



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Facultad de Química

IDENTIFICACIÓN DE LOS ELEMENTOS QUE PARTICIPAN EN EL INICIO DE
LA TRADUCCIÓN DEL IRES *Hsp101* DE MAÍZ

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. AUGUSTO SAMUEL JIMÉNEZ-GONZÁLEZ

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Estela Sánchez de Jiménez

Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. José Luis Reyes Taboada

Instituto de Biotecnología

Dr. León Patricio Martínez Castilla

Facultad de Química

Ciudad Universitaria, Ciudad de México. Febrero, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

| | |
|--|------|
| Dedicatorias..... | IV |
| Agradecimientos..... | V |
| Abreviaturas..... | VIII |
| Abstract..... | 1 |
| Resumen..... | 2 |
| Introducción..... | 3 |
| Vía canónica de la síntesis de proteínas dependientes de <i>cap</i> | 3 |
| Síntesis de proteínas independiente de <i>cap</i> y dependiente de IRES..... | 9 |
| Elementos IRES en ARN virales..... | 13 |
| Virus que poseen actividad IRES en la región 5'UTR..... | 13 |
| Virus que poseen actividad IRES en la región intergénica..... | 15 |
| Preferencia de IRES en mensajes celulares de plantas..... | 15 |
| Antecedentes..... | 19 |
| El IRES <i>Hsp101</i> de maíz requiere la secuencia completa 5'UTR para su óptimo funcionamiento..... | 19 |
| Estructura secundaria del IRES <i>Hsp101</i> de maíz obtenida por el programa mFOLD..... | 20 |
| Justificación..... | 23 |
| Hipótesis..... | 23 |
| Objetivos..... | 24 |
| Objetivo general..... | 24 |
| Objetivos particulares..... | 24 |
| Diseño experimental..... | 25 |
| Material y métodos..... | 25 |
| Plásmidos recombinantes..... | 25 |
| Extracción del ADN plasmídico por <i>miniprep</i> | 25 |
| Purificación de ADN plasmídico por Melton Prep (<i>Maxiprep</i>)..... | 26 |
| Linearización del plásmido con inserto..... | 27 |
| Síntesis de transcritos..... | 28 |

| | |
|---|----|
| Reacción de traducción <i>in vitro</i> | 29 |
| Cuantificación de la radioactividad incorporada a la proteína..... | 30 |
| <i>UV-crosslink</i> de ARN y los factores de inicio de la traducción..... | 30 |
| Marcaje de oligonucleótido con $\gamma[^{32}\text{P}]$ | 31 |
| <i>Selective 2'-Hydroxyl Acylation and Primer Extension (SHAPE)</i> | 32 |
| Obtención de la secuencia del IRES <i>Hsp101</i> de maíz..... | 33 |
| Preparación del gel de secuenciación..... | 34 |
| Obtención de la estructura secundaria del IRES <i>Hsp101</i> de maíz predicha con el software mFOLD y los resultados del ataque del NMIA..... | 34 |
| Modificación de la estructura secundaria del IRES <i>Hsp101</i> de maíz predicha con el software mFOLD y los resultados del ataque del NMIA..... | 36 |
| Identificación del sitio de inicio de la traducción de <i>Hsp101</i> de maíz (<i>Toeprint</i>)..... | 37 |
| Resultados..... | 38 |
| Estructura secundaria del IRES <i>Hsp101</i> de maíz obtenida experimentalmente por el método SHAPE..... | 38 |
| El IRES <i>Hsp101</i> de maíz tiene un único sitio de inicio de la traducción (<i>toeprint</i>)..... | 51 |
| Al IRES <i>Hsp101</i> de maíz se le unen un péptido de ~50 KDa y uno de ~75 KDa..... | 54 |
| Aislamiento de las proteínas de lisado de reticulocito de conejo unidas al IRES <i>Hsp101</i> de maíz en condiciones dependiente de <i>cap</i> | 56 |
| Aislamiento de las proteínas de lisado de reticulocito de conejo unidas al IRES <i>Hsp101</i> de maíz en condiciones independientes de <i>cap</i> | 58 |
| La proteína HSP90 forma parte del complejo traduccional activo del IRES <i>Hsp101</i> de maíz..... | 60 |
| Si se inhibe la proteína HSP90 no se lleva a cabo el inicio de la traducción por el IRES <i>Hsp101</i> de maíz..... | 61 |

| | |
|--|----|
| El IRES <i>Hsp101</i> de maíz tiene preferencia por el eIFiso4G sobre eIF4G..... | 64 |
| Similitud entre secuencias 5'UTR de distintas <i>Hsp101</i> de Gramíneas..... | 66 |
| Discusión..... | 69 |
| Conclusiones..... | 74 |
| Perspectivas..... | 75 |
| Bibliografía..... | 76 |
| Apéndices..... | 83 |
| Apéndice I: Mapa del vector de clonación <i>pGEM-T Easy</i> | 83 |
| Apéndice II: Péptidos identificados en las bandas de ~75 KDa y ~50 KDa..... | 84 |
| Apéndice III: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de distintas HSP90..... | 85 |
| Apéndice IV: Análisis ANOVA de la traducción dirigida por el IRES <i>Hsp101</i> de maíz en el sistema WGE incorporando eIF4G y/o eIFiso4G... | 87 |
| Artículo: Functional and Structural Analysis of Maize Hsp101 IRES..... | 89 |

DEDICATORIAS

A mis padres (SAMUEL Y TERESA), por el apoyo que me han brindado a lo largo de mi vida, en lo académico, en lo laboral y en lo personal, son las personas que me han acompañado al final de este proyecto y sé que cuento con ustedes para lo que vendrá. Gracias a ustedes soy una mejor persona.

A EDUARDO LÓPEZ, por ser el mejor regalo que me ha dado la vida, porque en cada momento estas para mí. Te Amo.

A NOÉ, WENDY, ALEXIS, JENIFER Y DAVID, esa bella familia que han llenado mis días de alegrías y por el gran amor que les tengo.

Sabiduría ante todo; adquiere sabiduría;
Y sobre todas tus posesiones adquiere inteligencia.
Engrandécela y ella te engrandecerá;
Ella te honrará, cuando tú la hayas abrazado.
Adorno de gracia dará a tu cabeza;
Corona de hermosura te entregara.

Proverbios 4: 7-9

AGRADECIMIENTOS

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

Agradezco a la Dra. Estela Sánchez de Jiménez por su asesoría durante la realización del proyecto, porque gracias a su experiencia y calidad humana me ha permitido un desarrollo profesional, académico y personal. La culminación de este proyecto y lo eh logrado gracias a su apoyo.

Agradezco al comité tutorial por sus consejos, opiniones y el apoyo que brindaron durante la realización de este proyecto, el cual estuvo formado por:

Dr. José Luis Reyes Taboada Instituto de Biotecnología, UNAM.

Dr. León Patricio Martínez Castilla Facultad de Química, UNAM.

Agradezco a la Dra. Encarnación Martínez Salas, la Dra. Noemí Fernández y a su grupo de investigación, por el buen recibimiento durante la estancia corta en el Instituto Severo Ochoa de la Universidad Autónoma de Madrid.

Agradezco a los revisores, por sus consejos, opiniones y el apoyo que brindaron para enriquecer este trabajo.

Dr. Jorge Nieto Sotelo Instituto de Biología, UNAM.

Dra. Blanca Haydé Ruiz Ordaz Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Dra. Xóchitl Pérez Martínez Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Dr. Greco Hernández Ramírez Instituto Nacional de Cancerología.

Dr. Felipe Cruz García Facultad de Química, UNAM.

A todos los compañeros del Laboratorio 103, por hacer todo este tiempo más ameno, por todas las bellas amistades que se formaron en este laboratorio.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio 103 del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas de la Facultad de Química, UNAM, Bajo la tutoría de la Dra. Estela Sánchez Quintanar, el proyecto fue financiado por la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA), UNAM, IN212910. El autor recibió beca de Doctorado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) 173696.

La estancia de investigación en el laboratorio de la Dra. Encarnación Martínez Salas del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa de la Universidad Autónoma de Madrid, se llevó a cabo con financiamiento del Programa de Apoyo para Estudios de Posgrado (PAEP).

ABREVIATURAS

| | |
|--------|--|
| 3'UTR | 3'no traducible |
| 4EBP | Proteína de unión a eIF4E |
| 5'UTR | 5'no traducible |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ARNm | Ácido ribonucleico mensajero |
| ADN | Ácido desoxinucleico |
| CAT | Cloranfenicol acetil transferasa |
| DEPC | Dietil pirocarbonato |
| DMSO | Dimetilsulfoxido |
| eIF | Factor de inicio de la traducción eucarionte |
| GMPPDP | Guanilil Imidodifosfato |
| HSP101 | Proteína de choque térmico de 101 KDa |
| Met | Metionina iniciadora |
| IRES | Sitio interno de entrada al ribosoma |
| ITAF | Factor IRES que actúa en <i>trans</i> |
| LUC | Luciferasa de luciérnaga |
| NMIA | N-metil isotoico anhidro |
| PABP | Proteína de unión a la cola de Poli(A) |
| RNPm | Ribonucleoproteina mensajera |
| RRL | Lisado de reticulocito de conejo |
| SHAPE | <i>Selective 2'Hydroxyl Acylation and Primer Extension</i> |
| WGE | Extracto de germen de trigo |

ABSTRACT

The protein synthesis (translation) is a highly controlled process, in which the canonical route depends on the recognition of the translational machinery of the *cap* structure in the 5'UTR (UnTranslated Region) of the messenger RNA. When the cell is in stress, the *cap* dependent translation can be inhibited. Nevertheless, cells need that different elements act and allow them to assure their survival during the above mentioned situation. This study evaluated the elements that take part in the formation of the active translation complex of the IRES (Internal Ribosome Entry Site), in the 5'UTR of the mRNA that codifies the heat shock protein of 101 KDa of maize named HSP101. The IRES *Hsp101* initiates the translation of the above mentioned protein in heat stress conditions, when the general protein synthesis has been inhibited. In this study we came to the conclusion that from the RNA's secondary structure of the IRES *Hsp101* of maize, depends the recognition of the elements that constitute the active translational complex, such as the translation initiation factors (eIFs), IRES trans-acting factors (ITAFs) or the ribosomal subunit 40S. This paper reports the first secondary structure of an IRES of plants. In addition, there was identified the selectivity of the translation factor eIFiso4G on eIF4G in translations made with the maize's IRES *Hsp101*, and it was found that there is a difference in the translational efficiency up to 50% more with the eIFiso4G factor. Also there was identified the importance of the molecular chaperone HSP90, since, by adding inhibitors of this protein to the translational system, the *Hsp101* IRES-directed translation of maize was inhibited, corroborating the importance of this protein in the formation of the active translational complex. Finally, it was identified, in an alignment of several 5' UTRs sequences from several gramineas, possible preserved motives that could take part in the recognition of some elements that take part in the formation of the active translational complex of *Hsp101* of maize.

RESUMEN

La síntesis de proteínas (traducción) es un proceso altamente regulado, en el cual la vía canónica depende del reconocimiento de la maquinaria traduccional a la estructura *cap* presente en el extremo 5'UTR (*UnTranslated Region*) del ARN mensajero. Cuando la célula se encuentra en situación de estrés, la traducción dependiente de *cap* puede ser inhibida. Sin embargo, las células requieren que distintos elementos actúen y le permitan asegurar su supervivencia durante dicha situación. En este trabajo se evaluaron los elementos que participan en la formación del complejo de traducción activo del IRES (*Internal Ribosome Entry Site*), presente en el extremo 5'UTR del ARNm que codifica la proteína de choque térmico de maíz de 101 KDa denominada HSP101. El IRES *Hsp101* inicia la traducción de dicha proteína en condiciones de estrés de calor, cuando la síntesis general de proteínas es inhibida. En este trabajo se dedujo la estructura secundaria del ARN del IRES *Hsp101* de maíz, de la cual depende el reconocimiento de elementos que forman el complejo traduccional activo, tales como los factores de traducción (eIFs), los factores IRES que actúan en *trans* (ITAFs) o bien la subunidad ribosomal 40S. Este trabajo reporta la primera estructura secundaria de un IRES de plantas. Además, se identificó la selectividad del factor de traducción eIFiso4G sobre eIF4G en traducciones realizadas con el IRES *Hsp101* de maíz, encontrándose que existe una diferencia en su eficiencia traduccional hasta en un 50% mayor con el factor eIFiso4G. También se identificó la importancia de la chaperona molecular HSP90, ya que, al agregar al sistema traduccional inhibidores de esta proteína, la traducción dirigida por el IRES *Hsp101* de maíz fue inhibida, corroborando la importancia de esta proteína en la formación del complejo traduccional activo. Por último, se identificaron, en un alineamiento de varias secuencias 5'UTRs pertenecientes a varias gramíneas, posibles motivos conservados que puedan participar en el reconocimiento de algún elemento que participe en la formación del complejo traduccional activo de *Hsp101* de maíz.

INTRODUCCIÓN

SÍNTESIS DE PROTEÍNAS DEPENDIENTE DE CAP

La síntesis de proteínas (traducción) es el proceso biológico mediante el cual, la información contenida en una molécula de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) es traducida en una molécula de proteína. Este proceso consta de 4 fases: la iniciación, la elongación de la cadena peptídica, la fase de terminación y el reciclamiento ribosomal (Sonenberg y Hinnebush, 2009).

La regulación de la traducción y la frecuencia con la que los ARN mensajeros son traducidos, juegan un papel crítico en muchos procesos biológicos fundamentales, entre los que se incluyen el crecimiento celular, el desarrollo y las respuestas a las señales biológicas o estrés ambiental. Es así que dos transcritos que estén presentes en el citoplasma en idénticas cantidades, pueden ser traducidos con diferentes eficiencias produciendo cantidades diferentes de la respectiva proteína codificada (Mathews *et al.*, 2000). Este fenómeno es debido, en parte, a que el ribosoma, estructura en donde se realiza la síntesis de la proteína, se une al ARNm por interacción con los eIFs. El inicio de la síntesis de las proteínas en organismos eucariontes es un proceso complejo, que requiere de la acción concertada de numerosas proteínas accesorias llamadas factores de inicio de la traducción eucarionte (eIFs). Estos factores están involucrados en el reclutamiento de la subunidad ribosomal 40S al ARNm (Hershey y Merrick, 2000). El reclutamiento se refiere a la fase de iniciación de la traducción y se define como el proceso en el que un iniciador especial, el ácido ribonucleico de transferencia, unido a la metionina iniciadora ($\text{met-tRNA}^{\text{met}}$), se une al sitio P (peptidil) del ribosoma, localizado en el codón de inicio correcto del ARNm por traducir (Hershey y Merrick, 2000; Sonenberg y Hinnebush, 2009).

En los organismos eucariontes el inicio de la traducción se lleva a cabo en 8 pasos. Paso 1: Se unen eIF3 y eIF1A a la subunidad ribosomal 40S, bloqueando la

unión entre las subunidades ribosomales 40S y 60S (en ausencia del complejo ternario eIF2-GTP-tRNA^{i^{met}}), además de esta manera se proporciona un andamio sobre el cual se puede formar el complejo de iniciación (Figura 1) (Komar y Hatzoglou, 2012; Komar *et al.*, 2012). En mamíferos eIF3 es un complejo formado por 13 subunidades proteicas diferentes (a - m), de las cuales las subunidades a - e son necesarias para formar el núcleo del complejo (Sonenberg y Hinnebush, 2009; Jackson *et al.*, 2010, Komar *et al.*, 2012).

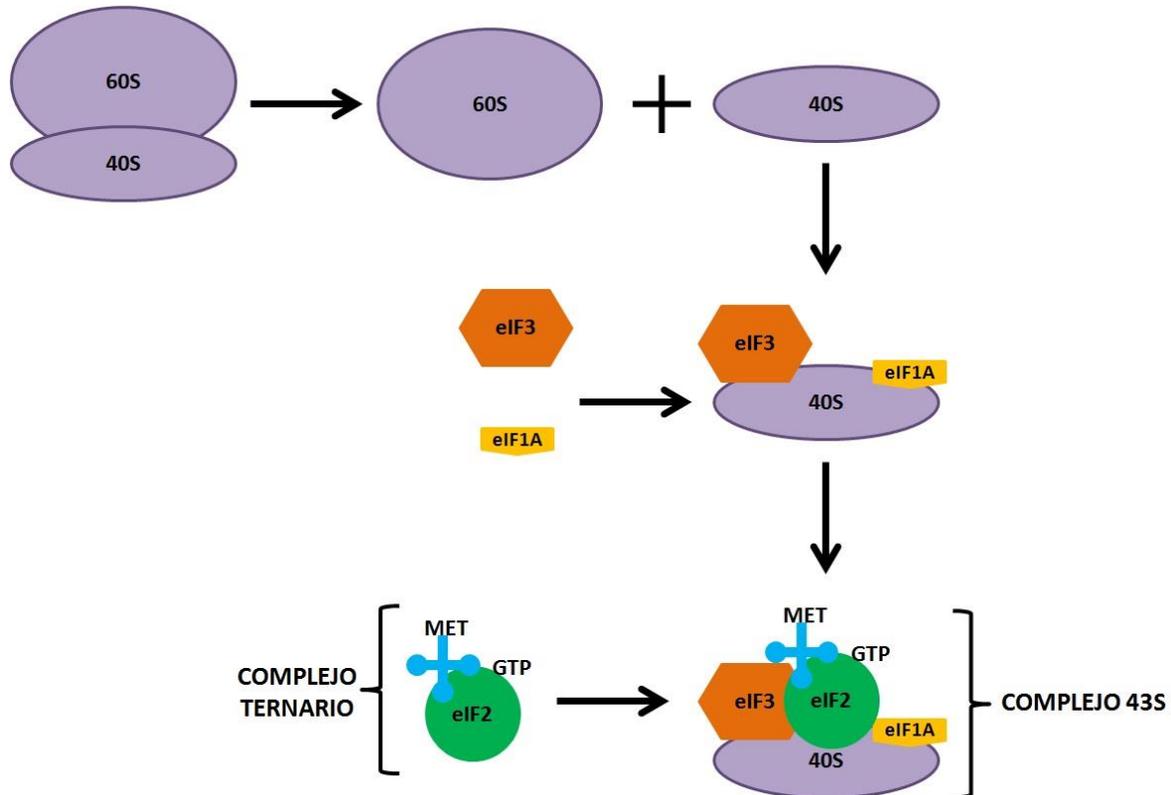


Figura 1: En la formación del complejo 43S, primero se separan las subunidades ribosomales 60S y 40S. Posteriormente se unen los factores eIF3 y eIF1A a la subunidad ribosomal 40S y por último a esta subunidad ribosomal se le une el complejo ternario formado por el factor eIF2 el cual está unido a una molécula de GTP y el primer tARN^{i^{met}}.

Paso 2: Se une el complejo ternario de eIF2-GTP-tRNA^{i^{met}} a la subunidad ribosomal 40S para formar el complejo 43S (Komar *et al.*, 2012) proporcionando la primera metionina iniciadora (Figura 1).

