*. Basado en los antecedentes anteriores, se plantea que en las plantas existen proteínas probablemente reguladoras que interaccionan con eIF4F y eIF(iso)4F formando diferentes complejos de regulación del inicio de la traducción.

En este trabajo se utilizó el modelo de germinación de ejes embrionarios de maíz, ya que en esta etapa la síntesis de proteínas *de novo* es muy activa y está altamente regulada por los complejos eIF4F y eIF(iso)4F. El objetivo de este trabajo fue la identificación de proteínas de unión a los complejos eIF4F y eIF(iso)4F, diferenciándose estas por las etapas seleccionadas [en ejes quiescentes eIF(iso)4F y en ejes germinados eIF4F/ eIF(iso)4F].

## II. RESUMEN

La traducción es uno de los procesos metabólicos más importantes en los seres vivos, ya que permite sintetizar los polipéptidos acorde a la secuencia de codones del mRNA para producir proteínas que asumen funciones muy variadas tales como: de reserva, para reconocimiento de señales, transporte, catalíticos, estructurales, movimiento, regulatorios, etc. Los estudios sobre regulación traduccional en eucariontes están bien documentados y se reporta que dicha regulación se da preferentemente a nivel del inicio de la traducción.

El inicio de la traducción en plantas requiere el reconocimiento de la estructura *cap* ( $m^7GpppN$ ) presente en los mRNAs, por cualquiera de los factores de iniciación eIF4E o eIF(iso)4E, que forman parte de los complejos heterotriméricos eIF4F y eIF(iso)4F respectivamente (Browning. 2004). El complejo eIF4F/eIF(iso)4F está formado además de eIF4E o eIF(iso)4E, por el factor eIF4A, una helicasa dependiente de ATP que desenrolla estructuras secundarias en el extremo 5', y el factor eIF4G o eIF(iso)4G, una proteína de anclaje que se une a varios factores (eIF4E, eIF4A, eIF3) y a la proteína PABP de enlace a la cola de poli(A). La actividad del complejo eIF4F está regulada por estímulos fisiológicos a través de reguladores negativos que unen al factor eIF4E (4E-BPs) mediante una secuencia YXXXXLØ (donde X es cualquier aminoácido y Ø un aminoácido hidrofóbico) e inhiben la formación del complejo eIF4F. En el maíz, el factor eIF(iso)4E es más abundante, en comparación con eIF4E, en el estado quiescente del eje embrionario. Durante la germinación los niveles de eIF4E aumentan a partir de las 12 horas hasta alcanzar niveles iguales a eIF(iso)4E a las 24 horas de germinación (Fig. 3; Dinkova y Sánchez de Jiménez, 1999).

Con el fin de identificar, en este estudio a proteínas que se unen a eIF4F y eIF(iso)4F, se obtuvieron los complejos eIF4F/eIF(iso)4F de ejes embrionario de maíz de 0 y de 24 h de germinación, mediante cromatografía de afinidad con  $^7mGTP$ -Sefarosa. Los complejos

eIF4F/eIFiso4F y las proteínas que interaccionan con estos, fueron obtenidas específicamente con  $m^7$ GTP en 5 fracciones de 400  $\mu$ L (F1, F2, F3, F4, F5), que se resolvieron mediante gel de poliacrilamida en electroforesis SDS-PAGE y se tiñeron con plata para el análisis de bandas diferenciales de proteínas en ambos estados de desarrollo del eje y su identificación por espectrometría de masas (LC/MS/MS). En el análisis se encontró que durante la elución de los complejos de ejes de 0 h, el complejo eIF(iso)4F se localiza preferentemente en las primeras 3 fracciones (F1<sup>0</sup>, F2<sup>0</sup>, F3<sup>0</sup>); mientras que, en las últimas 2 fracciones (F4<sup>0</sup>, F5<sup>0</sup>) aparece preferentemente el complejo eIF4F. A 24 horas, el comportamiento de la elución es diferente; en este caso ambos factores eluyen igualmente en F1<sup>24</sup>, F2<sup>24</sup>, F3<sup>24</sup>, F4<sup>24</sup> y F5<sup>24</sup>. Este comportamiento permitió elegir bandas diferenciales a 0 h e identificar las proteínas en cada fracción, en la que un complejo [eIF4F o eIF(iso)4F] se encuentra enriquecido.

Entre las proteínas identificadas a 0 h de germinación sobresalen dos proteínas de choque térmico ZmHSP101 y ZmHSP70; así como ZmLEAFBLADELESS, una proteína involucrada en el mecanismo del silenciamiento por RNAs pequeños (RNAi). Otras proteínas como ZmLOX1, ZmCBP80, ZmeIF4A y ZmeEF1A fueron identificadas en ambos estadios de germinación. Las proteínas ZmLOX1, ZmLEAFBLADELESS y ZmHSP70 muestran una secuencia similar a las proteínas de unión a eIF4E y estos podrían regular la formación del complejo eIF(iso)4F, mediante la interacción con eIF(iso)4E. Esto indica que los complejos eIF4F/eIF(iso)4F podrían estar interactuando con diferentes proteínas para regular el inicio de la traducción.

Los resultados obtenidos permiten concluir que:

1. En los ejes embrionarios quiescentes (0 h) y germinados (24 h) de maíz se identificaron proteínas que co-eluyen con los complejos eIF4F y eIF(iso)4F de forma diferencial.
2. HSP101 co-eluye específicamente con los complejos eIF4F/eIF(iso)4F.

### **III. Antecedentes**

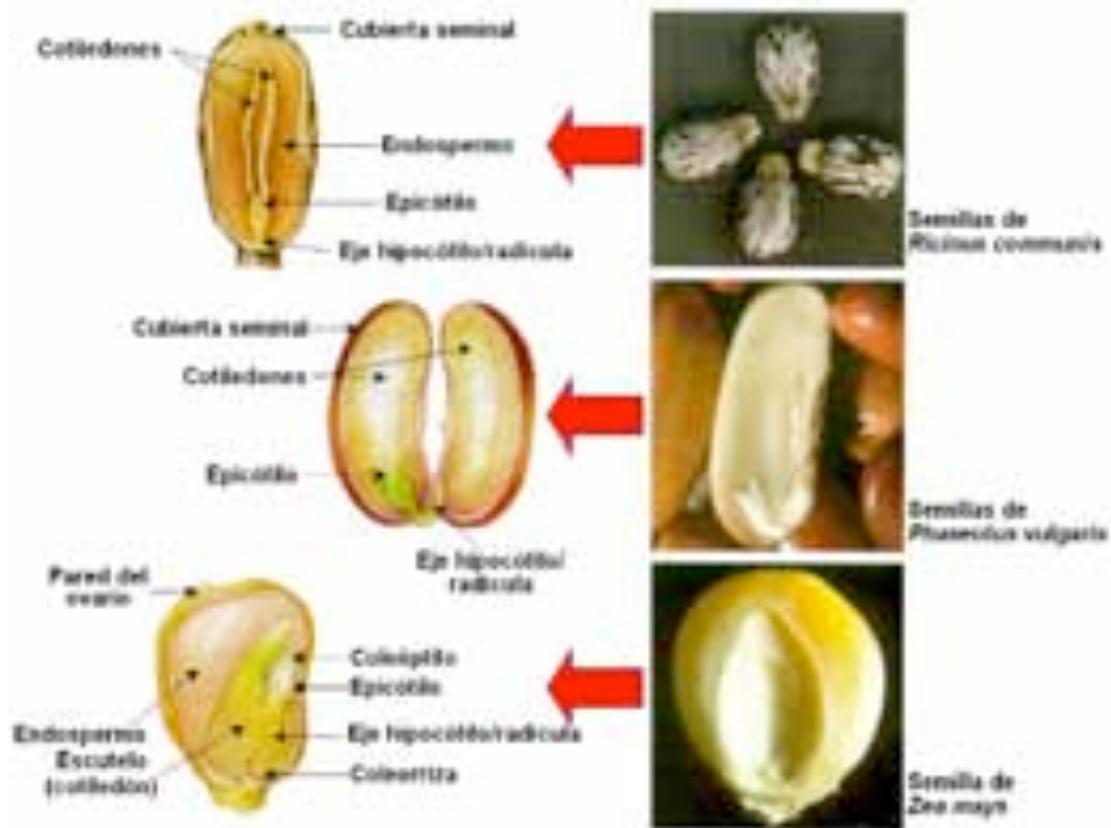
#### **III.1 La germinación del maíz**

El proceso de germinación es esencialmente la reiniciación del crecimiento del embrión una vez superado el período de latencia y cuando las condiciones de temperatura, luz, disponibilidad de oxígeno y agua son las adecuadas. Este proceso consta de múltiples estadios y requiere la expresión coordinada de numerosos genes, en diferentes tejidos. Además, debido a las diferentes funciones de los tejidos de las semillas y los distintos procesos bioquímicos, se espera que la traducción de los transcritos esenciales para la germinación sea regulada de manera coordinada, tanto espacial, como temporalmente.

La germinación comienza con la toma de agua por la semilla (imbibición) y finaliza cuando emerge la radícula (Bewley; 1997). Durante la imbibición, la semilla en estado quiescente rápidamente activa su metabolismo. La respiración, actividad enzimática y síntesis proteica son actividades fundamentales restablecidas durante la germinación y es un prerrequisito para el crecimiento de una plántula. Las enzimas hidrolíticas se secretan del epitelio escutelar y la capa de aleurona, y catalizan la despolimerización del almidón, así como de las reservas proteicas, y sus productos son absorbidos por el embrión y utilizados en los procesos bioquímicos. Uno de los procesos importantes durante la germinación es la síntesis de proteínas y RNA. Estos se reactivan durante la germinación y son un prerrequisito fundamental para la emergencia de la radícula (Potokina *et al.* 2002).

### III.1.1 Estructura y función de la semilla.

Las semillas proceden de los primordios o rudimentos seminales de la flor, una vez fecundadas y maduras. Su función es dar sustento al embrión en desarrollo, protección y dispersión de la especie a la que pertenece. La semilla consta esencialmente de embrión (formado por un eje embrionario y uno, dos o varios *cotiledones*), una provisión de reservas nutritivas, que pueden almacenarse en un tejido especializado (albumen o endospermo) o en el propio embrión, y una cubierta seminal que recubre y protege a ambos (Moore, *et al.*1998, Fig. 1).



**Figura 1.** Estructura de distintos tipos de semillas. (Arriba) Semillas de ricino (*Ricinus communis*), con abundante endospermo que envuelve a los dos cotiledones. (Medio) Semilla de frijol (*Phaseolus vulgaris*) mostrando los dos grandes cotiledones que absorben el endospermo antes de la germinación. (Abajo) Semilla de maíz (*Zea mays*) diferente a las anteriores; el único cotiledón que posee es una estructura que absorbe el endospermo denominado escutelo (Moore, *et al.*1998).

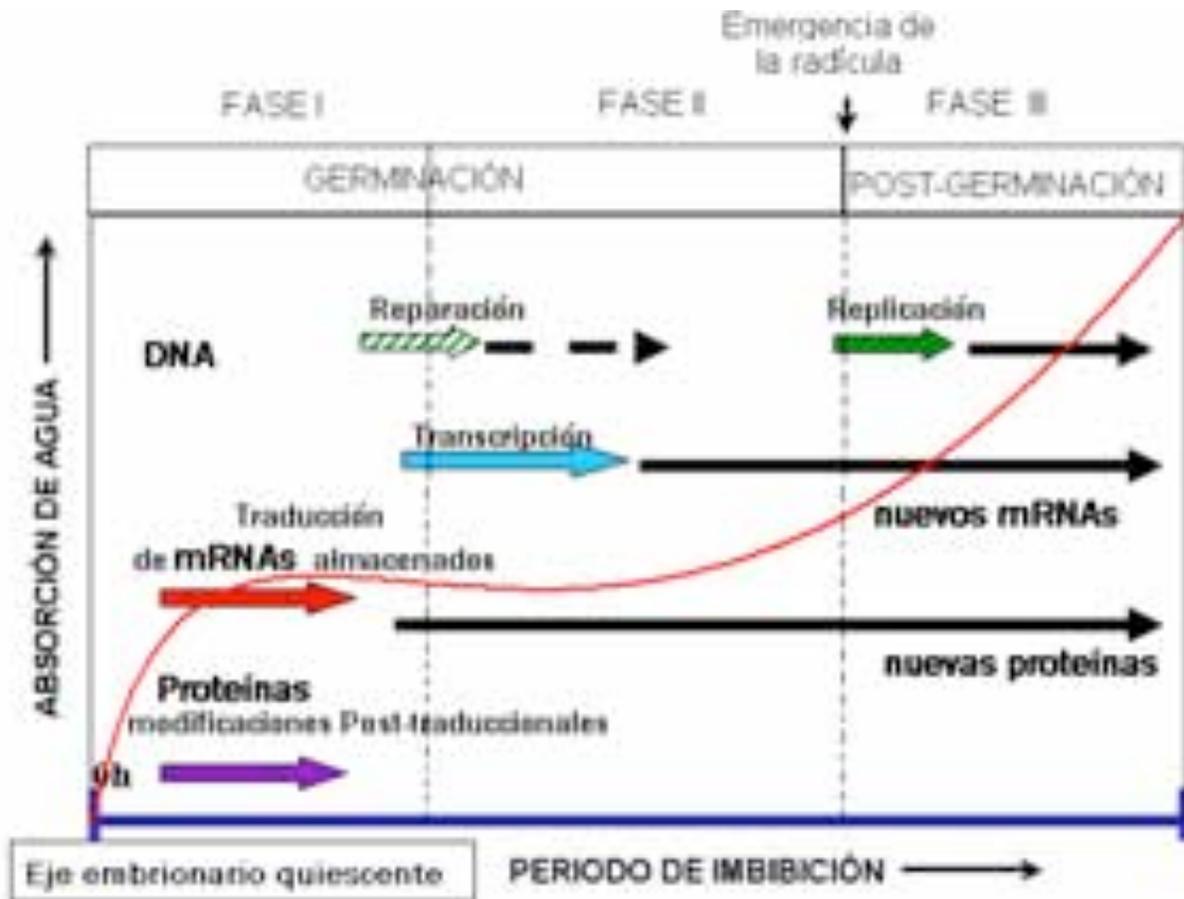
Para que la semilla cumpla con su ciclo, es necesario que el embrión se transforme en una plántula, que sea capaz de valerse por sí misma y, finalmente, convertirse en una planta adulta. Todo ello comprende una serie de procesos metabólicos y morfogenéticos cuyo resultado final es la germinación de las semillas (Bewley, 1997).

### **III.1.2 El proceso de germinación**

Para que el proceso de recuperación de la actividad biológica por parte de la semilla tenga lugar, es necesario que se de una serie de condiciones ambientales favorables como son: un sustrato húmedo, suficiente disponibilidad de oxígeno que permita la respiración aerobia y una temperatura adecuada, para que los distintos procesos metabólicos en el desarrollo de la plántula tengan lugar. La absorción de agua por la semilla desencadena una secuencia de cambios metabólicos que incluyen la respiración, la síntesis proteica y la movilización de reservas. A su vez, la división y el alargamiento celular en el embrión provocan la rotura de las cubiertas seminales; la que generalmente, se produce por la emergencia de la radícula. Cuando una semilla germina, en la mayoría de las especies la primera estructura que emerge después de la rehidratación de los diferentes tejidos es la radícula.

En el proceso de germinación podemos distinguir tres fases (Fig. 2): **Fase I de hidratación:** La absorción de agua es el primer paso de la germinación, sin el cual el proceso no puede darse. Durante esta fase se produce una intensa absorción de agua por parte de los distintos tejidos que forman la semilla. Dicho incremento va acompañado de un aumento proporcional en la actividad respiratoria. **Fase II de germinación:** Representa el verdadero proceso de la germinación. En ella, se producen las transformaciones metabólicas, necesarias para el correcto desarrollo de la plántula. En esta fase, la absorción de agua se reduce considerablemente, llegando incluso a detenerse. **Fase III de crecimiento:** Es la última fase

de la germinación y se asocia con la emergencia de la radícula (cambio morfológico visible). Esta fase se caracteriza porque la absorción de agua vuelve a aumentar, así como la actividad respiratoria (Bewley, 1997).



**Figura 2. Eventos físicos, bioquímicos y moleculares durante la germinación.** Los procesos metabólicos más estudiados en relación a la germinación son la respiración y la movilización de las sustancias de reserva (Tomado de Lane., 1991)

### III.1.3 La respiración.

Tres rutas metabólicas: glucólisis, ciclo de las pentosas y ciclo de Krebs son funcionales en las semillas embebidas (Ehrenshaft y Brambl, 1990; Attucci *et al.* 1991). Estas tres rutas producirán intermediarios del metabolismo vegetal, así como considerables cantidades de energía y poder reductor. Uno de los procesos más importantes durante la germinación es la respiración; donde los electrones de los equivalentes reducidos NADH y FADH obtenidos de la glucólisis, ciclo de las pentosas y ciclo de Krebs, son transferidos al oxígeno molecular (Fosforilación oxidativa). El objetivo principal del proceso respiratorio es la formación de ATP, necesario para la intensa actividad metabólica que tiene lugar durante la germinación. La semilla seca muestra una escasa actividad respiratoria, aumentando el consumo de O<sub>2</sub>, después de iniciada la imbibición. A partir de este momento, el proceso respiratorio de las semillas puede dividirse en cuatro fases: La fase I se caracteriza por un rápido incremento en la respiración que, generalmente, se produce antes de transcurridas 12 h desde el inicio de la imbibición. El aumento en la actividad respiratoria es proporcional a la hidratación de los tejidos de la semilla. Posiblemente, el principal sustrato utilizado en ésta fase es la sacarosa. En la fase II, la actividad respiratoria se estabiliza entre las 12 y 24 h desde el inicio de la imbibición. Probablemente las cubiertas seminales, que todavía permanecen intactas, limitan la entrada de O<sub>2</sub>. La eliminación de la testa puede acortar o anular esta fase. Fase III: Se produce un segundo incremento en la actividad respiratoria, que se asocia a la mayor disponibilidad de O<sub>2</sub>, como consecuencia de la ruptura de la testa producida por la emergencia de la radícula. (Fig. 2). Otro factor que contribuye a ese aumento es la actividad de las mitocondrias, recientemente divididas en las células del eje embrionario (Morohashi, 1981). En la última fase, la IV, tiene lugar una acusada disminución de la respiración, que coincide con la desintegración de los cotiledones, después de que han exportado las reservas almacenadas (Bewley., 1997).

### **III.1.4 El Movimiento de reservas.**

Las semillas contienen cantidades relativamente importantes de reservas alimenticias que permitirán el crecimiento y el desarrollo de la plántula hasta que esta sea capaz de alimentarse por sí misma. Estas reservas se encuentran, en su mayor parte, formando cuerpos intracelulares que contienen lípidos, proteínas, carbohidratos y compuestos inorgánicos. La movilización de las reservas requiere un proceso previo de hidrólisis para liberar los compuestos de menor peso molecular, que pueden ser utilizados durante el crecimiento inicial de la plántula. Además, en muchos casos, los productos de la hidrólisis sufren una serie de transformaciones metabólicas antes de ser transportados al eje embrionario en desarrollo. Los compuestos de reserva pueden estar almacenados en el embrión (cotiledones) o en tejidos extraembrionarios, principalmente, en el endospermo. Al iniciarse la germinación de las semillas, y cuando las células están suficientemente hidratadas, se produce una activación de la síntesis proteica y, por lo tanto, la formación de enzimas hidrolíticas que son las que promueven la movilización de las sustancias de reserva.

### **III.1.5 La terminación de la germinación**

Con algunas excepciones, la protrusión de la radícula a través de las estructuras circundantes del embrión es el evento que marca la terminación de la germinación y el comienzo del establecimiento de una nueva plántula; esta protrusión puede o no estar acompañada por división celular (Bewley, 1997).

No se conoce cuáles son los eventos específicos necesarios para que comience la protrusión de la radícula, pero se ha sugerido que pueden ser la combinación de los siguientes fenómenos fisiológicos: (1) por disminución del potencial osmótico en las células de la radícula como resultado de la acumulación del soluto, de forma tal que se incrementa la absorción de agua, que resulta en un incremento en la presión de turgencia que promueve la

elongación celular; (2) la relajación de las paredes celulares de la radícula mediante las enzimas que participan en el metabolismo de la pared celular, lo que también resultaría en un incremento del tejido; (3) el incremento del tejido es debido a que las estructuras que rodean la radícula se debilitan por hidrólisis.

### **III.1.6 La síntesis de DNA durante la germinación.**

En etapas tempranas de la germinación se inicia la síntesis de DNA, que es principalmente de tipo reparativo, en la cual se sustituyen el DNA nuclear y organelar que se encuentran dañados durante la maduración, la deshidratación y almacenamiento de semillas (Osborne *et al.* 1986, Fig. 2). Puesto que no hay un cambio significativo en el contenido de ADN total de los embriones, se sugiere que el número de nuevas células, resultado de la división celular, es pequeño en comparación con el número total de células dentro del embrión (Logan *et al.* 2001).

### **III.1.7 La síntesis de proteínas y RNA durante la germinación.**

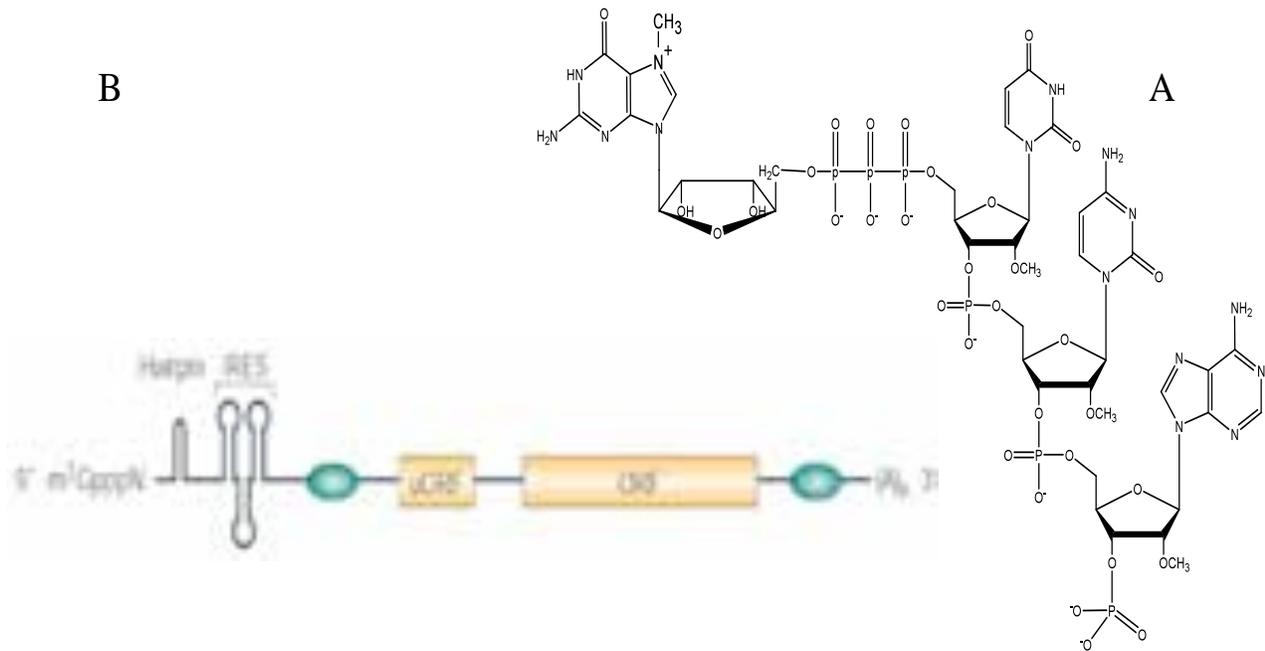
Todos los componentes de la maquinaria traduccional se encuentran presentes en las células del eje embrionario, lo que permite que los mRNAs almacenados y residuales en las células puedan ser traducidos a los pocos minutos de iniciar la imbibición (Cremer, 1990). Los mensajes son mRNAs que provienen de algunos procesos previos del desarrollo de la semilla (Lane, 1991). Algunos de estos codifican para proteínas importantes en la maduración y en la desecación, como las proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant proteins), que transitoriamente pueden ser traducidos hasta que los procesos de degradación se activen. Los mensajes almacenados se sintetizan durante el desarrollo de la semilla para que estén disponibles al momento de la hidratación y, por lo tanto, sean rápidamente traducidos a proteínas que participaran activamente en el proceso germinativo. Tal es el caso de las enzimas esenciales para el metabolismo intermedio y de las proteínas necesarias para que la germinación tenga éxito y alcance la protrusión de la radícula (Beltrán-Pena *et al.*; 1995). La

forma en que los mRNAs almacenados se mantienen íntegros en la semilla seca no se conoce, aunque algunos reportes dicen que estos mensajes están asociados a complejos ribonucleoproteicos (Bewley, 1997). A medida que la germinación procede, la síntesis de proteínas se hace dependiente de nuevos transcritos (Bewley, 1987, Fig. 2). El proceso de síntesis proteica involucra la participación de diversas proteínas, necesarias para la regulación de la maquinaria traduccional presente en el eje embrionario; esta maquinaria seleccionará los mensajes para su decodificación a proteínas que serán indispensables durante de germinación y el posterior establecimiento de una plántula.

### III.2 El proceso de síntesis proteica

La traducción es uno de los procesos metabólicos más importantes en los seres vivos, ya que permite sintetizar los polipéptidos acorde a la secuencia de codones del mRNA, para producir proteínas que asumen funciones muy variadas, tales como: reserva, para reconocimiento de señales, transporte, enzimático, estructural, movimiento, regulatorio, etc. La eficiencia traduccional se define como la velocidad de síntesis del polipéptido a partir de cada unidad de mRNA por unidad de tiempo. Los niveles de síntesis proteica están determinados no sólo por la abundancia de mensajes en el citoplasma, sino también por la habilidad de los transcritos para ser exitosamente traducidos. Esta capacidad está mediada por factores en **trans**, los cuales son proteínas o RNAs regulatorios sintetizados en diferentes condiciones como: desarrollo, presencia de nutrientes, enfermedad y estrés (Bewley, 1997). Estos factores reconocen elementos en **cis** que son secuencias regulatorias propias del mRNA. Entre estos elementos se encuentran la estructura *cap* ( $m^7GpppN$ ; donde  $m^7$  es el grupo metilo y N es cualquier nucleótido; Fig. 3A) en el extremo 5', una cola de poli(A) en el extremo 3' del mRNA y las regiones no traducibles 5'UTR y 3'UTR, en la que pueden encontrarse estructuras secundarias que bloquean la traducción (Gebauer, 2004); secuencias de entrada interna del ribosoma (IRES) que llevan a una traducción independiente de *cap*, o marcos de lectura río

arriba (uORFs) del marco abierto de lectura (ORF) principal del mRNA que funcionan normalmente como reguladores negativos, reduciendo la traducción del marco de lectura principal (Fig. 4B).



**Figura 3. Elementos que influyen en la eficiencia de la traducción.** A) Estructura *cap* ( $m^7GpppN$ ) en el extremo 5' de mRNA ; al menos en todos los organismos eucariontes existe un residuo de guanina modificado en un enlace 5'- 5' con el último nucleótido; B) Otros elementos regulatorios: los óvalos en verde simbolizan sitios de enlace a proteínas o RNAs reguladores, los cuales usualmente inhiben la traducción, pero ocasionalmente la promueven .

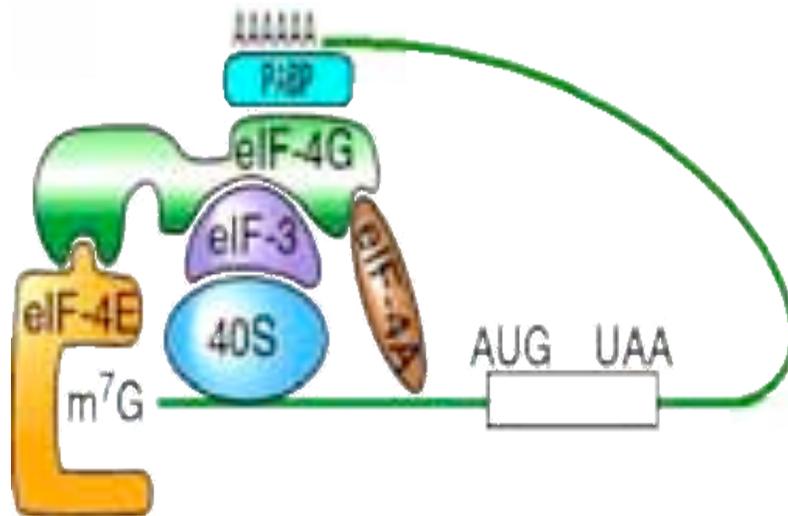
La traducción se divide en tres fases cinéticas: iniciación (reclutamiento del mRNA al ribosoma), elongación (síntesis de la cadena polipeptídica) y terminación (liberación de la cadena polipeptídica). Mientras que la elongación y terminación son asistidas por un grupo limitado de factores de regulación, el inicio de la traducción en organismos eucariontes es asistido al menos por 12 factores de iniciación (Tabla 1) y por la hidrólisis de ATP.

**Tabla 1. Factores involucrados en el inicio de la traducción en los tres dominios: Eukarya, Bacteria y Archae.**

Factor Eukarya	Factor Bacteria	Factor Archae	Función
eIF1	IF3	a-eIF1	Fidelidad para del reconocimiento de AUG
eIF1A	IF1	a-eIF1A	Facilita que el met-tRNA <sup>met</sup> se enlace con la subunidad ribosomal pequeña
eIF2		a-eIF2	Une la met-tRNA <sup>met</sup> a la subunidad 40S; GTPasa
eIF2B			Factor intercambiador de GTP para el eIF2
eIF3			Promueve la unión de met-tRNA <sup>met</sup> y el mRNA a la subunidad 40S
eIF4A		a-eIF4A	Helicasa con caja DEAD
eIF4B			Promueve la actividad de helicasa del eIF4A
eIF4E			Proteína de enlace a <i>cap</i> (m <sup>7</sup> GpppN)
eIF4F			Complejo de eIFs (eIF4A, eIF4E, eIF4G ) que enlaza a <i>cap</i>
eIF4G			Proteína multidominios que actúa como plataforma para la interacción con otros factores
eIF4B			Función similar al eIF4B
eIF5			Ayuda al reconocimiento del AUG y promueve la actividad GTPasa del eIF2
eIF5B	IF2	a-eIF5B	Ayuda la unión de la subunidad ribosomal grande con la pequeña; en procariontes se une a met-tRNA <sup>met</sup>

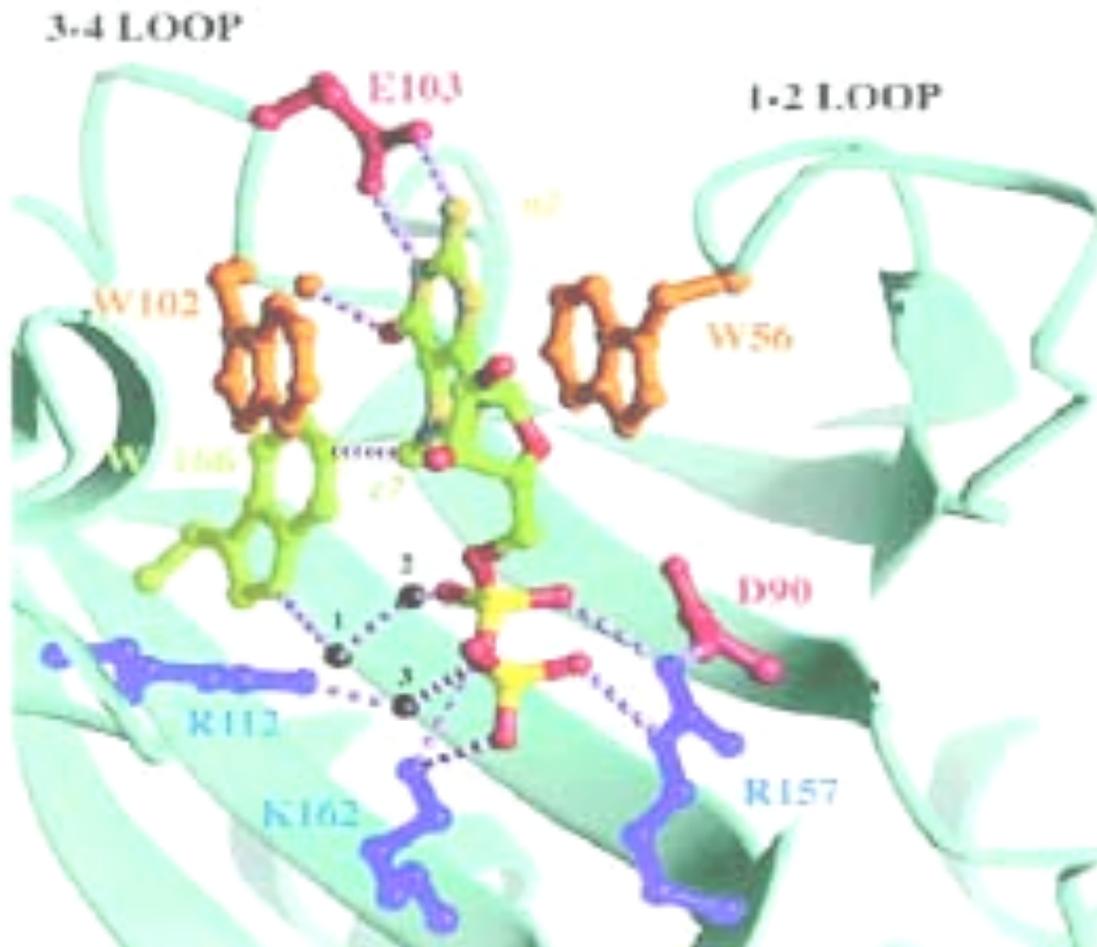
### III.2.1 El inicio de la traducción.

El primer paso del reclutamiento del mRNA a los ribosomas es la unión del complejo heterotrimérico eIF4F con el extremo 5' *cap* del mRNA. Este complejo está formado por el factor eIF4E, el único factor que tiene la capacidad de reconocer la estructura m<sup>7</sup>GpppN en el extremo 5' del mRNA; el factor eIF4A, una helicasa dependiente de ATP que desenrolla estructuras secundaria en el extremo 5'; el factor eIF4G, una proteína de anclaje que se une a varios factores (eIF4E, eIF4A y eIF3) y la proteína PABP de enlace a la cola de poli(A) (Acker *et al.*, 2008). Esto permite la circularización del mRNA, facilitando el reciclaje de la maquinaria traduccional y haciendo más eficiente la síntesis proteica (Fig. 4). El segundo paso es la unión del complejo de preiniciación 43S, que está compuesto por la subunidad ribosomal pequeña 40S, el factor eIF3 y el complejo ternario constituido por el factor eIF2 acoplado a GTP y met-tRNA<sup>i</sup>. Este complejo de preiniciación reconoce al mRNA mediado por la unión de eIF3 a la subunidad eIF4G del complejo eIF4F. Una vez colocado el complejo de preiniciación en el mRNA; este hace un escaneo en dirección 5' a 3' a lo largo del mensaje hasta encontrar el codón de inicio (AUG), asistido por eIF1 y eIF1A. La iniciación concluye con la unión de la subunidad ribosomal 60S para formar el complejo de iniciación competente 80S, que cataliza la formación del primer enlace péptido. Este evento es asistido por el factor eIF5B que dispara la hidrólisis de GTP unido a eIF2, una vez que se ha reconocido el codón de inicio (AUG).



**Figura 4. Formación de mRNA circular mediante interacciones entre proteínas que forman un puente entre los extremos 5' y 3'.** La proteína de unión a poli(A)(PABP) interacciona con la cola de poli(A) 3' sobre un mRNA eucarionte y con las subunidades del factor eIF4F, unidas a  $m^7G$ pppN y 40S (Adaptado de Gebauer; 2004).

El reconocimiento del *cap* por eIF4E ocurre mediante interacciones  $\pi$ - $\pi$  de la base púrica entre dos triptófanos conservados (trp56 y trp102 en humano). Esta interacción es estabilizada por puentes de hidrógeno e interacciones de van der Waals con otros residuos conservados. El trp166 reconoce la presencia del grupo  $N^7$ -metil de la estructura *cap* (Fig. 5; Marcotrigiano, 1997). Aunque el proceso de traducción es similar en todos los eucariontes, hay diferencias en mamíferos, plantas y levaduras con respecto a los factores del inicio de la traducción. Una de las diferencias más relevantes se ha encontrado, precisamente, en el factor eIF4E, que reconoce al *cap*. En plantas existen isoformas de eIF4E y eIF4G, que forman dos complejos antigénicamente distintos, eIF4F y eIFiso4F (Browning, 2004).



**Figura 5. Estructura de  $m^7$ GDP unido a eIF4E resuelta mediante rayos X.** Se muestran los residuos involucrados en la interacción con la estructura *cap*. Los enlaces de hidrógeno, interacciones de van der Waals, así como los puentes salinos, son representados con líneas punteadas. Las argininas 112 y 157, así como la lisina 162, son residuos positivos que estabilizan la carga negativa de los fosfatos. Las tres moléculas de agua son representadas con esferas negras (Marcotrigiano et al; 1997).

### III.2.2 Descripción de algunos factores que regulan el inicio de la traducción.

#### III.2.2.1 El factor eIF4E

La secuenciación de genomas ha mostrado varios genes relacionados con la familia eIF4E en diferentes organismos. La secuencia de aminoácidos de eIF4E es conservada en todos los eucariontes. Tres miembros se han descrito en mamíferos (Joshi *et al.* 2004), ocho en *Drosophila melanogaster* (Hernandez *et al.* 2005), sólo uno en *Saccharomyces cerevisiae* y cinco en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Keiper *et al.* 2000). De los miembros descritos

en *C. elegans*, IFE-3, es más similar a eIF4E-1 de humano (47% de identidad) y es requerido para la viabilidad embriogénica, y se une a *cap*'s monometilados. IFE-1, IFE-2 e IFE-5 están relacionados entre sí (57-80% de identidad), unen a *cap*'s trimetilados y, al menos uno, es requerido para la viabilidad. El FE-4 sólo se une a *cap*'s monometilados y no es requerido para la viabilidad (Keiper 2000). El IFE-4 es similar al nuevo miembro de eIF4E en humano llamado 4EHP, que puede unir a *cap*, pero no interacciona con eIF4G y, de este modo, no parece ser un homólogo funcional de eIF4E (Gingras, 1999). El IFE-4 y la 4EHP son similares a un miembro de eIF4E en plantas llamado nCBP. Las plantas superiores poseen además dos formas llamadas eIF(iso)4E y eIF4E que participan en la traducción de mRNAs y unen a dos proteínas diferentes, eIF(iso)4G y eIF4G. Estos hallazgos indican que formas análogas de eIF4E abundan en la mayoría de los eucariontes excepto en la levadura (Gingras 1999).

#### **III.2.2.1.1 Conservación de la secuencia de eIF4E**

La estructura de la proteína eIF4E se ha conservado a través de la evolución. Un dominio bien conservado en el C-terminal de aproximadamente 170 aminoácidos que comprende 8 triptófanos es suficiente para el reconocimiento de *cap*, enlace a eIF4G y estimulación de la traducción dependiente de *cap* (Marcotrigiano, 1997). Las proteínas más semejantes a eIF4E1 de mamíferos son las proteínas principales de unión a *cap*, mientras que el rol de las otras proteínas tipo eIF4E es específico y no es bien entendido en la actualidad.

La importancia universal de eIF4E se deduce de la conservación alta de la secuencia de aminoácidos en eucariontes superiores e inferiores (Fig. 6) y la letalidad de la falta de eIF4E en *S. cerevisiae*, que puede ser rescatada por cualquiera de las proteínas tipo eIF4E1 de plantas, protozoarios o animales. La secuencia proteica es más divergente en el N-terminal; en eIF4E de *Drosophila*, el N-terminal se extiende 35 aminoácidos y una segunda forma de *Xenopus laevis* tiene 18 amino ácidos duplicados en el amino terminal (Gingras 1999).

### III.2.2.1.2 Clasificación de los miembros de la familia eIF4E

Recientemente, Joshi y colaboradores (2005) sugirieron una agrupación de eIF4E en tres clases, al comparar los residuos localizados en la posición equivalente a trp43 y trp56 de eIF4E1 humano en más de 200 especies. Así, la clase 1 corresponde a eIF4E1 que contiene el residuo triptófano en ambas posiciones. La clase 2 corresponde a eIF4E2 que posee un residuo de tirosina en lugar de triptófano en la posición 43 y un residuo hidrofóbico (fen o leu) en la posición 56. La clase 3 que incluye a eIF4E3, contiene un residuo de triptófano en la posición 43 y un residuo de cisteína/tirosina en lugar de triptófano en la posición 56.

Los miembros de la clase 1 presentes en especies de Viridiplantae, metazoarios y Fungi muestran una identidad de ~35-40 % y una similitud de ~60-65% entre ellos. En esta clase se pueden encontrar dos miembros en Viridiplantae [eIF4E y eIF(iso)4E]. Aparentemente están presentes en todos los eucariontes (Fig. 6). Los miembros de la clase 2 incluyen a eIF4E-2 (4E-HP; IFE-4) de metazoarios y nCBP de Viridiplantae. Las proteínas de esta clase muestran aproximadamente un 50% de identidad y 70 – 80% de similitud entre sí, y poseen de un 30 ~ 35% de identidad y 60 – 65% de similitud con los miembros de clase 1. Miembros de esta clase pueden ser identificados en metazoarios, Viridiplantae y Hongos (Fig. 6). Los miembros de la clase 3 poseen un residuo de trp equivalente a trp-43 de *H. sapiens* pero llevan una substitución por cys/tyr relativa a trp-56 de eIF4E-1 de *H. sapiens*. Estas proteínas muestran ~25 – 30% de identidad y ~40 – 55% de similitud con los miembros de clase 1 y la clase 2. Los miembros de la clase 3 aparecen esporádicamente en metazoarios, siendo encontrado en *Cindaria (Hydra)*, en algunos moluscos (*Crassostrea virginica*) y algunos insectos y arácnidos (Fig. 6; Joshi *et al.* 2005).

**Fig. 6 Alineamiento de secuencia de aminoácidos y comparación de las regiones conservadas de miembros de la familia de eIF4E de diferentes grupos taxonómicos.** Clase I en azul; clase II en verde y clase III en rojo. En negro los miembros que no pueden ser correctamente clasificados dentro de la familia. El grupo taxonómico se representa de la siguiente manera: metazoa con diamantes, fungi con cuadros, viridiplantae con triángulos y los protistas con círculos. La secuencia conservada (S/T) VxxFW, representada en rosa, es responsable de la interacción con eIF4G y 4E-BP. Los triptófanos 56, 102 y 166 representados en verde interactúan con la estructura *cap*.

### III.2.2.1.3 eIF4E y su exportación nuclear.

Alrededor del 68% del eIF4E se encuentra en el núcleo, en sitios conocidos como cuerpos nucleares, en donde participan en la exportación de un grupo de mRNAs, que contiene una estructura que se le da el nombre de elemento sensible a eIF4E (Culjkovic *et al.* 2007). El eIF4E entra al núcleo cuando se une a la proteína de unión a eIF4E, conocida como 4E-T (Dostie *et al.* 2000). Una vez en el núcleo se une a *cap* e inhibe la exportación de mRNAs. Alrededor de 200 proteínas homeodominio contienen sitios potenciales de unión a eIF4E y se ha sugerido que estas proteínas podrían jugar un papel en la regulación de eIF4E; por tanto,

cada interacción podría ser involucrada en crecimiento celular, diferenciación y desarrollo (Culjkovic *et al.* 2007).

#### **III.2.2.1.4 Degradación de eIF4E**

El eIF4E está sujeto a ubiquitinación en la lisina 159 y posterior degradación por el proteasoma. El eIF4E ubiquitinado todavía une a *cap*, pero su fosforilación y su unión a eIF4G están reducidos (Othumpangat *et al.*, 2005; Murata y Shimotohno, 2006)

#### **III.2.2.2 El factor eIF4G.**

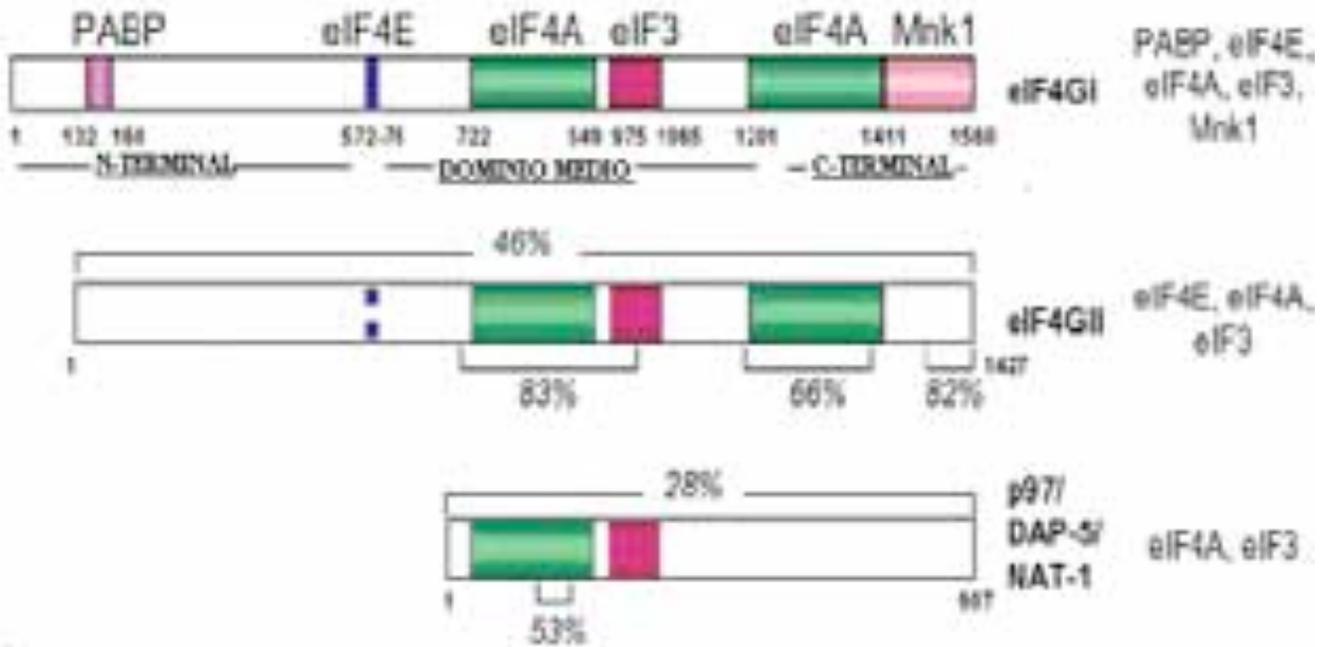
El factor de iniciación eIF4G se obtuvo y se clonó de diferentes especies, incluyendo *S. cerevisiae* y *S. pombe* (Goyer *et al.* 1993), *D. melanogaster* (Zapata *et al.* 1994), *T. aestivum* (Browning, 1996) y *H. sapiens* (Gradi *et al.* 1998; Yan *et al.* 1992). Hay dos isoformas en trigo [eIF4G y eIF(iso)4G], levadura (TIF4631 y TIF4632) y humano (eIF4GI y eIF4GII). El eIF4GI es el miembro prototipo de la familia. Estos factores están moderadamente conservados (46% de identidad en humano y 53% en levadura) y comparten actividad bioquímica similar. (Gallie y Browning, 2001; Tarun *et al.* 1996). La familia de eIF4G también comprende proteínas conservadas en la parte del C-terminal de eIF4G1. Por ejemplo, la proteína de mamíferos p97/NAT1/DAP-5 (30% de homología con eIF4GI) fue estudiada independientemente por tres diferentes grupos, encontrándose una expresión ubicua y abundante en tejidos y líneas celulares (Yamanaka *et al.* 1997). La proteína p97/NAT1/DAP-5 carece de una región en el amino terminal del eIF4G que contiene el sitio de enlace a poli(A) y a eIF4E, pero posee dominios de interacción con eIF3 y eIF4A. La sobre-expresión de p97/NAT1/DAP-5 en células HeLa, resulta en la inhibición de la síntesis proteica, sugiriendo que esta proteína funciona como un regulador negativo de la traducción (Imataka *et al.* 1997; Yamanaka *et al.* 1997). Sin embargo, en reportes recientes se ha descrito que DAP-5 se produce por traducción independiente de *cap* y que la proteína podría promover la entrada del aparato traduccional a sitios de entrada interna del ribosoma (IRES) afines a esta (Henis-Korenblit *et al.* 2000). Otras

dos proteínas con una modesta identidad de secuencia con el dominio central de eIF4G1, que pueden unir a eIF4A *in vitro* son: La proteína de unión a poli(A) y la secuencia del amino terminal de DUG (por death-upregulated gene) (Goke *et al.* 2002).

### **III.2.2.2.1 Estructura y función de eIF4G.**

El factor eIF4G1 de humanos se obtuvo como parte de un complejo proteico que pudo restaurar la síntesis de proteína en lisados derivados de células HeLa infectados con poliovirus (Tahara *et al.* 1981). Este complejo fue más tarde identificado como eIF4F. El eIF4G es polipéptido de alto peso molecular que interactúa con varias proteínas celulares y virales: (i) con eIF4E, eIF4A, eIF3 y la proteína de unión a *cap* nuclear CBP80 (McKendrick *et al.* 2001) ; (ii) con proteasas de picornavirus 2A y L (Foeger *et al.* 2002); (iii) con proteínas virales NS1 y NSP3 de influenza y rotavirus, respectivamente (Aragon *et al.* 2000; Piron *et al.* 1998); (iv) con la proteína de estrés por calor HSP27 (Cuesta *et al.* 2000); (v) con otras proteínas involucradas en el metabolismo de RNA, como la proteína de unión a poli(A), PABP (Imataka *et al.* 1998). El eIF4G1 posee tres dominios que son aproximadamente equivalentes en peso: la parte del amino terminal (aminoácidos 1-560) definida por su ruptura por proteasas de picornavirus; el dominio medio “core” (aminoácidos 561-1200), que es crítico para el ensamblaje de la maquinaria traduccional y el fragmento del carboxilo terminal (aminoácidos 1201-1560), que al parecer juega un papel regulatorio en la traducción (Fig. 7). La estructura del dominio medio de eIF4GII ha sido recientemente resuelta por cristalografía de rayos X y revela la presencia de 5 repeticiones HEAT (por Huntington, Elongation 3, A subunit of protein phosphatase 2A, Target of rapamycin; Marcotrigiano *et al.* 2001). La caja HEAT se encuentra en proteínas involucradas en complejos multifactoriales formados por arreglos de cinco pares repetidos de hélices alfa antiparalelas (Andrade y Bork, 1995). Así, estos datos estructurales confirmaron la función esencial de eIF4G1 en coordinar todos los componentes requeridos para construir el complejo de preiniciación de la traducción sobre el mRNA. Finalmente, la

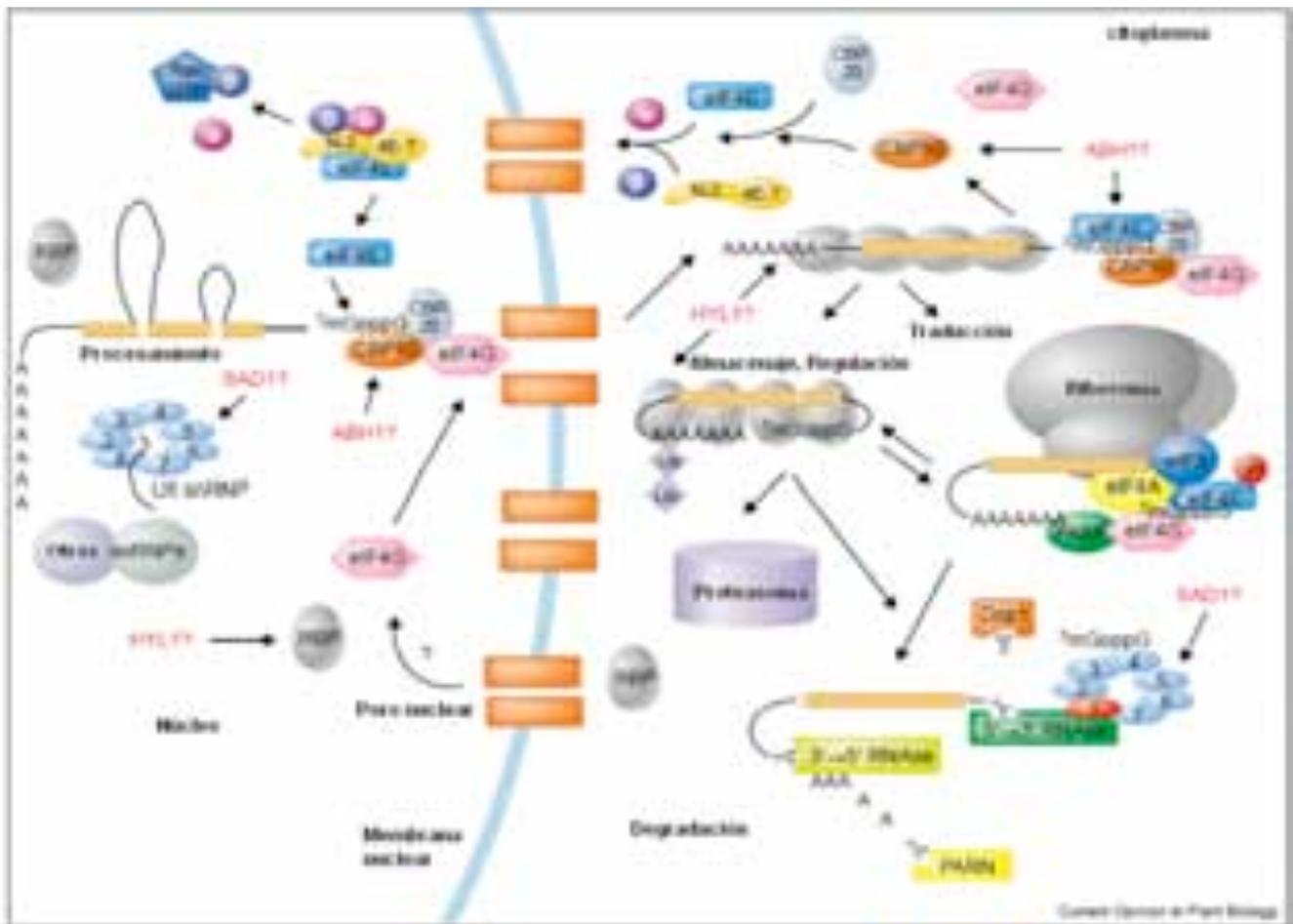
presencia de tres sitios de fosforilación localizados en el dominio medio de eIF4G, sugiere que esta proteína puede ser regulada por eventos de fosforilación (Raught *et al.* 2000).



**Figura 7. Familia de eIF4G en mamíferos y factores que interactúan con este.** Las moléculas de eIF4GI, eIF4GII y p97/DAP-5/NAT-1 están presentadas esquemáticamente. Se muestran los dominios de interacción entre eIF4GI y eIF4A (Lomakin *et al.*, 2000; Morino *et al.*, 2000), eIF3 (Korneeva *et al.*, 2000), Mnk-1 (Morino *et al.* 2000), PABP y eIF4E (Gingras *et al.* 1999b). Se indica la posición de aminoácidos de cada dominio individual. Los dominios probables de enlace de eIF4GII y p97/DAP-5/NAT-1 se presentan. El parecido de eIF4GII y p97/DAP-5/NAT-1 con eIF4GI se expresa como porcentajes de identidad de aminoácidos. La numeración es con respecto a la ampliación de la secuencia amino terminal (Piron *et al.* 1998; Imataka *et al.* 1998).

El eIF4G1 también contiene sitios de enlace para péptidos que no están directamente involucrados en el inicio de la traducción (Fig. 7), pero pueden modular la velocidad de síntesis proteica; entre estos está Mnk1 (Proteína MAP cinasa), responsable de la fosforilación de eIF4E. (Fukunaga y Hunter, 1997; Pyronnet *et al.* 1999). Mnk1 interactúa con la parte del carboxilo terminal de eIF4G1 para formar un complejo trimérico eIF4E– eIF4G1–Mnk-1, que parece ser requerido para la fosforilación (Pyronnet *et al.* 1999). En *S. cerevisiae*, la enzima Dcp1 es una proteína que remueve el *cap* de los mRNAs durante la degradación, la cual se ha reportado que interactúa con eIF4G (Vilela *et al.* 2000). Esta asociación ocurre con el dominio amino terminal de eIF4G, pero es una interacción débil y eIF4E o PABP puede competir por el mismo sitio de unión. Con el fin de interactuar con eIF4G y acceder a 5' *cap*, Dcp1 debe depender de la disociación del complejo eIF4E-eIF4G. Así, a través de la interacción modulada entre los componentes de la traducción y la maquinaria de degradación, eIF4G puede actuar como una molécula sensora para regular el destino del mRNA entre la traducción y la degradación (Fig. 8). Por último, se ha descrito una interacción letal entre las mutaciones en eIF4G y mutaciones en la proteína nuclear de unión a *cap* (CBP80) en *S. cerevisiae*. Experimentos *in vitro* e *in vivo* mostraron una interacción directa entre CBP80 y una región de eIF4G, parcialmente sobrepuesta a los sitios de unión a eIF4E y eIF4A. La CBP80 compite con eIF4G para unir a eIF4E, sugiriendo que el complejo nuclear de unión a *cap* (CBC) se desplaza del nuevo mRNA exportado, por interacción competitiva con el factor de inicio de la traducción en el citoplasma, antes de la primera ronda de traducción (Fortes *et al.* 2000). Recientemente, la asociación entre eIF4G y CBC ha sido descrita en células de mamífero (McKendrick *et al.* 2001). Por último, CBP80 unido a mRNAs está en condiciones de participar en una primera ronda de la traducción; sugiriendo que la subunidad ribosomal 40S pueden reclutarse a los *cap*-mRNAs celulares, incluso en ausencia de eIF4E (Ishigaki *et al.* 2001). Consistente con esto, se ha determinado que CBP80 tiene la capacidad de estimular

entre 2 y 5 veces la traducción en un extracto de levadura extraído de cepas con un eIF4G mutado en la unión a eIF4E y PABP (Fortes *et al.* 2000). Estos datos sugieren que eIF4G puede unir a mRNAs sintetizados *de novo* (a través de la CBC) y participar en el proceso de exportación nuclear e intercambio de CBC por eIF4F citoplásmico (Fig. 8).



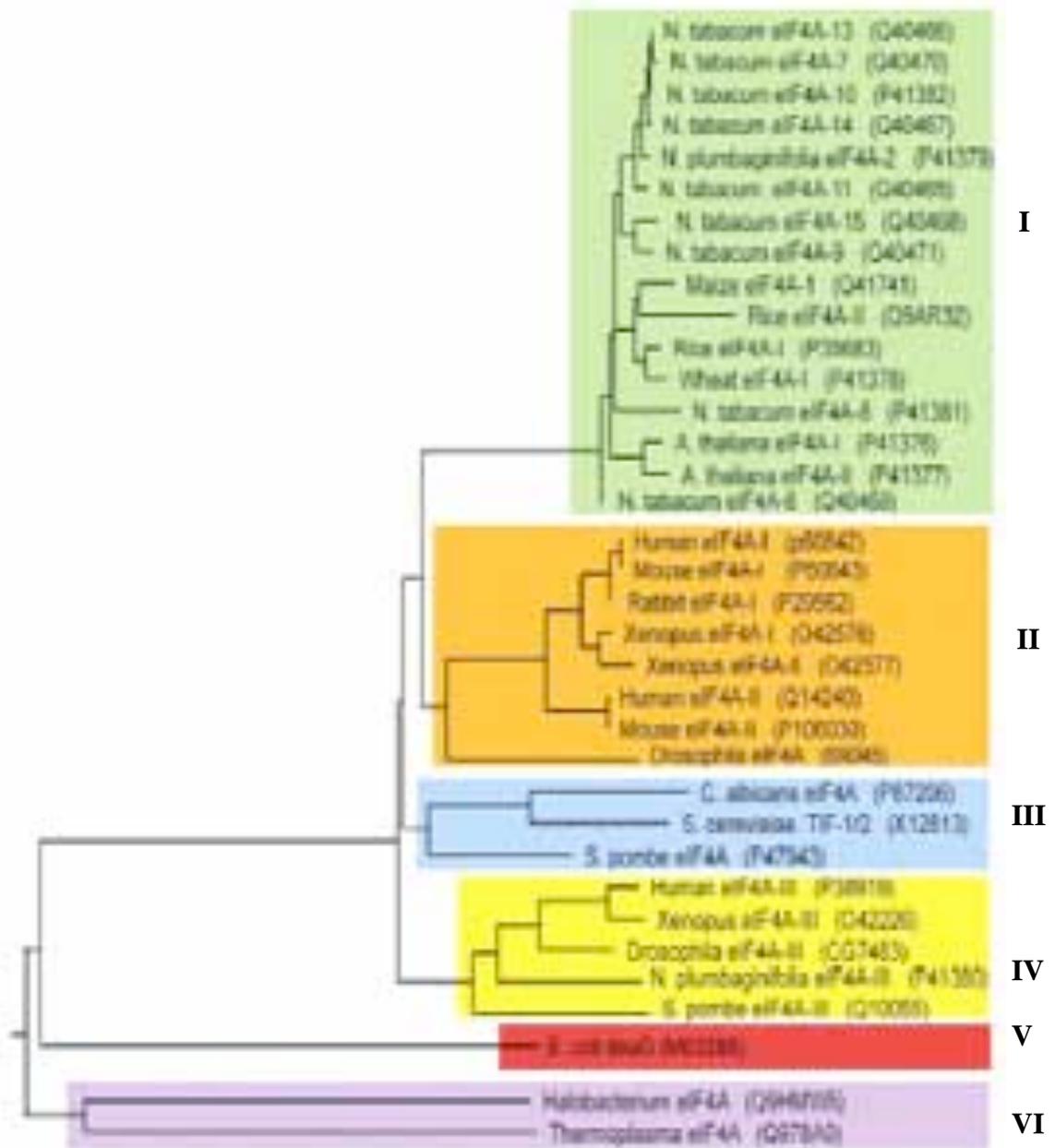
**Figura 8. Representación de proteínas involucradas en el procesamiento, exportación nuclear, traducción y la degradación del mRNA (Tomado de Fedoroff., 2002).** Ran es una GTPasa que participa en el tráfico de Proteínas. Alfa y beta son subunidades de la importina. 4E-T es una proteína involucrada en la importación nuclear de eIF4E. CBP, es una proteína de unión a *cap* nuclear; Dcp1, es una exoribonucleasa específica de *cap*; PARN, es una exoribonucleasa específica de poli(A); RBP, es una proteína de unión a RNA; snRNP, son partículas ribonucleoproteicas pequeñas nucleares; Ub, ubiquitina.