Paso 3: Se unen eIF4F (eIF4A, eIF4G y eIF4E) y eIF4B a la RNPm por una activación dependiente de ATP, y generalmente se remueven proteínas o estructuras secundarias del extremo 5' del ARNm (Komar y Hatzoglou, 2012; Komar *et al.*, 2012). En este proceso se une eIF4E al m⁷G(5')pppN (donde N puede ser cualquier nucleótido), este nucleótido modificado es conocido como estructura *cap*, siendo una modificación nuclear presente en el extremo terminal 5' de los ARNm (Figura 2) (Komar y Hatzoglou, 2005; Sonenberg y Hinnebush, 2009; Jackson *et al.*, 2010).

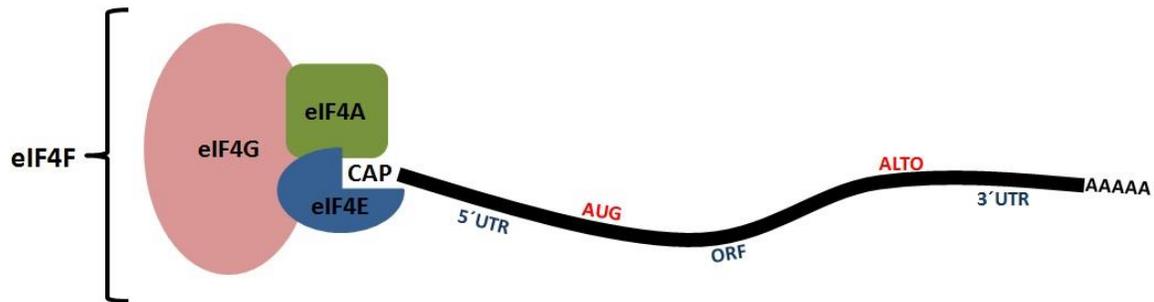


Figura 2: El factor de inicio de la traducción eIF4F se encuentra formado por los factores eIF4A, eIF4G y eIF4E, siendo este último el encargado de unirse a la estructura *cap* que se encuentra en el extremo 5'UTR del ARNm.

De las proteínas que conforman el complejo eIF4F, eIF4E es la proteína que se une directamente a la estructura *cap*, por lo que es fundamental para el inicio de la traducción dependiente de *cap*. El factor eIF4A tiene 2 funciones, la de ATPasa y la de RNA helicasa dependiente de ATP. Gracias a esta última se facilita el movimiento del ribosoma a lo largo del ARN mensajero, ya que se deshacen las estructuras secundarias de la región 5' no traducible (5'UTR) del ARNm que puedan detener al ribosoma en este proceso. La actividad de esta helicasa aumenta por la asociación de los factores eIF4B y eIF4H ya que estos realizan la hidrólisis del ATP a ADP proporcionando energía a la helicasa eIF4A (Komar y Hatzoglou, 2012; Komar *et al.*, 2012).

En mamíferos y *Drosophila* la disponibilidad del factor eIF4E y su unión con el factor eIF4G, es regulada por proteínas que se unen a eIF4E, denominadas 4E-

BPs (*4E-Binding Proteins*) las cuales, cuando se encuentran desfosforiladas, se unen a eIF4E e impiden que eIF4E se pueda unir a eIF4G (Richter y Sonenberg, 2005; Sonenberg y Hinnebusch, 2009). Sin embargo, en plantas aún no se han identificado proteínas que *in vivo* se unan a eIF4E.

Paso 4: Se unen el ARNm activado a la subunidad 43S. La formación del complejo ribosomal 48S se realiza por la unión de eIF3 y eIF4G, este factor sirve como proteína de andamio, tiene sitios de unión para eIF3 (Figura 3), eIF4E, eIF4A y la PABP (proteína que se une al poli-(A)) del extremo 3' del (Figura 3) (LeFebvre *et al.*, 2006; Masutani *et al.*, 2007; Komar y Hatzoglou, 2012; Komar *et al.*, 2012).

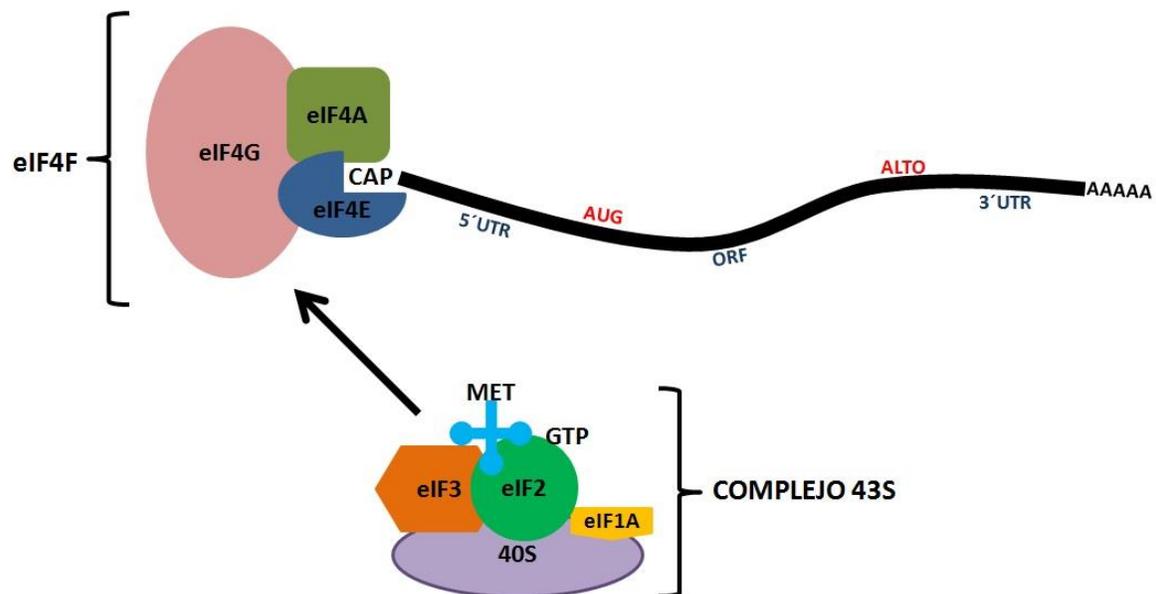


Figura 3: El complejo 48S, es formado por la interacción entre el factor eIF4G, que se encuentra formando el factor eIF4F unido al ARNm, y el factor eIF3 que se encuentra formando parte del complejo 43S.

La mayoría de los ARNm eucariontes, con la notable excepción de los ARNm de las histonas, poseen una cola de poli-(A) en el extremo 3', la cual tiene distintos tamaños, que van de los 50 a los 300 adeninas de largo. A esta cola de poli-(A) se le une la PABP, la cual interacciona con el factor eIF4G, provocando una circularización de los ARNm unidos al ribosoma (Figura 4). El puente formado entre eIF4G-PABPs une indirectamente a las regiones 5' y 3' del ARNm. La circularización del ARNm aumenta la eficiencia de la traducción mediante el

reciclamiento de los ribosomas (Kahvejian *et al.*, 2001; Sonenberg y Hinnebush, 2009; Komar y Hatzoglou, 2012).

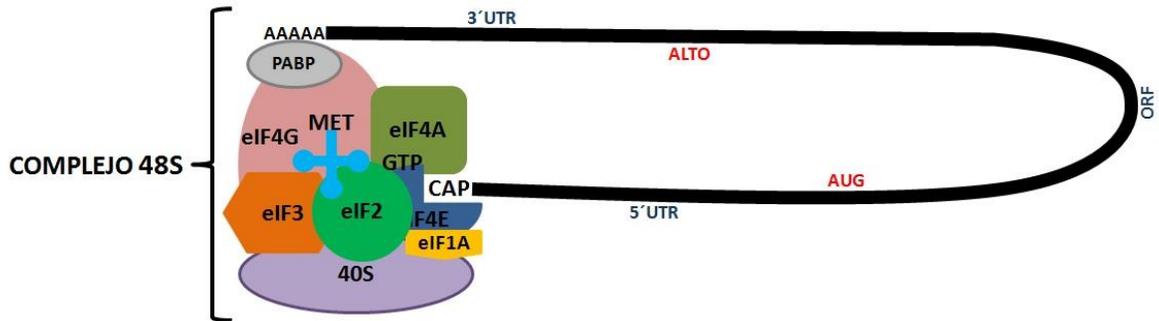


Figura 4: La circularización del ARNm se realiza por la unión de la cola de poli-(A) con la PABP, que se encuentra unida a eIF4G.

Paso 5: Escaneo del ARNm para identificar el codón de iniciación AUG. El complejo 48S lleva a cabo un barrido ribosomal sobre el ARNm en dirección 5' a 3' hasta localizar el codón de inicio con la ayuda de eIF1 y eIF1A reconociendo el codón de inicio (AUG), ayudado por el anticodón del tRNA^{i^{met}}, de esta forma se coloca en marco abierto de lectura (ORF) (Figura 5) (Pestova *et al.*, 2000; Komar *et al.*, 2012).

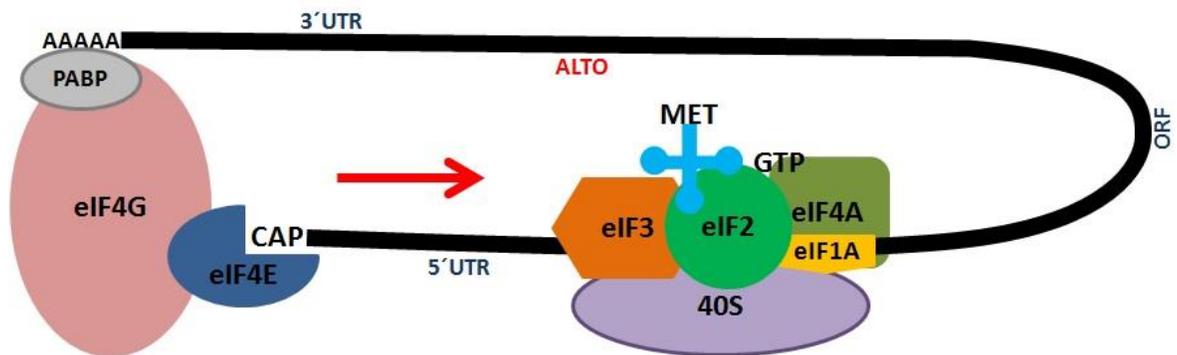


Figura 5: Durante el barrido o escaneo que realiza el ribosoma en el ARNm en dirección 5' a 3', se requiere de la actividad de RNA helicasa del factor eIF4A, para deshacer las estructuras que puedan formarse en el ARNm hasta localizar el codón de inicio AUG.

Paso 6: La unión de eIF5B provoca la hidrólisis de GTP en el complejo ternario, una vez que se ha localizado el codón de inicio (Komar *et al.*, 2012),

formando eIF2-GDP + Pi. Con la energía liberada se separan todos los factores de inicio de la traducción, quedando el tARN^{i^{met}} en el sitio P (peptidil) de la subunidad ribosomal 40S. Finalmente, el factor eIF5 media la unión de la subunidad ribosomal 40S a la subunidad ribosomal 60S para que se forme el complejo traduccional 80S activo (Figura 6), el cual inicia la traducción secuencial de los codones del ARNm elongando la proteína (Pestova *et al.*, 2000; Komar *et al.*, 2012).

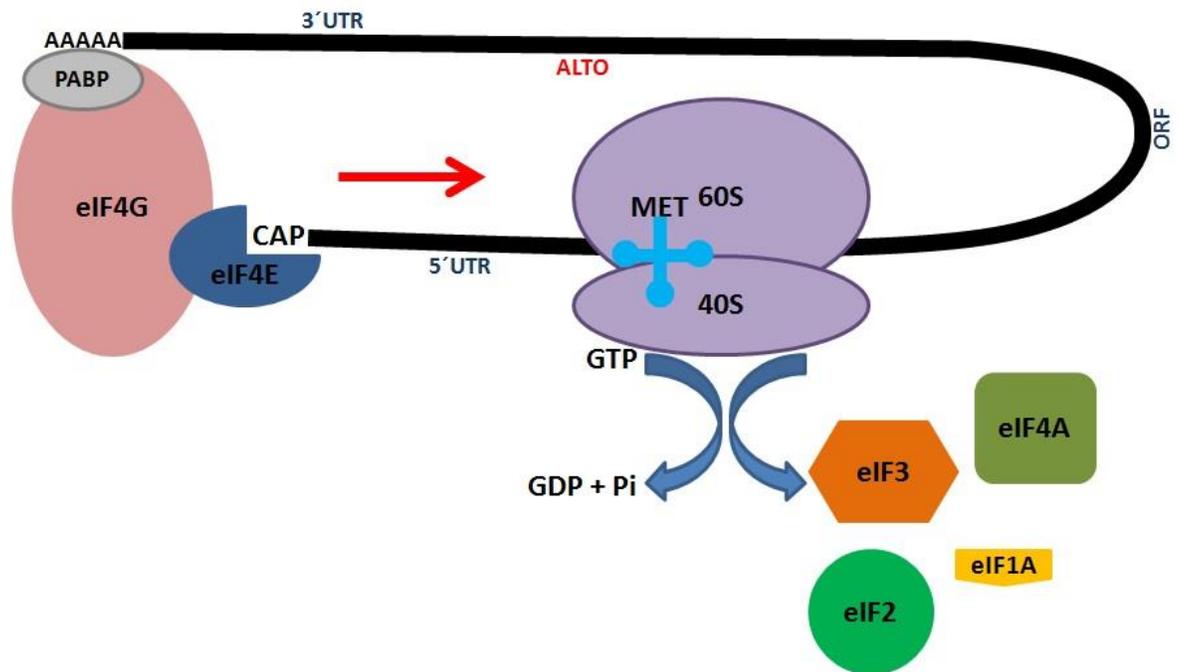


Figura 6: Cuando se identifica el codón AUG se realiza la hidrólisis de la molécula de GTP a GDP + Pi. La energía liberada provoca la liberación de los factores de inicio de la traducción permitiendo que la subunidad ribosomal 60S se una a la subunidad ribosomal 40S para formar el complejo ribosomal 80S.

Paso 7: Reciclamiento del complejo eIF2-GDP a eIF2-GTP (Komar *et al.*, 2012). El complejo inactivo eIF2-GDP se recicla para volver a formar al eIF2-GTP por medio del factor eIF2B, que realiza el intercambio de GDP a GTP.

Paso 8: Reensamblaje de eIF4F con eIF4A, eIF4E y eIF4G con los factores liberados durante el proceso de iniciación (Komar *et al.*, 2012).

SÍNTESIS DE PROTEINAS INDEPENDIENTE DE CAP Y DEPENDIENTE DE IRES

En 1988 se descubrió que la traducción del ARNm de los virus de la polio (PV) y de la encefalomiocarditis (EMCV) no siguen el mecanismo canónico de inicio de la traducción dependiente de *cap*, ya que no poseen esta estructura en su extremo final 5', sino que su traducción está mediada por una estructura de ARN que permite el ensamble de la maquinaria traduccional en una posición cercana o directamente sobre el codón de inicio del ARNm. A esta región del ARNm se le llamó "*Internal Ribosome Entry Site*" (IRES) o sitio interno de entrada para el ribosoma (Pelletier y Sonenberg, 1988; Jang *et al.*, 1988). Hoy se reconoce que los IRES constituyen un mecanismo alternativo para el inicio de la traducción, reclutando a la maquinaria traduccional de manera interna en el ARNm (Figura 7), cercana al codón de inicio con la ayuda de factores que reconocen al IRES que actúan en *trans* (ITAFs). Se ha propuesto que los ITAFs estabilizan la conformación estructural y/o sirven como puentes estructurales entre el IRES y el ribosoma (Jackson, 2000; Spriggs *et al.*, 2005; Chamond *et al.*, 2014). El descubrimiento de este mecanismo amplió la idea de los mecanismos que pueden ocurrir en la traducción de los ARNm.

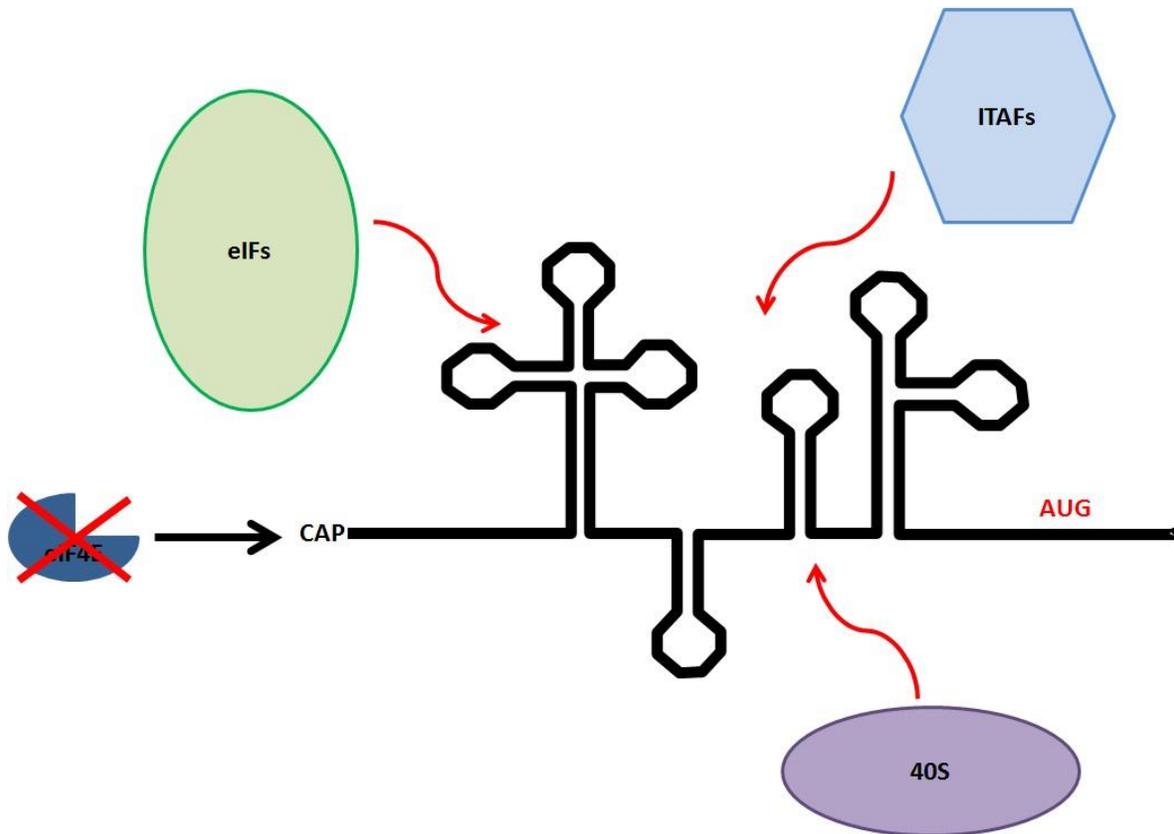


Figura 7: Esquema de la traducción dependiente de IRES. Cuando los factores de inicio de la traducción no se pueden unir al ARNm por medio de la estructura *cap*, para el reclutamiento del ribosoma, los eIFs, ITAFs o la subunidad ribosomal 40S, se pueden unir a regiones internas del ARNm del IRES de los ARNm que los contienen.