### III.2.2.2.2 Otras Funciones de eIF4G

A continuación, se exponen algunos ejemplos de funciones particulares de proteínas eIF4G: En las levaduras, la traducción del mRNA de HSP101 específicamente requiere a TIF4632 (miembro de la familia de eIF4G) para ser traducido en determinadas condiciones de estrés (Wells et al., 1998). En mamíferos, los *cap*-mRNAs son específicamente traducidos por eIF4GII en el inicio de la diferenciación de las células hematopoyéticas (Caron *et al.* 2004), mientras que eIF4GI se asocia con el complejo nuclear de unión a *cap* (CBC; McKendrick *et al.* 2001), posiblemente, para la exportación del mRNA del núcleo al citoplasma (Prevot *et al.* 2003). En plantas, eIF4G es más eficiente que eIF(iso)4G en estimular la traducción de mRNAs con 5'UTRs estructuradas y, además, lleva a cabo la traducción dependiente de IRES (Gallie y Browning, 2001). En otros trabajos, se ha reportado que eIF4G interactúa con la proteína inducida por choque térmico, HSP101, convirtiéndolo en un factor de estímulo traduccional para el RNA del virus del mosaico del tabaco (TMV; Wells, *et al.* 1998). En estos trabajos se planteó que HSP101 podría promover el inicio de la traducción mediante la unión a una secuencia en la 5'UTR de TMV llamada omega y al interactuar con eIF4G y eIF3, reclutar la subunidad ribosomal 40S al mRNA. Asimismo, podría regular la traducción mediante su actividad de chaperona. Por otro lado, en animales se ha reportado que HSP27, otra proteína inducida por choque térmico, enlaza a eIF4G previniendo el ensamblaje de eIF4F. En estas condiciones de eIF4G es secuestrando en gránulos de estrés por calor (Cuesta, R., *et al.*, 2000). Actualmente, la familia de eIF4G sigue siendo una de las menos caracterizadas de todas las familias de eIF4.

### III.2.2.3 El factor eIF4A

El eIF4A es un polipéptido de aproximadamente 46 kDa con actividad de helicasa dependiente de ATP (Pause y Sonenberg, 1992). El eIF4A es el miembro prototipo de una familia grande de helicasas que contienen una caja DEAD (Rogers *et al.* 2002). El modelo actual para la acción de eIF4A en el inicio de la traducción dependiente de *cap*, consiste en que se une en el extremo 5' del mRNA como parte del complejo eIF4F y, junto con eIF4B, desenrolla la estructura secundaria de la región 5'UTR, creando accesibilidad para el enlace al ribosoma. Durante la localización del codón de inicio AUG, el eIF4A se recicla dentro y fuera del complejo eIF4F, para deshacer la estructura secundaria de una manera dependiente de ATP (Pause *et al.*, 1994). El eIF4A tiene dos sitios de interacción con eIF4GI, uno en el carboxilo terminal, entre los aminoácidos 1201–1411 (Morino *et al.* 2000); el segundo en la parte lateral de eIF4GI, definido entre los aminoácidos 672–970 (Korneeva *et al.* 2001). En humanos, se han caracterizado tres proteínas, eIF4A-I, eIF4A-II y eIF4A-III (Li *et al.* 1999); dos en ratón, eIF4A-I y eIF4A-II (Nielsen y Trachsel, 1988); una en conejo (Conroy *et al.* 1990); tres en *Xenopus* (Morgan y Sargent, 1997); dos en levadura, codificadas por los genes TIF-1 y TIF-2 (Linder y Slonimski, 1989); dos en *Drosophila*, DmeIF4A y DmeIF4A-III (Dorn *et al.* 1993; Palacios *et al.* 2004); y uno en *E. coli* (Lu *et al.* 1999). En el caso de plantas se han encontrado dos genes en *A. thaliana* (Metz *et al.* 1992), uno en trigo (Metz y Browning, 1993) y más de 10 en tabaco (Brander *et al.* 1995; Owtrim *et al.* 1994). Numerosos genes del eIF4A se ha encontrado en otros organismos como *C. elegans* y *C. albicans*. La relación filogenética entre miembros de la familia eIF4A los agrupa en seis clases (Fig. 9): (1) Los eIF4A de plantas (verde); (2) eIF4A-I de mamíferos, eIF4A-I y eIF4A-II de *Xenopus* y eIF4A de *Drosophila* (naranja); (3) eIF4A de hongos (azul); los eIF4A-III (amarillo); (5) eIF4A de *E. coli* (rojo); y (6) eIF4A de archeobacteria (violeta).



**Figura 9. .Relación evolutiva de los miembros de la familia eIF4A.** El número de acceso está en paréntesis (Tomado de Hernández, 2005).

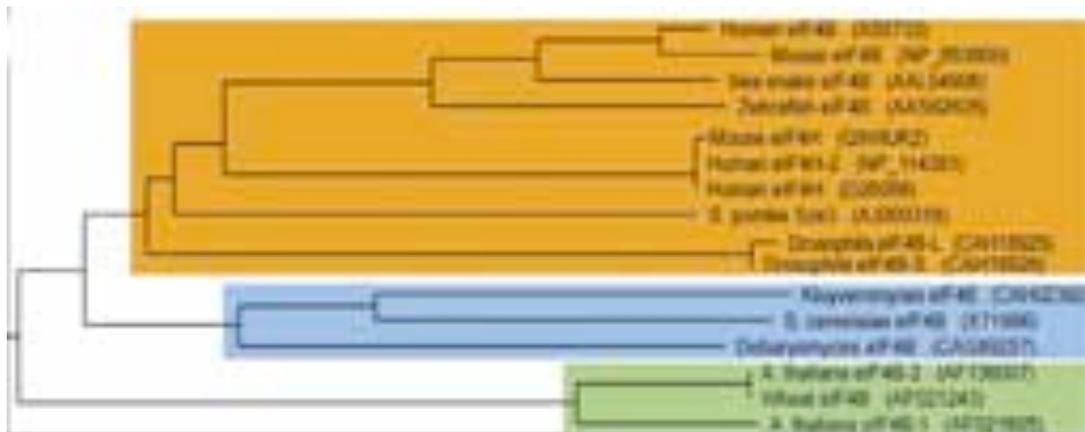
Esta distribución indica la necesidad universal de las helicasas de RNA en el metabolismo celular. El factor eIF4A-I, está extensivamente caracterizado en mamíferos, levadura y trigo, y es una helicasa activa durante el inicio de la traducción (Rogers *et al.* 2002). Las proteínas eIF4A-III fueron recientemente descubiertas y no participan directamente

con la traducción. En humano y *Drosophila*, eIF4A-III forma parte del complejo de empalme del intrón que se forma durante el splicing de los mRNAs. Este complejo también es esencial para la degradación de mRNAs que contienen codones de término prematuros (NMD) en mamíferos (Ferraiuolo *et al.* 2004; Shibuya *et al.* 2004). El eIF4A-III también es esencial para la localización apropiada del mRNA *oskar* en ovocitos (Palacios *et al.* 2004). Las mutantes nulas para DmEIF4A son letales (Dorn *et al.* 1993). Por tanto, mientras eIF4A-I juega un papel fundamental en el inicio de la traducción, eIF4A-III podría servir como una conexión entre la localización, el procesamiento o la degradación del mRNA con la diferenciación celular. Respecto a eIF4A-II, aunque se ha clasificado como una isoforma de eIF4A-I, su función real es desconocida.

No hay explicación plausible para las diferencias en el número de genes de eIF4A identificados en diferentes plantas. Lo único que se sabe es que los miembros de esta familia participan en una variedad de procesos durante el desarrollo. Es interesante que eIF4A-I sea el único entre eIF4s en archaea, ya que los mRNAs de archaeas carecen de estructura *cap* y ningún homólogo de eIF4E o eIF4G parece estar presente en estos organismos (Dennis, 1997). Puesto que el núcleo-citoplasma de las células eucariontes evolucionaron de células protoarcheobacteria, eIF4A-I pudo haber estado presente en el aparato traduccional archaea de un ancestro eucarionte (Woese, 2000).

### III.2.2.4 Los factores eIF4B y eIF4H

Hasta la fecha, se han caracterizado varios miembros de la familia de eIF4B y eIF4H, incluyendo eIF4B de humano (Milburn *et al.* 1990), eIF4B de trigo, eIF4B-1 y eIF4B-2 de *A. thaliana* (Metz *et al.* 1999), TIF3 de *S. cerevisiae* (Milburn *et al.* 1990) y eIF4B-L y eIF4B-S de *Drosophila* (Hernández *et al.* 2004). Se han identificado en el genoma de otros organismos genes que codifican probables eIF4Bs. El eIF4H de humano presenta similitud funcional con el eIF4B de humano (Richter-Cook *et al.* 1998). El SCE3 de *S. pombe* codifica para una proteína de unión a RNA involucrada en la división celular (Schmidt *et al.* 1997) que al parecer es un ortólogo de eIF4H de hongos. La relación evolutiva muestra que las eIF4Bs de plantas (verde), hongo (azul), así como la de mamíferos, pez cebra, serpiente de mar y *Drosophila*, junto con los eIF4Hs y SCE3 (naranja), forman tres grupos separados (Fig. 10).



**Fig. 10 Relación evolutiva de los miembros de la familia eIF4B y eIF4H.** El número de accesoión está en paréntesis (Tomado de Hernández, 2005).

La función de eIF4B y eIF4H durante el inicio de la traducción está bien establecida (López de Quinto *et al.* 2001). Sin embargo, el estudio de la expresión de las isoformas de eIF4B ha sido realizado sólo en *Drosophila*, durante el desarrollo (Hernández *et al.* 2004) y en trigo durante

la germinación (Gallie *et al.* 2007). Hasta ahora, no hay reportes concernientes a la expresión de eIF4H.

La falta de información acerca de eIF4B y eIF4H podría en parte ser debida al hecho en que estas proteínas son las menos conservadas de todos los eIF4s. Básicamente, no hay ninguna similitud de secuencias entre eIF4Bs de levadura y de mamíferos con las de plantas (Metz *et al.* 1999). Esto hace que su identificación en otros organismos sea más difícil.

### **III.2.2.5 El factor eIF3**

El eIF3 es el factor más grande en el inicio de la traducción, de aproximadamente 650 kDa (Behlke *et al.* 1986), y consiste de 10 a 13 diferentes subunidades polipeptídicas en células de mamífero (Hershey y Merrick, 2000; Unbehaun *et al.* 2004). El eIF3 es moderadamente abundante, con 0.5 a 1 molécula/ ribosoma en células HeLa y lisados de reticulocitos de conejo (Mengod y Trachsel, 1985). El eIF3 tiene muchas funciones en el complejo de inicio de la traducción y presenta interacción con los factores eIF1, eIF5, eIF4B y eIF4G. La interacción directa entre eIF3 y eIF4G sirve como un puente entre la subunidad ribosomal 40S y el mRNA unido al eIF4F (Hershey y Merrick, 2000). El eIF3 estabiliza la unión del complejo eIF2-GTP-tRNA<sup>met</sup> a la subunidad 40S (Chaudhuri *et al.* 1999) y, recíprocamente, la unión del complejo ternario a la subunidad 40S (Kolupaeva *et al.* 2005). Incluso en ausencia del complejo ternario, la presencia de RNA puede promover la unión de eIF3 a la subunidad 40S. En este caso se ha propuesto que el virus de la hepatitis (HCV) utiliza esta propiedad de eIF3 para colocar correctamente la subunidad ribosoma 40S sobre el sitio IRES del RNA viral. En levadura, eIF3 comprende sólo cinco subunidades: TIF32 (eIF3a), PRT1 (eIF3b), NIP1 (eIF3c), TIF35 (eIF3g) y TIF34 (eIF3i; Asano *et al.* 1998), todas conservadas con eIF3 de mamíferos (Tabla 2). La delección o mutación de eIF3a (Vornlocher *et al.* 1999), eIF3b (Phan *et al.* 1998), eIF3c (Greenberg *et al.* 1998), eIF3g (Hanachi *et al.* 1999), o eIF3i (Naranda *et al.* 1997), conduce a una reducción de la síntesis proteica; sugiriendo que cada una de las cinco

subunidades es requerida para la integridad del eIF3. Sin embargo, en estudios bioquímicos, usando extracto de levadura, se sugirió que un subcomplejo que comprende las subunidades eIF3a, eIF3b y eIF3c soporta el inicio de la traducción, y que las dos subunidades pequeñas, eIF3g y eIF3i son dispensables para el inicio de la traducción, al menos *in vitro* (Phan *et al.* 2001). Estudios recientes elucidaron mediante reconstitución y análisis de *toeprint*, el “núcleo” funcional del complejo eIF3. En este estudio se encontró que, de las subunidades reportadas en mamífero que son: p170 (eIF3a), p116 (eIF3b), p110 (eIF3c), p69 (eIF3l), p66 (eIF3d), p48 (eIF3e), p47 (eIF3f), p44 (eIF3g), p40 (eIF3h), p36 (eIF3i) y p28 (eIF3k), sólo tres subunidades conservadas: [p170 (eIF3a), p116 (eIF3b), p110 (eIF3c)] y tres subunidades no conservadas: [p69 (eIF3l), p48 (eIF3e) y p40 (eIF3h)], son indispensables para la traducción, y comprende el “núcleo” funcional de eIF3 de mamífero. Esto sugirió que eIF3g y eIF3i podrían estar involucrados en el control traduccional de mRNAs específicos o en condiciones celulares particulares (Masutani *et al.* 2007). Se ha encontrado que eIF3j no está asociado con el complejo en linfocitos T quiescentes, pero una estimulación por mitógenos provoca su unión al complejo y promueve la unión de la subunidad 40S. Esto podría contribuir al incremento de la velocidad de traducción durante la activación de linfocitos (Miyamoto *et al.* 2005). Por otra parte, el proteasoma 20S hidroliza específicamente a eIF3a, la subunidad más grande del complejo, afectando directamente a diferentes mRNAs. Los factores eIF3e y eIF3c poseen dominios PCI (proteasome-COP9-initiation factor) y los factores eIF3f y eIF3h tienen dominios MPN (Mpr1-Pad1-N-Terminal). Los dominios PCI y MPN dirigen la interacción proteína-proteína y se encuentran en algunas subunidades del proteasoma 26S y señalosoma COP9 (Chang y Schwechheimer, 2004). Estos hallazgos en conjunto establecen claramente que eIF3 es un factor esencial para el control traduccional (Hinnebusch, 2006).

**Tabla 2. Resumen de las subunidades de eIF3 en distintos eucariontes.**

Nomenclatura Unificada	<i>H. sapiens</i>	<i>A. thaliana</i>	Trigo	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pompe</i> Complejo csn7B	<i>S. pompe</i> Complejo Int6	Función
eIF3a	p170	P114	P116	TIF32	P107	P107	Se une a 40S, eIF4B, el complejo ternario eIF2-GTP-met-tRNA <sub>i</sub> <sup>met</sup> y recluta al mRNA.
eIF3b	P116	P82	P83	PRT1	P84	P84	Se une a 40S, el complejo ternario eIF2-GTP-met-tRNA <sub>i</sub> <sup>met</sup> , recluta al mRNA y ayuda al escaneo del ribosoma.
eIF3c	P110	P105	P107	NIP1	P104	P104	Une a 40S, el complejo ternario eIF2-GTP-met-tRNA <sub>i</sub> <sup>met</sup> , recluta al mRNA y ayuda en el reconocimiento del AUG
eIF3d	P66	P66	P87	-	-	Moe1	
eIF3e	P48	P51	P45	-	-	Int6	
eIF3f	P47	P32	P34	-	Csn6	Csn6	Posible sitio de unión a mTOR y S6K1
eIF3g	P44	P33	P36	TIF35	Tif35	Tif35	Se une a eIF4B y a la proteína transactivadora (TAV) del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) de plantas
eIF3h	P40	P38	P41b		P40	-	
eIF3i	P36	P36	P41a	TIF34	Sum1	Sum1	
eIF3j	P35	-	-	HCR1	-	-	Se une a 40S; uniendo al complejo multifactorial eIF3, eIF1, eIF5 y al complejo ternario eIF2-GTP-met-tRNA <sub>i</sub> <sup>met</sup> .
eIF3k	P28	P25	P28	-	-	-	
eIF3l	P67	P60	P56	-	-	-	
eIF3m	GA17	-	-	-	Csn7B	-	

### III.2.2.6 La proteína de unión a poly(A) (PABP)

La proteína de unión a poli(A) (Pab1p en levadura y PABP en eucariontes superiores) une a la cola de poli(A) presente en el extremo 3' del mRNA con una Kd de 2 a 7 nM. El prototipo de los miembros de esta familia contiene motivos de reconocimiento a RNA (RRMs) conservados. La Pab1p es esencial en levadura y está involucrada en varios procesos como traducción, estabilidad del mensaje y procesamiento del extremo 3' del mRNA (Gallie, 1998). Estas proteínas presentes en levadura, plantas y animales, no están conservadas en procariontes. Las PABPs han sido divididos en dos categorías relacionadas estrechamente: nuclear y citoplasmática. Típicamente, sólo un gen que codifica PABP citoplasmática (PABPC) está presente en los eucariontes unicelulares, mientras que múltiples genes de PABPC están presentes en los metazoarios y las plantas. También un sólo gen de PABP nuclear (PABPN) ha sido identificado en vaca, rana, humanos, ratón, mosca, gusano y levadura. Hasta el momento, se han identificado genes que codifican un sólo PABPN, cuatro PABPCs y cuatro pseudogenes en células humanas y se ha mapeado su localización cromosómica. En humanos, se observan tres linajes de proteínas PABP: PABPCs (PABPC1, PABPC3 y iPABP); PABPN (PABPN1) y PABPC5. El genoma de ratón codifica una PABP alterna, mPABPC2, que parece ser un retroposón, ya que no tiene intrones y su promotor es distinto de mPABPC1. La mPABPC2 está más estrechamente relacionado a hPABPC3, que también carece de intrones. De forma similar, todos los genes PABPC5 carecen de intrones, sugiriendo que ellos podrían derivarse de eventos de retrotransposición.

En un análisis de comparación evolutiva, se reportaron ocho genes en *Arabidopsis thaliana*. La comparación filogenética acoplada con análisis de la expresión identificó cuatro clases de proteínas de PABP. En la clase I (PAB3 y PAB5) la expresión está limitada a tejido reproductivo; los miembros de la clase II (PAB2, PAB4 y PAB8) son ubícuos y está altamente expresados en tejidos; los miembros de la clase III (PAB6 y PAB7) tienen un patrón restringido

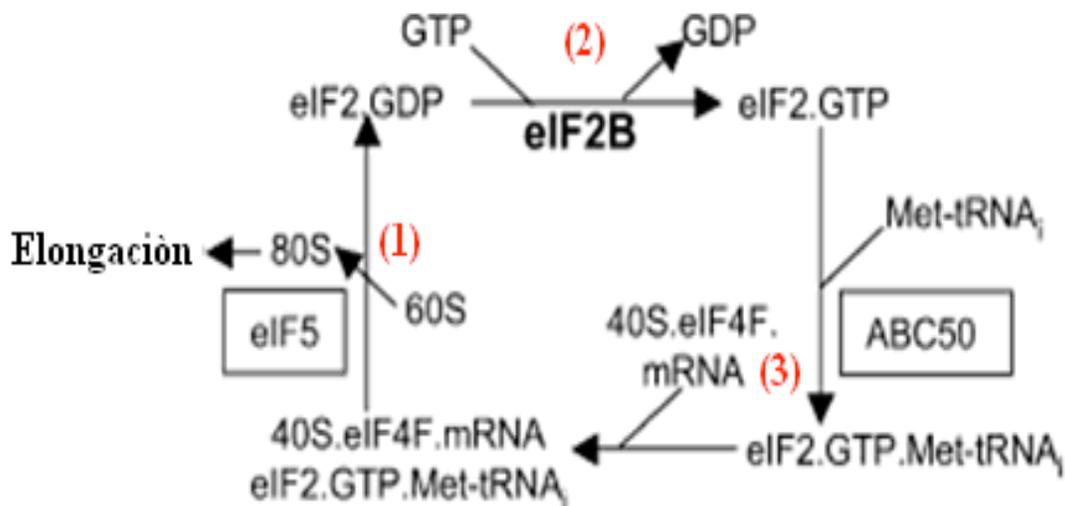
y moderado de expresión. Los miembros de la clase IV tienen expresión baja y es tejido específico (Mangus *et al.* 2003). La comparación de PABPs de *Arabidopsis thaliana* con los de arroz indica que los eventos de duplicación que dieron lugar a las clases I, II y III de plantas con flores ocurrieron antes de la divergencia de las monocotiledóneas con las dicotiledóneas, hace más de 200 millones de años. Por el análisis de la conservación y pérdida de intrones dentro de familia genética de PABP se propuso un modelo evolutivo, en el cual una PABP ancestral dió origen a las clases II, III y IV; con una subsiguiente clase I derivada de la clase II. Aunque las ocho PABPs de *Arabidopsis thaliana* están más estrechamente relacionadas al grupo de las PABPN que de las PABPC de otros eucariontes, ninguna de estas proteínas parece ser una especie PABPN1 auténtica. Una característica conservada entre los genes PABPC1 es una región rica en adeninas en la región 5' no traducible. Varios estudios han sugerido que los PABPs regulan su propia expresión por unión a estas secuencias. La asociación de PABPs con poli(A) requiere un sitio de unión con al menos 12 adenosinas y múltiples moléculas de PABPs, que unen al mismo tracto de poli(A), formando una unidad repetida cubriendo la cola de poli(A). Los PABPs interactúan con poly(A) mediante motivos de reconocimiento a RNA (RRMs); que son típicamente de 90 a 100 aminoácidos de longitud y que parecen estar presentes en las proteínas de todos los tipos de organismos; sugiriendo que es un motivo ancestral con una función en la biología del RNA. Los estudios por resonancia magnética nuclear y cristalografía de rayos X han determinado que el RRM es un dominio globular, compuesto por una lámina-beta formada por 4 hebras antiparalelas, rodeadas por dos hélices alfa. Las dos cadenas-beta centrales de cada RRM incluyen dos motivos altamente conservados: RNP1 octamérico (K/R)-G-(F/Y)-(G/A)-F-V-X-(F/Y), donde X es cualquier aminoácido y RNP2 hexamérico (L/I)-(F/Y)-(V/I)-(G/K)-(N/G)-(L/M). La especificidad para el reconocimiento de poli(A) está mediada por contactos de van der Waals, enlaces de hidrógeno e interacciones de apilamiento con residuos conservados en

el motivo RNP. El papel crucial de los PABPs en la vía de la expresión genética es unir a la cola de poli(A) del mRNA recién sintetizado e interactuar con efectores durante la poliadenilación, exportación y traducción del mRNA. Las PABPs también actúan aparentemente como antagonistas a la unión de factores que permiten el paso terminal de la degradación del mRNA. Careciendo de actividad catalítica, las PABPs proporcionan una plataforma para la unión de otras proteínas, incluyendo eIF4G, eIF4B, el factor de terminación eRF3 (GSPT2) y las proteínas de regulación Paip1 y Paip2 (*PABP-interacting proteins 1 y 2*). La interacción PABP–eIF4G circulariza al mRNA, explicando el sinergismo entre la estructura *cap* y la cola de poli(A) para estimular el inicio de la traducción.

### III.2.2.7 Los factores eIF2 y eIF2B

El factor eucariote eIF2 es un complejo heterotrimérico, que consiste de tres subunidades no idénticas eIF2 $\alpha$ , eIF2 $\beta$  y eIF2 $\gamma$ . El dímero eIF2 $\beta\gamma$  es activo, pero su actividad es baja comparada con el complejo eIF2 $\alpha\beta\gamma$ . El eIF2 enlaza al met-tRNA<sub>i</sub><sup>met</sup> de inicio al sitio P de la subunidad 40S. El GTP unido al eIF2 es necesario para la formación estable de un complejo ternario eIF2•GTP•tRNA<sub>i</sub><sup>met</sup> (TC), con la unión subsiguiente de este complejo ternario a 40S. El apareamiento de bases entre el anticodón del tRNA<sub>i</sub><sup>met</sup> y el codón de inicio AUG dispara la hidrólisis del GTP unido a eIF2; esta reacción también requiere de eIF5. El eIF2 es liberado del ribosoma en un complejo binario estable con el GDP. El factor de intercambio de guanina eIF2B (GEF) es necesario para el reciclaje de eIF2•GDP a eIF2•GTP. El reemplazo de GDP por GTP con ayuda de eIF2B es un evento importante para la regulación del inicio de la síntesis proteica. Esta regulación es mediada por dos ciclos de fosforilaciones; uno involucra a la subunidad eIF2 $\alpha$  y el otro a la subunidad epsilon del factor eIF2B (Fig. 11). El eIF2B es una proteína heteropentamérica y su actividad está controlada por fosforilación (inactivación). La rápida inhibición de la síntesis proteica por fosforilación del eIF2  $\alpha$ , mediante cinasas

dependientes de estrés, no ocurre de forma global, sino que induce cambios en la traducción de mRNAs específicos que codifican a proteínas que ayudan a enfrentarse al estrés (Browning, 2004).



**Fig. 11. Ciclo de eIF2 y eIF2B en la traducción.** (1) El GTP unido al eIF2 es necesario para la formación estable de un complejo ternario eIF2•GTP•tRNA<sub>i</sub><sup>met</sup> (TC); que junto con la subunidad 40S y los factores de inicio de la traducción (eIF4F) es reclutado al mRNA para su traducción. El GTP es hidrolizado durante el reconocimiento del codón de inicio AUG para dar el complejo eIF2-GDP, que sale del complejo de preiniciación y permite la entrada de la subunidad 60S (mediado por el factor eIF5); lo que da lugar a la formación de la unidad catalítica 80S, que favorece la unión de los enlaces peptídicos de las proteínas. (2) El GDP unido a eIF2 es intercambiado por GTP mediado por el factor de intercambio de guanina eIF2B. (3) El eIF2 otra vez unido a GTP puede unirse nuevamente a tRNA<sub>i</sub><sup>met</sup>, para formar el complejo ternario (promovido por ABC50). Junto con los componentes de la maquinaria de traducción puede participar en otra ronda durante el inicio de la traducción.

### III.2.3 Mecanismos de regulación del inicio de la traducción

Puesto que el primer paso del reclutamiento del mRNA a los ribosomas es la unión del complejo eIF4F en el extremo 5' del mensaje, no es sorprendente que el proceso esté altamente regulado a este nivel. En mamíferos, la actividad del complejo eIF4F está regulada de forma global por la subunidad que une a *cap*, eIF4E, a través de dos mecanismos separados, fosforilación y unión a proteínas inhibitorias (Sonenberg y Dever, 2003).

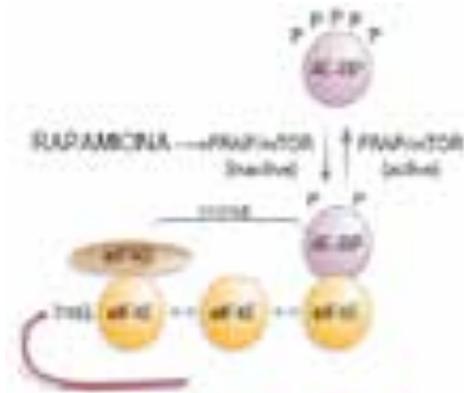
### III.2.3.1 Regulación por fosforilación

En mamíferos e insectos eIF4E es una fosfoproteína de aproximadamente 24 kDa. Esta es fosforilada por la MAP cinasa, Mnk1 o Mnk2 (Ruud A. 1998). Las Mnks se unen directamente con eIF4G (Pyronnet *et al.* 1999). El eIF4E fosforilado ha sido preferentemente co-purificado en el complejo eIF4F, debido probablemente a que posee una mayor afinidad por *cap*. La fosforilación de eIF4E se da en la ser209 potenciando la interacción con *cap* (Fig. 5). La fosforilación de eIF4E se incrementa en respuesta a algunos estímulos extracelulares tales como hormonas, factores de crecimiento y mitógenos. La desfosforilación de eIF4E durante estrés celular, choque térmico, e infección por virus, resulta en una disminución de la velocidad de traducción. La relevancia biológica de la fosforilación de eIF4E no es aún clara, aunque está correlacionada con la velocidad de traducción (Sonenberg, N., 2008).

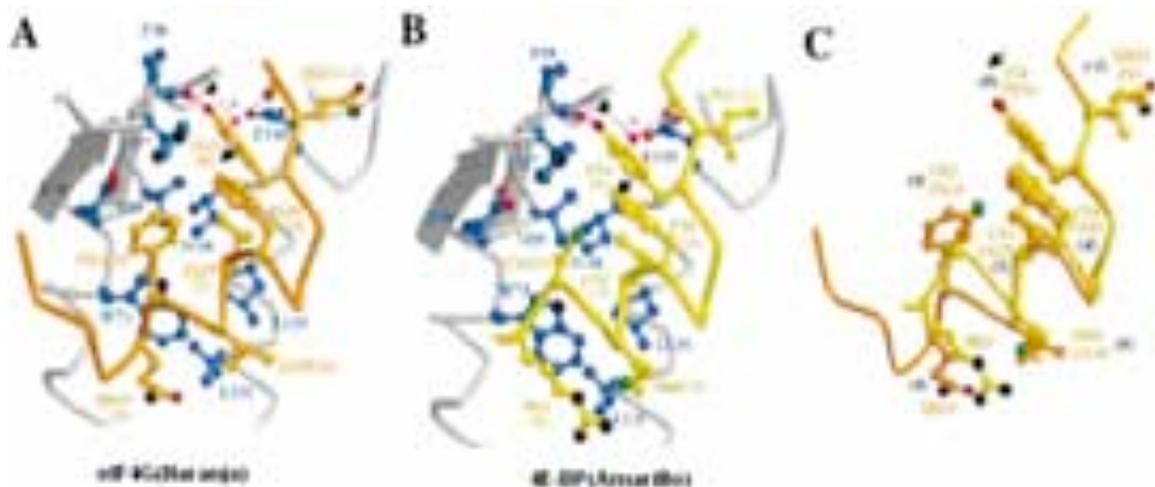
### III.2.3.2 Regulación por proteínas de unión a eIF4E.