La traducción dependiente de IRES no requiere de la estructura *cap* del ARNm ni de su reconocimiento por el factor eIF4E. Las secuencias de los IRES no tienen un grado de similitud que ayude a reconocer motivos conservados que permita identificar sus secuencias funcionales. Sin embargo, se ha descubierto que algunos IRES virales poseen secuencias pequeñas (~6 nts) o repeticiones de ellas que actúan como motivos conservados, los cuales son expuestos a los componentes de la maquinaria traduccional interactuando con ellos (Hellen y Sarnow, 2001; Stoneley y Willis, 2004; Cobbold *et al.*, 2008). Los IRES poseen estructuras secundarias y terciarias específicas que interactúan con los componentes de la maquinaria traduccional, así como con factores del inicio de la traducción e ITAFs, que atraen a los ribosomas para llevar a cabo el inicio de la

traducción de manera independiente de *cap* (Hellen y Sarnow, 2001; Stoneley y Willis, 2004; Cobbold *et al.*, 2008; Semler y Waterman, 2008; Komar y Hatzoglou, 2012). Por otro lado, en la mosca *D. melanogaster* y en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se ha descubierto que hay IRES ricos en A y U (Hernández *et al.*, 2004, Hernández 2008).

Este mecanismo independiente de *cap* se ha encontrado en algunos ARNm virales y también en algunos ARNm celulares, en los cuales el inicio de la traducción es generalmente dependiente del reconocimiento de la estructura secundaria formada en la región 5' UTR del ARNm, que es la encargada de reclutar a la subunidad ribosomal 40S hacia una región cercana al codón de inicio (Hellen y Sarnow, 2001; Stoneley y Willis, 2004; Firth y Brierley, 2012), sin embargo, existen reportes de IRES pobremente estructurados (Xia y Holcik, 2009).

El inicio de la traducción mediado por los IRES es estrictamente dependiente de la integridad de la estructura formada por su secuencia nucleotídica (Figura 8). Deleciones o inserciones e incluso una sustitución en la cadena de nucleótidos en el elemento IRES, pueden reducir severamente su actividad para iniciar la traducción (Martínez-Salas *et al.*, 2002; Fernández-Miragall y Martínez-Salas, 2003; King *et al.*, 2010; Komar y Hatzoglou, 2012; Sweeney *et al.*, 2014).

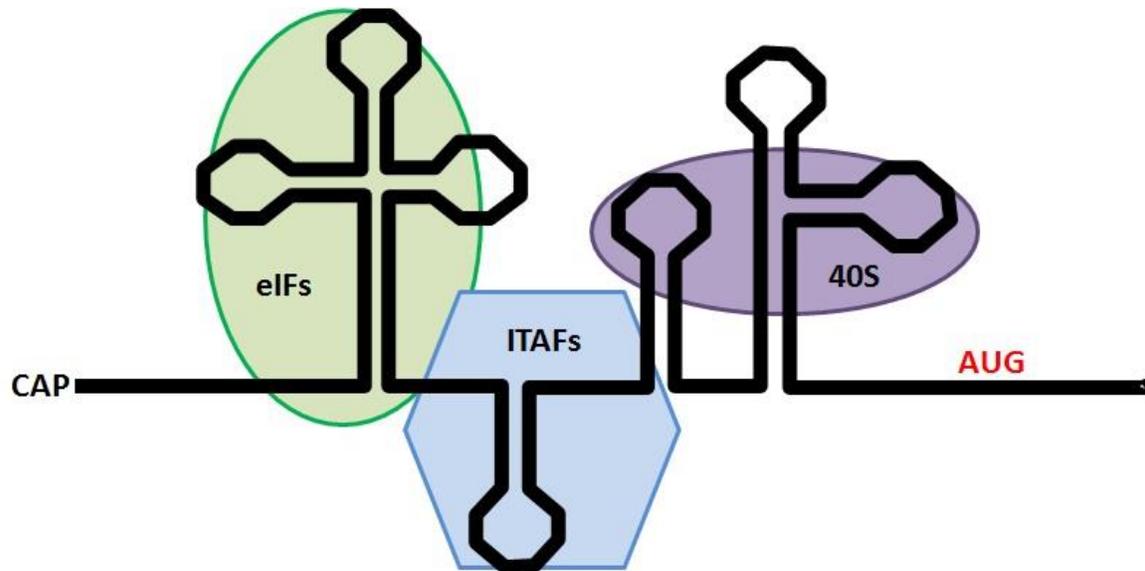


Figura 8: Los factores de inicio de la traducción, ITAFs o la subunidad ribosomal 40S, se unen a la estructura secundaria formada por los IRES en una posición cercana o directamente sobre el codón AUG, siendo este reconocimiento dependiente de la estructura secundaria de los IRES.

Los IRES presentes en ARNm celulares son activados por estímulos fisiológicos bajo condiciones de estrés que incluyen, entre otros, la hipoxia, las lesiones vasculares, la limitación del suero, la radiación gamma, así como los factores que inducen a la apoptosis, la interrupción del crecimiento, la angiogénesis, el estrés por calor (Wang y Jan, 2014), o por infecciones virales (Martínez-Salas *et al.*, 2001; Walsh y Mohr, 2011; Wang y Jan, 2014). En todas estas condiciones generalmente se encuentra inhibida la traducción dependiente de *cap*. También se ha propuesto que los IRES son una reliquia evolutiva (Hernández, 2008).

Los ARNm que contienen IRES generalmente codifican variedades de proteínas como factores de inicio de la traducción, factores de transcripción, factores de crecimiento, genes homeóticos y proteínas de supervivencia que son funcionales bajo situaciones de estrés (Martínez-Salas *et al.*, 2001; Dinkova *et al.*, 2005; Graber y Holcik, 2007; Martínez-Salas, *et al.* 2012), proporcionando una ventaja a los organismos que contienen IRES, ya que en estas condiciones se traducen preferencialmente proteínas que son esenciales para la adaptación y/o la supervivencia de las células que los contienen (Graber y Holcik, 2007).

ELEMENTOS IRES EN ARN VIRALES

Actualmente se conoce que los ARNm virales, al infectar las células de un organismo, tienen dos problemas principales para propagarse: 1) la competencia por la maquinaria traduccional con los ARNm celulares del organismo infectado y 2) la regulación traduccional de la célula hospedera que se ve alterada. Los virus que poseen un IRES en su región 5'UTR evitan la necesidad del reclutamiento de la maquinaria traduccional por el *cap* y compiten por el reclutamiento del ribosoma en un sitio cercano al codón de inicio de la traducción sin el escaneo ribosomal requerido en el extremo 5' por los ARNm celulares. Algunas de las diferencias que existen entre los IRES de los ARNm virales que infectan animales y los ARNm virales que infectan plantas, son que los IRES de los ARNs virales de animales son de tamaños generalmente largos de 200 a 500 nts, se encuentran altamente estructurados y están localizados en el extremo 5'UTR de los ARNm virales. Por contraste, los IRES de los ARNm virales que infectan plantas son de tamaños pequeños de 150 a 300 nts, son menos estructurados y generalmente se encuentran localizados en el extremo 5'UTR (Komar y Hatzoglou, 2005; Komar *et al.*, 2012).

Los IRES virales y celulares de manera general pueden ser agrupados en 2 grandes grupos, basándose en la localización del IRES en el ARN mensajero. En el primer grupo, los IRES que se localizan en la región 5'UTR de los ARNm virales que contienen un único marco abierto de lectura y por lo cual producen una única poliproteína. En el segundo grupo, los IRES que se localizan en una región interna o intragénica de los ARNm virales que poseen más de un marco de lectura abierto y por lo tanto producen más de una proteína (Komar y Hatzoglou, 2005).

VIRUS QUE POSEEN ACTIVIDAD IRES EN LA REGIÓN 5'UTR

Existen diferentes tipos de IRES que se localizan en la región 5'UTR. A continuación, se dan algunos ejemplos de los virus de este tipo más estudiados.

Los ARNs de la familia de los *Potyviridae* se caracterizan por poseer una proteína viral unida a su genoma (VPg) en el extremo 5´ y una cola de poli-(A). Son genomas sencillos de cadena positiva, que poseen un único codón de inicio AUG río arriba y codifican una poliproteína que es posteriormente procesada por una proteasa codificada por el virus. Su extremo 5´UTR mide ~150 nts y es poco estructurado.

La traducción independiente de *cap* en el *Tobacco etch potyvirus* (TEV) es dirigida por su secuencia 5´UTR, la cual mide 143 nts, además de que el TEV en su extremo 3´UTR posee una cola de poli-(A), la cual aumenta la eficiencia traduccional del ARNm de este virus. El virus TEV posee una secuencia cercana al extremo 5´ de los nucleótidos 38 al 75 que se puede plegar formando una estructura de pseudonudo llamado pK1. Dentro de esta estructura se encuentra la burbuja L3 (*Loop 3*), la cual es complementaria a los nucleótidos 1117 – 1123 del ARN ribosomal 18S. Cuando se realizan mutaciones en esta región, la eficiencia traduccional del virus se reduce sustancialmente, indicando la importancia de esta región para la traducción del virus, ya que las interacciones con esa secuencia aumentan la eficiencia traduccional, al facilitar el reclutamiento de la subunidad ribosomal 40S por la complementariedad de bases del ARN viral con el del ribosoma. Cuando la región 5´UTR de TEV es insertada en una región intergénica de construcciones de reporteros bicistrónicos, se facilita la traducción del segundo reportero, sugiriendo que TEV posee una actividad IRES en su región 5´UTR (Gallie, 2001).

Otro ejemplo es el *Potato virus Y* (PVY), este virus posee 55 nucleótidos en el extremo final 3´ de su región 5´UTR los cuales son muy importantes para la traducción independiente de *cap* en protoplastos de tabaco, ya que cuando su región 5´UTR es colocada en un vector bicistrónico estimula la traducción del marco abierto de lectura río abajo, demostrando que posee una actividad de IRES (Yan *et al.*, 1997).

Como los potivirus no poseen una estructura *cap* en el extremo 5'UTR, en su lugar poseen la proteína VPg que actúa como un homólogo de dicha estructura reclutando los factores eIF4E y eIFiso4E, formando en algunos potivirus el complejo traduccional por medio de esta proteína. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la secuencia 5'UTR se requiere para poder iniciar la traducción independiente de *cap* por lo cual la proteína VPg también podría estar participando como un competidor del *cap* de los ARNm del hospedero e inhibir la traducción de éstas (Thivierge *et al.*, 2005).

VIRUS QUE POSEEN ACTIVIDAD IRES EN LA REGIÓN INTERGÉNICA

Algunos virus de plantas poseen más de un ORF en su estructura genómica, por lo que la síntesis de sus proteínas se puede llevar a cabo como traducción dependiente de *cap* para el ORF en posición 5' y de manera independiente de *cap* para los ORFs que se encuentren hacia el extremo 3'. El *Tobacco Mosaic Virus* U1 (TMV U1) tiene 4 ORFs, el primer y segundo ORFs que comprenden la replicasa, se traducen de manera dependiente de *cap* por medio de un ARN genómico (gARN), mientras que el tercer y cuarto ORFs río abajo, que codifican la proteína de movimiento (MP) y la proteína de la cápside (CP), son traducidos de manera independiente de *cap* en un ARN subgenómico (sgARN). Los 75 nucleótidos que se encuentran dentro del ARNm bicistrónico I₂ sgARN, donde se encuentran los ORFs de MP y CP, no poseen *cap* en su 5'UTR. Estos 75 nts de la secuencia I₂ sgARN, son llamados IRES^{U1_{MP}} 75. Esta región promueve la traducción de los ORF río abajo en reporteros bicistrónicos, incluso en la presencia de un tallo-asa estable que puede bloquear el escaneo ribosomal (Skulachev *et al.*, 1999).

PREFERENCIA DE IRES EN MENSAJES CELULARES DE PLANTAS

Las plantas, al ser organismos sésiles, se encuentran expuestas a numerosos factores ambientales que afectan su supervivencia. Estos organismos no poseen, la habilidad de poder huir de condiciones ambientales desfavorables,

por esto, las plantas han desarrollado diversos mecanismos que les permiten enfrentar el medio ambiente desfavorable. Una de las primeras respuestas de supervivencia de estos organismos, es inhibir la síntesis general de proteínas, para disminuir su gasto energético y poder sobrevivir las condiciones ambientales adversas. Sin embargo, estos organismos requieren sintetizar distintas proteínas de supervivencia, las cuales les ayudarán a soportar las condiciones ambientales adversas, y a sobrevivir hasta que las condiciones ambientales mejoren (Echevarria-Zomeno *et al.*, 2013).

Durante el estado de estrés térmico, las células de plantas alteran sus niveles de síntesis de proteínas por dos razones principales: la primera, por la eficiencia con la que los mensajes son traducidos, debido al estrés, algunos mensajes son almacenados formando complejos con proteínas. También algunos factores de traducción pueden ser fosforilados inhibiendo su función en la traducción. Además, se ha observado que la función de la estructura *cap* y la cola de poli(A) pierden su función de interacción disminuyendo la traducción del ARNm. La segunda, por la estabilidad del ARNm, ya que algunos mensajes son degradados durante el estado de estrés. La importancia que tiene la traducción independiente de *cap*, la podemos observar en la síntesis de proteínas de choque térmico (HSP), que funcionan como chaperonas moleculares, ayudando al plegamiento correcto de algunas proteínas que proporcionan resistencia al estrés térmico (Gallie *et al.*, 1995).

Para evaluar el efecto del estrés de calor en plantas, a un cultivo de protoplastos de zanahorias se le aplicó un choque de calor, como resultado se observó que hubo un aumento en la transcripción y la traducción de ARNm que codifican proteínas HSPs. Cuando a los protoplastos de zanahoria se les introduce un ARNm monocistrónico formado de *cap-luciferasa-A₅₀* que no codifica para una proteína HSP y se le aplica un choque de calor, se observa que la traducción del reportero luciferasa es inhibida. El ARNm se mantuvo estable ya que no fue alterada la cantidad dentro de los protoplastos. Sin embargo, aunque se mantenga la estabilidad del ARNm que no es *Hsp*, la eficiencia traduccional disminuye debido a

la pérdida de la función de la estructura *cap* y de la cola de poli(A). De esta manera se demuestra la existencia de una ventaja traduccional de los ARNm *Hsp* sobre los ARN que no son *Hsp* (Gallie *et al.*, 1995).

El primer reporte de un IRES en plantas corresponde al encontrado en el ARNm *Hsp101* de maíz que codifica para la proteína de choque térmico de 101 KDa (HSP101). Para ello, la región 5'UTR de *Hsp101* fue insertada dentro de un vector bicistrónico (pBIC), donde el primer cistrón fue cloranfenicol acetil transferasa (CAT) y su inicio de traducción es dependiente de *cap*. El segundo cistrón fue luciferasa de luciérnaga (LUC) y el inicio de su traducción es independiente de *cap* o dependiente del 5'UTR *Hsp101*. Para evaluar el inicio de traducción mediado por el 5'UTR *Hsp101*, el ARNm del vector bicistrónico fue traducido en los sistemas de lisado de reticulocito de conejo (RRL) y extracto de germen de trigo (WGE), ambos en condiciones dependiente e independiente de *cap*. Al traducir el ARNm bicistrónico con el 5'UTR *Hsp101* en condiciones dependiente de *cap* se puede observar que no se altera la producción de los cistrones CAT y LUC. Sin embargo, cuando el ARNm bicistrónico con el 5'UTR *Hsp101* se traduce en condiciones independientes de *cap*, la traducción de CAT es inhibida, indicando que la vía de traducción dependiente de *cap* fue bloqueada. Por el contrario, la traducción de LUC no fue alterada, indicando que la vía de traducción independiente de *cap* se encuentra activada. De esta manera fue demostrado que la región 5'UTR de *Hsp101* de maíz posee actividad IRES. Además, el IRES *Hsp101* no discrimina el origen del sistema de traducción, ya que se puede traducir de manera eficiente en los sistemas animal de RRL y vegetal de WGE, sin importar que el IRES sea originario de maíz (Dinkova *et al.*, 2005).

El segundo IRES reportado en plantas se encontró al observar que en raíces de plántulas de maíz se producen numerosos péptidos anaeróbicos en cantidades basales, que incluyen proteínas requeridas en la glucólisis o en la fermentación etanólica. Estos péptidos aumentan su síntesis en condiciones de estrés, originada por la disminución de los niveles de oxígeno. De esta manera, se identificó el IRES

en el ARN mensajero de la alcohol deshidrogenasa (ADH) de maíz, cuyo ARNm fue probado en un sistema *in vitro* al dirigir la traducción del reportero GUS tanto en el sistema animal de RRL como en el vegetal de WGE (extracto de germen de trigo), comprobando la funcionalidad del IRES del ARNm *adh* al aumentar la eficiencia traduccional del reportero GUS (Mardanova *et al.*, 2008).

El efecto del IRES *adh* de maíz fue probado *in vivo*, realizando construcciones monocistrónicas donde se colocó la secuencia 5'UTR al reportero GUS. Posteriormente estas construcciones fueron infiltradas en células de tabaco para analizar la contribución real del IRES *Adh* de maíz en un sistema *in vivo* al exponer las células transformantes a condiciones de hipoxia. De esta manera el IRES *Adh* de maíz aumentó la traducción de GUS de manera dependiente de IRES, comprobando la funcionalidad del IRES no solamente en experimentos *in vitro*, sino también de manera *in vivo* (Mardanova *et al.* 2008).

ANTECEDENTES

EL IRES *Hsp101* DE MAÍZ REQUIERE LA SECUENCIA COMPLETA 5'UTR PARA SU ÓPTIMO FUNCIONAMIENTO

En nuestro grupo de trabajo se identificó la región mínima funcional del IRES *Hsp101* de maíz, por medio de amplificaciones de regiones específicas del cADN. En la figura 9a, se muestra la secuencia nucleotídica de la región 5'UTR contenida en el cADN de *Hsp101* de maíz, donde las flechas indican el nucleótido de inicio de cada región del IRES *Hsp101* amplificada, así como la nomenclatura utilizada para identificar las construcciones en este trabajo. En la figura 9b, se muestran la representación esquemática de cada fragmento amplificado e insertado entre los mensajes reporteros de cloranfenicol acetil transferasa (CAT) y Luciferasa de luciérnaga (LUC). En la figura 9c, se muestran los productos generados por el primer y segundo cistron (CAT y LUC) con pesos de 21 y 70 KDa respectivamente. Las traducciones fueron llevadas a cabo en el sistema animal de lisado de reticulocitos de conejo (RRL), debido a que este sistema es de muy fácil uso y se ha probado anteriormente con éxito en la traducción de ARNm virales y celulares. Además, no discrimina el ARNm de construcciones pBIC con el IRES *Hsp101* de maíz (Dinkova *et al.*, 2005), Las traducciones se llevaron a cabo en condiciones dependientes de *cap* ó independientes de *cap*. El sistema independiente de *cap* se generó al agregar al sistema de traducción el mensaje de la proteasa Lb para que, al sintetizarse la proteasa, realice un corte al factor eIF4G e inhiba la traducción dependiente de *cap*, bloqueando la traducción del primer cistrón (CAT) y permitiendo la traducción del segundo cistrón (LUC) por la vía dependiente del IRES. En la figura 9d, se muestran la eficiencia traduccional de las construcciones bicistrónicas donde se utilizó como control positivo a pBIC-5, siendo la eficiencia de la construcción *pBIC-Hsp101+1* tres veces mayor al control. Por otra parte, la eficiencia traduccional de las construcciones *pBIC-Hsp101Δ17* y *pBIC-Hsp101Δ50* fueron 4 y 5 veces menores al control pBIC-5 (Jiménez-González, 2009). De esta manera se pudo concluir que el IRES *Hsp101* de maíz requiere de la totalidad de su secuencia, ya que al realizar

un corte de los primeros 17 nucleótidos del extremo 5' el IRES *Hsp101* pierde su función al iniciar la traducción dependiente de IRES en más del 90% en comparación con la secuencia completa *pBIC-Hsp101+1*.