La actividad de eIF4E está modulada en respuesta a estímulos fisiológicos por una clase de reguladores negativos que son proteínas que se unen a este factor (4E-BPs) e inhiben la traducción dependiente de *cap* por competencia con eIF4G (Fig. 12). Esto ocurre mediante un secuencia conservada (YXXXXL $\Phi$ ; donde X puede ser cualquier amino ácido y  $\Phi$  un residuo hidrofóbico; Figs. 12 y 13), presente tanto en eIF4G como en 4E-BP, que es responsable de su interacción con eIF4E. La actividad de los 4E-BPs es regulada por su nivel de fosforilación (Pause y Sonenberg, 1992). En un estado hipofosforilado, 4E-BPs se encuentra unido a eIF4E, impidiendo la interacción con el factor eIF4G y, por tanto, la formación del complejo eIF4F necesario para una efectiva traducción. Cuando hay un estímulo interno (hormonal, mitógenos o factores de crecimiento) 4E-BP se hiperfosforila por medio de una cascada de fosforilaciones y tiene un cambio conformacional haciéndolo menos afín al factor eIF4E, por lo que lo libera para unir a eIF4G e iniciar la traducción. De esta manera, el inicio de la

traducción es controlado por los estímulos a los que la célula debe responder (Revisado por Gingras, 2004).



**Figura 12. Control traduccional por proteínas inhibitorias.** Este proceso ocurre debido a que las proteínas tipo 4E-BP comparten la misma secuencia de enlace de eIF4G para unirse con eIF4E; por lo que compiten por este último. Su regulación está controlada por cinasas y fosfatasas.



**Figura 13. eIF4G (A) y 4E-BP (B) interactuando con eIF4E mediante una secuencia YXXXXLΦ (donde X puede ser cualquier aminoácido y Φ un residuo hidrofóbico) presente tanto en eIF4G como en 4E-BP.** La posición de los residuos de aminoácidos se muestra entre paréntesis con la tirosina conservada en la posición (0). El factor eIF4E está representado en color gris; el eIF4G en color naranja y 4E-BP en color amarillo. Los residuos de eIF4E involucrados en el contacto intermolecular son marcados en azul y los enlaces de hidrógeno y contactos mediados por agua son representados por líneas punteadas (C) La sobreposición de las secuencias de eIF4G y 4E-BP, muestra que ambas adoptan una estructura terciaria similar (tomado de Marcotrigiano *et al.* 1999)

Además de 4E-BPs, existen otras proteínas, que pueden o no usar la secuencia común de enlace a eIF4E (YXXXXLΦ), las que participan en la regulación traduccional de mensajeros específicos. Este es el caso de algunos mecanismos de regulación que programan la división celular mitótica y meiótica en *Xenopus*, y que ayudan a establecer la polaridad del embrión en *Drosophila*. Por ejemplo, en este último caso, la proteína *cup* se une tanto a eIF4E como a proteínas de enlace en el extremo 3' UTR de algunos mRNAs que deben tener una traducción espacialmente restringida en el embrión. Estos forman complejos traduccionalmente inactivos para evitar la acumulación inadecuada de la proteína correspondiente (Vardy, 2007)

En ovocitos de *Xenopus* el mensajero que codifica para la ciclina B1, que en un estado traduccionalmente quiescente tiene una cola de poli(A) corta de ~20 nt, está reprimido por la proteína *maskin* mediante la misma secuencia de unión 4E-BP. *Maskin* se encuentra unida a la proteína de unión al elemento de poliadenilación citoplasmática (CPEB) que a su vez reconoce secuencias específicas en la región 3'UTR del mRNA. Esto permite formar los complejos traduccionalmente inactivos, donde eIF4G no puede interactuar con eIF4E y el resto de maquinaria traduccional no puede ser reclutada. En respuesta a estímulo por progesterona (preparación para la maduración) la cola de poli(A) se elonga a ~ 100 nt. La poliadenilación es activada por fosforilación de CPEB y, a la vez, induce la fosforilación de *maskin* causándole un cambio conformacional y haciéndola menos afín a eIF4E. A su vez, la unión de PABP con la cola de poli(A) desplaza a *maskin* permitiendo la interacción eIF4E- eIF4G para el inicio de la traducción (Vardy, 2007).

### **III. 3 Miembros de la familia eIF4E en plantas.**

El inicio de la traducción en plantas requiere el reconocimiento de la estructura *cap* presente en los mRNAs por cualquiera de las proteínas eIF4E o eIF(iso)4E, que forman parte de los complejos heterotriméricos eIF4F y eIF(iso)4F, respectivamente. El eIF4E (p26), la isoforma ortóloga de eIF4E-1 de mamíferos, así como el eIF(iso)4E (p28) pertenecen ambos a la clase 1 de eIF4E. Han sido estudiadas en varios tipos de plantas, tales como trigo, arroz, maíz, tabaco, *Arabidopsis* y otras. Cada una de estas isoformas forma complejos diferentes mediante su interacción con las correspondientes proteínas eIF4G de 200 kDa y eIF(iso)4G de 86 kDa. El eIF4E y eIF(iso)4E presentan selectividad en el reconocimiento de estructuras *cap* mono y di-metiladas (Carberry y Goss, 1991) y en la distribución tisular en las plantas (Rodríguez *et al.* 1998). La tercer isoforma de eIF4E se encontró en *Arabidopsis* (Ruud *et al.* 1998) y se nombró como proteína novedosa de unión a *cap* (nCBP). La nCBP puede unirse a eIF(iso)4G para formar un complejo capaz de soportar la traducción *in vitro*; este complejo tiene aproximadamente un 30% de eficiencia en la traducción comparado con el complejo eIF(iso)4F.

### **III.4 Expresión de los complejos eIF4E y eIFiso4E durante la germinación en maíz**

Con respecto a la semilla maíz se ha encontrado que eIF4E y eIF(iso)4E se expresan diferencialmente durante la germinación en los ejes embrionarios (Dinkova y Sánchez de Jiménez, 2000). El factor eIFiso4E se expresa mayoritariamente en comparación con eIF4E y durante la germinación los niveles de eIF4E aumentan a partir de las 12 horas hasta alcanzar los niveles de eIF(iso)4E y, al parecer, regulan la traducción selectiva de mRNAs en este proceso (Dinkova y Sánchez de Jiménez, 2000). La expresión de eIF(iso)4E está regulada a su vez a nivel de la traducción de su mensaje, por un estímulo selectivo con factores de crecimiento (Dinkova *et al.* 2000). Los primeros estudios sobre la función diferencial de las

isoformas eIF4E y eIF(iso)4E fueron realizados utilizando el grupo de mRNAs almacenados en la semilla quiescente de maíz (Dinkova *et al.* 2000). La importancia del estudio de la traducción selectiva durante la germinación es debido a que depende únicamente de este tipo de mensajes (Larkins *et al.* 1982). Asimismo, la selección de mRNAs para su traducción en esta etapa se ha descrito como uno de los mecanismos esenciales para la decisión de germinar mediante elongación de la radícula (Larkins *et al.* 1982). Durante los eventos posteriores a la germinación, aunque la transcripción de nuevos mRNAs es crucial para el crecimiento de la plántula, la regulación traduccional sigue teniendo un papel importante.

### **III.5 Interacción de eIF4E de plantas con proteínas diferentes a eIF4G.**

Existen escasos datos en la literatura sobre las proteínas que se unen a las isoformas de eIF4E en plantas y regulan el inicio de la traducción. Sin embargo, se han reportado dos proteínas que interaccionaron en análisis de doble híbrido con los diferentes miembros de eIF4E de *Arabidopsis thaliana* (Freire *et al.* 2000; Freire, 2004). Una de las proteínas encontradas en este estudio fue la Lipoxigenasa 2 (AtLOX2) que contiene una secuencia muy similar a las 4E-BPs, LKKYRKEEKLE e interacciona con eIF(iso)4E (Freire *et al.*, 2000). A pesar de que la localización de AtLOX2 es principalmente *cloroplástica*, esta proteína mostró ser capaz de interactuar con diferentes isoformas en eIF4E. Los estudios sobre la competencia entre AtLOX2 y eIF(iso)4G por el eIF(iso)4E sugiere que AtLOX2 podría no desplazar la interacción entre eIF(iso)4G y eIF(iso)4E. Los niveles de AtLOX2 son altos en tejidos de rápido crecimiento, en zonas de división celular y durante el ataque de patógenos. Su actividad parece estar relacionada con la biosíntesis de reguladores de crecimiento tales como el ácido jasmónico y a metil jasmonato. Hasta ahora, no se conoce la relevancia de la interacción eIF4E – AtLOX2 *in vivo*. Otra proteína que surgió como interactora de eIF(iso)4E en *Arabidopsis thaliana* es AtBTF3, homóloga del factor BTF3, que es la subunidad  $\beta$  del

complejo heteromérico asociado a polipéptido naciente (NAC) (Freire, 2004). La secuencia propuesta para la interacción fue RLQSTLKRIG que se encuentra en los primeros 101 aminoácidos de AtBTF3. Esta secuencia es similar al de proteínas de enlace a eIF4E (4E-BPs). Los estudios mostraron que AtBTF3 es capaz de competir con eIF(iso)4G en la formación del complejo eIF(iso)4F.

Los antecedentes indican que las proteínas de unión a eIF4E pueden establecer mecanismos de regulación de la síntesis de proteínas ya sea a nivel general o mensaje-específico. Los hallazgos en plantas no han arrojado mucha luz en este sentido y los reportes han sido basados en la identificación mediante el sistema de doble híbrido. Tomando en cuenta las herramientas que nos proporciona el modelo de estudio del maíz en germinación, propusimos la siguiente hipótesis:

## **IV. HIPÓTESIS**

Dado que en diferentes organismos eucariontes existen proteínas que regulan la formación del complejo eIF4F, en maíz existen proteínas de unión selectivas para eIF4F y eIF(iso)4F, las cuales podrían estar regulando el inicio de la traducción durante la germinación.

## **V. OBJETIVOS**

### **V. 1 OBJETIVO GENERAL**

El objetivo de este trabajo fue identificar proteínas que forman parte de los complejos eIF4F y eIF(iso)4F en ejes quiescentes [eIF(iso)4F] y en ejes germinados [eIF4F/eIFiso4F]; diferenciándolas por las etapas seleccionadas.

### **V. 2 OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1) Estandarizar el método de extracción de los complejos eIF4F y eIF(iso)4F con el fin de identificar proteínas que interaccionen con estos complejos.
- 2) Analizar el patrón de bandas proteicas que co-eluyen con los complejos eIF4F y eIF(iso)4F en ejes de 0 y 24 h de germinación y elegir las de mayor cambio para su identificación por espectrometría de masas (LC/MS/MS).
- 4) Comparar las secuencias obtenidas por LC/MS/MS con la base de datos disponible para el maíz en NCBI.
- 5) Corroborar algunas proteínas de unión a los complejos por *western blot*.

## **VI. MATERIALES Y ESTRATEGIA METODOLÓGICA**

### **VI.1 Sistema biológico**

Las semillas de maíz (*Zea mays L.*) utilizadas fueron de la variedad Chalqueño de origen Mexicano. Los ejes del maíz fueron extirpados manualmente tanto de semillas sin germinar (quiescentes) como de semillas con un período de germinación de 24 h, por imbibición en un colchón de algodón humedecido con agua, a 25 °C en la oscuridad.

### **VI. 2 Método de purificación de los complejos eIF4F y eIF(iso)4F de ejes embrionarios de maíz.**

Los ejes embrionarios se reducen a polvo fino con nitrógeno líquido en un mortero y se mezclan con 20 ml con solución amortiguadora A [100 mM KCl, 20 mM HEPES pH 8.6, 0.2 mM EDTA, 10 % Glicerol (v/v), 100 mM PMSF, 0.5 mM DTT y una tableta de inhibidores de proteasas "Complete TM" libre de EDTA (Roche Molecular Diagnostics) por cada 50 ml de solución]. La extracción se realizó a 4<sup>0</sup>C y el extracto proteico total se clarifica por centrifugación a 15000 rpm en un rotor Sorvall tipo 20. El sobrenadante se pasó a través de 7 capas de gasa y se incubó con 0.5 ml de la resina m<sup>7</sup>GTP-Sefarosa (GE Healthcare) durante 1.5 h. Posteriormente, la mezcla se depositó en una microcolumna (BioRad) para realizar la cromatografía de afinidad. La resina se sometió a los siguientes lavados: el primero con 5 ml (10 veces el volumen de la resina) de solución amortiguadora B [100 mM KCl, 20 mM HEPES, pH 7.6, 0.2 mM EDTA, 10% Glicerol (v/v), 0.5 mM PMSF, 0.5 mM DTT, inhibidores de proteasas], con el fin de eliminar impurezas proteicas; el segundo con 5 ml (10 veces el volumen de la resina) de solución amortiguadora C [100 mM KCl, 20 mM HEPES, pH 8.6, 0.2 mM EDTA, 10 % Glicerol(v/v), 0.5 mM PMSF, 0.5 mM DTT, inhibidores de proteasas y 100 µM GTP], para eliminar interacciones inespecíficas y GTPasas. La elución de eIF4F y eIF(iso)4F se realizó en 5 fracciones, cada uno con 400 µL con solución amortiguadora D [100 mM KCl,

20 mM HEPES, pH 7.6, 0.2 mM EDTA, 10% Glicerol (v/v), 0.5 mM PMSF, 0.5 mM DTT, inhibidores de proteasas y 200  $\mu$ M de  $m^7$ GTP].

### **VI. 3 Detección de los complejos eIF4F y eIF(iso)4F por SDS-PAGE y *western blot*.**

Los complejos eIF4F y eIF(iso)4F colectados en 5 fracciones de 400  $\mu$ l cada una, se analizaron por SDS-PAGE unidimensional, tiñendo con plata y por *immunoblot* con anticuerpos policlonales dirigidos contra proteínas recombinantes.

#### **VI.3.1 Electroforesis SDS-PAGE y transferencia.**

Las proteínas eluidas con  $m^7$ GTP, así como el último mililitro de cada lavado (50  $\mu$ l de cada fracción y lavados) y 7  $\mu$ l del total del extracto del eje de maíz, se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 15%. La electroforesis se llevó a cabo en un equipo de BIO-RAD modelo Mini-PROTEAN 3 cell, en solución amortiguadora (55 mM de Tris, 431 mM de glicina, 1% de SDS y 20 de metanol) a 90 Volts, por aproximadamente 3 h. Las proteínas fueron transferidas durante 1 hora a 100 volts a una membrana para *immunoblot* PVDF (Millipore) por el método húmedo en un equipo de BIO-RAD modelo Mini-trans-blot cell 3.

#### **VI.3.2 Tinción con plata**

Las proteínas en el gel se fijaron en una solución que contiene 50% metanol, 12% ácido acético y 0.02% de formaldehído al 37% por 3 horas; posteriormente se realizaron tres lavados con etanol al 35 %, por 20 minutos. El gel se sensibilizó con una solución de tiosulfato de sodio al 0.02% por 2 minutos y se lavó 3 veces con H<sub>2</sub>O, cada vez por 5 minutos. Entonces el gel se incubó con una solución de plata (0.4% AgNO<sub>3</sub>, 25 mL de NaOH al 0.36%, 2 ml de NH<sub>4</sub>OH al 28-30%) por 30 minutos y se lavó 2 a 3 veces con H<sub>2</sub>O, cada vez por 5 minutos. Las proteínas se revelaron con una solución que contiene 2 mL de citrato de sodio al 1%, 200  $\mu$ l de formaldehído al 37% y 200 mL de H<sub>2</sub>O. La tinción se detuvo con una solución que contiene

50% metanol, 12% ácido acético y 0.02% de formaldehído al 37%. El gel teñido se almacenó en H<sub>2</sub>O hasta por 15 días para secuenciar las bandas proteicas.

### **VI.3.3 Western blot**

Las membranas se bloquearon durante una hora con leche al 5% en PBS (68 mM de NaCl, 1.3 mM de KCl, 5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O) y 1% tween 20 (BIO-RAD), seguido de la incubación por 2 horas con anticuerpos policlonales de suero de conejo dirigidos contra: el complejo eIF4F de trigo donado por la Dra K. S. Browning (Universidad de Texas, Austin, TX, U.S.A.), en una dilución 1:5000; HSP101 de maíz, donado por el Dr. Jorge Nieto (Instituto de Biotecnología UNAM, Cuernavaca, Méx.) en una dilución 1:1000; LOX2 de frijol, donado por el Dra. Elena Porta Ducoing (Instituto de Biotecnología UNAM, Cuernavaca, Méx.) en una dilución 1:100; la proteína recombinante eIF4E de maíz en una dilución 1:1000. Las membranas fueron entonces incubadas por 1 hora con un segundo anticuerpo contra conejo conjugado con la peroxidasa en una dilución 1:5000. Entre cada incubación con el primer y segundo anticuerpo se realizaron 3 lavados con PBS y 1% tween 20, por 15 minutos. La detección fue realizada con el sustrato *quimioluminisciente* immobilon HRP (Millipore) y mediante exposición a película radiográfica.

### **VI.3.4 Obtención de anticuerpos anti-eIF4E de maíz**

Para la obtención del anticuerpo policlonal anti-eIF4E, se purificó la proteína recombinante como se describe en el apartado de resultados **VII.1**. La proteína se obtuvo por corte de la banda del gel y se solubilizó con suero (PISA) y adyuvante (Sigma) a volumen final de 1 ml. La inmunización del conejo llevó a cabo durante 3 semanas, inyectando vía intramuscular aproximadamente 1 mg de proteína recombinante cada 5 días. La inmunización se realizó en el bioterio del edificio "A" de la facultad de química. En el análisis del título mediante *dot-blot* y *western blot* utilizando diferentes concentraciones de anticuerpo, se encontró que la dilución efectiva para detectar a eIF4E es 1:1000.

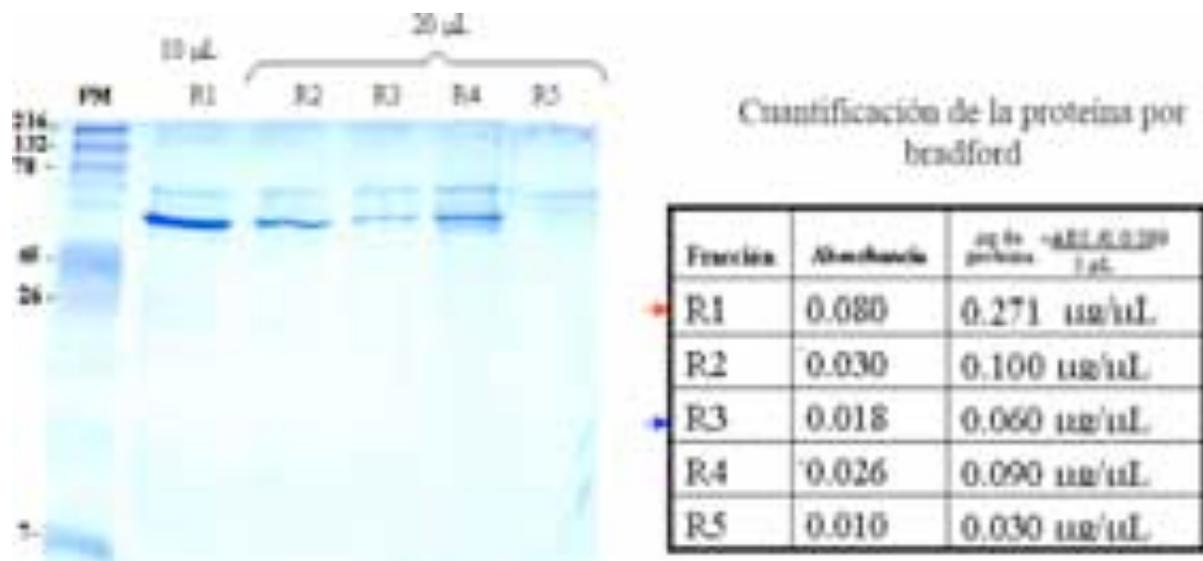
#### **VI.4 Análisis de péptidos mediante LC/MS/MS**

Para identificar los péptidos, las muestras se enviaron a la unidad de proteómica de la Universidad de Laval en Québec Canadá (ULAVAL.CA), donde se utilizó el método de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC/MS/MS); que consiste en la digestión de la muestra por proteasas (normalmente tripsina) seguido de LC-MS/MS para obtener la secuencia de cada una de las bandas seleccionadas y cortadas del gel. Cada una de las secuencias obtenidas se analizó por el programa “*Scaffold*” y la base de datos del maíz disponible en NCBI.

## VII. RESULTADOS

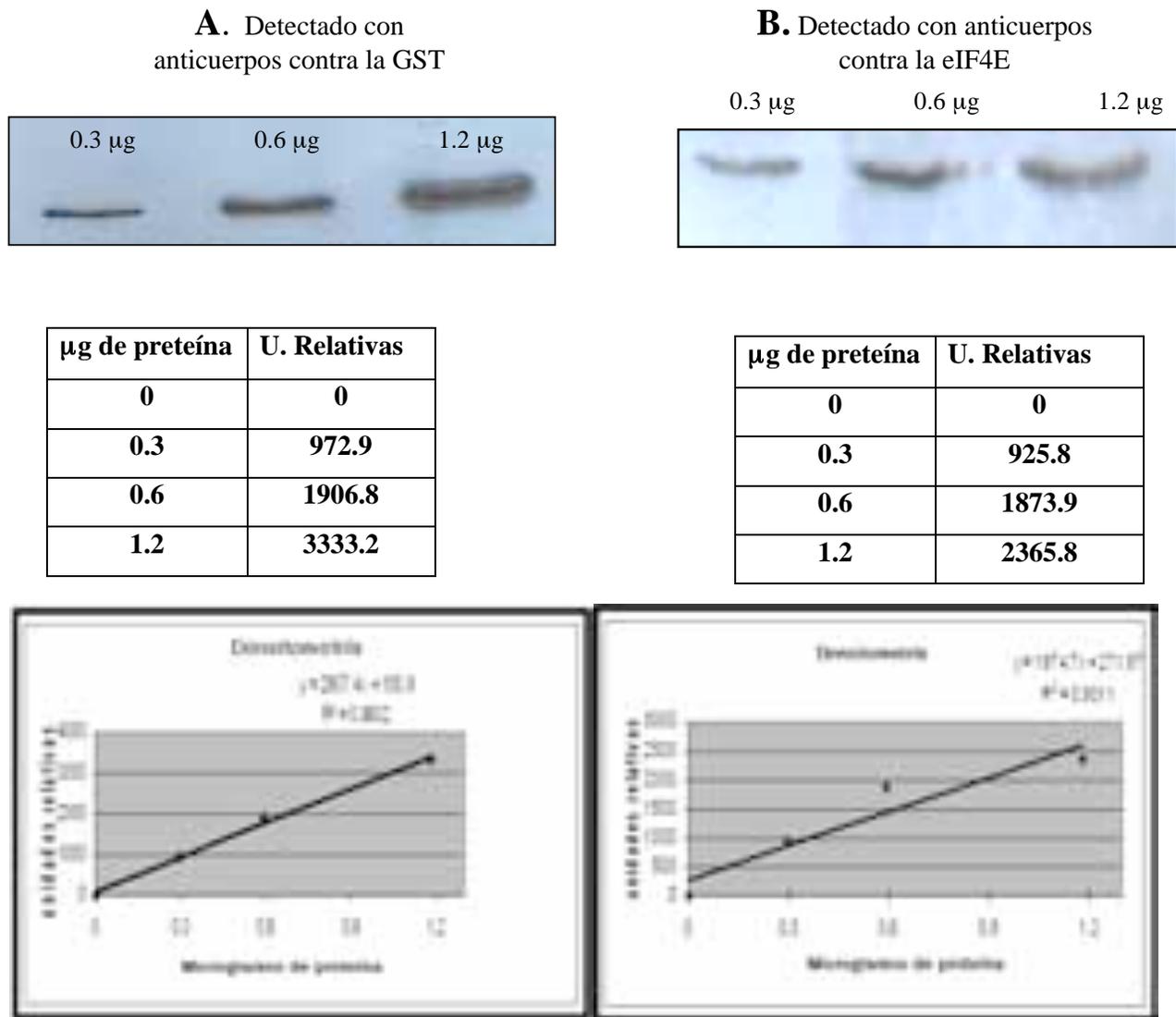
### VII.1 Estandarización del método de extracción de los complejos eIF4F y eIF(iso)4F.

Para la estandarización de la extracción de los complejos eIF4F y eIF(iso)4F, se valoró el rendimiento de 500  $\mu$ l resina m<sup>7</sup>GTP-Sefarosa en una columna de afinidad, utilizando una proteína eIF4E recombinante de maíz fusionada a GST. La proteína se obtuvo a partir de la inducción con 100  $\mu$ M de IPTG a un cultivo de *E. coli* conteniendo el vector pZm4E-GST, que fueron lisadas mediante sonicación. La purificación de la proteína recombinante se realizó mediante cromatografía de afinidad utilizando la resina glutatión-Sefarosa; en la que se obtuvieron 5 fracciones de un mililitro, cuya concentración de proteína se cuantificó mediante Bradford (Fig.15).



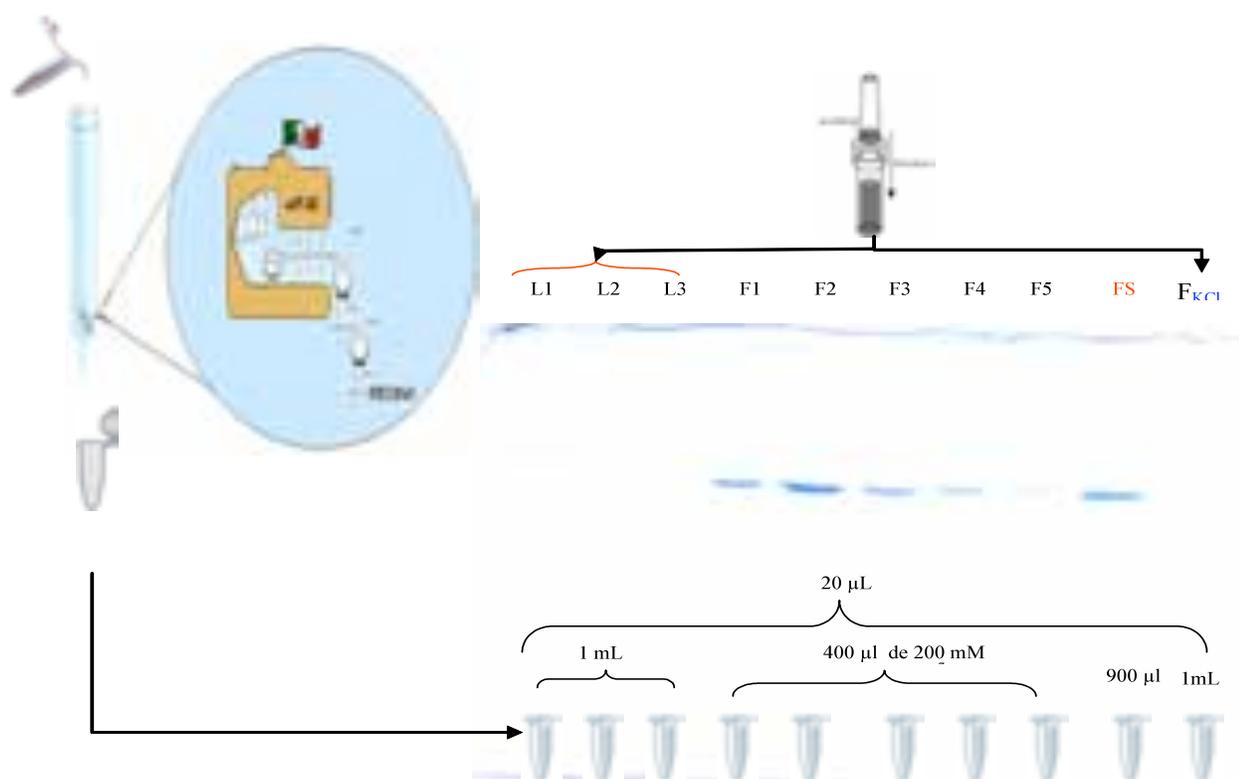
**Figura 15. Obtención de la proteína recombinante.** La fracción 3 (R3) fue utilizada para la obtención de una curva de densitometría y la fracción 1 (R1) para la medición del rendimiento de la columna de m<sup>7</sup>GTP-Sefarosa.

De las cinco fracciones obtenidas, la tercera se utilizó para obtener una curva densitométrica; para la que se cargaron tres diferentes concentraciones de eIF4E recombinante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para la separación, que posteriormente fueron transferidos a una membrana de PVDF y detectados por *immunoblot* mediante anticuerpos contra GST y eIF4E (Fig.16; A y B). La obtención de las curvas mediante el programa "Quantity one" en ambos casos fue aproximadamente igual.



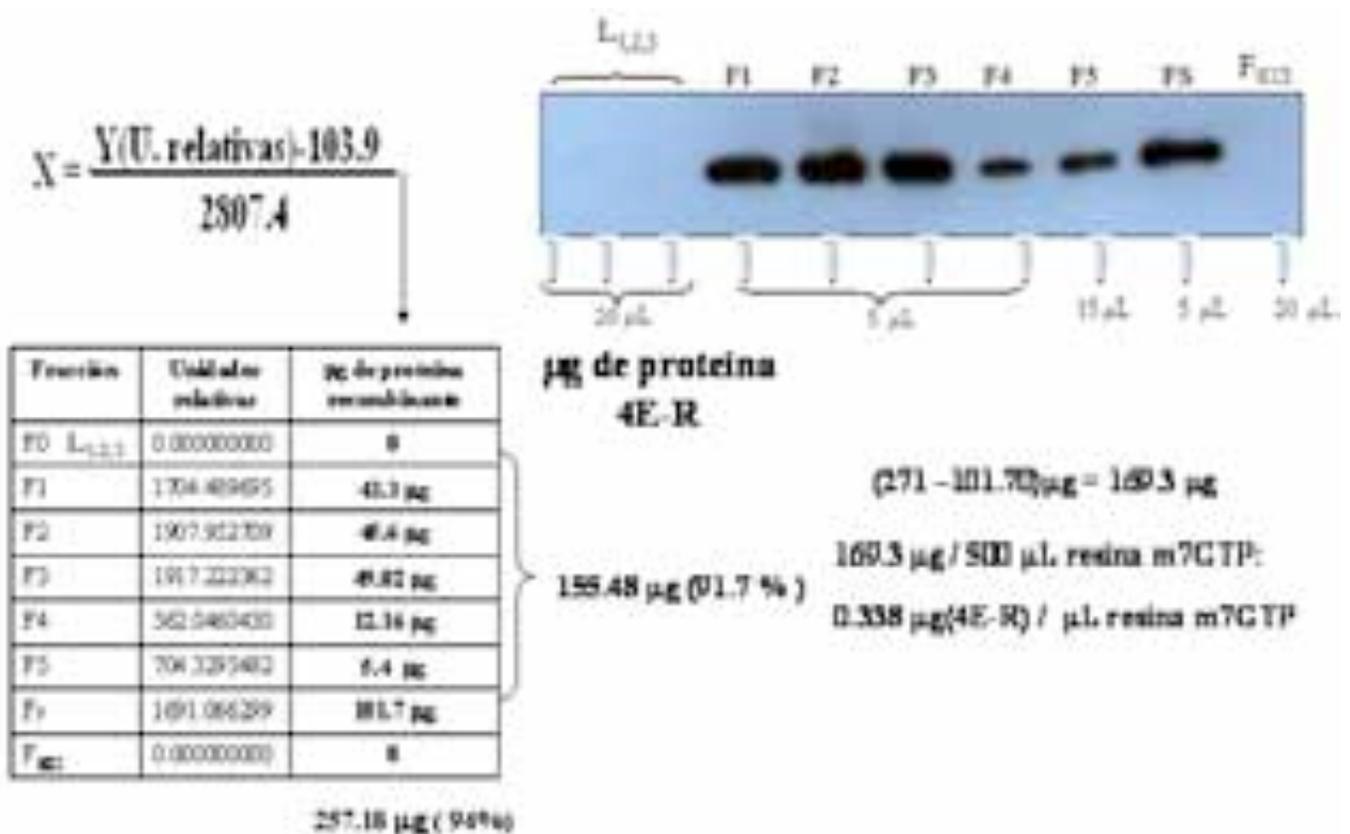
**Figura 16.** Obtención de la curva de densitometría de las bandas por *immunoblot*, usando anticuerpos contra GST y a eIF4E.

Para medir el rendimiento de la resina m<sup>7</sup>GTP-Sefarosa en la columna de afinidad, se incubaron 500 µL de resina con 271.0 µg de la proteína recombinante durante 1.5 horas. Se centrifugó para obtener el sobrenadante (SN) y la resina se depositó en una microcolumna con la m<sup>7</sup>GTP-Sefarosa. Las fracciones de los lavados (L1, L2, L3), las fracciones eluidas con m<sup>7</sup>GTP (F1, F2, F3, F4, F5) y con KCl 0.5 M (F<sub>KCl</sub>), así como el sobrenadante (FS), se resolvieron en un gel SDS-PAGE, cargando un volumen constante de 20 µL de cada fracción. Como se puede observar en la Figura 17, el factor eIF4E muestra una alta afinidad a la resina m<sup>7</sup>GTP-Sefarosa y un alto rendimiento de recuperación con el buffer de m<sup>7</sup>GTP 200 µM. Sin embargo la resina se satura con aproximadamente la mitad del total de proteína añadida (≈ 169.3 µg).



**Figura 17. Rendimiento de la columna m<sup>7</sup>GTP-Sefarosa.** Como se observa en el gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie, el factor eIF4E sólo se obtiene en fracciones eluidas con m<sup>7</sup>GTP (F1, 43.3 µg; F2, 45.6µg; F3, 49. 02 µg; F4, 12.16 µg y F5, 5.4 µg). Sin embargo, la resina se satura con aproximadamente la mitad de proteína recombinante (Fs, 169.3 µg).

Cada una de las fracciones anteriores fue analizada por *western blot* y cuantificadas densitométricamente mediante la curva patrón utilizando el programa “Quantity one”. Como se observa en los valores de la tabla (Fig.18); de los 271.0  $\mu\text{g}$  incubados con 500  $\mu\text{L}$  de resina, sólo se retienen 155.48  $\mu\text{g}$  (suma de los valores densitométricos de cada fracción); correspondiendo a un rendimiento del 91.7 % con respecto al valor teórico esperado de 169.3  $\mu\text{g}$ ; asegurando una obtención eficiente de los complejos eIF4F y eIFiso4F en 5 fracciones.

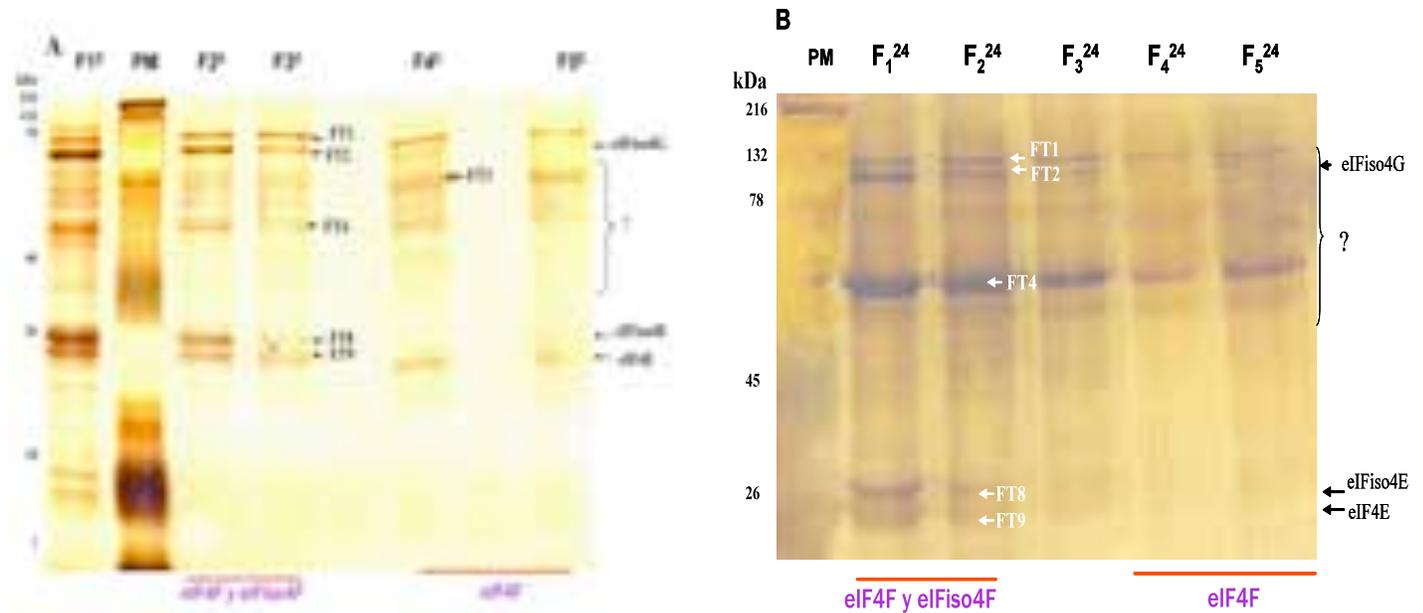


**Figura 18. Cuantificación del rendimiento de la columna mediante *immunoblot* utilizando anticuerpos contra la GST.** Los cálculos densitométricos muestran que la elución de eIF4E durante el procedimiento para la obtención de los complejos en 5 fracciones es altamente eficiente; obteniendo un rendimiento del 91.7 %.

## VII.2 Purificación de los complejos eIF4F y eIFiso4F de maíz.

Para la purificación de los complejos eIF4F y eIFiso4F de maíz de ejes quiescentes (0 h) y 24 horas de germinación, se establecieron las condiciones adecuadas de extracción con varias modificaciones respecto a lo reportado anteriormente (Dinkova y Sanchez de Jiménez.1999). La extracción de los complejos eIF4F y eIFiso4F de maíz en este trabajo realizó con menos lavados a la resina  $m^7$ GTP-Sefarosa para mantener las interacciones débiles de las proteínas que interaccionan con los complejos. La obtención de los complejos eIF4F y eIFiso4F en este caso, se eluyó en cinco fracciones (F1, F2, F3, F4 y F5) con 400  $\mu$ L de buffer D conteniendo 200  $\mu$ M de  $m^7$ GTP; la cual fueron congelados inmediatamente con nitrógeno líquido para evitar su degradación. El objetivo de fraccionar la elución, fue obtener fracciones donde estuviera más enriquecido uno u otro complejo y evaluar que proteínas interaccionan específicamente con eIF4F y eIF(iso)4F. El comportamiento de elución en cada fracción, se analizó por tinción con plata en geles SDS-PAGE, cargando un volumen constante de 50  $\mu$ L (Fig.19). En el análisis por tinción con plata se encontró que durante la elución de los complejos de ejes de 0 horas, se obtiene el complejo eIFiso4F preferentemente en las primeras 3 fracciones (F1<sup>0</sup>, F2<sup>0</sup>, F3<sup>0</sup>) y en las ultimas 2 fracciones (F4<sup>0</sup>, F5<sup>0</sup>) aparece el complejo eIF4F, acorde a reportes previos y resultados que ubicaron las bandas correspondientes a eIF(iso)4E y eIF4E (Browning, *et al.* 1992). Respecto a las 2 bandas fuertes que se encuentran alrededor de 80 kDa, al menos una debía corresponder a eIF(iso)4G, mientras que una banda alrededor de los 200 kDa que correspondería a eIF4G no fue detectada. A 24 horas, el comportamiento de la elución es diferente a lo observado a 0 horas con respecto a las bandas que por su peso molecular corresponderían a los factores eIF(iso)4E y eIF4E. En este caso ambos factores tienen un mismo patrón de elución en las 5 fracciones (F1<sup>24</sup>, F2<sup>24</sup>, F3<sup>24</sup>, F4<sup>24</sup> y F5<sup>24</sup>). Este comportamiento permite elegir bandas

diferenciales fundamentalmente a 0 h e identificar proteínas en cada fracción donde el complejo eIF4F o eIF(iso)4F se encuentre preferentemente y que pudieran unirse a estos (Fig.19).

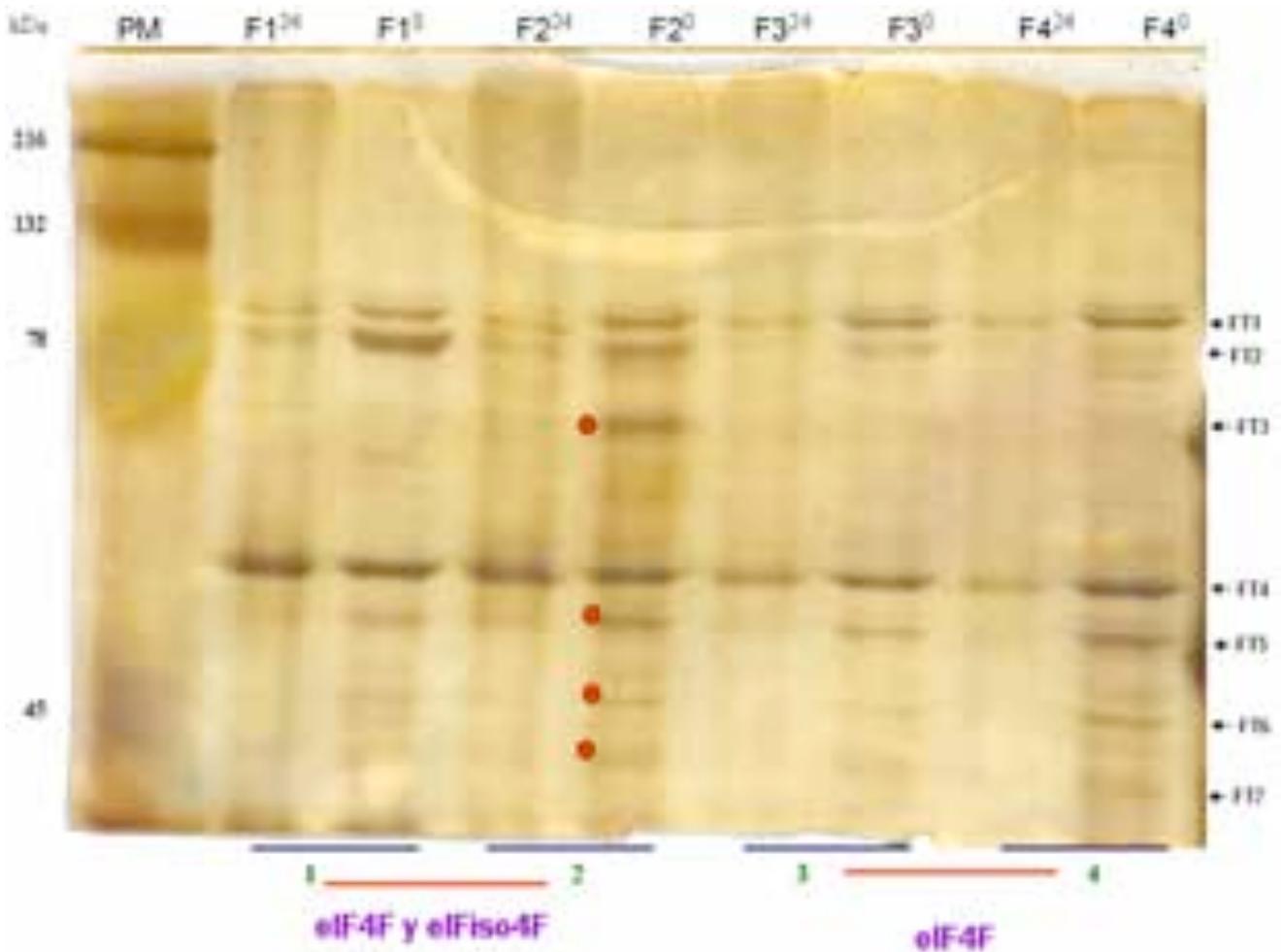


**Figura 19. Comportamiento de elución en las 5 fracciones de los complejos purificados de ejes de 0 h y 24 horas de germinación. (A)** Tinción con plata de las 5 fracciones de 0 h (F1<sup>0</sup>, F2<sup>0</sup>, F3<sup>0</sup>, F4<sup>0</sup> y F5<sup>0</sup>). **(B)** Tinción con plata de las 5 fracciones de 24 h (F1<sup>24</sup>, F2<sup>24</sup>, F3<sup>24</sup>, F4<sup>24</sup> y F5<sup>24</sup>). PM; marcador de la masa molecular. Las bandas FT1, FT2, FT4, FT8 y FT9 de 0 y 24 h, fueron identificadas por espectrometría de masas LC/MS/MS (Tabla 3).

### VII.3 Comparación de bandas diferenciales en el patrón proteico de 0 y 24 h de germinación.

Para elegir las bandas diferenciales a ser analizadas por espectrometría de masas se realizó una comparación a la par de cada una de las fracciones de ambos estadios de germinación del eje. Puesto que la mayor diferencia se encontró en las bandas de mayor tamaño (por arriba de los 45 kDa); este análisis se realizó utilizando la separación en SDS-PAGE al 10%, para discernir mejor las bandas (Figura 20). En la comparación del patrón proteico de los

complejos purificados de 0 h (quiescente) y 24 h de germinación del eje embrionario, se seleccionaron cuatro bandas diferenciales altamente reproducibles (en al menos 3 réplicas) en ejes quiescentes. Estas bandas son referidas como FT3, FT5, FT6, FT7, que están ausentes a 24 horas de germinación. Otras bandas como FT1, FT2 Y FT4 se encontraron presentes en ambos estadios de germinación del eje embrionario.



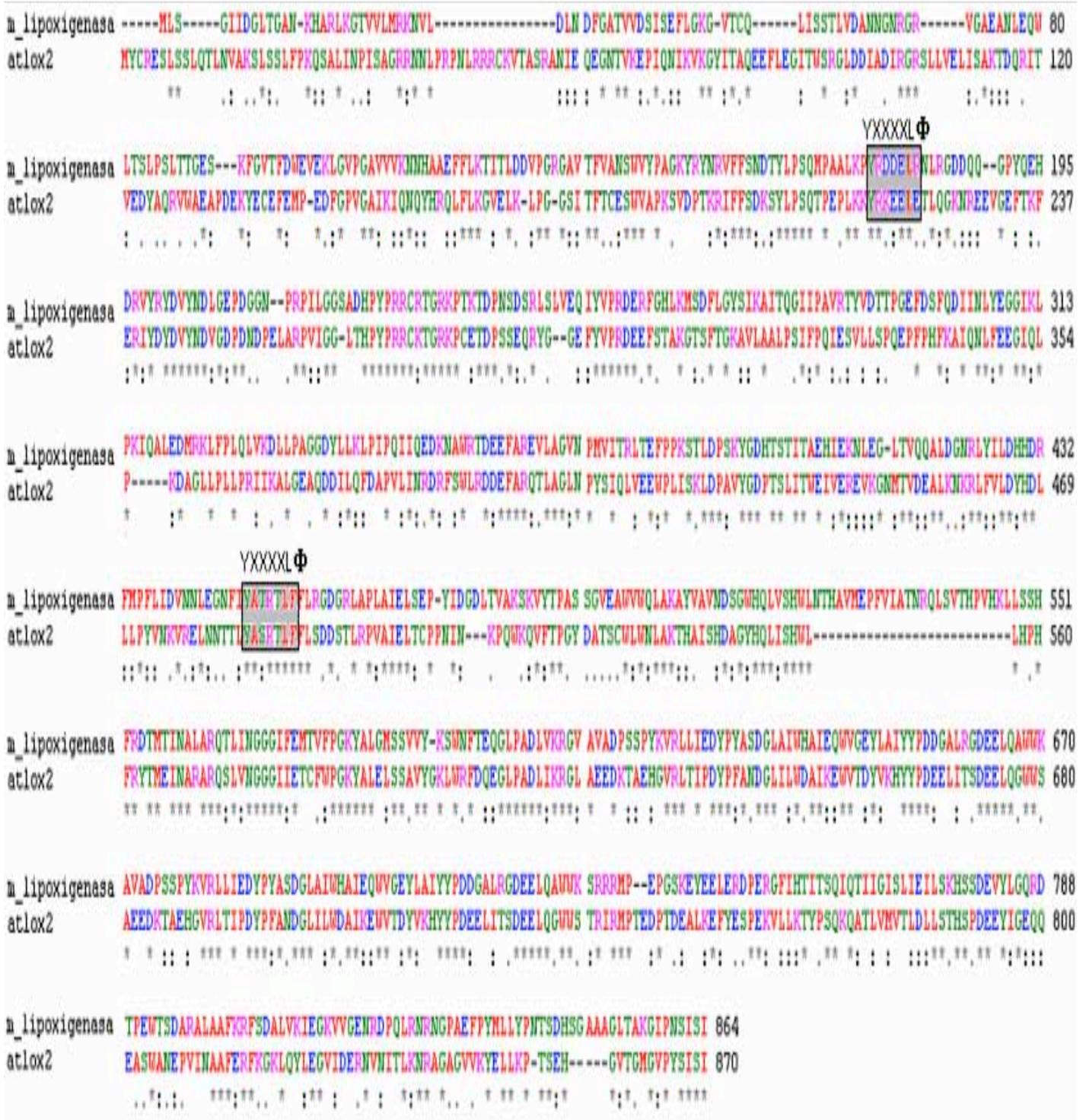
**Figura 20. Análisis de bandas diferenciales de 0 y 24 h de germinación mediante tinción con plata.** Las bandas FT1, FT2 y FT4, están presentes en ambos estadios de germinación. Las bandas FT3, FT5, FT6 y FT7, están presentes sólo en ejes quiescentes (marcados con círculos rojos). Todas fueron identificadas por espectrometría de masas LC/MS/MS (Tabla 3).

## VIII. Análisis de bandas proteicas diferenciales por espectrometría de masas (LC/MS/MS).

Antes del análisis de las bandas proteicas diferenciales, se identificaron las proteínas correspondientes a las bandas FT1, FT2, FT4, FT8 Y FT9 (Fig. 19). Estas eran las bandas más fuertes y por consiguiente se esperaba que fuera las correspondientes a los componentes canónicos de los complejos eIF4F y eIF(iso)4F. Los resultados mostraron que las bandas contenían más de una proteína y, por consiguiente, la composición proteica en cada banda podría diferir entre 0 h y 24 h de germinación. Por esta razón se decidió analizar las mismas bandas de 24 horas (FT1A, FT2A, FT4A, FT8A Y FT9A) y todas las bandas diferenciales (FT3, FT5, FT6, FT7). Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 3 (Apéndice 1)**. En FT1 se identificaron: HSP101, CBP80 y la subunidad “C” del factor eIF3 (eIF3c). En FT1A a CBP80, ATECP63 y Globulina. En FT2 al factor eIF(iso)4G y a Lipoxigenasa 1. En FT2A a eIFiso4G, Vicilina y Lipoxigenasa 1. Por su peso molecular el factor eIF(iso)4G se esperaba en FT2 y FT2A. De las proteínas identificadas en FT1 y FT1A, se encuentra la subunidad de 80 kDa de la proteína de unión a *cap* nuclear (CBP80), la cual unida a la subunidad de 20 kDa (CBP20), media la exportación de los mRNAs del núcleo al citoplasma. Esta proteína se ha encontrado como parte de los complejos de unión a *cap* en otros organismos (Hernández, G., 2005.). Respecto al factor eIF3c identificada solo en FT1, es la subunidad del factor multimérico eIF3, que recluta a la subunidad ribosomal pequeña al mRNA por interacción con el factor eIF4G, por lo que es lógico identificarlo. Con respecto a la Lipoxigenasa 1 citoplásmica (ZmLox1), fue identificada en FT2 y FT2A y por alineamiento de secuencia con AtLOX2 que es una proteína *cloroplástica* y reportada que interacciona con las distintas isoformas del factor eIF4E, ambas proteínas contienen una secuencia de unión similar a 4E-BPs (Fig. 21). Sin embargo; al igual que la AtLOX2, no sabemos cual sería su papel en la regulación del inicio de la traducción.

En FT4 y FT4A se identificó al factor eIF4A, la helicasa que desdobra el mRNA durante el proceso de búsqueda del codón AUG para dar inicio a la traducción proteica y que ha sido reportado que eluye con estos complejos (Hernández, G., 2005.) Además, se identificó a EF-1alfa (factor de elongación) que lleva los aminoacil-tRNAs al sitio A del ribosoma durante la síntesis del polipéptido; y por tanto no es sorprendente identificarlo, debido a que podría interactuar con algún componente de complejo del inicio de la traducción durante su reclutamiento al ribosoma para catalizar la unión de los enlaces peptídicos entre los aminoacil-tRNAs. En FT4 y FT4A también se identificó a la subunidad regulatoria 6A del proteasoma 26S, que forma parte del subcomplejo de la partícula regulatoria (RP), la cual dirige la degradación proteica mediante la vía ubiquitina-proteasoma (Chang y Schwechheimer, 2004).

En FT8 y 8A y FT9 y 9A se identificaron, como se esperaba, a los factores eIF(iso)4E y eIF4E respectivamente (Fig. 20). Con respecto a las bandas diferenciales; en FT3 se identificó la HSP70, otra proteína inducida por calor; a una proteína de unión luminal cBiPe2 (HSP70) y a *LEAFBLADELESS*, una proteína involucrada en la biogénesis de RNAs pequeños en plantas como: el ta-siRNA-ARF y miR166. Esta última proteína controla la polaridad (adaxial/abaxial) de la hoja. Para estas proteínas se encontró una secuencia similar al reportado para proteínas de unión al factor eIF4E (Tabla 4). Con respecto a las bandas diferenciales FT5, FT6 y FT7 se identificaron principalmente proteínas involucrados en el metabolismo de carbohidratos; estando presente en FT5; la 3-fosfoglicerato cinasa citosólica, La alcohol deshidrogenasa 1 y la actina; en FT6, la fructosa-bifosfato aldolasa y alcohol deshidrogenasa. En FT7 se identificó a la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa citosólica y al malato deshidrogenasa.



**Figura 21.** Alineamiento de secuencias de ZmLOX1 de maíz (citoplásmica) y AtLOX2 de *Arabidopsis thaliana* (cloroplástica). Ambos contienen al menos dos secuencias conservadas de unión, similares a los de las 4E-BP (YXXXXLΦ).

**Tabla 3. Resultado de la identificación de proteínas por espectrometría de masas LC/MS/MS en las distintas bandas, tanto de 0h y 24 horas. ATECP63, Globulina 2 y Vicilina, son proteínas de almacenaje de semillas y germinación, que se identifican en distintas bandas; sin embargo no corresponden al peso.**

Horas de germinación	0 horas			24 horas (A)		
Banda	Proteína	Peso Molecular kDa	# de péptidos identificados	Proteína	Peso Molecular kDa	# de péptidos identificados
FT1	HSP101	101	10	CBP80	99	5
	CBP80	99	4	ATECP63	48	4
	eIF3_c	104	3	Globulina 2	50	4
FT2 <b>zxcc</b>	eIFiso4G	88	7	eIFiso4G	88	7
	Lipoxigenasa1	96	3	Globulina 2	50	6
				Vicilina	66	2
				Lipoxigenasa1	96	2
FT3	HSP70	71	22			
	leafbladeless	68	4			
	Proteína de unión luminal cBiPe2	73	3			
FT4	eIF4A	47	27	eIF4A	47	16
	F. Elongacion 1 $\alpha$	49	16	F. Elongacion 1 $\alpha$	49	6
	Subunidad regulatoria 6 del proteasoma 26S	39	5	Subunidad regulatoria 6 del proteasoma 26S	39	2

Horas de germinación	0 horas			24 horas (A)		
Banda	Proteína	Peso Molecular kDa	# de péptidos identificados	Proteína	Peso Molecular kDa	# de péptidos identificados
FT5	3-fosfoglicerato cinasa citosólica	32	17			
	actina	37	16			
	Alcohol deshidrogenasa 1	41	6			
FT6	Fructosa-bifosfato aldolasa	39	23			
	Alcohol dehydrogenase 1	41	11			
FT7	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa citosólica	37	15			
	Malato deshidrogenasa	36	3			
FT8	eIFiso4E	24	8	eIFiso4E	24	3
	Globulina 2	50	7	Globulina 2	50	4
FT9	Globulina 2	50	8	Globulina 2	50	5
	eIF4E	24	1	eIF4E	24	3

**Tabla 4. Conservación de la secuencia de unión a eIF4E de distintas proteínas reportadas previamente, así como de las identificadas en este trabajo (azul).**

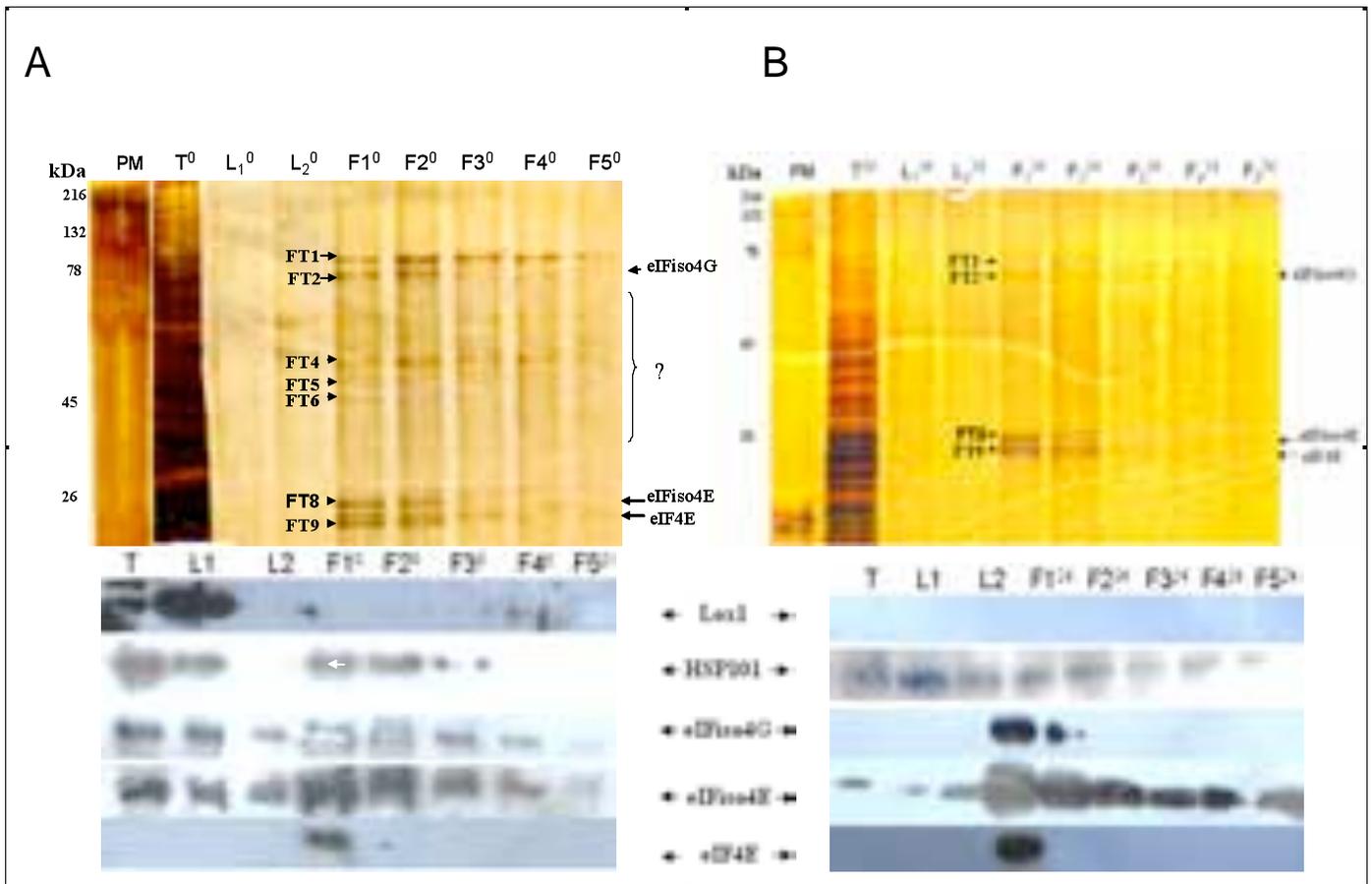
heIF4G1	<u>Y</u> D R E F <u>L</u> L
heIF4GII	<u>Y</u> D R E F <u>L</u> L
yeIF4GI	<u>Y</u> G P T F <u>L</u> L
yeIF4GII	<u>Y</u> G P T F <u>L</u> L
h4E-BP1	<u>Y</u> D R K F <u>L</u> M
h4E-BP2	<u>Y</u> D R K F <u>L</u> L
h4E-BP3	<u>Y</u> D R K F <u>L</u> L
h4E-T	<u>Y</u> T K E E <u>L</u> L
xMaskin	T E A D F <u>L</u> L
d4E-BP1	<u>Y</u> E R A F M L
dCup	<u>Y</u> T R S R <u>L</u> M
dBicoide	<u>Y</u> I R P Y <u>L</u> L
hGemin5	<u>Y</u> E A V E <u>L</u> L
	<u>L</u> K L P F <u>L</u> K
Atlox2	<u>Y</u> R K E E <u>L</u> E
AtBTF3	S T L K R <u>I</u> G
Zmllox1	<u>Y</u> R D D E <u>L</u> R
ZmLeafbladeless 1	<u>Y</u> M D L E <u>L</u> E
ZmeIFiso4G	<u>Y</u> T R D Q <u>L</u> L
ZmHSP70	<u>Y</u> S C V G <u>L</u> W
<b>Consenso</b>	<u>Y</u> X X X X <u>L</u> $\Phi$

#### **IX. Western blot para proteínas identificadas en los complejos eIF4F y eIF(iso)4F.**

La elución de HSP101 y LOX1 con los complejos eIF(iso)4F y eIF4F de ejes de quiescentes y de 24 horas de germinación fue verificada por *immunoblot* con anticuerpos policlonales contra HSP101 de maíz y contra LOX2 de frijol. Además, se utilizaron anticuerpos dirigidos contra eIF(iso)4F y eIF4E de trigo como control. En estos ensayos; además de cargar las 5 fracciones correspondientes a las eluciones de los complejos, se cargó la última fracción de cada lavado, esto con el fin de evaluar si las proteínas que eluyen en los complejos presentan uniones específicas o si son debidas a un mal lavado. Como se puede observar en la tinción

con plata (Fig. 22), las proteínas que interactúan con los complejos sólo aparecen cuando se eluye a el complejo eIF(iso)4F y eIF4F con  $m^7$ GTP y no en los lavados; incluso con lavados más exhaustivos (20 volúmenes), algunas bandas como FT1, FT2, FT4, FT5 y FT6 siguen eluyendo fuertemente con los complejos de ejes de 0 horas, mientras que sólo FT1A y FT2A eluyen fuertemente con los complejos purificados de ejes embrionarios con 24 horas de germinación. Esto nos lleva a suponer que la interacción de las proteínas a 0 horas es más fuerte debido al estado estacionario de la actividad metabólica, en comparación a 24 horas, donde el intercambio proteico en los complejos ocurre a una velocidad más alta. En el análisis por *immunoblot*, se encontró que efectivamente HSP101 se encuentra asociado a los complejos de 0 y 24 horas, y al parecer la interacción con el complejo es más fuerte a 0 horas (Figura 22). Se observó que a 0 horas HSP101 se encuentra ausente en el último lavado y comienza aparecer cuando se eluyen los complejos específicamente con  $m^7$ GTP; mientras que a 24 horas HSP101 se encuentra en los dos lavados. Además, esta proteína parece tener un comportamiento de elución muy similar al factor eIF(iso)4G y eIF(iso)4E (Fig. 22).