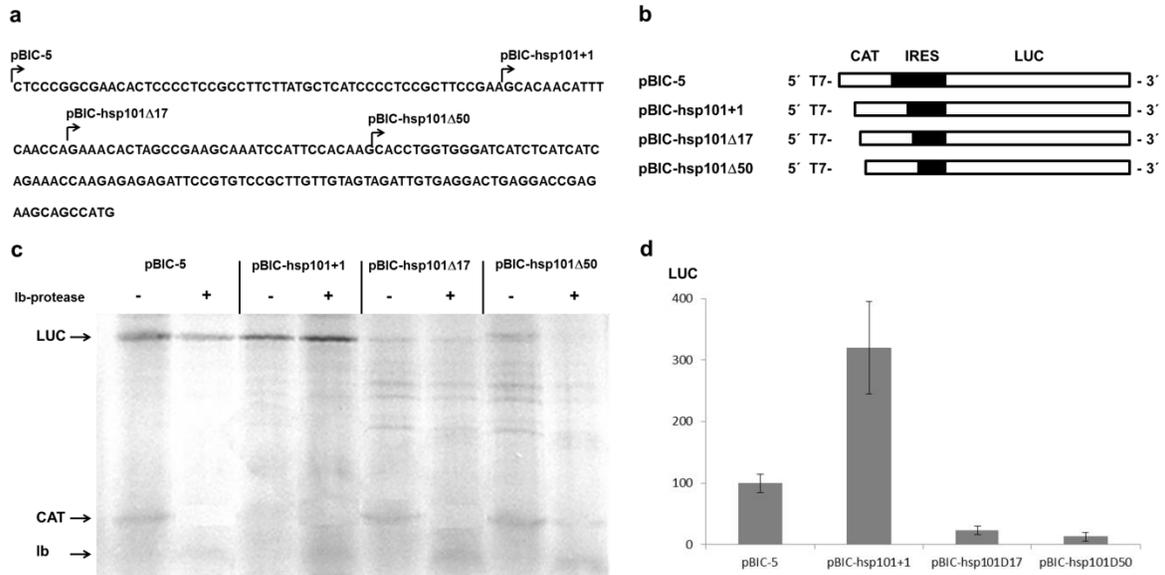


Figura 9: Identificación de la región mínima funcional del IRES *Hsp101* de maíz en el sistema RRL. a, secuencia nucleotídica de la región 5'UTR contenida en el cADN *Hsp101* de maíz. b, representación esquemática de las construcciones bicistrónicas, el plásmido pBIC-5 fue utilizado como control positivo. c, traducción dependiente e independiente de *cap*, en el gel se muestran las bandas correspondientes a la traducción de CAT y LUC en condiciones dependientes de *cap* (Lb proteasa -) e independientes de *cap* (Lb-proteasa +). d, histograma de la eficiencia tradicional de las construcciones bicistrónicas en condiciones independientes de *cap*.

Una vez identificada la región mínima funcional del IRES *Hsp101* de maíz, el siguiente paso fue identificar la estructura secundaria que forma la secuencia nucleotídica de este IRES que pueda interactuar con numerosos factores para formar el complejo traduccional activo.

ESTRUCTURA SECUNDARIA DEL IRES *Hsp101* DE MAÍZ OBTENIDA POR EL PROGRAMA mFOLD

Una manera de obtener la estructura secundaria del IRES *Hsp101* de maíz, es por medio de software informáticos, que predicen la estructura secundaria de las

secuencias nucleotídicas. La secuencia *Hsp101+1* del ARNm que codifica la proteína HSP101 de maíz contiene la región completa 5'UTR de 146 nucleótidos. En la figura 10 se muestra la estructura secundaria que se genera al ingresar la secuencia nucleotídica en el programa mFOLD. La estructura está compuesta por dos tallos intermedios, *Stem 1* y *Stem 2* (S1 y S2), que están flanqueados por las burbujas *Loop 1*, *Loop 2* y *Loop 3* (L1, L2 y L3) y un pequeño tallo-asa, *Stem-Loop 1* (SL1) en el extremo 5' (figura 10). Los nucleótidos se observan en los colores correspondientes a la figura 12.

Después de obtener la estructura secundaria del IRES *Hsp101+1* predicha por un software, se requirió obtener la estructura secundaria experimental.

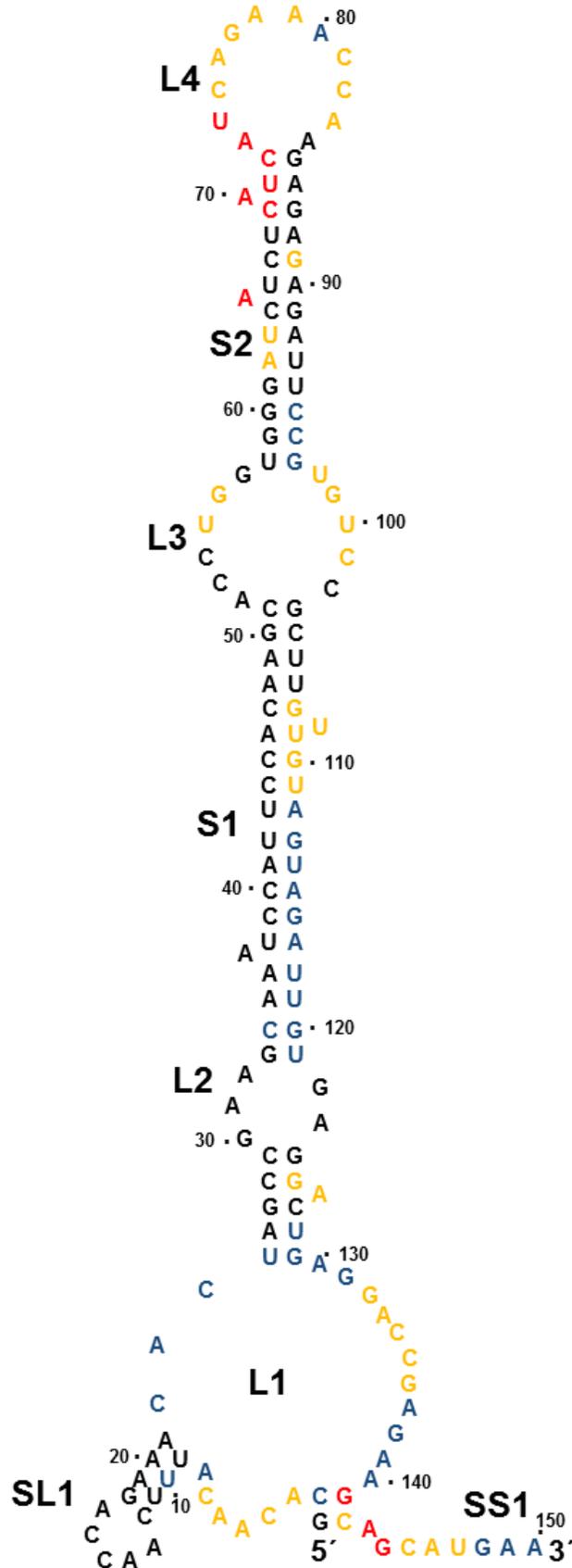


FIGURA 10: Estructura secundaria del IRES *Hsp101* de maíz obtenido con el programa mFOLD. En la estructura secundaria se representan los nucleótidos en colores de acuerdo a los valores obtenidos en el histograma (figura 3b), los nucleótidos de color negro tienen un valor de 0 ya que no fueron atacados por el NMA, los de color azul tienen un valor <20. Los nucleótidos de color amarillo tienen un valor <50 y los nucleótidos de color rojo tienen un valor >50. Modificado de Jiménez-González, 2009.

JUSTIFICACIÓN

Debido a que las plantas son organismos sésiles, se encuentran expuestas a condiciones ambientales adversas que ponen en riesgo su supervivencia, los elementos IRES permiten la traducción de proteínas de supervivencia en condiciones adversas cuando la traducción general es inhibida. En la actualidad se han reportado dos elementos IRES en plantas pertenecientes a los ARNm que codifican las proteínas de choque térmico de 101 KDa (HSP101) y la alcohol deshidrogenasa (ADH), ambas en maíz. La proteína HSP101 es una chaperona molecular que es esencial para la termotolerancia en maíz, aumentando su síntesis durante un estado de estrés de calor. Es de gran importancia investigar la estructura secundaria experimental del IRES *Hsp101* de maíz, ya que ahí se unen los factores que forman el complejo traduccional con el cual se da inicio a la traducción de manera independiente de *cap*. Además, es importante identificar cuáles son los factores proteicos que se unen al IRES *Hsp101* de maíz, como puede ser eIF4G o eIFiso4G, ya que existen reportes previos de su participación en la formación del complejo traduccional de distintos IRES, siendo necesario para el inicio de la traducción de manera independiente de *cap*.

HIPÓTESIS

El IRES *Hsp101* de maíz forma una estructura secundaria específica que interacciona con eIF4G o eIFiso4G para iniciar la traducción del mensaje en condiciones independientes de *cap*.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Definir la estructura secundaria funcional y las proteínas que participan en el mecanismo de inicio de la traducción mediada por el IRES *Hsp101* de maíz.

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar la estructura secundaria funcional del IRES *Hsp101* de maíz.

Identificar a las proteínas del sistema RRL que se unan al IRES *Hsp101* de maíz para formar el complejo traduccional activo en condiciones independientes de *cap*.

Evaluar el efecto de eIF4G y eIFiso4G en la traducción mediada por el IRES *Hsp101* de maíz en condiciones independiente de *cap*.

DISEÑO EXPERIMENTAL

MATERIAL Y MÉTODOS

PLÁSMIDOS RECOMBINANTES

Para llevar a cabo este trabajo se utilizaron las construcciones recombinantes que se encuentran en el plásmido comercial *pGEM-T Easy Vector System* (PROMEGA #cat A1360) las cuales fueron obtenidas en un trabajo anterior (Jiménez-González, 2009), en el plásmido *pGEM-T Easy* fueron insertados fragmentos del IRES *Hsp101* de maíz. Las construcciones que se usaron en este trabajo fueron: a) la construcción *pGEM-210* que contiene toda la región del IRES incluyendo 60 nts río arriba del sitio +1 de transcripción (Dinkova *et al.*, 2005), b) la construcción *pGEM-Hsp101+1* que contiene toda la región del IRES *hsp101* iniciando en el sitio +1 de transcripción, c) la construcción *pGEM-Hsp101Δ17* que posee el IRES *Hsp101* de maíz al cual se le cortaron los primeros 17 nts del extremo 5' y d) la construcción *pGEM-Hsp101Δ50* la cual posee el IRES *Hsp101* al cual se le cortaron los primeros 50 nts del extremo 5'. También fueron utilizados las construcciones bicistrónicas recombinantes *pBIC-Hsp101+1 SEN* (sentido) y *pBIC-Hsp101+1 AS* (anti sentido), estos vectores contienen al IRES *Hsp101* desde el sitio +1 de transcripción en sentido y anti sentido respectivamente, y están flanqueados por dos cistrones, en donde el primero es el mensaje para el cloranfenicol acetil transferasa (CAT) y el segundo es el mensaje para la luciferasa de luciérnaga (LUC) (Jiménez-González, 2009).

EXTRACCIÓN DEL ADN PLASMÍDICO POR *MINIPREP*

De cada una de las 6 cepas recombinantes (que contienen los plásmidos recombinantes de *pGEM*, donde se encuentran los fragmentos de IRES de *Hsp101*) y los plásmidos recombinantes de *pBIC-Hsp101+1* en sentido y antisentido, se inoculó una asada en 5 ml de medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml).

Las muestras se incubaron durante toda la noche a 37 °C con agitación a 250 rpm. Para iniciar la extracción del ADN plasmídico, se centrifugaron las células bacterianas arriba mencionadas a 3 000 rpm durante 5 min en tubos Eppendorf de 1.5 ml, se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 100 µl de la solución I (glucosa 50 mM, Tris HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8) y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Después se agregaron 200 µl de la solución II (NaOH 0.2 N, SDS al 1%, la cual debe ser preparada al momento de usarse), se mezcló por inversión y se incubó durante 5 min en hielo. Posteriormente se agregaron 150 µl de la solución III fría (60 ml de AcK 5M, 11.5 ml de ácido acético, 28.5 ml de agua) y se mezcló por inversión y la mezcla fue incubada durante 10 min en hielo. Los tubos se centrifugaron durante 10 min a 14 000 rpm a 4°C, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo tomando nota de los volúmenes transferidos y se le agregó 0.1 volúmenes de Tris-HCl 1M pH 8 y 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), mezclándose con un vortex durante 15 seg. Acto seguido, las mezclas se centrifugaron durante 5 min a 14 000 rpm a 4°C y se recuperaron las fases acuosas, a las cuales se les agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto frío, se agitaron por inversión y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. Los tubos se centrifugaron durante 10 min a 14 000 rpm a 4°C, se desecharon los sobrenadantes y la pastilla se lavó con 0.5 ml de etanol al 70%. Las muestras se dejaron secar y se resuspendieron en 50 µl de agua estéril.

PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO POR *MELTON PREP (MAXIPREP)*

Los plásmidos recombinantes arriba mencionados se crecieron en 50 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml) durante toda la noche a 37°C a 250 rpm para obtener una cantidad grande de ellos. Para extraer el plásmido se separó el cultivo en dos tubos corex de 30 ml y se centrifugaron a 5 000 rpm (centrifuga GS-15R y rotor F2402 ambos de *BECKMAN*) durante 10 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y las pastillas se resuspendieron en 5 ml de NaCl 10 mM. Las células se centrifugaron a 5 000 rpm durante 10 min a 4°C. Las pastillas se resuspendieron en 0.6 ml de solución amortiguadora de lisis (Tris 25 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8,

sacarosa al 15%, lisozima a 2 mg/ml) y se incubaron durante 20 min en hielo. Posteriormente, se les agregó 1.2 ml de la solución de lisis (NaOH 0.2 M, SDS 1%), se mezclaron suavemente y se incubaron 10 min en hielo. Después se adicionó a cada muestra 0.75 ml de NaAc 3M, se mezcló suavemente y se incubó 20 min en hielo. Los tubos se centrifugaron durante 15 minutos a 7000 rpm a 4°C. Los sobrenadantes fueron transferidos a otros tubos, a los cuales se les agregaron 5 µl de RNAsa A 100 mg/ml (*SIGMA* #cat R 6513) y se incubaron durante 30 min a 37°C. Se les agregó 1 volumen de fenol-cloroformo (25:24) y los tubos se agitaron suavemente, posteriormente fueron centrifugados durante 10 min a 7 000 rpm a 4°C, las fases acuosas fueron recuperadas y se repitió 2 veces el lavado con fenol-cloroformo. Las fases acuosas fueron precipitadas con 2 volúmenes de etanol absoluto y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. Las muestras precipitadas se centrifugaron durante 10 min a 8 500 rpm a 4°C, se eliminaron los sobrenadantes y las pastillas se lavaron con 0.5 ml de etanol al 75%. Las pastillas se resuspendieron en 168 µl de H₂O estéril y fueron transferidos a tubos Eppendorf estériles y se les agregaron 32 µl de NaCl 5 M, se mezclaron bien y se les agregaron 200 µl de PEG 8000 al 13% y se dejaron incubando toda la noche a 4°C. Al día siguiente los tubos Eppendorf se centrifugaron durante 10 min a 14 000 rpm a 4°C, y se eliminó el sobrenadante de cada tubo, las muestras se centrifugaron nuevamente para eliminar todo el PEG posible. Las pastillas se lavaron con 0.5 ml de etanol al 75%, y se centrifugaron durante 5 min a 14 000 rpm a 4°C. Los tubos se dejaron invertidos hasta que el etanol se secó. Las pastillas se resuspendieron en 50 µl de H₂O, se tomó 1 µl de cada muestra y se diluyó en 99 µl de H₂O y se cuantificó su absorbancia a 260 nm.

LINEARIZACIÓN DEL PLÁSMIDO CON INSERTO

Los plásmidos fueron linearizados mediante digestiones enzimáticas, con la enzima de restricción apropiada. Los plásmidos bicistrónicos *pBIC-Hsp101+1 SEN*, *pBIC-Hsp101+1 AS*, *pBIC-Hsp101Δ17* y *pBIC-Hsp101Δ50*, fueron linearizados con la enzima *Hpa I* (*INVITROGEN* #cat 15208-028). Para el plásmido con el cDNA de

la proteasa Lb se utilizó la enzima *Xba*I (INVITROGEN #cat 15226-012) y para las reacciones SHAPE de *pBIC-Hsp101+1 SEN* se utilizó la enzima *Bbu*I. En el proceso se digirieron 10 µg de ADN plasmídico purificado por *Melton prep* en un volumen de reacción final de 30 µl durante 3 h a 37°C. Se verificó el avance de la digestión corriendo 1 µl de reacción en un gel de agarosa al 1%, mientras el ADN estaba en hielo. Una vez que la digestión se había completado, se diluyó la reacción con H₂O tratada con DEPC (dietil pirocarbonato) hasta alcanzar un volumen de 100 µl y se extrajo con 1 volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó en un vortex durante 1 min y se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 min a 4°C. La fase acuosa se recuperó y se le agregó 1 volumen de chisam (cloroformo: alcohol isoamilico 24:1), se agitó en un vortex durante 1 min y se centrifugó a 14 000 durante 5 min a 4°C. La fase acuosa se recuperó y el ADN se precipitó con 0.1 volúmenes de NaAc 3M pH 5.2 y 2 volúmenes de etanol absoluto. Se almacenó a -72°C durante 30 min y se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 min a 4°C. La pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min a 4°C. Se dejó secar el precipitado y la pastilla fue resuspendida a una concentración final de 1 µg/µl con H₂O tratada con DEPC a temperatura ambiente.

SÍNTESIS DE TRANSCRITOS

Se realizó la reacción de transcripción *in vitro* con 5 µg de ADN plasmídico linearizado (*pBIC-hsp101+1 SEN*, *pBIC-Hsp101+1 AS*, *pGEM-Hsp101Δ17*, *pGEM-Hsp101Δ50* o la proteasa Lb) en un volumen de 100 µl y se incubó durante 60 min a 37°C con la polimerasa de RNA T7 (*PROMEGA* #cat P2077), de acuerdo a Schernborn (1998). Posteriormente, se agregaron 5 µl de la DNAsa RQ (*PROMEGA* #cat M6101) y se incubó durante 15 min a 37°C. Se extrajo con 1 volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó por inversión durante 1 min. Se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 min a 4°C. La fase acuosa se extrajo con 1 volumen de chisam (cloroformo: alcohol isoamilico 24:1), se agitó por inversión durante 1 min y se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 min a 4°C. La fase acuosa se

recuperó y el ARN se precipitó con 0.5 volúmenes de NH₄Ac 7.5M y 2 volúmenes de etanol absoluto incubándose toda la noche a -72°C.