Con respecto a la identificación de ZmLOX1 en los complejos, su *inmunodetección* con un anticuerpo dirigido contra la PvLOX2 de frijol (53% identidad con ZmLOX1 de maíz) fue muy baja, dando una señal muy tenue en las últimas fracciones en los complejos de 0 horas y no se pudo observar señal a 24 horas (Fig. 22).



**Figura 22. Identificación de proteínas en los complejos eIF4F y eIF(iso)4F por *western blot*.** La última fracción de cada lavado y las eluciones de los complejos de ejes de quiescentes (A) y de 24 horas de germinación (B), fueron inmunodetectados con anticuerpos policlonales dirigidos contra eIF(iso)4E, eIF(iso)4G, eIF4E, HSP101 de maíz y Lox2 de frijol.

## X. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron un patrón de bandeo y composición proteica diferencial en cada banda para los complejos eIF4F y eIF(iso)4F entre el estado quiescente y germinado del eje embrionario. Esto indica que los complejos eIF4F y eIF(iso)4F podrían estar interactuando con diferentes proteínas para regular el inicio de la traducción acorde al grupo de mRNAs a traducir y a las necesidades de cada etapa. Las proteínas identificadas en ambos estados de desarrollo del eje embrionario muestran una expresión diferencial respecto al número de péptidos identificados para cada proteína. Teniendo en cuenta que la identificación de péptidos es proporcional a la abundancia de la proteína en cada muestra; por ejemplo, para los factores eIF(iso)4E y eIF4E se identificaron 8 y 1 péptidos respectivamente a 0 h y tres péptidos en ambos factores a 24 h (Tabla 3). Esto concuerda con resultados previos, en donde el factor eIF(iso)4E es mayoritario en ejes quiescentes y el factor eIF4E aumenta a partir de las 12 h de germinación hasta que ambos factores igualan su expresión (Dinkova y Sánchez de Jiménez. 2000).

Por otro lado, CBP80, eIF3c, eIF(iso)4G y eIF4A son factores que ya han sido reportados como componentes de los complejos de unión a *cap* en otros organismos (Hernández *et al.* 2005). En este estudio se lograron identificar otras proteínas tales como EF-1alfa (factor de elongación) y la subunidad 6A del proteasoma 26S, cuya presencia en los complejos de unión a *cap* podría esperarse por su interacción con componentes de la maquinaria traduccional (Fedoroff, 2000). La subunidad 6A del proteasoma (rpt5: Yta1 en levadura; TBP1/p48, en humano, bovino, *Arabidopsis* y arroz), es un componente del subcomplejo de la partícula regulatoria 19S (RP). Este subcomplejo es la tapa de la partícula catalítica 20S (CP). La RP unida a CP constituye el proteasoma 26S, en donde se lleva a cabo la degradación de proteínas ubiquitinadas (Tanaka y Tsurumi, 1997). En levadura, la RP consta de 18 subunidades. Seis de ellas son ATPasas de la familia AAA y son nombradas como Rpt1-6

(por Regulatory Particle Triple-AAA protein). El resto de las subunidades son denominadas Rpn1-12 (por Regulatory Particle Non-ATPase). La función específica de cada subunidad Rpt no se conoce, pero se cree que juegan un papel esencial en el reconocimiento y la degradación selectiva de proteínas blanco, presumiblemente, proporcionando energía al proteasoma 26S (Glickman *et al.* 1999). Recientemente, se han descrito dos motivos estructurales en varias subunidades del RP: El motivo PCI (proteasome–COP9-initiation factor) y el motivo MPN (Mpr1-Pad1-N-Terminal). Estos motivos dirigen la interacción proteína-proteína, y están presentes en señalosoma COP9 y algunas subunidades del factor eIF3: Las subunidades eIF3c y eIF3e poseen motivos PCI; las subunidades eIF3f y eIF3h poseen motivos MPN (Chang y Schwechheimer, 2004). La conservación de las subunidades de la RP en eucariontes es extraordinaria. En levadura y humano, las subunidades Rpt tienen un porcentaje de identidad del 66-76 %; mientras que, las subunidades Rpn tienen un rango de identidad del 33-47 % (Glickman *et al.* 1999). En *Arabidopsis thaliana* y arroz, la descripción de la RP y la CP del proteasoma 26S mediante espectrometría de masas y anticuerpos específicos, mostró que además de tener la misma composición, tienen una organización similar comparada con sus contrapartes de levadura y animales (Yang *et al.* 2003; Shibahara *et al.* 2002). Por otro lado, el proteasoma 26S hidroliza específicamente a eIF3a; la subunidad grande del complejo de iniciación eIF3 (Othumpangat *et al.* 2005; Murata y Shimotohno, 2006). La identificación de la subunidad 6S del proteasoma 26S en este trabajo, es consistente con la vía de degradación de varios factores del inicio de la traducción, incluyendo al eIF4E. Por otra parte, otra vía de regulación traduccional del mRNA, mediada por el proteasoma 26S es la degradación de mRNA ricos en secuencias AU (ARE), localizadas en su extremo 3' no traducible. Estas secuencias funcionan como señales de desestabilización de estos transcritos; en donde AUF, una proteína de unión a la secuencia ARE, y componentes del aparato traduccional, regulan el decaimiento de los ARE-mRNA a

través de la vía ubiquitina-proteasoma (Lu *et al.* 2006). Considerando estos datos, la subunidad 6A del proteasoma 26S, podría estar asociada a los complejos eIF4F y eIF(iso)4F para llevar a degradación a ciertos reguladores o componentes de la maquinaria traduccional en condiciones o estadios específicos, principalmente los componentes de eIF3, un factor esencial en el control traduccional (Hinnebusch, 2006).

Otra proteína interesante que se encontró en los complejos fue la HSP101. La HSP101 pertenece a la subfamilia clpB de una familia de proteínas llamadas Hsp101/clp (Schirmer *et al.*, 1996). Los miembros de la familia Hsp101/Clp muestran una gran variedad de funciones que van desde ser subunidades reguladoras, como de la proteasa bacteriana Clp, a los factores que controlan la herencia de los priones tal como [PSI+] y factores requeridos para la tolerancia de altas concentraciones de sales en bacteria (Schirmer *et al.* 1996). Esta familia está dividida en 2 clases, en función a sus dominios de unión a nucleótido (NBDs). Los de Clase 1 tienen 2 dominios de unión a nucleótido y tienen conservadas las regiones amino, media y carboxilo; los de Clase 2 tiene sólo un dominio de unión a nucleótido y son proteínas más pequeñas (Celerin *et al.* 1998; Nieto-Sotelo *et al.* 1999). Una característica típica de la subfamilia clpB (clase 1) es su inducibilidad por estrés calórico. Estas proteínas son requeridas para la supervivencia a altas temperaturas por una previa aclimatación a temperaturas medias del estrés calórico (termotolerancia inducida) (Celerin *et al.*, 1998; Nieto-Sotelo *et al.*, 1999).

La secuencia de HSP101 de plantas es altamente conservada y se reportó en *Arabidopsis*, soya, maíz, trigo, tabaco y frijol (Lee *et al.* 1994; Schirmer *et al.* 1994; Wells *et al.* 1998; Nieto-Sotelo *et al.* 1999; Keeler *et al.* 2000; Campbell *et al.* 2001).

Trabajos previos muestran un papel dual de HSP101 de plantas. Por un lado HSP101 de maíz (ZmHSP101) ha sido reportado que se acumula en el eje embrionario y escutelo de la semilla y sus niveles de expresión decrecen en las primeras horas de germinación en

condición normal (Nieto-Sotelo *et al.* 2002). En este estudio se demostró que ZmHSP101 no sólo induce termotolerancia a altas temperaturas, sino que también tiene un efecto en el crecimiento de la raíz primaria en condición basal; esto debido a que mutantes nulas en ZmHSP101 tienen un mayor crecimiento radicular en las primeras horas de la germinación. Sin embargo, el efecto negativo del crecimiento mediado por ZmHSP101 que pudiera ser debido a la división celular o elongación de la célula, no se conoce. Las HSP101 de tabaco (NtHSP101) y de *Arabidopsis* (AtHSP101) actúan como factores traduccionales, aumentando la traducción del RNA del virus del mosaico del tabaco (TMV) en levadura y en protoplastos mediante su interacción con la secuencia  $\Omega$  de la region 5'UTR del RNA viral (Wells *et al.* 1998; Ling *et al.* 2000). Wells *et al.* (1998) observaron que tanto el factor eIF4G como eIF3 son indispensables para el incremento traduccional, lo que sugiere que HSP101 promueve el enlace de eIF4G y eIF3 necesario para reclutar la subunidad ribosomal pequeña al RNA viral. También se plantea que su actividad de chaperona podría tener un papel en la traducción (Wells *et al.* 1998). La NtHSP101 es capaz de interactuar con un elemento regulatorio (iLRE) presente en el 5'UTR del mRNA de la ferredoxina de *Arabidopsis* (*fed1*) aumentando su traducción (Ling *et al.* 2000).

Un trabajo reciente propone que el complejo HSP101- $\Omega$  es funcionalmente análogo a los complejos eIF4E-5'-cap y PABP-poly(A), lo cual sirve para reclutar al complejo eIF4F a un mRNA e incrementar su traducción (Gallie, 2002). Actualmente con todos estos estudios se ha logrado utilizar la tecnología del complejo HSP101- $\Omega$  con fines biotecnológicos, en donde la alta expresión de HSP101 de arroz (OsHSP101) mediado por la secuencia omega, incrementa la capacidad termotolerante y por tanto puede ser utilizado como marcador de selección en plantas de tabaco. Asimismo HSP101 pudo transactivar *in vivo* la traducción del reportero  $\Omega$ -Luciferasa mediante una recíproca cruce de líneas transgénicas de tabaco conteniendo a HSP101 y  $\Omega$ -Luciferasa, por lo que brinda la posibilidad de utilizar esta

tecnología para producir altas cantidades de proteínas de interés comercial en plantas (Chang, 2007). Además de HSP101, otras proteínas inducidas por calor o chaperonas como HSP27 pueden tener un papel en la regulación del inicio de la traducción. La HSP27 es capaz de enlazar a eIF4G previniendo el ensamblaje de eIF4F en condiciones de choque térmico, en donde eIF4G se encuentra insoluble en gránulos de estrés por calor (Cuesta, R., *et. al*, 2000). Por lo tanto, se plantea que la asociación de HSP101 con eIF(iso)4F y eIF4F durante la germinación podría regular estos complejos, quizá por los siguientes mecanismos: Por un lado, HSP101 podría unir a eIF4G y permitir el reclutamiento de las subunidades ribosomales, eficientando el inicio de la traducción. La otra posibilidad es que, durante la desecación, en donde la semilla presenta estrés, HSP101 se une a eIF4G y se reprime la traducción; que durante las condiciones favorables de la germinación, la represión del inicio de la traducción regulada por HSP101 se revierte. Por otro lado, no se descarta la idea de que HSP101 unido a eIF(iso)4F y eIF4F actúe mediante su actividad de chaperona, plegando correctamente a estos complejos antes de iniciar la traducción.

En los complejos de unión a <sup>7</sup>mGTP de ejes embrionarios de maíz quiescente [donde el complejo eIF(iso)4F es más abundante] hemos identificado a HSP70, además de HSP101. (Fig. 22). Analizando la secuencia de esta proteína se encontró que, HSP70 en su región amino terminal tiene una secuencia (YSCVGLW) similar a las 4E-BPs (YXXXXLΦ)(Tabla 4), lo cual sugiere que la proteína HSP70 identificada en los complejos podría tener alguna función en la regulación de la traducción de ciertos mensajes traducidos preferentemente por eIF(iso)4F.

La proteína HSP70 se expresa ubicuamente y es parte de la maquinaria celular que ayuda a plegar las proteínas, protegiendo la célula del estrés (Wegele et al., 2004). Los miembros de la familia de HSP70 son fuertemente regulados por estrés por calor y estrés químico

particularmente por metales pesados, tales como cadmio, mercurio y arsénico, evitando la desnaturalización y una posible agregación de proteínas. Todos los miembros de la familia HSP70, contienen tres dominios que los caracteriza: (1) un dominio de unión a ATP en el amino terminal (clase 2 respecto a la familia hsp101/clp); (2) un dominio de unión a sustrato que contiene una ranura con afinidad a aminoácidos neutrales e hidrofóbicos, suficiente como para interactuar con los péptidos; (3) un dominio rico en estructuras alfa hélice en el carboxilo terminal, que actúa como tapa para el dominio de unión a sustrato (Wegele et al., 2004). La HSC70 es otra clase de proteínas que pertenecen a los miembros de la familia HSP70; sin embargo, estas proteínas son constitutivas y se unen al polipéptido nascente que emerge de los ribosomas permitiendo un correcto plegamiento. Aunque la HSP70 y HSC70 comparten aproximadamente un 90% de identidad en el dominio de unión a ATP y el dominio de unión a sustrato, solo existe un 65% de identidad en el dominio de alfa hélice; por tanto se cree que este dominio podría dirigir la especificidad a distintas proteínas (Zimmer et al., 2001). Estudios previos han demostrado que HSP70 y HSC70 coinmunoprecipitan con PABP, eIF4G y AUF1, un factor de degradación que une a secuencias de poli(U) (secuencia ARE) presentes en el extremo 5' mRNA, soportando la hipótesis que la interacción directa de este complejo, podría estar ligada, ya sea a la rápida degradación del ARE-mRNA con la maquinaria traduccional o acoplado a la estabilización de estos mRNAs mediada por HSP70 y HSC70 (Laroia.1999, Lu. 2006). Trabajos más recientes han determinado que HSC70 y HSP40 junto con PABP y eIF4F estabilizan al ARE-mRNA de BIM, evitando su degradación. De este modo, la regulación de la expresión de BIM, un activador de muerte celular en células progenitoras hematopoyéticas, controlaría el número de células de la sangre (Matsui et al. 2007). En plantas no hay reportes acerca de la regulación traduccional de mRNAs celulares mediado por HSP101, HSP70 y HSC70, pero se reporta que en plantas de maíz,

ZmHSP70 coimmunoprecipita con ZmHSP101, indicando que estas dos proteínas podrían formar complejos en células de plantas (Zhang et al., 2005).

Otra proteína que se identificó solo a 0 h es LEAFBLADELESS; esta proteína está involucrada en la biogénesis de ta-siRNA-ARF y miR166 y regula la polaridad dorsoventral de la hoja en plantas de maíz. Algunos genes adaxializantes como HD-ZIPIII y otros abaxializantes, son blancos de regulación mediada por RNA de interferencia. El gen de *leafbladeless1(lbl1)* codifica una proteína ortóloga del SUPRESOR DEL SILENCIAMIENTO GENÉTICO 3(SGS3) de *Arabidopsis*, que es esencial para la biogénesis de ta-siRNA. Los componentes de la vía TAS3 tasiRNA en maíz son expresados sobre el lado adaxial de la hoja, y restringen la expresión de factores abaxializantes *arf3a* y miR166 tempranamente en el desarrollo de la hoja (Timmermans, 1998; Nogueira, 2007). En este trabajo se ha identificado a proteína LEAFBLADELESS asociado a los complejos del inicio de la traducción, principalmente a 0 horas donde el complejo eIF(iso)4F es más abundante. El análisis de la secuencia de aminoácidos de LBL1 muestra una secuencia consenso similar a los 4EBPs; por lo que se pensaría que esta proteína podría interactuar principalmente con eIF(iso)4E, para reprimir la traducción de ciertos mRNAs dependientes de eIF(iso)4F. La otra posibilidad es que LEAFBLADELESS esté en los complejos traduccionales porque actúa dentro de la vía del RNA interferente. Ambas posibilidades propuestas son mecanismos en los que el fin fisiológico es garantizar la polaridad de la hoja desde el estado quiescente. Esta idea es apoyada, por un claro ejemplo en *Drosophila*, donde la represión traduccional de mensajeros específicos mediado por proteínas de unión a eIF4E(4E-BPs) regulan la polaridad del embrión, mediante la expresión de un gradiente de proteínas claves que se expresan a lo largo del embrión, controlando el patrón anterior- posterior del ovocito. Otra posibilidad es que LEAFBLADELESS1 reprima la traducción de eIF(iso)4E-cap-mRNAs en un estado de desarrollo temprano y estos se desrepriman en un estado posterior de germinación,

donde las proteínas de estos mRNAs serán necesarios para la emergencia y polarización de la hoja.

En cuanto a la Lipoxigenasa 1 (ZmLOX1, citoplásmica) que al igual que la AtLOX2 (cloroplástica) de *Arabidopsis thaliana*, contiene la secuencia consenso a las 4EBPs, responsable de la unión con eIF4E. Sin embargo, la función en la regulación del inicio de la traducción de estas proteínas no se conoce. Se ha reportado que Lipoxigenasa 1 de *Arabidopsis thaliana* (AtLOX1) está involucrada en la estimulación de la germinación de las semillas, esta proteína se expresa principalmente en la epidermis, donde controla la pérdida de agua y el intercambio gaseoso y provee un mecanismo de defensa contra patógenos. Otra posibilidad es que la AtLOX1 sea requerida para la producción de moléculas necesarias para la defensa contra patógenos, quizás regulando la traducción de mRNAs necesarias para la producción de metabolitos de defensa (Melan, et al, 1994). En el caso de ZmLOX1 que está preferentemente a 24 horas, podría estar uniéndose preferentemente a eIF(iso)4E durante el estrés por ataque de patógenos, reprimiendo la traducción dependiente de *cap* y sólo permite la traducción de mRNA necesarios para contrarrestar dicho estrés mediante el mecanismo independiente de *cap*. La represión mediada por proteínas de unión a eIF4E, asegura que la traducción de mensajeros clave proceda en una forma apropiada, tanto temporal, como espacialmente para la traducción de cierta proteína o grupo de proteínas indispensables en un estado específico de desarrollo de un organismo. Por lo tanto el estudio del mecanismo traduccional asistido por proteínas de unión a eIF4E, es de gran importancia para el entendimiento del control traduccional en plantas. En cualquiera de los casos de estas proteínas, su interacción con eIF4E/eIF(iso)4F u otras proteínas de los complejos de unión a *cap* debe ser probada y su función abordada de forma específica.

Con respecto a ATECP63, Globulina 2 y Vicilina, las encontramos en diferentes muestras; estas proteínas son de almacenaje y germinación en semillas de maíz quiescentes. Sin

embargo; en algunos casos no corresponden a la masa molecular y a la presencia en los complejos de unión a *cap* no se conoce.

Finalmente, en la últimas tres bandas diferenciales: FT5, FT6 Y FT7, encontramos proteínas involucradas en el metabolismo de carbohidratos, indispensables en ejes embrionarios para remoción de reservas presentes en la semilla durante el período de germinación, donde la actividad metabólica es muy activa. La presencia de estas proteínas en los complejos, podría ser inespecífica y no estar relacionada con factores del inicio de la traducción. Sin embargo, aún con lavados más astringentes a la resina  $m^7GTP$  estas proteínas se encuentran fuertemente asociadas a los complejos. Además la interacción de estas proteínas con los complejos de unión a *cap* podría ser debido a la interacción con HSP101 o HSP70. En otro trabajo se ha reportado que HSP70 interacciona con la enzima NADP málica en maíz; para conferirle estabilidad y evitar la formación de agregados proteicos (Anwar, 2002). No es sorprendente que este tipo de proteínas estén asociadas a las chaperonas; dada la necesidad de un correcto plegamiento para las proteínas que son claves durante la reactivación del metabolismo energético al inicio de la germinación del eje embrionario. La relevancia de la interacción de proteínas del metabolismo energético y los complejos de unión a *cap* en el inicio de la traducción es totalmente desconocida.

## **XI. CONCLUSIONES.**

1. En ejes embrionarios quiescentes (0 h) y germinados (24 h) de maíz se identificaron diferentes conjuntos de proteínas que co-eluyen con los complejos eIF4F y eIF(iso)4F.
2. HSP101 co-eluye específicamente con los complejos eIF4F/eIF(iso)4F.
3. ZmLOX1, ZmLEAFBLADELESS y ZmHSP70 muestran una secuencia similar a las proteínas de unión a eIF4E; que interrumpe la formación del complejo eIF4F.

## **XII. PERSPECTIVAS.**

La interacción de proteínas como ZmLOX1, ZmLEAFBLADELESS y ZmHSP70 con eIF(iso)4E y/o eIF4E debe ser estudiada a fondo para demostrar su especificidad tipo 4E-BP. Su relevancia en el control traduccional durante la germinación debe ser elucidada. La interacción específica de HSP101 con los componentes de los complejos eIF4F y eIF(iso)4F debe ser abordada. El papel de HSP101 durante las primeras horas de germinación deberá ser determinado desde el punto de vista de activación o represión de la traducción. Todo esto con el objetivo de conocer los mecanismos de regulación que permiten el reinicio de la traducción de los mRNA almacenados en ejes embrionarios, necesarios para la germinación del maíz y el establecimiento de una nueva plántula.

## XV. BIBLIOGRAFÍA

- Acker, M.G., and Lorsch, J.R.** (2008). Mechanism of ribosomal subunit joining during eukaryotic translation initiation. *Biochem Soc Trans* **36**, 653-657.
- Andrade, M.A., and Bork, P.** (1995). HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nat Genet* **11**, 115-116.
- Anwar, A., Siegel, D., Kepa, J.K., and Ross, D.** (2002). Interaction of the molecular chaperone Hsp70 with human NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1. *J Biol Chem* **277**, 14060-14067.
- Aragon, T., de la Luna, S., Novoa, I., Carrasco, L., Ortin, J., and Nieto, A.** (2000). Eukaryotic translation initiation factor 4G1 is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus. *Mol Cell Biol* **20**, 6259-6268.
- Asano, K., Phan, L., Anderson, J., and Hinnebusch, A.G.** (1998). Complex formation by all five homologues of mammalian translation initiation factor 3 subunits from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**, 18573-18585.
- Attucci, S., Carde, J.P., Raymond, P., Saint-Ges, V., Spiteri, A., and Pradet, A.** (1991). Oxidative Phosphorylation by Mitochondria Extracted from Dry Sunflower Seeds. *Plant Physiol* **95**, 390-398.
- Behlke, J., Bommer, U.A., Lutsch, G., Henske, A., and Bielka, H.** (1986). Structure of initiation factor eIF-3 from rat liver. Hydrodynamic and electron microscopic investigations. *Eur J Biochem.* **157**, 523-530.
- Beltran-Pena, E., Aguilar, R., Ortiz-Lopez, A., Dinkova, T.D., and De Jimenez, E.S.** (2002). Auxin stimulates S6 ribosomal protein phosphorylation in maize thereby affecting protein synthesis regulation. *Physiol Plant* **115**, 291-297.
- Bewley, J.D.** (1997). Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell* **9**, 1055-1066.
- Brander, K.A., Mandel, T., Owttrim, G.W., and Kuhlemeier, C.** (1995). Highly conserved genes coding for eukaryotic translation initiation factor eIF-4A of tobacco have specific alterations in functional motifs. *Biochim Biophys Acta* **1261**, 442-444.
- Brander, K.A., and Kuhlemeier, C.** (1995). A pollen-specific DEAD-box protein related to translation initiation factor eIF-4A from tobacco. *Plant Mol Biol* **27**, 637-649.
- Browning, K.S.** (1996). The plant translational apparatus. *Plant Mol Biol* **32**, 107-144.
- Browning, K.S., Webster, C., Roberts, J.K.M., and Ravel, J.M.** (1992). Identification of an Isozyme Form of Protein Synthesis Initiation Factor 4F in Plants. *J Biol Chem.* **267**, 10096-10100.

- Browning, K.S.** (2004). Plant translation initiation factors: it is not easy to be green. *Biochem Soc Trans* **32**, 589-591.
- Campbell, J.L., Klueva, N.Y., Zheng, H.G., Nieto-Sotelo, J., Ho, T.D., and Nguyen, H.T.** (2001). Cloning of new members of heat shock protein HSP101 gene family in wheat (*Triticum aestivum* (L.) Moench) inducible by heat, dehydration, and ABA(1). *Biochim Biophys Acta* **1517**, 270-277.
- Carberry, S.E., Darzynkiewicz, E., and Goss, D.J.** (1991). A comparison of the binding of methylated cap analogues to wheat germ protein synthesis initiation factors 4F and (iso)4F. *Biochemistry*. **30**, 1624-1627.
- Caron, S., Charon, M., Cramer, E., Sonenberg, N., and Dusanter-Fourt, I.** (2004). Selective modification of eukaryotic initiation factor 4F (eIF4F) at the onset of cell differentiation: recruitment of eIF4GII and long-lasting phosphorylation of eIF4E. *Mol Cell Biol*. **24**, 4920-4928.
- Celerin, M., Gilpin, A.A., Schisler, N.J., Ivanov, A.G., Miskiewicz, E., Krol, M., and Laudenschlag, D.E.** (1998). ClpB in a cyanobacterium: predicted structure, phylogenetic relationships, and regulation by light and temperature. *J Bacteriol* **180**, 5173-5182.
- Chang, C.-C., Huang, P.-S., Lin, H.-R., and Lu, C.-H.** (2007). Transactivation of Protein Expression by Rice HSP101 in *Planta* and Using Hsp101 as a Selection Marker for Transformation. *Plant Cell Physiol*. **48**, 1098-1107.
- Chang, E.C., and Schwechheimer, C.** (2004). ZOMES III: the interface between signalling and proteolysis. Meeting on The COP9 Signalosome, Proteasome and eIF3. *EMBO Rep* **5**, 1041-1045.
- Chaudhuri, J., Chowdhury, D., and Maitra, U.** (1999). Distinct functions of eukaryotic translation initiation factors eIF1A and eIF3 in the formation of the 40 S ribosomal preinitiation complex. *J Biol Chem* **274**, 17975-17980.
- Conroy, S.C., Dever, T.E., Owens, C.L., and Merrick, W.C.** (1990). Characterization of the 46,000-dalton subunit of eIF-4F. *Arch Biochem Biophys* **282**, 363-371.
- Cremer, F., Dommès, J., Van de Walle, C., and Bernier, G.** (1990). Diurnal Rhythmicity in the Pattern of mRNAs in the Leaves of *Sinapis alba*. *Plant Physiol* **94**, 1590-1597.
- Cuesta, R., Laroia, G., and Schneider, R.J.** (2000). Chaperone hsp27 inhibits translation during heat shock by binding eIF4G and facilitating dissociation of cap-initiation complexes. *Genes Dev* **14**, 1460-1470.
- Culjkovic, B., Topisirovic, I., and Borden, K.L.** (2007). Controlling gene expression through RNA regulons: the role of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E. *Cell Cycle* **6**, 65-69.

- Dennis, P.P.** (1997). Ancient ciphers: translation in Archaea. *Cell* **89**, 1007-1010.
- Dinkova, T.D., Aguilar, R., and Sanchez de Jimenez, E.** (2000). Expression of maize eukaryotic initiation factor (eIF) iso4E is regulated at the translational level. *Biochem J* **351 Pt 3**, 825-831.
- Dorn, R., Morawietz, H., Reuter, G., and Saumweber, H.** (1993). Identification of an essential *Drosophila* gene that is homologous to the translation initiation factor eIF-4A of yeast and mouse. *Mol Gen Genet* **237**, 233-240.
- Dostie, J., Ferraiuolo, M., Pause, A., Adam, S.A., and Sonenberg, N.** (2000). A novel shuttling protein, 4E-T, mediates the nuclear import of the mRNA 5' cap-binding protein, eIF4E. *EMBO J* **19**, 3142-3156.
- Ehrenshaft, M., and Brambl, R.** (1990). Respiration and Mitochondrial Biogenesis in Germinating Embryos of Maize. *Plant Physiol* **93**, 295-304.
- Fedoroff, N.V.** (2002). RNA-binding proteins in plants: the tip of an iceberg? *Curr Opin Plant Biol.* **5**, 452-459.
- Ferraiuolo, M.A., Lee, C.S., Ler, L.W., Hsu, J.L., Costa-Mattioli, M., Luo, M.J., Reed, R., and Sonenberg, N.** (2004). A nuclear translation-like factor eIF4AIII is recruited to the mRNA during splicing and functions in nonsense-mediated decay. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4118-4123.
- Foeger, N., Glaser, W., and Skern, T.** (2002). Recognition of eukaryotic initiation factor 4G isoforms by picornaviral proteinases. *J Biol Chem* **277**, 44300-44309.
- Fortes, P., Inada, T., Preiss, T., Hentze, M.W., Mattaj, I.W., and Sachs, A.B.** (2000). The yeast nuclear cap binding complex can interact with translation factor eIF4G and mediate translation initiation. *Mol Cell* **6**, 191-196.
- Freire, M.A.** (2005). Translation initiation factor (iso) 4E interacts with BTF3, the beta subunit of the nascent polypeptide-associated complex. *Gene* **345**, 271-277.
- Freire, M.A., Tourneur, C., Granier, F., Camonis, J., El Amrani, A., Browning, K.S., and Robaglia, C.** (2000). Plant lipoxygenase 2 is a translation initiation factor-4E-binding protein. *Plant Mol Biol* **44**, 129-140.
- Fukunaga, R., and Hunter, T.** (1997). MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. *EMBO J* **16**, 1921-1933.
- Gallie, D.R.** (1998). Controlling gene expression in transgenics. *Curr Opin Plant Biol* **1**, 166-172.
- Gallie, D.R.** (2002). The 5'-leader of tobacco mosaic virus promotes translation through enhanced recruitment of eIF4F. *Nucleic Acids Res* **30**, 3401-3411.