Al siguiente día la fase acuosa recuperada se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 min a 4°C. El precipitado se resuspendió en 100 µl de NH₄Ac 2.5 M, se añadieron 100 µl de etanol absoluto y se incubó a -72°C durante 1.5 h. Se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 20 µl de H₂O tratada con DEPC. Se tomó una alícuota de 1 µl para calcular la concentración de ARN mediante la estimación de su absorbancia a 260 nm. La muestra se almacenó a -72°C, para posteriormente ser utilizada en la traducción *in vitro*.

REACCIÓN DE TRADUCCIÓN *IN VITRO*

Para generar un sistema de traducción *in vitro* independiente de *cap* se utilizó RRL (lisado de reticulocitos de conejo de *PROMEGA* #cat L4960) con el mensaje de la proteasa Lb del FMDV (virus de la fiebre aftosa). La proteasa Lb corta específicamente a la proteína eIF4G e interrumpe la actividad del complejo eIF4F en la traducción dependiente de *cap* (Gingras *et al.*, 1999). Por lo tanto, se preincubó el RRL con 50 ng de transcrito de la proteasa Lb durante 15 minutos para realizar un buen corte del factor eIF4G e inhibir la traducción dependiente de *cap*.

La traducción del mensaje *pBIC-Hsp101+1* SEN se llevó a cabo *in vitro* en el sistema animal RRL en una reacción final de 25 µl que contuvo 17.5 µl de RRL preincubado con la proteasa Lb, 0.1 µg de ARNm transcrito *in vitro* y 10 µCi [³⁵S] metionina (actividad específica de 555 MBq ml⁻¹; *Amersham Biosciences*, Uppsala, Suecia). En reacciones por separado, se le agregó a la mezcla 10 mg ó 25 mg de Radicol. La reacción de traducción se incubó durante 1 h a 37°C, se tomó 1 µl de la reacción a tiempo 0 y también cuando terminó la reacción. Ambas alícuotas se colocaron sobre un papel filtro para cuantificar la incorporación de la metionina radioactiva. Con el sobrante de la reacción (23 µl) se realizó una electroforesis en

gel de poliacrilamida al 12%. El gel se secó y se expuso en una pantalla de fósforo para obtener la fluorografía en un *Phosphorimager* (*Personal Molecular Imagen FX* de *BIORAD*). La imagen resultante se analizó con el programa *Quantity One* (*BIORAD*) (Dinkova *et al.*, 2005).

CUANTIFICACIÓN DE LA RADIOACTIVIDAD INCORPORADA A PROTEÍNA

Para cuantificar la eficiencia de incorporación de la [³⁵S]-metionina a las proteínas, se tomaron los papeles filtro con la reacción de traducción a tiempo 0 y a tiempo de 1 h. Se dejaron secar y se les lavó con ácido tricloro-acético (TCA) al 10% durante 15 min con agitación constante (100 ml para cada 10 papeles), se eliminó el TCA al 10% y los papeles filtro se colocaron en TCA al 5% (100 ml para 10 papeles) y se hirvieron durante 10 min. Concluido este tiempo, se agregó hielo en el interior del vaso para enfriar, se decantó el líquido y se lavaron los papeles con 500 ml de H₂O desionizada. Se eliminó el agua y se dieron dos lavados a los papeles durante 10 min cada uno con etanol absoluto agitando constantemente, se eliminó el etanol y se lavaron durante 15 min con acetona al 100% agitando constantemente. Se eliminó la acetona y los papeles filtro se dejaron secar.

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

UV-CROSSLINK DE ARN CON EXTRACTO DE RRL

Para analizar el entrecruzamiento del IRES *Hsp101* de maíz y RRL, se llevó a cabo una transcripción *in vitro* del IRES, utilizando rUTP marcado con [³²P] (actividad específica 9.25 MBq ml⁻¹; *Amersham Biosciences*, Uppsala, Suecia). La

construcción *pGEM-Hsp101+1* fue utilizada para obtener únicamente el transcrito del IRES *Hsp101* de maíz. Se incubó este mensaje marcado con [³²P] (100 000 cpm) en un ensayo de *UV-crosslinking* en un volumen final de reacción de 16 µl que contenía: HEPES-KOH 10 mM pH 7.4, KCl 35 mM, MgCl 22.75 mM, glicerol al 10% y DTT 0.5 mM. La reacción se incubó durante 15 min a temperatura ambiente y después fue expuesta a luz UV (254 nm, UVC500, *HOEFER*) durante 30 min en hielo. Posteriormente se le agregó RNasa A, a una concentración de 0.3 µg/µl durante 30 min a 37°C, para eliminar el ARN que no fue protegido por alguna proteína. Posteriormente, se corrió una electroforesis *SDS-PAGE* al 10% y posteriormente, el gel se secó y fue expuesto a una pantalla de fósforo. La fluorografía se realizó en un *phosphorimager* (*Personal Molecular Imagen FX* de *BIORAD*) y se analizó con el programa *Quantity One* (*BIORAD*) (López de Quinto *et al.*, 2001).

Para realizar un ensayo *UV-crosslinking* en condiciones independientes de *cap*, por separado se llevó a cabo un ensayo, donde se agregó extracto proteico de RRL previamente tratado con la proteasa Lb, para simular una interacción de manera dependiente de IRES.

MARCAJE DE OLIGONUCLEÓTIDO CON γ [³²P]

Se usó el oligonucleótido pBICas 5´- GGCCTTTCTTTATGTTTTTGGCG -3´ el cual hibrida en el cistron de luciferasa (95 nucleótidos río abajo del codón de inicio de *pBIC-Hsp101+1*) por lo cual puede amplificar toda la secuencia del IRES (Fernández-Miragall y Martínez-Salas 2007). pBICas se marcó radioactivamente con la enzima polinucleótido Kinasa de PROMEGA en una reacción que contenía el buffer de la enzima a 1X, oligonucleótido a 10 mM, 10 U de Polinucleótido Kinasa y 10 mCi de rUTP γ [³²P], la reacción se dejó incubando a 37°C durante 1 hora. Posteriormente para eliminar el exceso de marca no incorporada, se utilizaron las columnas G-25 de *GE HEALTHCARE Micro Spin G-25 #cat 27-5325-01*. Para preparar la columna, primero se le rompió el tapón y se colocó en un tubo Eppendorf,

el cual se centrifugó a 3 000 rpm durante 3 min, posteriormente se eliminó el tubo Eppendorf con el líquido eluido y la columna fue colocada en un tubo nuevo y se le agregó 50 µl de buffer TE al 1X, la columna se centrifugó durante 3 000 rpm por 3 min, el tubo Eppendorf con el líquido eluido fue eliminado y la columna fue colocada en un tubo nuevo. El oligonucleótido marcado fue llevado a un volumen de 50 ml agregando 40 ml de TE 1X, la mezcla fue colocada en la columna y se centrifugó a 3 000 rpm por 3 min. Se desechó la columna y se recuperó el líquido eluido de ella, Por último, se agregaron 1 volumen de acetato de amonio al 7.5 M, 2 1/2 volúmenes de etanol absoluto y 1 ml de glucógeno, se mezclaron bien y se dejaron precipitando a -72°C por 30 min. La muestra se centrifugó a 14 000 durante 15 min a 4°C, la pastilla fue lavada 2 veces con etanol al 75%. Se dejó secar y se resuspendió en 10 ml de agua.

SELECTIVE 2'-HYDROXYL ACYLATION AND PRIMER EXTENSION (SHAPE)

Para identificar la estructura secundaria del IRES *Hsp101* de maíz se utilizaron 2 pmol del ARN *pBIC-Hsp101+1 SEN* y fueron llevados a un volumen de 12 µl en un tubo para PCR. El ARN fue calentado en un termociclador a 95°C durante 2 min y posteriormente enfriado a 4°C durante 2 min. Se añadió 6 µl de 3´3 *RNA folding mix* (HEPES 333 mM pH 8, NaCl 333 mM y MgCl₂ 20mM) y la mezcla fue incubada a 37°C durante 20 min. Esta reacción fue dividida en dos tubos donde cada uno contuvo 9 µl. A uno de ellos se le agregó 1.5 µl de la solución de N-metil isotoico anhídrido al 10X (NMIA 65mM) y al otro se le agregaron 1.5 µl de dimetil sulfoxido (DMSO), el cual fue el control. Posteriormente, se incubaron ambas muestras a 37°C durante 45 min. Por último, cada muestra se precipitó agregando 90 ml de H₂O DEPC, 4 µl de NaCl 5M, 1 µl de glucógeno 2 µl de EDTA 100 mM y 350 ml de etanol absoluto y se incubó a -72°C durante 30 min y después se centrifugó a 14 000 rpm durante 30 min a 4°C, las muestras se secaron y fueron resuspendidas en 20 µl de TE 0.5X.

Por separado, se tomaron 10 μ l del ARN tratado con NMIA y DMSO, y se le agregaron 0.5 μ l del oligonucleótido pBICas marcado anteriormente con [32 P]. Las muestras fueron colocadas en un termociclador y se utilizó el programa SHAPE A, donde los tiempos y temperaturas que se utilizaron fueron las siguientes: 5 min a 65°C - 5 min a 35 °C - 1 min a 4°C. Después se agregaron 3 μ l de buffer de la Transcriptasa Reversa *Super Scrip III* de INVITROGENE #cat 18080-44, 1.5 μ l de la mezcla de dNTPs 10 μ M, 0.25 μ l de DTT 0.5 mM, 0.25 μ l de RNAsin y 0.25 μ l de H₂O, y se utilizó el programa SHAPE B, donde el tiempo y la temperatura fueron de 1 min y 52 °C respectivamente. Posteriormente, se le agregó 0.25 ml de la Transcriptasa Reversa *Super Scrip III* y se utilizó el programa SHAPE C, donde el tiempo y la temperatura fue de 30 min a 52°C. Cuando la reacción finalizó, a cada tubo se le agregó 0.4 ml de NaOH 4 M para parar la reacción y cada muestra se precipitó con 0.4 ml de glucógeno, 1 volumen de NH₄ acetato 7M (15 ml) y 75 ml de etanol absoluto y se incubaron a -72°C durante 30 min. Por último, las muestras se centrifugaron a 14 000 rpm durante 15 min a 4°C y después se les dio un lavado con etanol al 75%, las muestras se dejaron secar y fueron resuspendidas en 10 μ l de H₂O.

OBTENCIÓN DE LA SECUENCIA DEL IRES *Hsp101* DE MAÍZ

Para obtener la secuencia del IRES *Hsp101* de maíz se utilizó el *Thermo sequenase cycle sequencing kit* de USB #cat 78500-1kt y el cual se utilizó de la siguiente manera: se prepararon 4 tubos de PCR a los que se les agregó por separado 4 ml de su nucleótido correspondiente (ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP), Por separado, se preparó una mezcla que contenía 500 ng de *pBIC-Hsp101+1 SEN*, 2 μ l de buffer, 4 μ l de oligonucleótido pBICas marcado con [32 P] y 2 μ l de termosequenasa en un volumen final de 17.5 ml. De esta mezcla se agregaron 4 ml a cada tubo que contenía un nucleótido distinto y fueron colocados en un termociclador, donde se realizaron 50 ciclos, con el siguiente perfil de temperaturas: 30 s a 95°C - 30 s a 55°C - 90 s a 72°C, y una temperatura final de 4°C. La reacción se detuvo con el buffer de paro del kit y la muestra se almacenó a -20°C.

PREPARACIÓN DEL GEL DE SECUENCIACIÓN

Previo a la preparación del gel de secuenciación, los vidrios fueron lavados 2 veces con acetona al 100%, después, fueron lavados 2 veces con etanol absoluto y posteriormente se preparó el gel de bis-acrilamida al 6% y urea 8 M. El gel se recorrió con buffer de formamida por 20 min a 70 W, después se cargaron 4 o 5 μ l de las muestras del ARN tratadas con NMIA durante 4 horas a 70 W. Al terminar de correr el gel, se fijó con una solución de ácido acético 7% y metanol 50% durante 10 min, el gel fue colocado en papel filtro y se secó a 80°C durante 1 hora.

El gel seco fue expuesto en una película fotográfica la cual fue revelada para poder observar los sitios de paro de la retrotranscripción y la imagen fue analizada con el programa *Quantity One*.

OBTENCIÓN DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA DEL IRES *Hsp101* DE MAÍZ PREDICHA CON EL SOFTWARE mFOLD Y LOS RESULTADOS DEL ATAQUE DEL NMIA

Para obtener la estructura secundaria del IRES *Hsp101* de maíz se utilizaron los valores experimentales del ataque que causó el NMIA a los nucleótidos de la secuencia del IRES y el software mFOLD. Los valores del ataque de los nucleótidos fueron graficados y representados por colores, los nucleótidos de color negro no sufrieron ataque por el NMIA, los nucleótidos de color azul sufrieron un ataque <20 %, los nucleótidos de color amarillo sufrieron un ataque <50 % y los nucleótidos de color rojo sufrieron un ataque >50 %.

Para obtener la estructura secundaria del IRES *Hsp101* de maíz, se utilizaron los resultados del ataque sufrido por la secuencia de nucleótidos con NMIA y el software mFOLD (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>). La secuencia fue colocada en el “cuadro de secuencia” en formato fasta, como se muestra abajo. Paso siguiente, en el “cuadro de información de restricción” se ingresó el comando

P i 0 k, para que los nucleótidos que se encuentran en color azul, amarillo y rojo se mantengan en cadena sencilla. El comando P i 0 k se ingresó como se muestra en el ejemplo de abajo, en donde: P significa prohibir, i es número del primer nucleótido de una secuencia que se encuentra en cadena sencilla, 0 son los nucleótidos que se encuentran apareados (este no se modifica) y k es el número de nucleótidos que desde i se encuentran en cadena sencilla. Después de ingresar el código, se dio *click* en el cuadro “*Check constrain*” para cargar la orden. Con esto, en el cuadro de secuencia se observó una “P” bajo los nucleótidos que se mantendrán en cadena sencilla. De esta manera fueron cargados los comandos hasta ser ingresados todos los nucleótidos que se encuentran en cadena sencilla. Por último, se corrió el programa para obtener las posibles estructuras secundarias del IRES *Hsp101* de maíz.

Enter the sequence to be folded in the box below. All non-alphabet characters will be removed. FASTA format may be used.

```

10      20      30      40      50
GCACAACAUU UCAACCCAGAA ACACUAGCCG ARGCAAAUCC AUUCCACRAG
PPPPPP
60      70      80      90      100
CACCCUGSUGG GAUCAUCUCA UCAUCAGAAA CCAAGAGAGA GAUUCGGUGU
110     120     130     140     150
CCGCUUGUUG UAGUAGAUUG UGAGGACUGA GGACCGAGAA GCAGCCAUG

```

Format Sequence Clear Constraints Check Constraints

Sequence length = 149.
48 A's, 37 C's, 35 G's, 29 U/T's, and 0 N's.

Enter [constraint information](#) in the box at the right. (optional) You may:

1. force bases $i, i+1, \dots, i+k-1$ to be double stranded by entering:
F i 0 k on 1 line in the constraint box.
2. force consecutive base pairs $i, i+1, j-1, \dots, i+k-1, j-k+1$ by entering:
F i j k on 1 line in the constraint box.
3. force bases $i, i+1, \dots, i+k-1$ to be single stranded by entering:
P i 0 k on 1 line in the constraint box.
4. prohibit the consecutive base pairs $i, i+1, j-1, \dots, i+k-1, j-k+1$ by entering:
P i j k on 1 line in the constraint box.
5. prohibit bases i to j from pairing with bases k to l by entering:
P i-j k-l on 1 line in the constraint box.

P 2 0 6

Para organizar los nucleótidos en una estructura secundaria bidimensional se siguió lo siguiente: primero, mantener el extremo 5' en la izquierda y el extremo 3' en la derecha, segundo, dentro de lo posible, los extremos 5' y 3' que se encuentran en cadena sencilla fueron colocados de manera horizontal (→), tercero, las estructuras de tallo y tallo-asa fueron colocadas de manera vertical, horizontal o

con un ángulo de 45 grados en dirección a la parte superior (↑), según sea el caso, cuarto, las regiones en cadena sencilla flanqueada por un tallo y/o tallo-asa, fueron ordenadas de manera que se forme una burbuja.

MODIFICACIÓN DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA DEL IRES *Hsp101* DE MAÍZ PREDICHA CON EL SOFTWARE mFOLD Y LOS RESULTADOS DEL ATAQUE DEL NMIA

Para la obtención de la estructura secundaria del IRES *Hsp101* de maíz, basada en una estructura predicha con el software mFOLD, y modificada con los resultados experimentales del ataque del NMIA al ARN fue llevado a cabo lo siguiente. Primero, se obtuvo la estructura secundaria del IRES *Hsp101* de maíz con el software mFOLD (desde aquí se siguieron las mismas reglas arriba mencionadas, para organizar los nucleótidos en una estructura secundaria bidimensional). Segundo, se identificaron los nucleótidos de color azul, amarillo y rojo en la primera estructura predicha con mFOLD y fueron modificados, colocando estos nucleótidos en cadena sencilla. Tercero, con el software mFOLD, se siguió el mismo proceso arriba mencionado ingresando el comando $P \ i \ 0 \ k$, obteniendo los apareamientos de los nucleótidos de color negro, evitando que se mantengan en cadena sencilla. Con la información de los nucleótidos apareados, la estructura secundaria en la cual fueron separados los nucleótidos en cadena libre fue modificada, ordenando los tallos y tallos-asa predichos por el programa mFOLD de manera vertical, horizontal o en ángulo de 45 grados, según sea el caso, iniciando por el extremo 5'. Además, los nucleótidos en cadena sencilla fueron colocados formando una burbuja, con excepción de los extremos 5' y 3' ya que estas secuencias fueron colocadas de manera lineal.

IDENTIFICACIÓN DEL SITIO DE INICIO DE LA TRADUCCIÓN DE *Hsp101* DE MAÍZ (*TOEPRINT*)

Para evaluar la interacción ARN-Proteína se utilizó la misma técnica SHAPE, el ARN se desnaturalizó de la misma manera como está arriba mencionado, por separado se formó el complejo proteínico en un volumen final de 10.6 ml el cual contenía 5 ml de RRL, 1 ml de RNAsin, DTT 1 mM, espermidina 0.5 mM, KAc 100 mM, GMPPNP 2mM y MgAc 1 mM. La mezcla fue incubada durante 5 min a 30°C y posteriormente se le agregaron 2 pmol de ARN *pBIC-Hsp101+1* SEN y se incubó durante 10 minutos a 30°C. La mezcla fue dividida en dos fracciones y a una se le agregó 1 µl de NMIA (NMIA 65 mM) y a la otra 1 µl de DMSO y se incubaron durante 45 min a 37°C. Por último a la muestra se le agregó un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamilico (25:24:1), y fue centrifugado a 14 000 rpm durante 5 min a 4°C, el sobrenadante se precipitó con medio volumen de NH₄Ac y 2 ½ vol de etanol absoluto. Para finalizar, se llevó a cabo la retrotranscripción a cada muestra de la misma manera como se menciona para la reacción del SHAPE.