- Gallie, D.R.** (2004). The role of the initiation surveillance complex in promoting efficient protein synthesis. *Biochem Soc Trans.* 32, 585-588.
- Gallie, D.R.** (2007). Use of in vitro translation extract depleted in specific initiation factors for the investigation of translational regulation. *Methods Enzymol* **429**, 35-51.
- Gallie, D.R., and Browning, K.S.** (2001). eIF4G functionally differs from eIFiso4G in promoting internal initiation, cap-independent translation, and translation of structured mRNAs. *J Biol Chem* **276**, 36951-36960.
- Gebauer, F., and Hentze, M.W.** (2004). Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 827-835.
- Gingras, A.C., Raught, B., and Sonenberg, N.** (2004). mTOR signaling to translation. *Curr Top Microbiol Immunol* **279**, 169-197.
- Gingras, A.-C., Raught, B., and Sonenberg, N.** (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Ann. Rev. Biochem.* **68**, 913-963.
- Goke, A., Goke, R., Knolle, A., Trusheim, H., Schmidt, H., Wilmen, A., Carmody, R., Goke, B., and Chen, Y.H.** (2002). DUG is a novel homologue of translation initiation factor 4G that binds eIF4A. *Biochem Biophys Res Commun* **297**, 78-82.
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Fu, H., Larsen, C.N., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Vierstra, R., Baumeister, W., et al.** (1999). Functional analysis of the proteasome regulatory particle. *Mol Biol Rep.* **26**, 21-28.
- Goyer, C., Altmann, M., Lee, H.S., Blanc, A., Deshmukh, M., Woolford, J.L., Jr., Trachsel, H., and Sonenberg, N.** (1993). TIF4631 and TIF4632: two yeast genes encoding the high-molecular-weight subunits of the cap-binding protein complex (eukaryotic initiation factor 4F) contain an RNA recognition motif-like sequence and carry out an essential function. *Mol Cell Biol* **13**, 4860-4874.
- Gradi, A., Imataka, H., Svitkin, Y.V., Rom, E., Raught, B., Morino, S., and Sonenberg, N.** (1998). A novel functional human eukaryotic translation initiation factor 4G. *Mol Cell Biol* **18**, 334-342.
- Greenberg, J.R., Phan, L., Gu, Z., deSilva, A., Apolito, C., Sherman, F., Hinnebusch, A.G., and Goldfarb, D.S.** (1998). Nip1p associates with 40 S ribosomes and the Prt1p subunit of eukaryotic initiation factor 3 and is required for efficient translation initiation. *J Biol Chem* **273**, 23485-23494.
- Hanachi, P., Hershey, J.W., and Vornlocher, H.P.** (1999). Characterization of the p33 subunit of eukaryotic translation initiation factor-3 from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **274**, 8546-8553.

- Henis-Korenblit, S., Strumpf, N.L., Goldstaub, D., and Kimchi, A.** (2000). A novel form of DAP5 protein accumulates in apoptotic cells as a result of caspase cleavage and internal ribosome entry site-mediated translation. *Mol Cell Biol* **20**, 496-506.
- Hernandez, G., Vazquez-Pianzola, P., Zurbriggen, A., Altmann, M., Sierra, J.M., and Rivera-Pomar, R.** (2004). Two functionally redundant isoforms of *Drosophila melanogaster* eukaryotic initiation factor 4B are involved in cap-dependent translation, cell survival, and proliferation. *Eur J Biochem* **271**, 2923-2936.
- Hernandez, G., Altmann, M., Sierra, J.M., Urlaub, H., Diez del Corral, R., Schwartz, P., and Rivera-Pomar, R.** (2005). Functional analysis of seven genes encoding eight translation initiation factor 4E (eIF4E) isoforms in *Drosophila*. *Mech Dev* **122**, 529-543.
- Hershey, J.W.B., and Merrick, W.C.** (2000). Pathway and mechanism of initiation of protein synthesis. In *Translational Control of Gene Expression*, N. Sonenberg, J.W.B. Hershey, and M.B. Mathews, eds (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 33-88.
- Hershey, J.W., Asano, K., Naranda, T., Vornlocher, H.P., Hanachi, P., and Merrick, W.C.** (1996). Conservation and diversity in the structure of translation initiation factor EIF3 from humans and yeast. *Biochimie* **78**, 903-907.
- Hinnebusch, A.G.** (2006). eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes. *Trends Biochem Sci* **31**, 553-562.
- Imataka, H., Olsen, H.S., and Sonenberg, N.** (1997). A new translational regulator with homology to eukaryotic translation initiation factor 4G. *EMBO J* **16**, 817-825.
- Imataka, H., Gradi, A., and 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.
- Imataka, H., and Sonenberg, N.** (1997). Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) possesses two separate and independent binding sites for eIF4A. *Mol Cell Biol* **17**, 6940-6947.
- Ishigaki, Y., Li, X., Serin, G., and Maquat, L.E.** (2001). Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20. *Cell* **106**, 607-617.
- Joshi, B., Cameron, A., and Jagus, R.** (2004). Characterization of mammalian eIF4E-family members. *Eur. J. Biochem.* **271**, 2189-2203.
- Joshi, B., Lee, K., Maeder, D.L., and Jagus, R.** (2005). Phylogenetic analysis of eIF4E-family members. *BMC Evol Biol.* **5**, 48.

- Keeler, S.J., Boettger, C.M., Haynes, J.G., Kuches, K.A., Johnson, M.M., Thureen, D.L., Keeler, C.L., Jr., and Kitto, S.L.** (2000). Acquired thermotolerance and expression of the HSP100/CipB genes of lima bean. *Plant Physiol* **123**, 1121-1132.
- Keiper, B.D., Lamphear, B.J., Deshpande, A.M., Jankowska-Anyszka, M., Aamodt, E.J., Blumenthal, T., and Rhoads, R.E.** (2000). Functional characterization of five eIF4E isoforms in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* **275**, 10590-10596.
- Kolupaeva, V.G., Unbehaun, A., Lomakin, I.B., Hellen, C.U., and Pestova, T.V.** (2005). Binding of eukaryotic initiation factor 3 to ribosomal 40S subunits and its role in ribosomal dissociation and anti-association. *RNA* **11**, 470-486.
- Korneeva, N.L., Lamphear, B.J., Hennigan, F.L., Merrick, W.C., and Rhoads, R.E.** (2001). Characterization of the two eIF4A-binding sites on human eIF4G-1. *J Biol Chem* **276**, 2872-2879.
- Lane, B.G.** (1991). Cellular desiccation and hydration: developmentally regulated proteins, and the maturation and germination of seed embryos. *FASEB J* **5**, 2893-2901.
- Larkins, B.A., Mason, A.C., and Hurkman, W.J.** (1982). Molecular mechanisms regulating the synthesis of storage proteins in maize endosperm. *Crit Rev Food Sci Nutr* **16**, 199-215.
- Laroia, G., Cuesta, R., Brewer, G., and Schneider, R.J.** (1999). Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitin-proteasome pathway. *Science* **284**, 499-502.
- Lee, Y.R., Nagao, R.T., and Key, J.L.** (1994). A soybean 101-kD heat shock protein complements a yeast HSP104 deletion mutant in acquiring thermotolerance. *Plant Cell* **6**, 1889-1897.
- Li, Q., Imataka, H., Morino, S., Rogers, G.W., Jr., Richter-Cook, N.J., Merrick, W.C., and Sonenberg, N.** (1999). Eukaryotic translation initiation factor 4AIII (eIF4AIII) is functionally distinct from eIF4AI and eIF4AII. *Mol Cell Biol* **19**, 7336-7346.
- Linder, P., Lasko, P.F., Ashburner, M., Leroy, P., Nielsen, P.J., Nishi, K., Schnier, J., and Slonimski, P.P.** (1989). Birth of the D-E-A-D box. *Nature* **337**, 121-122.
- Ling, J., Wells, D.R., Tanguay, R.L., Dickey, L.F., Thompson, W.F., and Gallie, D.R.** (2000). Heat shock protein HSP101 binds to the Fed-1 internal light regulator  $\gamma$  element and mediates its high translational activity. *Plant Cell* **12**, 1213-1227.
- Logan, D.C., Millar, A.H., Sweetlove, L.J., Hill, S.A., and Leaver, C.J.** (2001). Mitochondrial biogenesis during germination in maize embryos. *Plant Physiol* **125**, 662-672.
- Lopez de Quinto, S., Lafuente, E., and Martinez-Salas, E.** (2001). IRES interaction with translation initiation factors: functional characterization of novel RNA contacts with eIF3, eIF4B, and eIF4GII. *RNA* **7**, 1213-1226.
- Lu, J.Y., Bergman, N., Sadri, N., and Schneider, R.J.** (2006). Assembly of AUF1 with eIF4G-poly(A) binding protein complex suggests a translation function in AU-rich mRNA decay. *RNA* **12**, 883-893.

- Lu, J., Aoki, H., and Ganoza, M.C.** (1999). Molecular characterization of a prokaryotic translation factor homologous to the eukaryotic initiation factor eIF4A. *Int J Biochem Cell Biol* **31**, 215-229.
- Mangus, D.A., Evans, M.C., and Jacobson, A.** (2003). Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biol* **4**, 223.
- Marcotrigiano, J., Gingras, A.C., Sonenberg, N., and Burley, S.K.** (1997). X-ray studies of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP. *Nucleic Acids Symp Ser*, 8-11.
- Marcotrigiano, J., Gingras, A.C., Sonenberg, N., and Burley, S.K.** (1999). Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G. *Mol Cell* **3**, 707-716.
- Marcotrigiano, J., Lomakin, I.B., Sonenberg, N., Pestova, T.V., Hellen, C.U., and Burley, S.K.** (2001). A conserved HEAT domain within eIF4G directs assembly of the translation initiation machinery. *Mol Cell* **7**, 193-203.
- Masutani, M., Sonenberg, N., Yokoyama, S., and Imataka, H.** (2007). Reconstitution reveals the functional core of mammalian eIF3. *EMBO J* **26**, 3373-3383.
- Matsui, H., Asou, H., and Inaba, T.** (2007). Cytokines direct the regulation of Bim mRNA stability by heat-shock cognate protein 70. *Mol Cell* **25**, 99-112.
- McKendrick, L., Thompson, E., Ferreira, J., Morley, S.J., and Lewis, J.D.** (2001). Interaction of eukaryotic translation initiation factor 4G with the nuclear cap-binding complex provides a link between nuclear and cytoplasmic functions of the m(7) guanosine cap. *Mol Cell Biol* **21**, 3632-3641.
- McKendrick, L., Morley, S.J., Pain, V.M., Jagus, R., and Joshi, B.** (2001). Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) at Ser209 is not required for protein synthesis in vitro and in vivo. *Eur J Biochem* **268**, 5375-5385.
- Melan, M.A., Enriquez, A., and Peterman, T.K.** (1994). The LOX1 Gene of Arabidopsis Is Temporally and Spatially Regulated in Germinating Seedlings. *Plant Physiol* **105**, 385-393.
- Mengod, G., and Trachsel, H.** (1985). Eukaryotic protein synthesis initiation factor eIF-3: determination of concentration and association with ribosomes in rabbit reticulocyte and HeLa cell lysates. *Biochim Biophys Acta* **825**, 169-174.

- Metz, A.M., and Browning, K.S.** (1993). Sequence of a cDNA encoding wheat eukaryotic protein synthesis initiation factor 4A. *Gene* **131**, 299-300.
- Metz, A.M., Timmer, R.T., and Browning, K.S.** (1992). Sequences for two cDNAs encoding *Arabidopsis thaliana* eukaryotic protein synthesis initiation factor 4A. *Gene* **120**, 313-314.
- Metz, A.M., Wong, K.C., Malmstrom, S.A., and Browning, K.S.** (1999). Eukaryotic initiation factor 4B from wheat and *Arabidopsis thaliana* is a member of a multigene family. *Biochem Biophys Res Commun* **266**, 314-321.
- Milburn, S.C., Hershey, J.W., Davies, M.V., Kelleher, K., and Kaufman, R.J.** (1990). Cloning and expression of eukaryotic initiation factor 4B cDNA: sequence determination identifies a common RNA recognition motif. *EMBO J* **9**, 2783-2790.
- Miyamoto, S., Patel, P., and Hershey, J.W.** (2005). Changes in ribosomal binding activity of eIF3 correlate with increased translation rates during activation of T lymphocytes. *J Biol Chem* **280**, 28251-28264.
- Moore, R., Clark, W.D., and Vodopich, D.S.** (1998). botany. (WCB/McGraw-Hill).
- Morgan, R., and Sargent, M.G.** (1997). The role in neural patterning of translation initiation factor eIF4All; induction of neural fold genes. *Development* **124**, 2751-2760.
- Morino, S., Imataka, H., Svitkin, Y.V., Pestova, T.V., and Sonenberg, N.** (2000). Eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) binding site and the middle one-third of eIF4GI constitute the core domain for cap-dependent translation, and the C-terminal one-third functions as a modulatory region. *Mol Cell Biol* **20**, 468-477.
- Morohashi, Y., Bewley, J.D., and Yeung, E.C.** (1981). Biogenesis of Mitochondria in Imbibed Peanut Cotyledons : II. DEVELOPMENT OF LIGHT AND HEAVY MITOCHONDRIA. *Plant Physiol* **68**, 318-323.
- Murata, T., and Shimotohno, K.** (2006). Ubiquitination and proteasome-dependent degradation of human eukaryotic translation initiation factor 4E. *J Biol Chem* **281**, 20788-20800.
- Naranda, T., Kainuma, M., MacMillan, S.E., and Hershey, J.W.** (1997). The 39-kilodalton subunit of eukaryotic translation initiation factor 3 is essential for the complex's integrity and for cell viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **17**, 145-153.
- Nielsen, P.J., and Trachsel, H.** (1988). The mouse protein synthesis initiation factor 4A gene family includes two related functional genes which are differentially expressed. *EMBO J* **7**, 2097-2105.
- Nieto-Sotelo, J., Kannan, K.B., Martinez, L.M., and Segal, C.** (1999). Characterization of a maize heat-shock protein 101 gene, HSP101, encoding a ClpB/Hsp100 protein homologue. *Gene* **230**, 187-195.

- Nieto-Sotelo, J., Martinez, L.M., Ponce, G., Cassab, G.I., Alagon, A., Meeley, R.B., Ribaut, J.M., and Yang, R.** (2002). Maize HSP101 plays important roles in both induced and basal thermotolerance and primary root growth. *Plant Cell* **14**, 1621-1633.
- Nogueira, F.T., Madi, S., Chitwood, D.H., Juarez, M.T., and Timmermans, M.C.** (2007). Two small regulatory RNAs establish opposing fates of a developmental axis. *Genes Dev* **21**, 750-755.
- Osborne, D.J., and McManus, M.T.** (1986). Flexibility and commitment in plant cells during development. *Curr Top Dev Biol* **20**, 383-396.
- Othumpangat, S., Kashon, M., and Joseph, P.** (2005). Eukaryotic translation initiation factor 4E is a cellular target for toxicity and death due to exposure to cadmium chloride. *J Biol Chem* **280**, 25162-25169.
- Owttrim, G.W., Mandel, T., Trachsel, H., Thomas, A.A., and Kuhlemeier, C.** (1994). Characterization of the tobacco eIF-4A gene family. *Plant Mol Biol* **26**, 1747-1757.
- Palacios, I.M., Gatfield, D., St Johnston, D., and Izaurralde, E.** (2004). An eIF4AIII-containing complex required for mRNA localization and nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* **427**, 753-757.
- Pause, A., and Sonenberg, N.** (1992). Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: the mammalian translation initiation factor eIF-4A. *EMBO J* **11**, 2643-2654.
- Pause, A., Methot, N., Svitkin, Y., Merrick, W.C., and Sonenberg, N.** (1994). Dominant negative mutants of mammalian translation initiation factor eIF-4A define a critical role for eIF-4F in cap-dependent and cap-independent initiation of translation. *EMBO J*. **13**, 1205-1215.
- Phan, L., Zhang, X., Asano, K., Anderson, J., Vornlocher, H.P., Greenberg, J.R., Qin, J., and Hinnebusch, A.G.** (1998). Identification of a translation initiation factor 3 (eIF3) core complex, conserved in yeast and mammals, that interacts with eIF5. *Mol Cell Biol* **18**, 4935-4946.
- Piron, M., Vende, P., Cohen, J., and Poncet, D.** (1998). Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J* **17**, 5811-5821.
- Potokina, E., Blattner, R., Alexandrova, T., and Bachmann, K.** (2002). AFLP diversity in the common vetch (*Vicia sativa* L.) on the world scale. *Theor Appl Genet* **105**, 58-67.
- Prevot, D., Darlix, J.L., and Ohlmann, T.** (2003). Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. *Biol Cell* **95**, 141-156.
- Pyronnet, S., Imataka, H., Gingras, A.C., Fukunaga, R., Hunter, T., and Sonenberg, N.** (1999). Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E. *EMBO J* **18**, 270-279.

- Raught, B., Gingras, A.C., Gygi, S.P., Imataka, H., Morino, S., Gradi, A., Aebersold, R., and Sonenberg, N.** (2000). Serum-stimulated, rapamycin-sensitive phosphorylation sites in the eukaryotic translation initiation factor 4G1. *EMBO J* **19**, 434-444.
- Richter-Cook, N.J., Dever, T.E., Hensold, J.O., and Merrick, W.C.** (1998). Purification and characterization of a new eukaryotic protein translation factor. Eukaryotic initiation factor 4H. *J Biol Chem* **273**, 7579-7587.
- Rodriguez, C.M., Freire, M.A., Camilleri, C., and Robaglia, C.** (1998). The *Arabidopsis thaliana* cDNAs coding for eIF4E and eIF(iso)4E are not functionally equivalent for yeast complementation and are differentially expressed during plant development. *Plant J* **13**, 465-473.
- Rogers, G.W., Jr., Komar, A.A., and Merrick, W.C.** (2002). eIF4A: the godfather of the DEAD box helicases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **72**, 307-331.
- Ruud, K.A., Kuhlman, C., Goss, D.J., and Browning, K.S.** (1998). Identification and characterization of a novel cap-binding protein from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **273**, 10325-10330.
- Sanchez-de-Jimenez, E., Aguilar, R., and Dinkova, T.** (1997). S6 ribosomal protein phosphorylation and translation of stored mRNA in maize. *Biochimie* **79**, 187-194.
- Schirmer, E.C., Lindquist, S., and Vierling, E.** (1994). An *Arabidopsis* heat shock protein complements a thermotolerance defect in yeast. *Plant Cell* **6**, 1899-1909.
- Schirmer, E.C., Glover, J.R., Singer, M.A., and Lindquist, S.** (1996). HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem Sci* **21**, 289-296.
- Schmidt, S., Hofmann, K., and Simanis, V.** (1997). Sce3, a suppressor of the *Schizosaccharomyces pombe* septation mutant *cdc11*, encodes a putative RNA-binding protein. *Nucleic Acids Res* **25**, 3433-3439.
- Schwechheimer, C.** (2004). The COP9 signalosome (CSN): an evolutionary conserved proteolysis regulator in eukaryotic development. *Biochim Biophys Acta* **1695**, 45-54.
- Shibuya, T., Tange, T.O., Sonenberg, N., and Moore, M.J.** (2004). eIF4AIII binds spliced mRNA in the exon junction complex and is essential for nonsense-mediated decay. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 346-351.
- Sonenberg, N.** (2008). eIF4E, the mRNA cap-binding protein: from basic discovery to translational research. *Biochem Cell Biol* **86**, 178-183.
- Sonenberg, N., and Dever, T.E.** (2003). Eukaryotic translation initiation factors and regulators. *Curr Opin Struct Biol* **13**, 56-63.

- Shibahara, T., Kawasaki, H., and Hirano, H.** (2002). Identification of the 19S regulatory particle subunits from the rice 26S proteasome. *Eur J Biochem.* **269**, 1474-1483.
- Tahara, S.M., Morgan, M.A., Shatkin, A.J.**(1981).Two forms of purified m7G-cap binding protein with different effects on capped mRNA translation in extracts of uninfected and poliovirus-infected HeLa cells. *J Biol Chem.* **256**, 7691-4.
- Tanaka, K., and Tsurumi, C.** (1997). The 26S proteasome: subunits and functions. *Mol Biol Rep.* **24**, 3-11.
- Tarun, S.Z., and Sachs, A.B.** (1996). Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *EMBO J.* **15**, 7168-7177.
- Timmermans, M.C., Schultes, N.P., Jankovsky, J.P., and Nelson, T.** (1998). Leafbladeless1 is required for dorsoventrality of lateral organs in maize. *Development.* **125**, 2813-2823.
- Unbehaun, A., Borukhov, S.I., Hellen, C.U., and Pestova, T.V.** (2004). Release of initiation factors from 48S complexes during ribosomal subunit joining and the link between establishment of codon-anticodon base-pairing and hydrolysis of eIF2-bound GTP. *Genes Dev.* **18**, 3078-3093.
- Vardy, L., and Orr-Weaver, T.L.** (2007). Regulating translation of maternal messages: multiple repression mechanisms. *Trends Cell Biol.* **17**, 547-554.
- Vilela, C., Velasco, C., Ptushkina, M., and McCarthy, J.E.** (2000). The eukaryotic mRNA decapping protein Dcp1 interacts physically and functionally with the eIF4F translation initiation complex. *EMBO J.* **19**, 4372-4382.
- Vornlocher, H.P., Hanachi, P., Ribeiro, S., and Hershey, J.W.** (1999). A 110-kilodalton subunit of translation initiation factor eIF3 and an associated 135-kilodalton protein are encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* TIF32 and TIF31 genes. *J Biol Chem.* **274**, 16802-16812.
- Wegele, H., Muller, L., and Buchner, J.** (2004). Hsp70 and Hsp90--a relay team for protein folding. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* **151**, 1-44.
- Wells, D.R., Tanguay, R.L., Le, H., and Gallie, D.R.** (1998). HSP101 functions as a specific translational regulatory protein whose activity is regulated by nutrient status. *Genes Dev* **12**, 3236-3251.
- Woese, C.R.** (2000). Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 8392-8396.
- Woese, C.R., Olsen, G.J., Ibba, M., and Soll, D.** (2000). Aminoacyl-tRNA synthetases, the genetic code, and the evolutionary process. *Microbiol Mol Biol Rev.* **64**, 202-236.

- Yamanaka, S., Poksay, K.S., Arnold, K.S., and Innerarity, T.L.** (1997). A novel translational repressor mRNA is edited extensively in livers containing tumors caused by the transgene expression of the apoB mRNA-editing enzyme. *Genes Dev.* **11**, 321-333.
- Yang, P., Fu, H., Walker, J., Papa, C.M., Smalle, J., Ju, Y.M., and Vierstra, R.D.** (2004). Purification of the Arabidopsis 26 S proteasome: biochemical and molecular analyses revealed the presence of multiple isoforms. *J Biol Chem.* **279**, 6401-6413.
- Zapata, J.M., Martinez, M.A., and Sierra, J.M.** (1994). Purification and characterization of eukaryotic polypeptide chain initiation factor 4F from *Drosophila melanogaster* embryos. *J Biol Chem.* **269**, 18047-18052.
- Zhang, C., and Guy, C.L.** (2005). Co-immunoprecipitation of Hsp101 with cytosolic Hsc70. *Plant Physiol Biochem.* **43**, 13-18.
- Zimmer, C., von Gabain, A., and Henics, T.** (2001). Analysis of sequence-specific binding of RNA to Hsp70 and its various homologs indicates the involvement of N- and C-terminal interactions. *RNA.* **7**, 1628-1637.

### XIII. Apéndice I

Los péptidos identificados por LC/MS/MS a lo largo de la secuencia de las proteínas que forman parte de los complejos de unión a *cap*, se resaltan en amarillo y verde. Los péptidos con un porcentaje de identificación de 80 a 94 % se muestran en amarillo y aquellos con un porcentaje de identificación por arriba del 94 % se muestran en verde.

#### HSP101

gi|4584937 (100%), 101.913.5 Da  
 Heat shock protein 101, 101 kDa heat shock protein (Zea mays)  
 10 unique peptides, 10 unique spectra, 11 total spectra, 119/912 amino acids (13% coverage)

MRFDNFTTRET	REATVCAHEI	AVEACHAQIT	FLHLAAVYLA	DECCILRQAI
<b>TEALCGDCAA</b>	<b>CDTTEBYIN</b>	SLKCLPDSLP	PPDLVPAITA	LIRYIRBAQL
AGKRRGDSHL	AVDQLLLCLL	EDSDTSDCLR	EACVLAARYR	AELEKLRCCF
CRVVELASCD	TNFOALRTYC	BDLYEQACKL	DPYICRDEEI	RRVYRILSRR
TA <b>NHPVLI</b> CE	<b>PCVCKTAVVE</b>	CLAGN <b>IYRCQ</b>	<b>VPSNLLDVR</b> L	IALDMCALVA
CAVYAGLFEF	RLAAYLREVE	EAEGRVILFI	DEIHLVLCAC	RTEGSMGAAN
LFRPMLARCD	LRICATTLF	EYRKYVIRDA	AFERRRQQVF	VATPSVPTDY
SILRCLREKY	EGHHCYRIQD	<b>RALYVAAGLS</b>	<b>RRTIMGSHLP</b>	DEAIDLYDEA
CANVRA <b>VQLDS</b>	<b>QPTTEIDNLER</b>	RRIDQLVELLH	ALEREERDRAS	KARCLIEVRR
LDDLRDGLQF	LTMLYRKKIAT	RIDQLRSLKQ	RRDELQPTLQ	EATRRMQLAR
VADLRVYCALQ	ETDAAISKLI	SETCENLMLT	ETVCRPQIAT	VYLRMTCTPV
TRLCQNDKER	IYGLADALHQ	<b>RYYCQTEAYS</b>	<b>AVAAAYLSR</b>	ACLGRFQQPT
CSPLILLCPTC	YCRTELAKRL	AEQLIDDENI	LYRDOMSEFM	EQHIVARLIC
APPDGYCHEI	CCQLTQOYRR	RPYLYILFDE	YKAAHYAVFN	TLIQYIDDCR
LTDCCGRYVD	FENTYIIMTS	NLCAEHLIAC	MYCRNSMKVA	<b>RDLYMQEVR</b>
HFBPELLNRI	DEIVVDPFLS	HCQLRKYARR	<b>GMEDVAVELA</b>	ICCIALAVTD
AALDIIILSLI	YDPVYCARPI	RRWIERRYVT	QLSEMLIQEI	IDINCTYIID
AAPFERDEIVY	RYDRSCCLVN	AITCWR <b>SDIL</b>	<b>IQVFNSSTR</b> L	DAAQAYRRMR
IMIEDQEDGMD	EE			

#### CBP80

gi|588708113 (100%), 98.893.3 Da  
 MBF4C domain containing protein, expressed (Oryza sativa (japonica cultivar-group))  
 4 unique peptides, 4 unique spectra, 5 total spectra, 36/567 amino acids (6% coverage)

MSACWRATLLI	RIGDRCPHYG	CSADHREHIE	TCYGVLEBEY	EHSKDMFET
LLQCADQLPH	RIPFTCYLIC	LINCINEDFS	ECIVDTTHAN	LQDALHNENR
DRIRILLRFL	CCLMCSKVYL	FNSIIEETFEA	LLSSAATILD	EETCNFSWQP
RADFYVYTCIL	ASLPWCCSEL	FEQYPDEFER	VLVGIQSYIS	IRRHFDLIAF
SVFETDEGNS	FNKEDPIEDL	WERIQVLSRN	GMRYKSYKAP	HLSPFAQLVA
GVSHRFSPIS	CPPPTISQSS	SEIVRCQSEH	EADLEYPQRL	RELHIFPTNR
<b>AENMQPYDRF</b>	YVEECILDYL	LFINGCRREC	AFYLVSLPVP	FRYEYLMADT
IFSQLLLLLPN	PPFEPITYTL	VITDLCKALP	CAFPYVYVCA	VHALFDRTSN
<b>MDMELRTEL</b>	LWFSHHLINP	QFTWFWQEWA	YVKDLPEWAP	<b>QRVTVQEVLE</b>
<b>REIRLSYFDK</b>	IKQSIEDAVE	LEELLPPKAC	PNFHYHSDEC	KESTDGHRLS
KELVAMVRCR	KTQGDITISWY	DEKILFPYNGA	KFALDQVYSQT	LLDIDGKXSP
HLITVYERYC	QIISKLCPNE	EMQLLLMDEV	SATWKNSTQM	IAIAIDRMMC
<b>TRLESLNAIV</b>	<b>KWYFSPANVD</b>	QFHYSDRPWE	ILBNAYSKTY	NRIFDLRKEI
QTLRKCLOAA	KEASENAARE	LCEARSLIEI	YDCQVVPSEN	PCGLRRLQAR
ADKARSGEVT	TDESLEAKIA	LLARCLIEER	ELLRLLPKSF	VEVLETERLPP
ISADCDVPL	RACDPNVNSI	ARQPEATTME	IDNENCCDND	SQINCCQNKRI
SHNYCELEQW	CLCTLGFLRS	FSRQYATEIN	SHIAMLDQEI	FYGNHPLIR
KAAFSGLCRP	TSEGSHL			

eIF3\_c

gi1511515264 (100%), 111,829.8 Da  
 On62yl023300 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]  
 3 unique peptides, 3 unique spectra, 4 total spectra, 31,984 amino acids (3% coverage)

MHRHRPNLLE	AQLRNLIPHF	LHRRRSGRVH	NSRAAAAYLL	SSELLPBRRA
LRITLISAPL	RVEICDLSSEI	EEQEFESSEAC	SSESEDECCDA	CCRSQNGNRY
LRTTNASDSD	ESDSCQRVVR	SLKDRRNEEL	KITYDQMRNA	RRINDWYNLQ
ESFERKLNKQL	FEYVRYNELL	TYPNMYIKEL	VLLSDFLAIA	LANKIACKRM
SSNAKALNA	MKQELKRNK	QFENLIQRCR	EHPIRFIDDD	VEDKDDDDDT
EDDSDAIED	FEKIAMLESD	EGDDDEIDDD	OCCDVRHTN	KEDKLMKQI
LEDPSLITWD	IYDERLREIV	ASRGRKKTGR	VIR <b>VEQLTFL</b>	<b>TRVAKTPAQR</b>
LEILPHYISA	QFDVNPILLC	HMPVNMRRKC	VNNMLLVLDI	LQOYPHIYVD
TSVEFDIKET	QCCADYDCEI	HVTCOLVATL	ELLDLEFRES	LQCTDPYTRD
YVQRLRDEPL	FLVVAQNVQD	YLEHYGMFKA	EAKVALRRVI	LYYKPFQIVY
DSMRRLAIED	EDSREIDEDAE	ADIERQVSDN	NKCPFFVVI	FEYVPRPTI
PESCRALMDA	LMIVYRYCD	TRTKAAMLC	DIYHHAISDI	FLYVARDLLM
LHLQDCYQLM	DILIQILYNR	<b>YMAQLCLAP</b>	<b>EA</b> CLIIIAHC	CLSELYSTER
YR <b>ELLAQCVQ</b>	<b>QSR</b> THERTFE	QERLERRROM	PYHMHINLEL	LEATHLICAM
LIEVFNMAAS	TYDERKPFMR	TFRALLEISE	ROTFFVCPFEN	VRSHYMAATR
ALSRGCHQKA	FDYINSLIHW	ELLRNREHYL	EMLELKRFE	ALRTYLFYRI
SCYQSLSLDQ	LTTMFDLLEQ	QARLVVSRMM	WHIELHASWD	QPTKCIITHN
VDQTRBLCCL	FQMADELSVI	VESNERAYEA	ETCCTFEICAP	PRRRCDAQDS
SNLCRWQENF	VSTQCRQCCG	RSCYSCRCCG	SCRCCCCYQR	DRCTQCYSRC
YCCCSRFQDC	CRERTCLMAK	CCCDCCARMK	FHLW	

eIFiso4G

gi1511564790 (100%), 88,495.2 Da  
 On64g0499300 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]  
 7 unique peptides, 8 unique spectra, 12 total spectra, 55,806 amino acids (7% coverage)

SSTPPLPLPP	PPPLIPSQTQ	PSLAEECEGR	RGFDFSAISF	RIPPPPTASGS
CDLLRSHVCC	ASKICDPNFE	VREVRVRYTRD	<b>QLLELR</b> IIVD	IPFAILRINQ
EIDTELHGED	QIWCRPELDV	QVQTQTQAQP	HNRYCETDNR	DWRARTVQPF
AANEK <b>SWDN</b>	<b>IREAX</b> AAHAS	SCRQQEQVNR	QDQLNHQFAS	<b>KAQVCPTRAL</b>
<b>IEAEY</b> PWSAR	RCNLSEKDRV	LKTVRGILNK	LTPEKFDLLR	COLMESCITT
ADILNDYISL	IFEKAYFEPT	FCPMYAGLCS	DLNEKLPSTP	SEIPGCKEIT
FERYLLNQCQ	EAFECAESLR	AEIAR <b>LTCFD</b>	<b>QEMER</b> RDKER	IYKRLTLCNI
BLIGELLEKQK	MVPERIVHHI	YQELLCSGPD	KKACPEEENV	EAIQFFNTI
GRGLDENPRS	<b>RREINDTYIIQ</b>	<b>RE</b> ELTTNLOL	APRLRFMYRD	VVDLR <b>SNWV</b>
<b>PR</b> REIRART	ISLIHDEAME	TLCLEPGATC	LTRNCRNAPC	CPISPCCFPM
NRFGTCGMMP	GMFCTPGMPC	SEKMPGMPCL	DNDNWEVPRS	KSMFRGDSLR
NQCPLLNKPS	SINEPSSINS	ELLPHGSCAL	IGKSALLCSC	CPFSRPSLSM
ASLTHTPAQT	APSPKPYSA	PAVVPYTDEA	AGSSHMPAA	VQRKTVSLEI
EYICIRILDE	AQCIEELQCC	PEYYSIIVEI	AINIALDKCP	NFIDPLVREL
EHLHARRIFK	TEDLKTGCLL	YARLLEDIGI	DLPLAPALFC	ENVARELSLSC
CLSPFYVEEI	LRAVEDTYFR	KGFDAVMEI	MCCNSSCQA	LSHAVVIDA
ENKLLK				

## Lipoxygenasa 1

gi|12620877|gb|AAC61118.1| (100%), 96479.0 Da

Lipoxygenase (2aa maps)

1 unique peptides, 1 unique spectra, 1 total spectra, 11/864 amino acids (1% coverage)

MLSCIIIDCLT	CANCHARBLEC	TVVLMREENVL	DLNDFCATVY	DSIIEFLCKC
YTCQLISSTL	VDANNCNRCR	VCAIANLQW	LTSLPPLTTG	ESLFCYTFDW
EYERLCYPCA	VYVENNHAAT	FFLETTTLDQ	YPCRCAVTTY	ANLWYYPACL
FETNRVTFIS	DTYLPSONPA	ALEPYRDDQL	RNLRCDDQGC	PYQENRDRVYR
YDYYNDLCEP	DCCNFRPILC	CSADHFFPRR	CRTCCKPTKT	DPNSDSRLSL
VEDIYVPRDE	RFCHLELSDP	LCYSIRKAITQ	GIIPAVRITY	DTTFCEFDSE
QDFINLYECC	IKLFPKIDALI	DMRLLFPLOL	VXDLLPAGGD	YLLKLPFPQI
IQEDKNAMRT	DEEFAREYLA	CYNPMVITRL	TEFPFKVTLQ	PSKYCDRTAT
ITAEHIEKNL	ECLTVQOALD	CNRLYLDRH	DFMPFLIDV	NNLECNFIYA
TRTLFFLRCD	CELAPLAIEL	LEPYIDCDLT	VAKSRYTTPA	SLCEVIAWYVQ
LAKAYVAVND	TCWHQLVSHW	LNTHAYMEPF	VIATNRQLSY	THPVKCLLSL
HFRDVTMTINA	LAROTLINGC	CIFEMTVFPG	KYALCMSISVY	YKSWNFTEQC
LPADLVERCV	AVADPSSPYK	VRLLIEDYFY	ASDCLAIWHH	ICQWYGETLA
IYFPDICALR	CDEELQAMWK	EVREYCHCDH	EDAPWWRMQL	AVILLASACT
TIWIWIALALH	RAYNFCQFPY	ACYLPNRPTV	SRBRMPEFCS	KIPEELERDP
ERCFIHTITS	QIQITICISL	TEILSKHSSD	EYVLCQRDTP	EWTLQARALA
AFERFSDALY	KIECEVYCEK	EDPOLRNRNC	PAETPTMLLY	PNTSDHSCAA
AGLTAECIPN	SISL			

## HSP70

gi|123593|sp|P01143|HSP70\_MAZE (100%), 70404.9 Da

Heat shock 70 kDa protein

22 unique peptides, 25 unique spectra, 42 total spectra, 204/645 amino acids (32% coverage)

MAKSECPAIC	IDLGTTYSCV	CLWQHQRVEI	IANDQGNRTT	PSHYGFTDTE
ELIGDAAKNQ	VANNPTNTVF	DAKRLICRRF	SSPAVDSSMK	LWPSRHLGIG
DKPMIVFNYS	CEEKQFAAEE	ISSVLIKXK	EIAEAYLGST	IKNAVVTVPA
YFNDSSRQAT	EDAGVIAGLN	VMRIINEPTA	AAIAYGLQK	ATSSGSKNYL
IFDLGGGTFD	YSLLTIEEGI	FEYKATAGDT	HLGGEDFDR	VYNHFFVQEFK
RKNKKDISGM	PRALRRLBTA	CERAKRTLSS	TRQTTIEIDS	LFEGIDFTPR
SSRARFEEEL	MDLFRKCMFP	VERCLADAKM	DKSSVHDVYL	VGCSTELPKY
QQLDQFFNGR	ELCKSSINPDE	AVAYCAAVQA	AILLSGEGNER	SOLLLLDYTP
LSLGLLETAGC	VMTVLIPIANT	TIPTRKEQYF	STYSQNGPCV	LIQVYECERA
RTRDNNLLGR	FELSCIPPAF	RGVPQITVTF	DIDYNNILNV	SAEDKTTGQR
NKITTITNDKQ	RLSKEEIEEM	VQEAERYKAE	DEEYRKEVDA	KNALENYAYN
NRNTIADDEK	ASKLPADKK	KIEDAVDGA	SWLDSNQLAS	VIEFEDKMKF
LEGICNPIIA	RMVKGECAGM	GAAAGMDEDA	PSGCSGAGPK	IEEVD

## LEAFBLADELESS

gi|511559385|gb|AB010633.1| (100%), 67,751.0 Da  
leafbladeless1 [Zea mays]

3 unique peptides, 3 unique spectra, 3 total spectra, 35/594 amino acids (5% coverage)

MSGLCDRRCG	GPPGSHSGWE	TMCKRSRPG	QACGRQWAPW	SSTNYTPNTA
RPANCGSGSS	HPSGTSMQA	PDHCAATRGN	PEPPSQTSRP	YLAPPLANGW
QWQSRPRPSC	SEVRKDDAPP	SCSVPEVENY	DCNNTSDDDD	DDDDDLSDDI
SDDYDSDAST	KSFETRKTNK	WFKEFFEVLN	TLSLEQINED	TQWHCPCAK
<b>NEPCAIDWYK</b>	CLOPLYSHAR	TCCSTRYKLN	<b>RLAALLEEE</b>	<b>LSRIGTSVLP</b>
<b>AEIQIGKWK</b>	IQISTDRRIY	WPPMVIYMNT	FLIRDIIDRW	KCMGNOILLO
YFGYEASKA	RHAYGPSCHR	CMVLIIFESS	AVGYMEASRL	HKHFYNGGTD
RNSWHLRKYR	FVPGCKRQLY	CFLANKEDME	AFNKHCHGES	RLKYEMRSYN
EMVVIQMKQM	SEDNQQLNYL	ENKMYRTEQR	SEAVEESLCY	VTQKLRETIE
ENIFVRSKAK	EKHMEYEEEM	KSQEEIFHCL	IEDIWKATED	KERQFERLLQ
EEBSKARFPD	VDSCTMKDRQ	LRKEYVQKFI	DCQVKDYAEF	EYERDELIRV
HEDRKLKLLK	IYMDLELELL	RLFDAALTCI	WECHKPDTFE	ASSS

## Proteína de unión luminal cBiPe2

gi|5575128|gb|AAC49899.1| (100%), 71,086.8 Da  
luminal binding protein cBiPe2 [Zea mays]

2 unique peptides, 2 unique spectra, 2 total spectra, 42/663 amino acids (6% coverage)

MDRARGSAFL	LCVLLAGSLF	AFSVAREETK	KLCTVICIDL	GTTYSCVGVY
KNGHYEIIAN	DQCNRITPSW	<b>YAFTQSERLI</b>	CEAAKNQAAV	NPERTIFDVK
RLIGREFADK	EVQRDMKLYP	YRIINRDEGP	YIQVEIRDCE	NKVFSPDEIS
AMILGRMKDT	AEAYLGKKIN	DAVVTVPAYF	NDAQRQATEQ	<b>KCVIAGLNVA</b>
<b>RIINEPTAAA</b>	<b>IAYGLDKKCC</b>	EKNILVFDLC	CGTFOVSIIT	IDNGYFEVLA
TNGDTHLCGE	DFOQRIMEYF	IKLIKKKYSK	DISKONRALC	KLREAEERAK
RALSNQHQR	VEIESLFDCT	DFSEPLTRAR	FEELNNDLFR	KTMCPVEKAM
EDAGLEKSOI	HEIVLVCGST	RIPKVQQLLR	DYFDCKEPRK	CYNPDEAVAF
GAAVQGSILS	GEGGDETQDI	LLLDVAPLTL	GIETYGGVMT	KLIPRNTVIP
TRKSQVFTTY	QDQQTTVSIQ	VFEGERSMTR	DCRLLGKFDL	NGIAPAPRCT
PQIEYTFEVD	ANGILNVKAI	DRGTGKSEKI	TITNEKCRLS	QEEIDRMVRE
AEEFAEEDKK	YKERIDARNQ	LETYYVNMEN	TVGDKDELAD	KLEAEERERV
EEALKEALEW	LDDNQSAEKE	DYEELKEVE	AVCNPIVSAV	YQRSGCCAPCC
DADCCYDDDH	DEL			

## eIF4A

gi|234104|gb|AAB67607.1| (100%), 46,962.7 Da

translational initiation factor eIF-4A [Zea mays]

27 unique peptides, 38 unique spectra, 176 total spectra, 202/414 amino acids (49% coverage)

MACWAFICIG	FOAKHYDSKW	QELLSTCETE	EFFTSYDEVF	ESFDOMGLQE
NLLRCITAYE	TEKPSAIQQR	CIVPTACGLD	YIQQAQSCYC	KTATFCSCIL
QQLDYCLVIC	QALVLAFTRE	LAQQIERKYM	ALCOYICVKE	HAIVCCTSMR
EDQRIILASGV	MVYVCTPGRY	FQMLRRQSLE	PQNIAMFVLO	EADENLSRCF
EDQIYDIFQL	LPSKIQYGYF	SATMPPEALE	ITRKFMNKPY	RILYKRDELT
LEGIEQFYYN	YDEIDWKLDT	ICDLYETLAI	TQSYIFVNTA	KKVDWLTQNM
KSRDHTYSAT	HGDMDQNTRE	IIMREFRSCS	SAVLITRDLL	AKCIQYQQVS
LVINYDLPTQ	PENYLHRICR	SCRFGKRCYA	INFYTRQNER	GLFDIQKFTN
VLIEELFANY	ADLL			

## Factor de elongación 1 $\alpha$

gi|2282584|gb|AAB64207.1| (100%), 49290.8 Da

elongation factor 1-alpha [Zea mays]

16 unique peptides, 34 unique spectra, 83 total spectra, 156/447 amino acids (35% coverage)

MGKEK	THINI	VVIGHVDSGK	STTTGHLIYK	LGGIDKRVIE
RFEKEAAEMN		KRSFKYAWVL	DKLKAERERG	ITIDIALWKF
ETTK	YYCTVI	DAPGHRDFIK	NMITGTSQAD	CAVLIIDSTT
GGFEAGISKD		GQTREHALLA	FTLGVK	CCNKMDATTP
KYSK	ARYDEI	VKEVSSYLK	VGYNPDKIHF	VPISGFEGDN
MIER	STNLDW	YKGP TLL EAL	DLIN EPKRPS	DKPLR
VYKIGGIGTV		PVGRVETGVI	KPGM	VVTFGP
EMHHEALQEA		LPGDNVGFNV	KNVAVKDLKR	TGLTTEVK
PAKEAASFTS		QVIIMNHPGQ	IGNGYAPVLD	SV
AELVTKIDRR		SGKELEKEPK	FLKNGDAGMV	GYVASNSKDD
ETFSQYPLG		RFAVR	DMRQT	CHTSHIAVKF
KAAAKKK			VAVGVIK	K
				MVPTKPMVV
				KKDPTGAKVT

## Subunidad regulatoria 6 del proteasoma 26S

gi|3024431|sp|O04019|PRS6A\_ARATH (100%), 46665.0 Da

26S protease regulatory subunit 6A homolog (TAT-binding protein homolog 1) (TBP-1)

5 unique peptides, 6 unique spectra, 6 total spectra, 54/419 amino acids (13% coverage)

MAEDTSFEGD	QLASMTTDDI	GRASRLLANE	IRILKEESQR
TNLDLESVKE	KIKENQEKIK	LNKQLPYLVG	NIVEILEMSP
EDDAEEDGAN	IDLDSQRK GK	CVVLKTSTRQ	TIFLPVVGLV
DPDTLK <b>PGDL</b>	<b>VGVNK</b> DSYLI	LDTLPSEYDS	RVKAMEVDEK
PTEDYNDIGG	LEKQIQELVE	AIVLPMTHKE	QFEKLGIRPP
K <b>GVLLYGPPG</b>	<b>TGK</b> TLMAR <b>AC</b>	<b>AAQT NATFLK</b>	L AGPQLVQMF
IGDGAKLVRD	AFLLAKEKSP	CIIFIDEIDA	IGTKRFDSEV
SGDREVQRTM	LELLNQLDGF	SSDDRIVKIA	ATNR <b>ADILD P</b>
<b>ALMR</b> SGRLDR	KIEFPHPTEE	ARGRILQIHS	RKMNVNADV N
FEELAR <b>STDD</b>	<b>FNGAQLK</b> AVC	VEAGMLALRR	DATEVN HEDF
NEGIIQVQAK	KKASLNYYA		

## 3-fosfoglicerato cinasa citosólica

gi|28172915|gb|AA032643.1|AF343452\_1 (100%), 31626.4 Da

cytosolic 3-phosphoglycerate kinase [Zea mays]

17 unique peptides, 30 unique spectra, 44 total spectra, 183/299 amino acids (61% coverage)

<b>YSLKPLVPR L</b>	SELLGVEVVM	ANDCIGEEVE	K <b>LAAALPEGG</b>
<b>VLLLENVRFY</b>	<b>KEEEKNEPEF</b>	<b>AKK LASVADL</b>	<b>YVNDAFGTAH</b>
R <b>AHASTE GVT</b>	KYLKPAVAGF	<b>LMQKELDYLV</b>	<b>GAVANPKKPF</b>
<b>AAIVGGSK</b> VS	SK <b>IGVIESLL</b>	<b>AKVDILILGG</b>	GMIYTFYKAQ
GYSVGKSLVE	EDKLELATSL	IEKAK <b>AKGVS</b>	<b>LLLPTDIVVA</b>
<b>DKFAADAESK</b>	IVPATAIPDD	WMGLDVGPDA	TK <b>TFNEALDT</b>
<b>TKTVIWN GPM</b>	<b>GVFEFEKFAA</b>	<b>GTEAIAKKLA</b>	<b>ELTTTKGVTT</b>
<b>IIGGDSVAA</b>	<b>VEK</b> AGLADK		

## Actina

gi|1498388|gb|AAB40105.1| (100%), 37154.3 Da

actin [Zea mays]

16 unique peptides, 26 unique spectra, 75 total spectra, 127/336 amino acids (38% coverage)

<b>AGFAGDDAPR</b>	<b>AVFPSIVGRP</b>	<b>R</b> HTGVMVGMG	QK <b>DAYVGDEA</b>
<b>QSKRGILTLK</b>	YPIEHGIVSN	WDDMEKIWHH	TFYNELRVAP
EEHPVVLTEA	PLNPKANREK	MTQIMFETFN	VPAMYVAIQ
VLSLYASGRN	TGIVLDSGDG	VSHTVPIYEG	YALPHAILR <b>L</b>
<b>DLAGRDLTDS</b>	<b>LMK</b> ILTER <b>GY</b>	<b>SFTTTAEREI</b>	<b>VRDIKEK</b> <b>LAY</b>
<b>VALDYDQELE</b>	<b>NAK</b> SSSSVEK	<b>SYELPDGQVI</b>	<b>TIGAER</b> FRC <b>P</b>
EVLFPQPSFIG	MEAPGIHETT	YNSIMK <b>CDVD</b>	<b>IRK</b> DLYGN <b>I</b> V
LSGGTTMFPG	IADRM <b>SK</b> <b>EIT</b>	<b>ALAPSS</b> <b>M</b> KIK	<b>VVAPPER</b> KYS
VWIGGSILAS	LSTFQQ		

## Alcohol deshidrogenasa 1

gi|113359|sp|P00333|ADH1\_MAIZE (100%), 40980.5 Da

Alcohol dehydrogenase 1

6 unique peptides, 7 unique spectra, 7 total spectra, 60/379 amino acids (16% coverage)

MATAGKVIKC	KAAVAWEAGK	PLSIEEVEVA	PPQAMEVRVK
ILFTSLCHTD	VYFWEAKGQT	PVFPRIFGHE	AGGIIESVGE
GVTDVAPGDH	VLPVFTGECK	ECAHCKSAES	NMCDLLRINT
DRGVM IADGK	SRFSINGKPI	YHFVGTSTFS	EYTMHVGCV
AKINPQAPLD	KVCVLSGYS	TGLGASINVA	KPPKGSTVAV
FGLGAVGLAA	AEGARIAGAS	<b>R</b> <b>IIGVDLNPS</b>	<b>RFEEAR</b> K <b>FGC</b>
<b>TEFVNPK</b> DHN	KPVQEVLAEM	TNGGVDRSVE	CTGNINAMIQ
AFECVHDGWG	VAVLVGVPHK	DAEFKTHPMN	FLNERTLK <b>GT</b>
<b>FFGNYKPRTD</b>	<b>LPNVVELY</b> <b>M</b> K	KELEVEK <b>FIT</b>	<b>HSVPFAEINK</b>
AFDLMAKGEG	IRCIIRMEN		

## Fructosa-bifosfato aldolasa

gi|113621|sp|P08440|ALF\_MAIZE (100%), 38605.0 Da

Fructose-bisphosphate aldolase, cytoplasmic isozyme

23 unique peptides, 32 unique spectra, 46 total spectra, 194/355 amino acids (55% coverage)

M S A Y C G K Y K D	E L I K N A A Y I G	T P G K G I L A A D	E S T G T I G K R L
S S I N V E N V E E	N R R A L R E L L F	C C P G A L Q Y I S	G V I L F E E T L Y
Q K T K D G K P F V	D V L K E G G V L P	G I K V D K G T I E	V V G T D K E T T T
Q G H D D L G K R C	A K Y Y E A G A R F	A K W R A V L K I G	P N E P S Q L A I D
L N A Q G L A R Y A	I I C Q E N G L V P	I V E P E I L V D G	P H D I D R C A Y V
T E T V L A A C Y K	A L N E H H V L L E	G T L L K P N M V T	P G S D S K K V T P
E V I A E Y T V R T	L Q R T V P A A V P	A V L F L S G G Q S	E E E A T R N L N A
M N K L S T K K P W	S L S F S F G R A L	Q A S T L K A W A G	K V E N L E K A R A
A F L A R C K A N S	E A T L G T Y K G D	A A A D T E S L H V	K D Y K Y

## Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa citosólica

gi|1184772|gb|AAA87578.1| (100%), 36542.1 Da

cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPC2

15 unique peptides, 26 unique spectra, 41 total spectra, 162/337 amino acids (48% coverage)

M G K I K I G I N G	F G R I G R L V A R	V A L Q S E D V E L	V A V N D P F I T T
D Y M T Y M F K Y D	T V H G Q W K H S D	I A L K D S K T L L	F G E K P V T V F G
I R N P E E I P W G	E A G A E Y V V E S	T G V F T D K D K A	A A H L K G G A K K
V V I S A P S K D A	P M F V V G V N E D	K Y T S D V N I V S	N A S C T T N C L A
P L A K V I H D N F	G I I E G L M T T V	H A I T A T Q K T V	D G P S A K D W R G
G R A A S F N I I P	S S T G A A K A V G	K V L P E L N G K L	T G M S F R V P T V
D V S V V D L T V R	I E K G A S Y E E I	K K A I K A A S E G	P L K G I M G Y V E
E D L V S T D F T G	D S R S S I F D A K	A G I A L N D H F I	K L V S W Y D N E W
G Y S N R V V D L I	R H M F K T Q		

## Malato deshidrogenasa

gi|18202485|sp|Q08062|MDHC\_MAIZE (100%), 35589.4 Da

Malate dehydrogenase, cytoplasmic

3 unique peptides, 3 unique spectra, 3 total spectra, 37/332 amino acids (11% coverage)

MAKEPMRVLV	TGAAGQIGYA	LVPMIARGVM	LGADQPVILH
MLDIPPAEA	LNGVKMELVD	AAFPLLKGVV	ATTDVVEACT
GVNVAVMVG	FPRKEGMERK	DVMSKNVSIY	KSQASALEAH
AAPNCKVLVV	ANPANTNALI	LKEFAPSIPE	KNVTCLTRLD
HNRALGQISE	R LNVQVSDVK	NV I IWGNHSS	SQYPDVNHAT
VKTSTGEKPV	RELVSDDEWL	NGEFITTVQQ	RGAAIIKARK
FSSALSAASS	ACDHIRDWVL	GTPEGTFVSM	GVYSDGSYGV
PSGLIYSFPV	TCSGGEWKIV	QGLPIDEF SR	KKMDATAQEL
TEEKT LAYSC	LE		

## eIFiso4E

gi|3342823|gb|AAC27715.1| (100%), 24104.2 Da

eukaryotic translation initiation factor p28 subunit [Zea mays]

8 unique peptides, 15 unique spectra, 20 total spectra, 72/216 amino acids (33% coverage)

MAEVEAPATA	VEAPAAAVAT	TTPEVAAPEA	GAATEAKGPH
KLHRQWTFWY	DIQTKTKSGA	AWGTSLLKAY	TFDTVEEFWS
MYDQIFRPSK	LSGNADFHLF	KAGVEPKWED	PECANGGKWT
VPCNRKATFE	TMWLETLMAL	IGE QFDETED	ICGIVASVRA
RGDKLALWTR	TASNEAVQVN	IGKKWKDVID	YNDKITYTFH
DDSKRDKPSR	GGRYTV		

## eIF4E

gi|3342821|gb|AAC27714.1| (100%), 24470.9 Da

eukaryotic translation initiation factor small subunit [Zea mays]

3 unique peptides, 5 unique spectra, 8 total spectra, 30/218 amino acids (14% coverage)

M A E E T D T R P A	S A G S R G R P A P	E D D D R E E G E I	T D L A C A P S P P
A T H P L E H S W T	F W F D N P Q S K S	K Q A A W G S S I R	P I H T F S T V E E
F W G L Y N N I N H	P S K <b>L I V G A D F</b>	<b>H C F K</b> N K I E P K	W E D P I C A N G G
K W T I S C G R G K	S D T F W L H T L L	A M I G E Q F D Y G	D E I C G A V V S V
R G K Q E R <b>I A I W</b>	<b>T K N A A N E A A Q</b>	<b>V S I G K</b> Q W K E L	L D Y K D S I G F I
V H D D A K K M D K	G L K E R Y T V		

## Globulina 2

gi|228310|prf||1802402A (100%), 49922.4 Da

globulin 2

8 unique peptides, 10 unique spectra, 11 total spectra, 88/450 amino acids (20% coverage)

M K V P V L L L L V	S L C F S L A L A W	Q T D T E S G S G R	P Y H Y G E E S F R
H W T R S R Q G R F	R V L E R F T H E L	L E D A V G N Y R <b>V</b>	<b>A E L E A A P R</b> A F
L Q P S H Y D A D E	V M F V K <b>E G E G V</b>	<b>I V L L R</b> G G K R E	S F C V R E G D V M
V I P A G A V V Y S	A N T H Q S E W F R	<b>V V M L L S P V V S</b>	<b>T S G R</b> F E E F F P
I G G E S P E S F L	S V F S D D V I Q A	S F N T R R E E W E	K V F E K Q S K <b>G E</b>
<b>I T T A S E E Q I R</b>	<b>E L S R</b> S C S R G G	R S S R S E G G D S	G S S S S K W E I K
P S S L T D K K P T	H S N S H G R H Y E	I T G D E C P H L R	<b>L L D M D V G L A N</b>
<b>I A R</b> G S M M A P S	Y N T R A N K I A I	V L K G Q G Y F E M	A C P H V S G G R S
S P R R E R G H G R	E E E E E R E E E Q	G G G G G Q K S R S	Y R Q V K S R I R E
G S V I V I P A G H	P T A L V A G E D K	N L A V L C F E V N	A S F D D K <b>V F L A</b>
<b>G T N S A L Q K</b> M D	R P A K <b>L L A F G A</b>	<b>D E E Q Q V D R</b> V I	G A Q K D A V F L R
G P Q S H R V S S V			

## Vicilina

gi|22284|emb|CAA41809.1| (100%), 66160.7 Da

vicilin-like embryo storage protein [Zea mays]

2 unique peptides, 2 unique spectra, 2 total spectra, 22/582 amino acids (4% coverage)

```
M V S A R I V V L L   A T L L C A A A V   A S S W E D D N H H   H H G G H K S G Q C
V R R C E D R P W H   Q R P R C L E Q C R   E E E R E K R Q E R   S R H E A D D R S G
E G S S E D E R E Q   E K E K Q K D R R P   Y V F D R R S F R R   V V R S E Q G S L R
V L R P F D E V S R   L L R G I R D Y R V   A V L E A N P R S F   V V P S H T D A H C
I C Y V A E G E G V   V T T I E N G E R R   S Y T I K Q G H V F   V A P A G A V T Y L
A N T D G R K K L V   I T K I L H T I S V   P G E F Q F F F G P   G G R N P E S F L S
S F S K S I Q R A A   Y K T S S D R L E R   L F G R H G Q D K G   I I V R A T E E Q T
R E L R R H A S E G   G H G P H W P L P P   F G E S R G P Y S L   L D Q R P S I A N Q
H G Q L Y E A D A R   S F H D L A E H D V   S V S F A N I T A G   S M S A P L F N T R
S F K I A Y V P N G   K G Y A E I V C P H   R Q S Q G G E S E R   E R D K G R R S E E
E E E E S S E E Q E   E A G Q G Y H T I R   A R L S P G T A F V   V P A G H P F V A V
A S R D S N L Q I V   C F E V H A D R N E   K V F L A G A D N V   L Q K L D R V A K A
L S F A S K A E E V   D E V L G S R R E K   G F L P G P E E S G   G H E E R E Q E E E
E R E E R H G G R G   E R E R H G R E E R   E K E E E R E G R H   G G R E E R E E E E
R H G R G R R E E V   A E T L M R M V T A   R M
```

## ATECP63

gi|15228014|ref|NP\_181202.1| (100%), 48492.5 Da

ATECP63 (EMBRYONIC CELL PROTEIN 63) [Arabidopsis thaliana]

4 unique peptides, 5 unique spectra, 5 total spectra, 37/448 amino acids (8% coverage)

```
M A S D K Q K A E R   A E V A A R L A A E   D L H D I N K S G G   A D V T M Y K V T E
R T T E H P P E Q D   R P G V I G S V F R   A V Q G T Y E H A R   D A V V G K T H E A
A E S T K E G A Q I   A S E K A V G A K D   A T V E K A K E T A   D Y T A E K V G E Y
K D Y T V D K A K E   A K D T T A E K A K   E T A N Y T A D K A   V E A K D K T A E K
I G E Y K D Y A V D   K A V E A K D K T A   E K A K E T A N Y T   A D K A K E A K D K
T A E K V G E Y K D   Y T V D K A V E A R   D Y T A E K A I E A   K D K T A E K T G E
Y K D Y T V E K A T   E G K D V T V S K L   G E L K D S A V E T   A K R A M G F L S G
K T E E A K G K A V   E T K D T A K E N M   E K A G E V T R Q K   M E E M R L E G K E
L K E E A G A K A Q   E A S Q K T R E S T   E S G A Q K A E E T   K D S A A V R G N E
A K G T I F G A L G   N V T E A I K S K L   T M P S D I V E E T   R A A R E H G G T G
R T V V E V K V E D   S K P G K V A T S L   K A S D Q M T G Q T   F N D V G R M D D D
A R K D K G K L
```

#### XIV. Glosario de términos

ATP	Trifosfato de Adenosina
eIF	Factor de iniciación eucariótico
FT	Factor asociado a los eIF
GTP	Trifosfato de Guanosina
HSP	Proteína de estrés calórico
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
LC/MS/MS	Cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas en tándem
kDa	kilo Dalton
nt	Nucleótido
m <sup>7</sup> GpppN	Estructura <i>cap</i> del mRNA
mRNA	RNA mensajero
ORF	Región codificadora del mRNA
PABP	Proteína de unión a poli(A)
UTR	Región no traducible del mRNA
4EBP	Proteína de unión al factor eIF4E
μL	Microlitro
μg	Microgramo
mL	Mililitro
mg	Miligramos
L	Litro