RESULTADOS

ESTRUCTURA SECUNDARIA DEL IRES *Hsp101* DE MAÍZ OBTENIDA EXPERIMENTALMENTE POR EL MÉTODO *SHAPE*

Es importante obtener la estructura secundaria del IRES *Hsp101* de maíz de manera experimental, dado que la formación del complejo traduccional activo depende del reconocimiento de motivos de ARN estructurales por factores de traducción, ITAFs o por la subunidad ribosomal 40S, y de esta manera iniciar la traducción dependiente de IRES. La predicción de estructuras secundarias y terciarias de ARN realizadas con software informáticos tienen una exactitud promedio del 50%. Aunque tiene un valor elevado, es más exacta la predicción de estructuras secundarias de ARN predichas con software comparativos que examinan la covariación de secuencias homologas (Bair *et al.* 2006). Sin embargo, al no haber reporte de estructuras secundarias o terciarias homologas del IRES *Hsp101* de maíz, la mejor vía de obtener dichas estructuras es por métodos experimentales. En este caso fue elegida una técnica de modificación de nucleótidos en la que se utiliza el reactivo NMIA (N-metil isotoico anhidro) el cual aprovecha la flexibilidad de los nucleótidos que se encuentran en cadena sencilla y puede modificar los 4 nucleótidos de ARN (Uracilo, Adenina, Guanina y Citocina). El NMIA ataca el grupo 2'hidroxilo generando un 2'-O-aducto estable en los nucleótidos del ARNm que se encuentran en cadena sencilla por medio de una descarboxilación. Al realizar una retro-transcripción la estructura 2'-O-aducto detiene la retrotranscriptasa. De esta manera cada banda es identificada como un paro o un nucleótido modificado, el cual se encuentra en cadena sencilla. En la figura 11 se muestra el resultado del ataque de NMIA a la secuencia IRES *pBIC-Hsp101+1*. La cantidad de muestra cargada fue igualada en un producto total (el cual no se observa en la imagen recortada), para prevenir que el error por la carga de muestra fuera el mínimo. En el carril 5 (control -) se muestran los paros correspondientes a estructuras secundarias estables que son nativas del IRES *Hsp101* de maíz y no pudieron ser desechas por el paso de la retro transcriptasa

durante la reacción de *primer extensión*. Dichos nucleótidos se encuentran aproximadamente en las primeras 10 posiciones de la estructura del IRES *Hsp101* de maíz, además se encuentran dos estructuras más alrededor de la posición 60 y 75 de este IRES. En el carril 6 se muestran las bandas que indican los sitios ó paros de la retro transcriptasa durante la reacción de *primer extension*, mostrando los nucleótidos modificados por el NMIA e indicando que estructuralmente se encuentran en cadena sencilla. De esta manera, se puede deducir que el IRES *Hsp101* de maíz se encuentra pobremente estructurado, ya que el bandeo se encuentra distribuido a lo largo del carril 6.

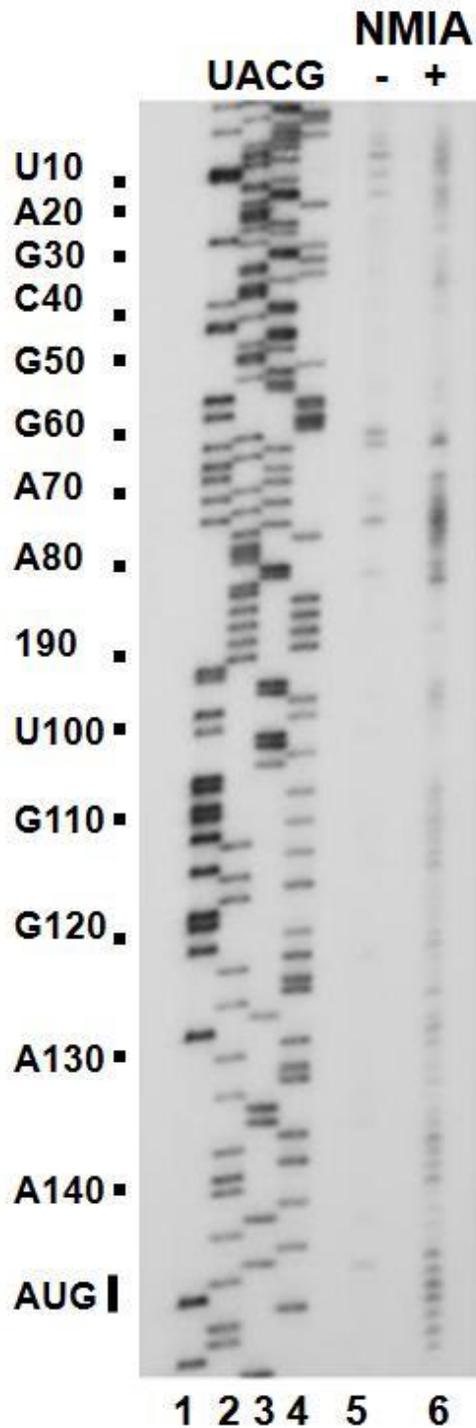


FIGURA 11: Análisis estructural del IRES *Hsp101* de maíz. Gel desnaturizante con los productos de la retro transcripción de *pBIC-Hsp101+1* tratado con NMIA. En los primeros cuatro carriles se muestra la secuencia de *pBIC-Hsp101+1*. En el carril 5 se muestra la amplificación que se realizó al ARN *pBIC-Hsp101+1* sin ser expuesto al NMIA. En el carril 6 se muestra la amplificación que se realizó al ARN *pBIC-Hsp101+1* al ser expuesto a NMIA.

Para obtener los valores del ataque de NMIA a los nucleótidos del IRES *Hsp101* de maíz, se cuantificaron densitométricamente las bandas correspondientes a los carriles 5 (NMIA-) y 6 (NMIA+) de la figura 11. Posteriormente los valores de cada nucleótido de NMIA- fueron restados a los valores de NMIA+ para tener el verdadero valor de ataque de NMIA. La gráfica de la figura 12 muestra los valores relativos de reactividad de los nucleótidos modificados por el NMIA. Para esto los valores obtenidos fueron normalizados a 100% con el valor máximo que corresponde a U71. Se designó el rango de ataque de cada nucleótido por colores de la siguiente manera: los nucleótidos que no tuvieron alguna modificación por NMIA se representan en color negro (valor de 0%), por lo cual en la gráfica se muestran como espacios vacíos, los nucleótidos representados en color azul tuvieron un ataque de 0% a 20%, en color amarillo se representan los nucleótidos que tuvieron un ataque de 20% a 50% y en color rojo se representan los nucleótidos que tuvieron un ataque de 50% a 100%. Los nucleótidos representados con alguno de estos últimos tres colores en la gráfica se encuentran en cadena sencilla, de esta manera se pudo identificar que más del 50% de los nucleótidos del IRES *Hsp101* de maíz se encuentra desapareado en algún grado, razón por la cual en la estructura secundaria se tiene que representar en cadena sencilla. De esta manera se refuerza la deducción de que la estructura del IRES *Hsp101* de maíz tiene regiones libres para la interacción con algún elemento que pueda participar en la formación del complejo traduccional activo.

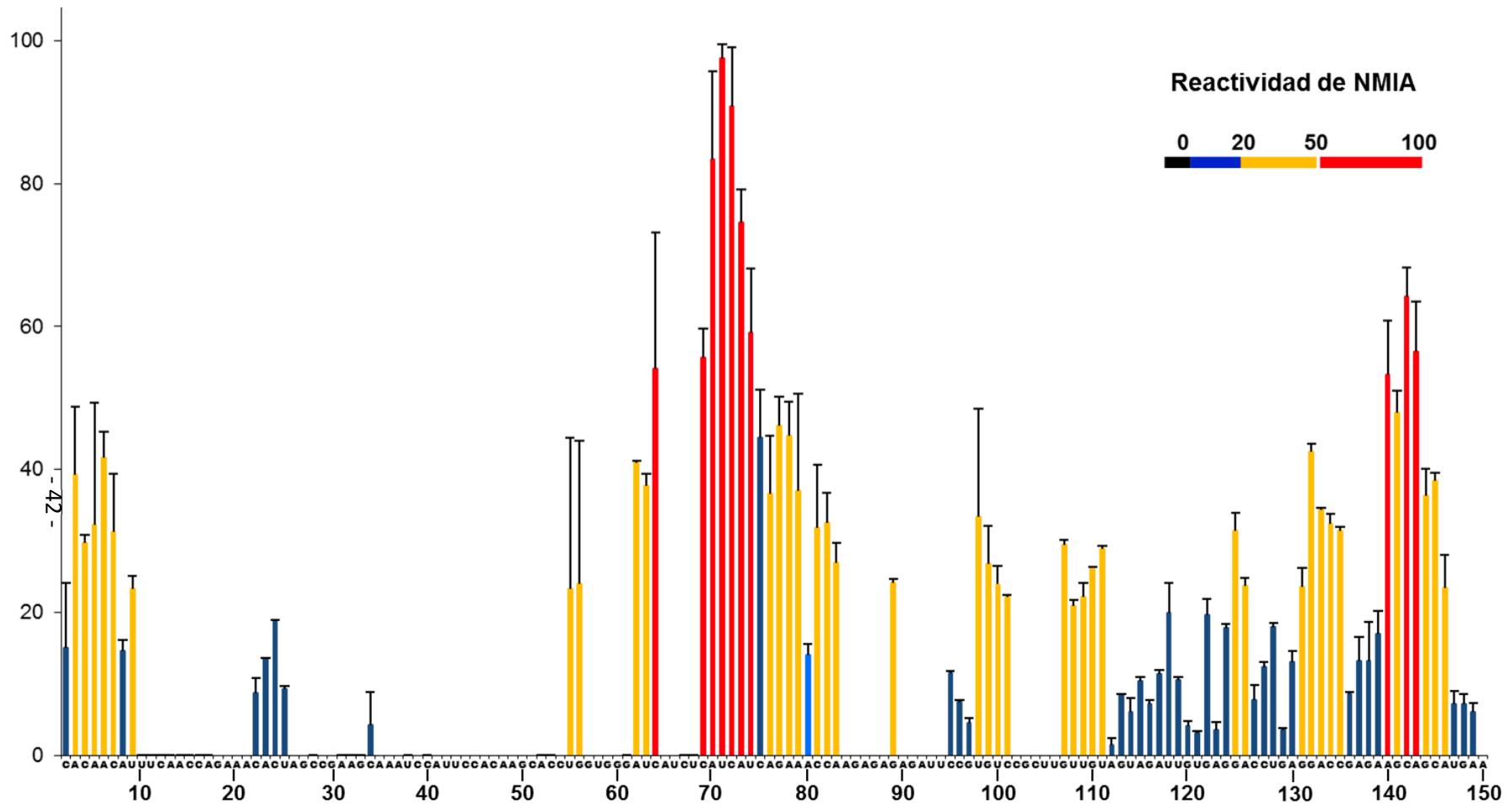


Figura 12: Histograma de la reactividad de los nucleótidos al NMIA. La reactividad de los nucleótidos al NMIA fue normalizada respecto al producto total (100%), las barras de color azul representan valores <20, las barras del color amarillo representan valores <50 y las barras de color rojo representan valores >50. Además, se muestra los espacios vacíos correspondientes a los nucleótidos que no presentaron reactividad al NMIA.

Al identificar el porcentaje de ataque que tiene el NMIA en los nucleótidos del IRES *Hsp101* de maíz, el siguiente paso fue separar los nucleótidos que se encuentran en cadena sencilla (color azul, amarillo y rojo) y en cadena doble (color negro), los cuales se muestran en una representación de la secuencia del IRES *Hsp101* de maíz en la figura 13.

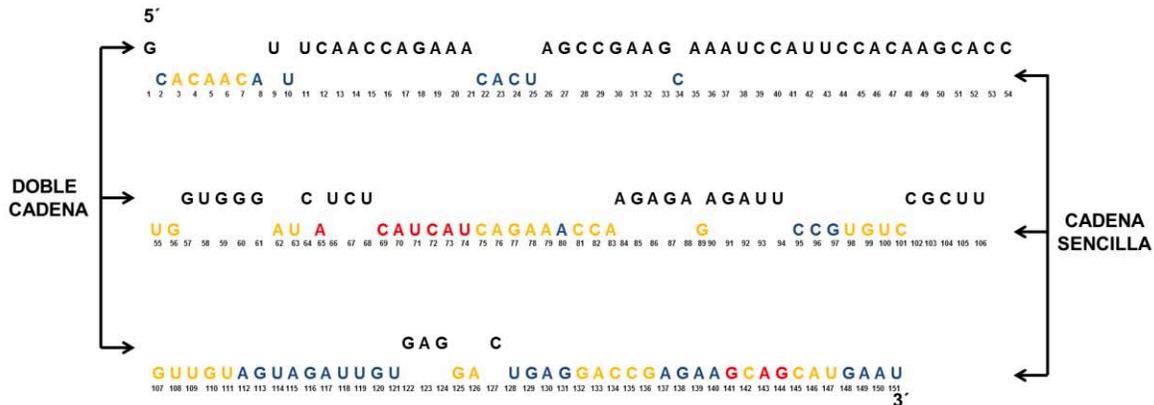


Figura 13: Secuencia del IRES *Hsp101* de maíz, en color negro se representa los nucleótidos que están en cadena doble y en color azul, amarillo y rojo se representan los nucleótidos que se encuentran en cadena sencilla.

Para poder obtener la estructura secundaria del IRES *Hsp101* de maíz se utilizó el programa mFOLD, en el cual se cargó la secuencia de nucleótidos que forman el IRES. Posteriormente se dio la orden prohibir que los nucleótidos 2 - 8, 22 - 25, 34, 55 - 56, 62 - 65, 69 - 83, 89, 95 - 101, 107 - 121 y 125 - 150 (Figura 13) se aparearan y se mantuvieran en cadena sencilla. Con esta información, el software puede llevar a cabo una predicción de la estructura secundaria de la secuencia de nucleótidos del IRES, dejando en cadena sencilla los nucleótidos que fueron atacados con el NMIA y colocando en cadena doble los nucleótidos que no recibieron un ataque por este reactivo.

En la figura 14 se observan dos estructuras secundarias del IRES *Hsp101* de maíz predichas con el software mFOLD, sin que estas se hayan modificado por alguna otra manera. Estas estructuras podrían reclutar la maquinaria traduccional para iniciar la traducción de manera dependiente de IRES. La estructura de la figura 14a cuenta con un dominio principal poco estructurado que se compone de dos

tallo-asa (*Stem-Loop*) SL1 (9-21 nts) y SL2 (41-63 nts). También, se pueden identificar dos pequeños tallos (*Stem*), S1 (31 a 34-103 a 106 nts) y S2 (65 a 68 y 90 a 93 nts). Además, se identificó la formación de dos burbujas (*Loop*) pequeñas, L1 (34 – 41, 63 - 65, 93 – 101 nts) y L2 (68 – 90 nts) y finaliza con una región en cadena sencilla SS3 (107 – 150 nts). Por otra parte, la estructura de la figura 14b, cuenta con un dominio principal muy poco estructurado compuesta por un tallo, S1 (9 a 12 – 87 a 90 nts). También, podemos observar la formación de dos tallo-asa, SL1 (27 – 34 nts) y SL2 (42 – 63 nts). Además, se forma una burbuja grande, L1 (12 – 27, 34 – 42 y 63 – 87 nts) y finaliza con una región en cadena sencilla SS2 (91 – 150 nts). En ambas estructuras predichas con mFOLD podemos identificar una región estructurada en el extremo 5' y una región en cadena sencilla en el extremo 3'. Además, de la conservación del tallo-asa grande SL2 en ambas imágenes y la formación de una burbuja de diferente tamaño a la cual se une SL2. Sin embargo, como una limitante de este método, podemos observar distintas regiones de nucleótidos que no sufrieron ataque del NMIA en cadena sencilla, ya que el software mFOLD no pudo aparear esos nucleótidos. Siendo en la estructura de la figura 14a los nucleótidos de la región SS2 (26 – 30 nts), SL1 (35 – 40, 63, 94 y 102 nts), SL2 (84 – 88 nts) y SS3 (122 – 124 y 127 nts). Y en la estructura de la figura 14b los nucleótidos de la región en L1 (13 – 21, 26, 35 – 41, 64, 66 – 68 y 84 – 86 nts) y en SS2 (91 – 94, 102 – 106, 122 – 124 y 127 nts).

Otra manera de obtener la estructura secundaria del IRES Hsp101 de maíz, es mediante la modificación de una estructura ya predicha, adecuando los nucleótidos y las estructuras con la ayuda del software mFOLD. De esta manera podemos reacomodar nucleótidos que el software omite.

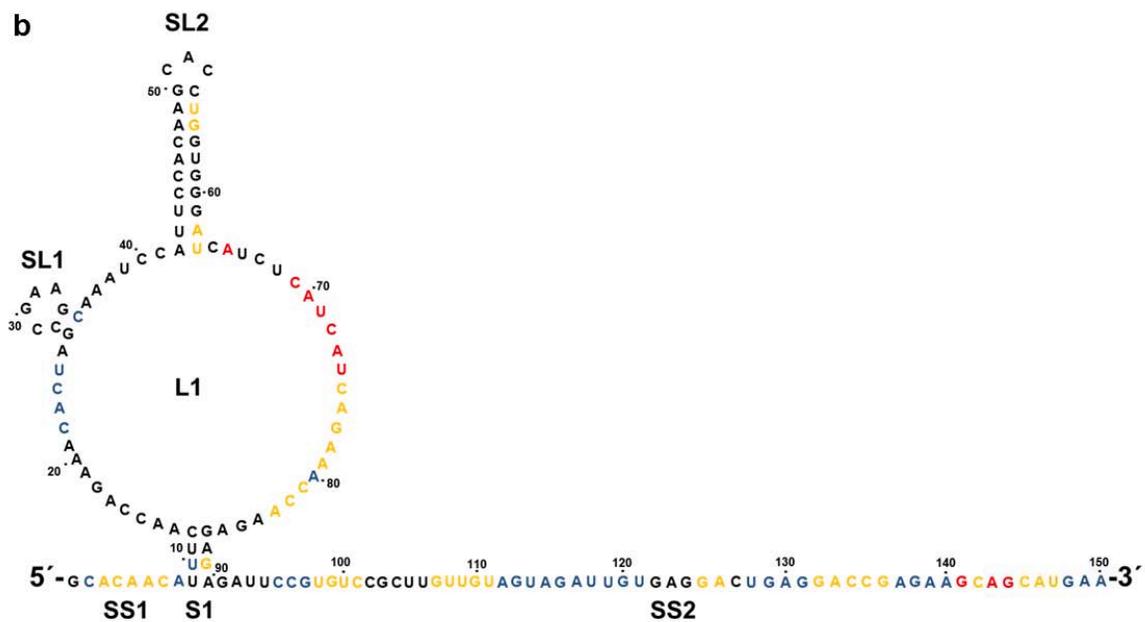
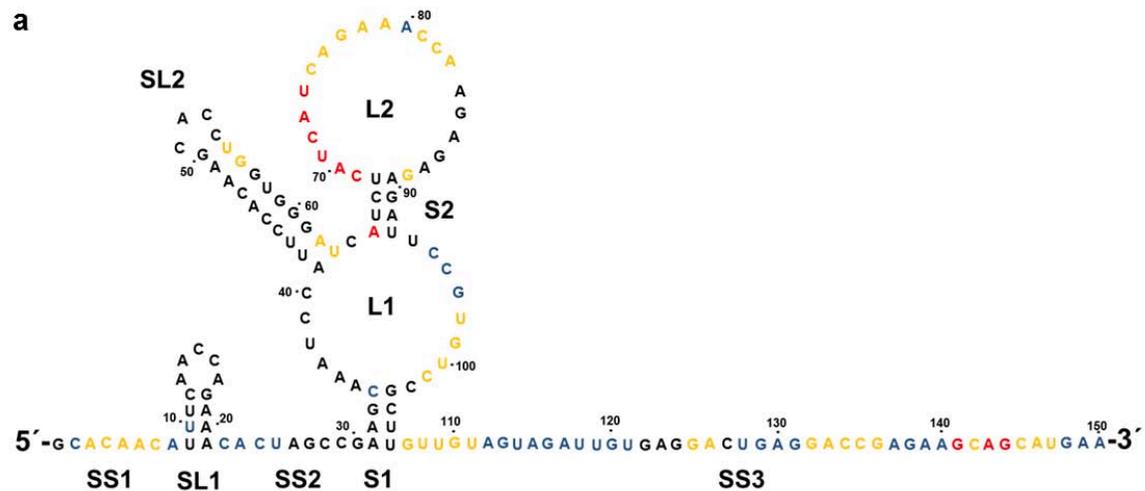


Figura 14: Estructuras secundarias del IRES *Hsp101* de maíz predichas con el software mFOLD. En las estructuras secundarias se representan los nucleótidos en colores de acuerdo a los valores obtenidos en el histograma (figura 12), los nucleótidos de color negro tienen un valor de 0 ya que no fueron atacados por el NMIA, los de color azul tienen un valor <20. Los nucleótidos de color amarillo tienen un valor <50 y los nucleótidos de color rojo tienen un valor >50.

Para llevar a cabo el moldeamiento de la estructura secundaria experimental del IRES *Hsp101* de maíz, la estructura original predicha por el programa mFOLD (Figura 15a) fue utilizada como molde y posteriormente fue modificada con los

resultados experimentales obtenidos por el ataque que causo el NMIA (Figura 12). Primero, los nucleótidos que se encuentran en color azul, amarillo y rojo se colocaron en cadena sencilla ya que fueron atacados en algún grado por el NMIA, de esta manera se obtuvo la figura 15b en la cual podemos observar la pérdida de la estructura L1 quedando libre el extremo 5' del IRES. Por otra parte, la estructura SS1 presente en el extremo 3' aumentó de tamaño, quedando una región expuesta cercana al codón de inicio. También se observa que las estructuras L2, L3 y L4 no solo fueron conservadas, sino que aumentaron de tamaño.

Segundo, para obtener los apareamientos en cadena doble se utilizó el programa mFOLD, la secuencia de nucleótidos que no sufrieron ataque por el NMIA y se encuentran en color negro (Figura 13), fueron cargadas en el software mFOLD incluyendo a U55, G56 y G89, debido a que se encuentran flanqueados por nucleótidos que no fueron atacados por el NMIA, además de que, estructuralmente, la formación de burbujas de 1 o 2 nucleótidos tienen una baja probabilidad. Con esta información se obtuvieron varias estructuras en tallo-asa con las cuales fue modificada la estructura de la figura 15b. En la estructura de la figura 15c se pueden observar dos tallo-asa en el extremo 3', el primero es un tallo-asa pequeño formado por los nucleótidos 27 a 34 y el segundo es un tallo-asa grande formado por los nucleótidos 43 a 61. La formación de estas estructuras rompe las burbujas correspondientes a L2 y L3 (Figura 15a y 15b) dejando dos estructuras temporales en forma de medio círculo. La estructura de burbuja correspondiente a L4 (Figura 15a y 15b) aumentó de tamaño debido a que los nucleótidos 66 a 68 no tuvieron un apareamiento predicho por el programa mFOLD. Además, se agregaron los nucleótidos 62 a 65, que se encuentran en cadena sencilla, formando una estructura temporal en forma de paleta.

Tercero, con los apareamientos obtenidos con el programa mFOLD fue modificada la estructura de la figura 15c. En la figura 15d se muestra la formación de dos pequeños tallos. El primer tallo se forma entre los nucleótidos A37-G124, U38-A123 y C39-G122 y el segundo tallo se forma entre los nucleótidos G85-U106,

A86-U105 y G87-C104, con este nuevo reordenamiento las estructuras temporales en forma de paleta y el semicírculo grande en el extremo 5´ se unen formando una burbuja flanqueada por estos tallos pequeños. Por otra parte, en el extremo apical de la estructura de la figura 15d se forma una estructura temporal en cadena sencilla.

Cuarto, por último, se llevó a cabo el ordenamiento de los nucleótidos 88 a 94 que quedaron en cadena sencilla en la estructura de la figura 15d, debido a que el programa mFOLD no predijo un apareamiento en cadena doble de esta secuencia, los nucleótidos se dejaron en cadena sencilla formando una burbuja de los nucleótidos 88 a 103. La estructura secundaria final del IRES *Hsp101* de maíz resultante de este proceso puede observarse en la figura 16.

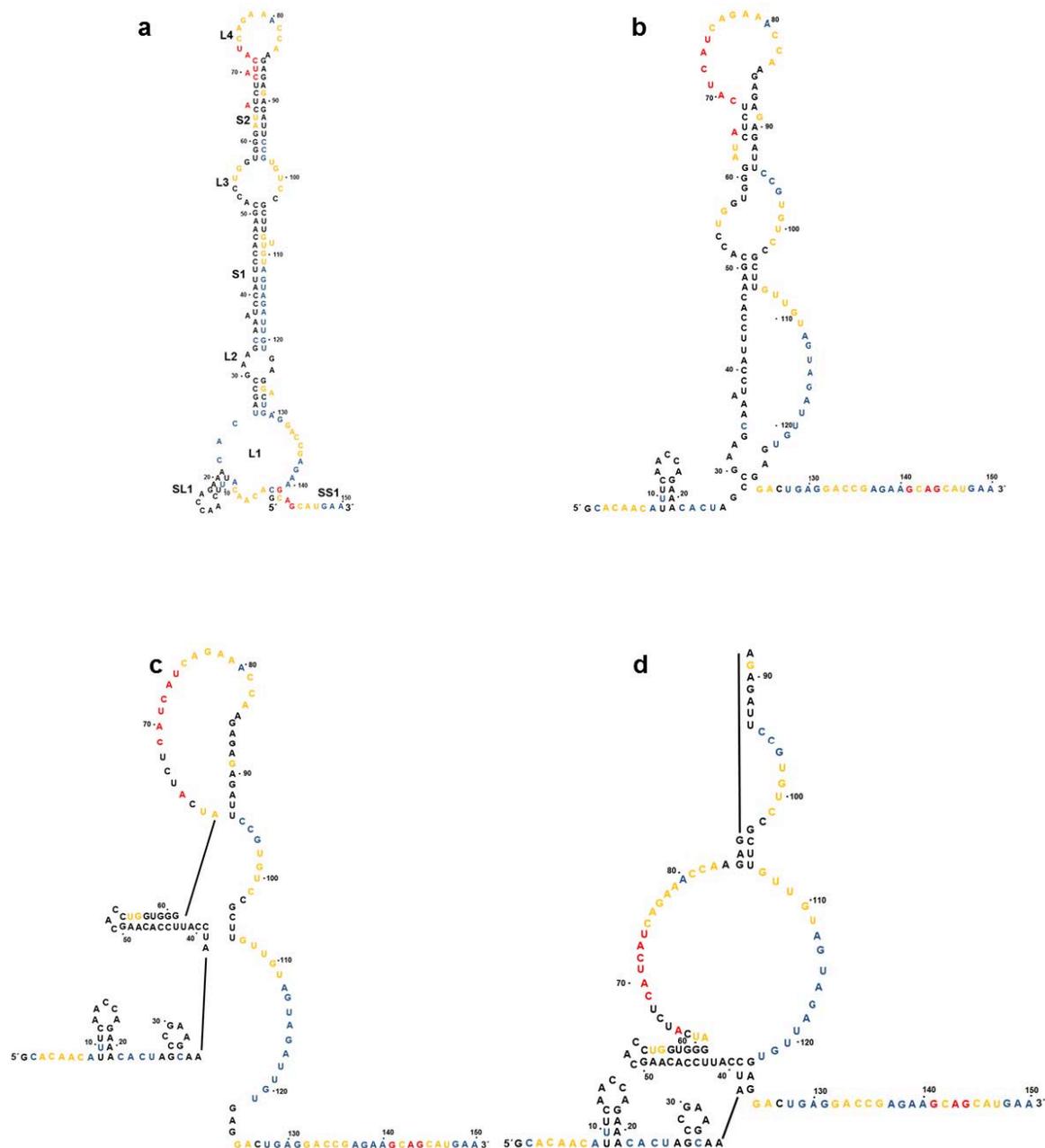


Figura 15: Proceso de moldeamiento de la estructura secundaria del ARN del IRES *Hsp101* de maíz. Los nucleótidos de color negro son aquellos que no fueron atacados por NMIA y se encuentran en cadena doble, los nucleótidos que se encuentran en color azul, amarillo y rojo son aquellos que fueron atacados por NMIA y se encuentran en cadena sencilla. a) Estructura secundaria del IRES *Hsp101* de maíz predicha con el software mFOLD. b) Modificación de la estructura del IRES *Hsp101* de maíz, donde los nucleótidos que no recibieron ataque por NMIA se colocaron en cadena sencilla. c) Formación de las estructuras de tallo-asa en la región 3' del IRES *Hsp101* de maíz. d) Formación de la burbuja central flanqueada por dos pequeños tallos del IRES *Hsp101* de maíz.

Para un mayor entendimiento de la estructura secundaria del IRES *Hsp101* de maíz, debemos recordar que el ARN se encuentra en un espacio tridimensional. Sin embargo, para poder comprender la estructura la imagen es presentada en un espacio bidimensional, sin olvidar que la estructura mantiene una flexibilidad que permite comprender las modificaciones que el NMIA causó a los nucleótidos. En la figura 16 se observa la estructura secundaria del IRES *Hsp101* de maíz, la cual recluta la maquinaria traduccional que inicia la traducción de manera dependiente de IRES. La estructura la podemos dividir en dos dominios principales, el primero altamente estructurado que va del nucleótido 1 a 61 dirección 5' a 3' y se compone de tres tallo-asa (*Stem-Loop*), SL1 (9-21 nts), SL2 (27-34 nts) y SL3 (43-61 nts) y un tallo corto (*Stem*), S1 (37-122). El segundo dominio contiene una alta cantidad de nucleótidos en cadena sencilla que va del nucleótido 62 al codón de inicio AUG y se compone de una burbuja (*Loop*) grande, L1 (62-84 nts) y una burbuja pequeña L2 (107-121 nts), un tallo corto S2 (87-103) y finaliza con una región en cadena sencilla (126-150 nts) río arriba del codón de inicio AUG.

Los nucleótidos que no tuvieron ataque (color negro) y no presentaron compatibilidad al utilizar el programa mFOLD para formar una cadena doble, se encuentran integrando las burbujas de SL1, SL2, SL3 y L2. Estas estructuras se pueden postular debido a que, aunque se encuentren en cadena sencilla, el NMIA no tiene acceso a ellas debido a la flexibilidad del ARN o a que se encuentran interaccionando con regiones distantes del propio IRES. Esta misma flexibilidad del ARN nos ayuda a explicar por qué nucleótidos que fueron pobremente atacados (color azul) se encuentran en regiones tan expuestas en la estructura del IRES *Hsp101* de maíz.

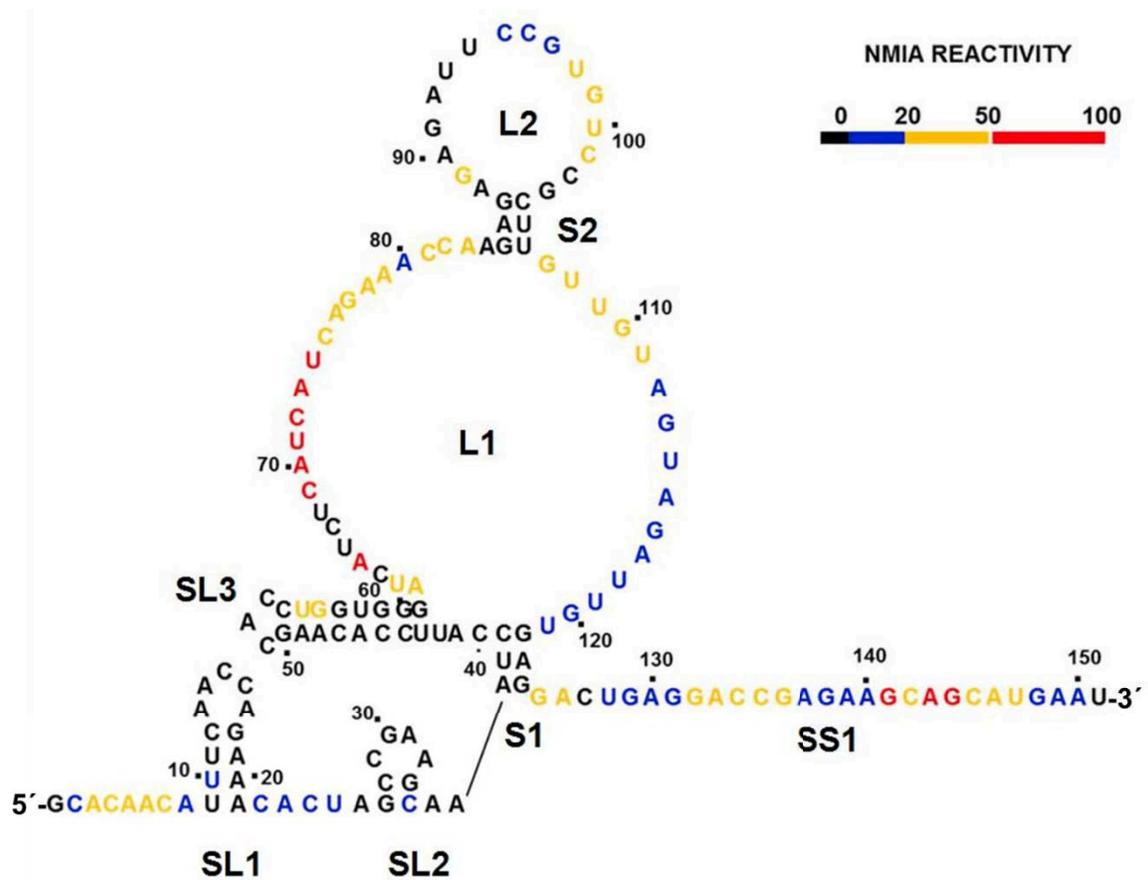


Figura 16: Estructura secundaria del IRES *Hsp101* de maíz. En la estructura secundaria se representan los nucleótidos en colores de acuerdo a los valores obtenidos en el histograma (figura 11b), los nucleótidos de color negro tienen un valor de 0 ya que no fueron atacados por el NMIA, los de color azul tienen un valor <20. Los nucleótidos de color amarillo tienen un valor <50 y los nucleótidos de color rojo tienen un valor >50.

Al llevar a cabo una comparación entre las 3 estructuras predichas por ambos métodos, podemos observar regiones estructurales que se conservan. La estructura SL1 de la figura 16 es similar a SL1 de la figura 14a. La estructura SL2 de la figura 16 es similar a SL1 de la figura 14b. La estructura SL3 de la figura 16 es similar a SL2 en las figuras 14a y 14b. Además, de que esta estructura en las 3 imágenes se encuentra insertada en una burbuja. Con respecto a las regiones en cadena sencilla de los extremos 5' y 3', en las tres imágenes son similares, lo que las vuelve diferente es el tamaño en el extremo 3' siendo de 43 nts, 59 nts y 25 nts en las figuras 14a, 14b y 16, respectivamente.

Una vez obtenida la estructura secundaria de la región funcional del IRES *Hsp101* de maíz, lo siguiente fue identificar cuáles son los factores de inicio de la traducción u otras proteínas que se unen al IRES para formar el complejo traduccional activo.

EI IRES *Hsp101* DE MAÍZ TIENE UN ÚNICO SITIO DE INICIO DE LA TRADUCCIÓN (*TOEPRINT*)

La interacción con eIFs, ITAFs o el ribosoma 40S es dependiente de la accesibilidad de los sitios de reconocimiento que estos elementos tengan con la estructura secundaria del IRES *Hsp101* de maíz. Por esto se llevó a cabo un único experimento de *toeprint* en donde se colocó el IRES *pBIC-Hsp101+1* para que interaccionara con el extracto proteico de RRL y así formar un complejo ARN-proteína. Al atacar este ARN con NMIA, la proteína que se una al ARN, protegerá los nucleótidos con los que esté interaccionando, evitando la modificación de los mismos. Para evitar la disociación de este complejo se utilizó el inhibidor Guanilil Imidodifosfato (GMPPDP), que impide la hidrólisis del GTP reprimiendo así la separación de los eIFs del ARNm (Figura 5). Para identificar el *toeprint* se utilizó el sistema de traducción RRL debido a que los ensayos traduccionales se llevaron a cabo en este sistema, iniciando eficientemente la traducción el IRES *Hsp101* de maíz (Dinkova *et al.* 2005).

Para identificar el *toeprint* o la formación del complejo 48S, en el gel de la izquierda de la figura 17 podemos observar el perfil de la retro transcripción al poner a interaccionar el ARN *pBIC-Hsp101+1* con RRL. En el carril 5 y 7 se observan las bandas correspondientes al *toeprint* o el sitio de paro de la retrotranscriptasa, lo que indica que un complejo proteínico de RRL se unió al IRES *Hsp101* de maíz formando el complejo 48S. Dicho complejo detuvo la función de la retrotranscriptasa 25 nucleótidos río abajo del codón AUG, el cual se representa como una línea de paro, que indica que el complejo 48S sirve de barrera y al llevarse a cabo la retrotranscripción la enzima choca con este complejo y detiene la elongación del

ARN. La señal de la banda que corresponde al *toeprint* que se encuentra en el carril 5 es más débil comparada con la señal del *toeprint* del carril 7. Con respecto al carril 6, la banda correspondiente al *toeprint* desaparece por completo, esto puede deberse a el tratamiento de fenol que se dio al complejo formado entre ARN-proteína (carril 5 y 6), separando el complejo proteínico del ARN del IRES. Además, en el gel no se observa la presencia de otro sitio de paro o *toeprint*, lo que nos indica que no existe otro codón de inicio o alguna estructura en el ARN del IRES *Hsp101* de maíz, que pueda iniciar la traducción dirigida por este IRES.

Con el mismo experimento de *toeprint* podemos identificar áreas de ARN pertenecientes al IRES *Hsp101* de maíz que se encuentran protegidas por proteína de RRL. Al identificar estos nucleótidos de interacción en el experimento de *toeprint* (Figura 17 izquierda) y tener el diseño de la estructura secundaria del IRES *Hsp101* de maíz (Figura 17 derecha), se puede realizar un modelo indicando las regiones del IRES a las que se unan algún tipo de proteína. En el carril 7 del gel de la izquierda en la figura 17 podemos observar las áreas que fueron protegidas por alguna proteína ya que no fueron atacadas por el NMIA, en comparación con el carril 9 donde se muestra el patrón de bandeo correspondiente al ARN desnudo (sin RRL). Estas áreas fueron identificadas en la estructura secundaria del IRES *Hsp101* de maíz en donde se pueden observar dos áreas principales de interacción. La primer área protegida se encuentra entre los nucleótidos 65 a 85, los cuales forman parte de la región L1, dicha área se encuentra encerrada en un círculo de color verde. La segunda área protegida se encuentra entre los nucleótidos 100 hasta el codón de inicio AUG, el área de interacción forma parte de las regiones L1, L2, S1, S2 y SS1, dicha área se encuentra encerrada en un círculo azul. Además, en esta área se encuentra la interacción correspondiente a la formación del *toeprint*. Por último, se puede identificar una tercera área entre los nucleótidos 1 a 21, los cuales forman parte de SL1. En esta área no se pudo identificar una zona de protección para el NMIA (Carril 7), sin embargo, se considera de relevancia debido a la pérdida de función que sufre el IRES *Hsp101* de maíz al cortar los primeros 17 nucleótidos (Figura 9c y 9d). Dicha área se encuentra encerrada en un círculo color morado.

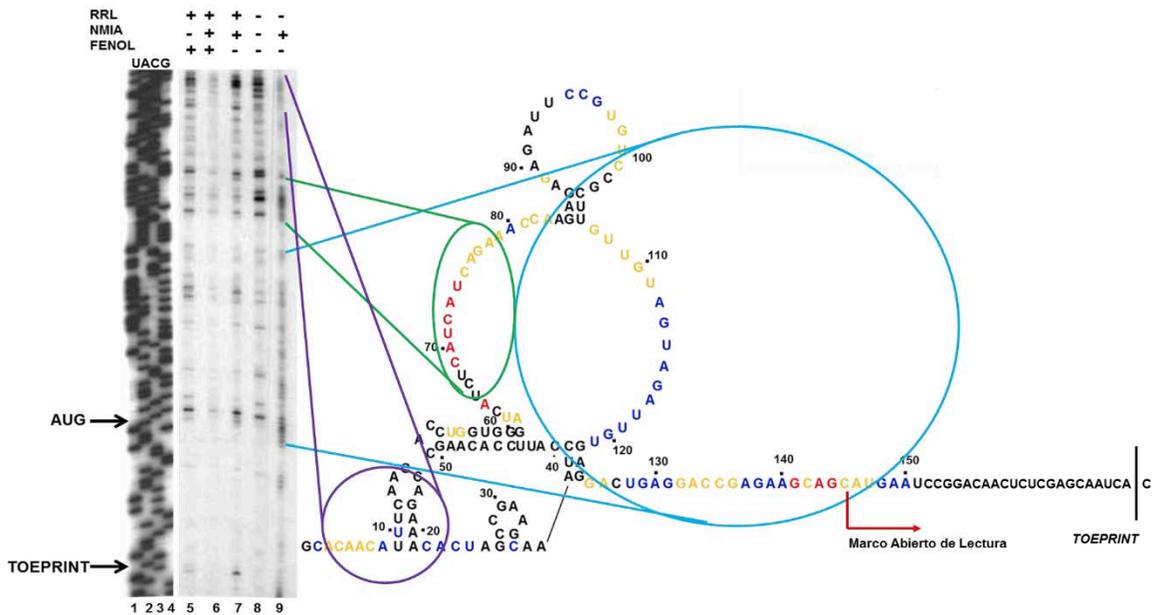


FIGURA 17: Gel desnaturalizante de la retro transcripción de *pBIC-Hsp101+1* con lisado de reticulocito de conejo tratado con NMIA. En los primeros cuatro carriles se muestra el patrón que presenta la secuencia de *pBIC-Hsp101+1*. En el carril 5 se muestra la amplificación del ARN *pBIC-Hsp101+1* unido a RRL y no fue tratado con NMIA. En el carril 6 se muestra la amplificación que se realizó al ARN *pBIC-Hsp101+1* unido a RRL y expuesto a NMIA. Carril 7 se muestra la amplificación que se realizó al ARN *pBIC-Hsp101+1* unido a RRL y expuesto a NMIA. En el carril 8 se muestra la amplificación del ARN *pBIC-Hsp101+1* sin ser tratado con NMIA. En el carril 9 se muestra la amplificación del ARN *pBIC-Hsp101+1* tratado con NMIA. En la derecha se muestra la estructura secundaria del IRES *Hsp101* de maíz y en círculos se observa las regiones que fueron protegidas por RRL.

Al identificar los posibles sitios de unión de algún elemento que forma parte del complejo traduccional activo del IRES *Hsp101* de maíz, el siguiente paso fue identificar qué proteínas pueden formar parte de este complejo traduccional.

AL IRES *Hsp101* DE MAÍZ SE LE UNEN UN PÉPTIDO DE ~50 KDa Y UNO DE ~75 KDa

Al estar identificados los posibles sitios de unión de proteínas de RRL al IRES *Hsp101* de maíz, el siguiente paso fue identificar cuáles son las proteínas que se unen directamente al ARN. Para este fin se llevó a cabo un *UV-crosslink* entre el IRES *Hsp101* de maíz y extracto de RRL, debido a que los experimentos de traducción y *toeprint* (Figuras 9 y 17) fueron realizados con este extracto proteico. Para llevar a cabo el *crosslink* fueron sintetizados con la T7 RNA polimerasa los ARNs *pGEM210*, *pGEM-Hsp101+1*, *pGEM-Hsp101Δ17* y *pGEM-Hsp101Δ50*, utilizando como molde las construcciones dentro del vector de clonación *pGEM-T Easy* (Figura 26 las cuales corresponden a las construcciones dentro de pBIC en la figura 9a y 9b). Estos ARN fueron marcados radioactivamente al utilizar UTP γ [P³²]. Las interacciones entre los ARNs y RRL fueron expuestas a luz ultravioleta para que se llevara a cabo un entrecruzamiento. Posterior a esta interacción se agregó RNAsa A para degradar el ARN que no estuviera protegido por alguna proteína. Por último, estas muestras se corrieron en gel de acrilamida para poder observar las bandas radioactivas que pueden representan algún péptido que se unió al IRES *Hsp101* de maíz.

En la figura 18 se muestra el experimento de *crosslink* en condiciones dependientes de *cap* (Figura 18a) e independiente de *cap* (Figura 18b), en ambas imágenes se puede observar la presencia de dos bandas, una de ~75 KDa y la otra de ~50 KDa, lo cual indica que al menos se están uniendo al ARN del IRES dos proteínas que correspondientes a esos tamaños. Las bandas correspondientes a ~75 KDa y ~50 KDa se encuentran presentes en todos los carriles, lo que indica que están unidas a los IRES *pGEM210*, *pGEM-Hsp101+1*, *pGEM-Hsp101Δ17* y *pGEM-Hsp101Δ50*. Además, ambas bandas se encuentran interaccionando tanto en condiciones dependientes de *cap* como en condiciones independientes de *cap*. Por lo cual las interacciones de estas proteínas podrían estarse llevando a cabo del nucleótido 51 hasta el codón AUG. La posible región de interacción se encuentra en

la zona más expuesta del IRES lo cual podría indicar la importancia de esta región para la funcionalidad del IRES *Hsp101* de maíz.

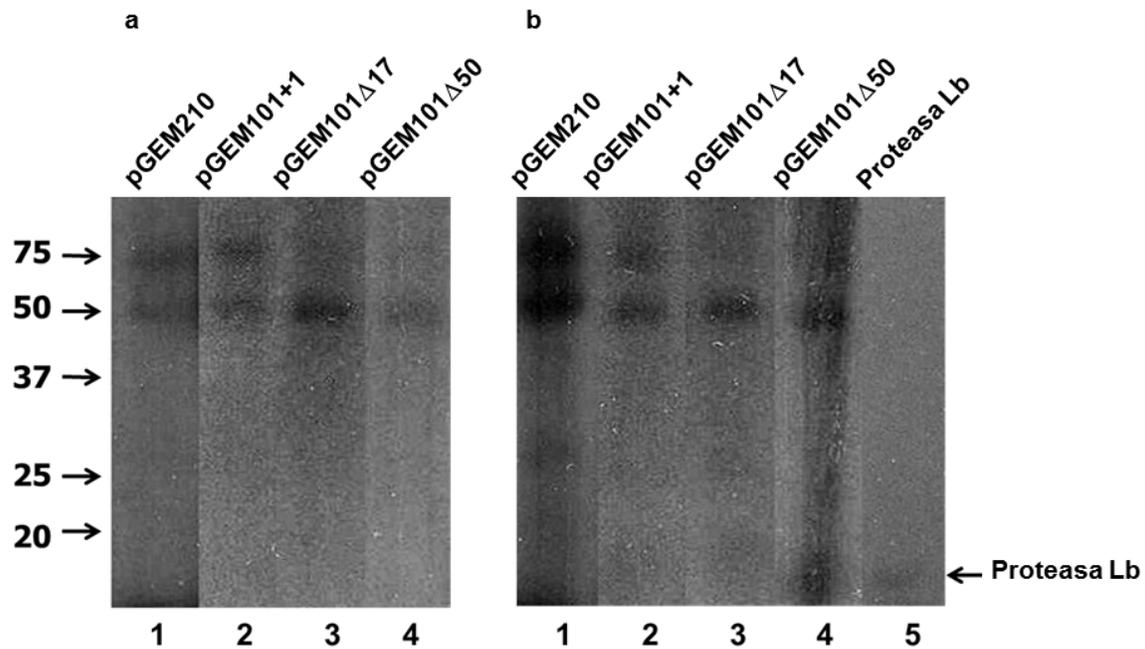


FIGURA 18: *Crosslink* del IRES *Hsp101* de maíz con RRL. En la izquierda (a) se muestra la interacción en condiciones dependiente de *cap*. Carril 1: Interacción de pGEM210 (pBIC-5) con RRL; Carril 2: Interacción de *pGEM-Hsp101+1* con RRL; Carril 3: Interacción de *pGEM-Hsp101Δ17* con RRL y Carril 4: Interacción de *pGEM-Hsp101Δ50*. En la derecha se muestra la interacción en condiciones independientes de *cap* (b) Carril 1: Interacción de *pGEM210* (pBIC-5) con RRL; Carril 2: Interacción de *pGEM-Hsp101+1* con RRL; Carril 3: Interacción de *pGEM-Hsp101Δ17* con RRL; Carril 4: Interacción de *pGEM-Hsp101Δ50* y Carril 5: Proteasa Lb.

El siguiente paso fue identificar las proteínas que se encuentran en las bandas correspondientes a ~50 kDa y ~75 kDa que se observan en la imagen de *crosslink* (figura 18), para lo cual, purificamos el complejo que se está uniendo al IRES *Hsp101* de maíz e identificamos las proteínas que están interaccionando con el IRES.

AISLAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS DE LISADO DE RETICULOCITO DE CONEJO UNIDAS AL IRES *Hsp101* DE MAÍZ EN CONDICIÓN DEPENDIENTE DE *CAP*

Para identificar las proteínas que se unen al IRES *Hsp101* de maíz se realizó una purificación de los complejos proteicos de RRL unidos a las construcciones de *Hsp101* de maíz en condiciones dependientes de *cap*. Los ARNs que se utilizaron fueron *pGEM210*, *pGEM101+1*, *pGEM-101Δ17* y *pGEM101Δ50* correspondientes a los utilizados en el experimento de *UV-crosslink*. También, se utilizaron los ARNs del IRES funcional *pBIC-Hsp101+1* en secuencia sentido (*pBIC-Hsp101+1 sen*) y antisentido (*pBIC-Hsp101+1 as*). Con este objetivo, a los ARNs se les agregó una cola poli-adenilada utilizando la poli(A) polimerasa para purificar los complejos IRES-RRL por medio de la unión a oligo-dT. Los ARNm poliadenilados fueron colocados en una interacción con oligo-dT. Posteriormente, la resina fue lavada para eliminar el ARNm que no se unió. Después, fue colocado extracto de RRL para que se uniera al ARN poliadenilado del IRES que se encontraba unido al oligo-dT y así formar el complejo traduccional. También fue agregado ARN total de maíz como competidor. Los complejos fueron lavados para eliminar la proteína y el ARN que no formó algún complejo PROTEÍNA-IRES *Hsp101*-OLIGO-DT y por último las muestras fueron corridas en geles de poliacrilamida.

En la figura 19 se muestran los patrones de bandeo de las interacciones obtenidas entre los ARNs del IRES *Hsp101* de maíz con proteínas de RRL. Cada banda equivale a por lo menos una proteína que puede estar interaccionando con el ARN de algún IRES de *Hsp101* que fue utilizado. Al comparar los carriles 2, 3, 4, 5, 6 y 7, donde fue colocado algún ARN del IRES *Hsp101*, no se observa ninguna diferencia con el control (carril 8), donde no se incorporó ARN. Este resultado nos indica que se están uniendo proteínas de manera inespecífica a la resina de oligo-dT, por lo cual no se puede considerar a alguna de estas proteínas pertenecientes al complejo traduccional del IRES *Hsp101* de maíz.

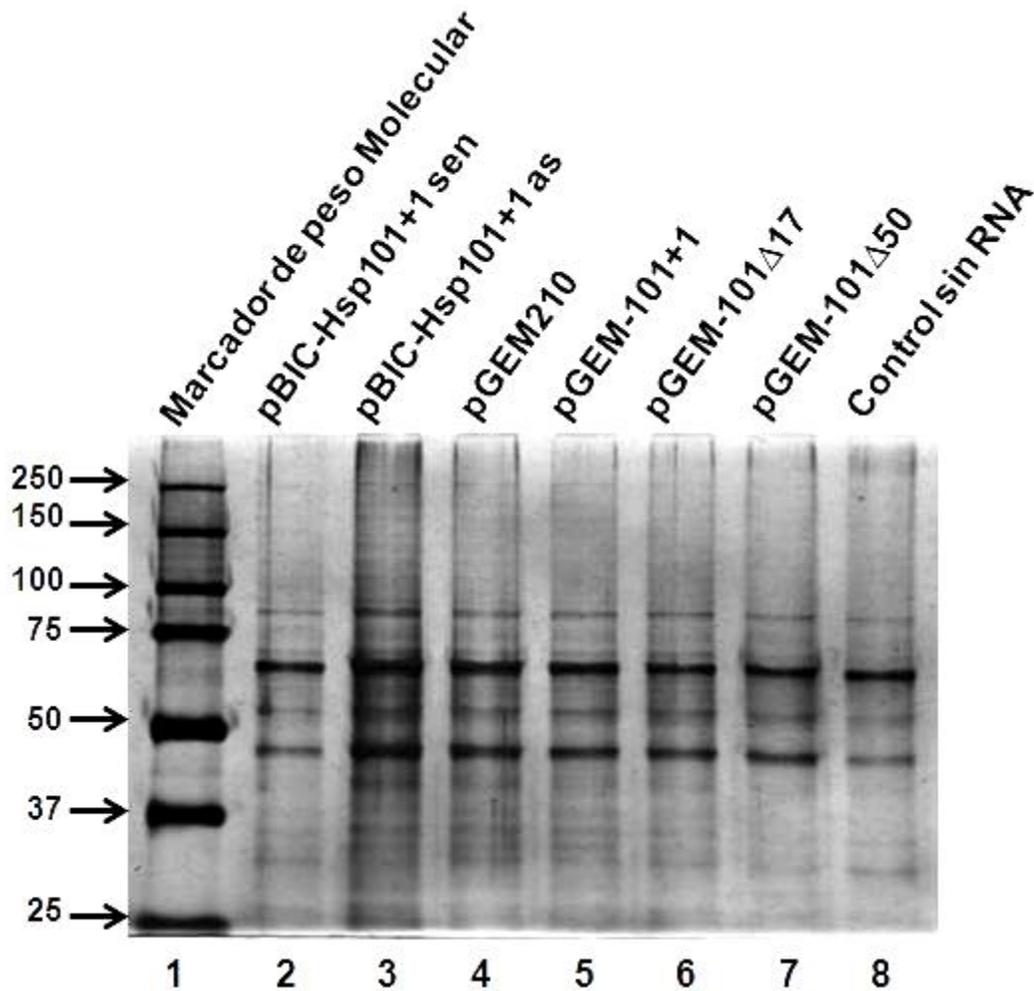


FIGURA 19: interacción de los complejos proteicos formados con *Hsp101* de maíz. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2; bandas del complejo de *pBIC-Hsp101+1* con RRL; Carril 3: bandas del complejo de *pBIC-Hsp101+1* anti sentido con RRL; Carril 4: bandas del complejo de pGEM210 con RRL; Carril 5: bandas del complejo de *pGEM-Hsp101+1* con RRL; Carril 6: bandas del complejo *pGEM-Hsp101Δ17* con RRL; Carril 7: bandas del complejo *pGEM-Hsp101Δ50* con RRL, Carril 8: control sin ARN.

El siguiente paso fue purificar las proteínas que se unen al IRES *Hsp101* de maíz en condiciones independientes de *cap* o dependientes de IRES.

AISLAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS DE LISADO DE RETICULOCITO DE CONEJO UNIDAS AL IRES *Hsp101* DE MAÍZ EN CONDICIÓN INDEPENDIENTE DE *CAP*

Debido a que los perfiles de purificación de las proteínas que se unieron al IRES *Hsp101* no mostraron alguna diferencia en condiciones dependientes de *cap*, se llevó a cabo una repetición para identificar qué proteínas de RRL se unen al IRES *Hsp101* de maíz en condiciones independientes de *cap*. La purificación se llevó a cabo con los ARNs *pGEM210*, *pGEM101+1*, *pGEM-101Δ17* y *pGEM101Δ50*, *pBIC-Hsp101+1 sen* y *pBIC-Hsp101+1 as* y de la misma manera que en condiciones dependientes de *cap* (arriba mencionado). La única diferencia es que para lograr la condición independiente de *cap*, el sistema de RRL se preincubó con la proteasa Lb. Así mismo, a fin de poder purificar los complejos unidos a las construcciones de *Hsp101* de maíz, se les agregó a dichas construcciones una cola de poli(A) para poder ser purificados por medio del oligo-dT.

En la figura 20 en el carril 2 se identificaron dos bandas que indican que por lo menos dos péptidos se unen al IRES *Hsp101* de maíz correspondientes a ~75 KDa y ~50 KDa (flechas rojas), las cuales coinciden en tamaño con las bandas identificadas en la figura 18 lo cual refuerza la idea de que al menos estas dos proteínas forman parte del complejo traduccional, además de que tienen contacto directo con el ARNm. Ninguna de las dos bandas se localizó en otro ARN, ni siquiera en *pGEM-Hsp101+1* (figura 20 carril 5) lo cual puede indicar que los cistrones CAT y LUC (Figura 9b) ayudan a la estabilidad de la estructura secundaria del IRES *Hsp101* de maíz, a diferencia de los ARNs que fueron transcritos de las construcciones dentro del vector *pGEM T-Easy* (ya que no cuentan con algún cistrón). A diferencia de la figura 18, donde las dos bandas fueron localizadas en todas las construcciones, este resultado puede deberse por la mayor sensibilidad de la muestra marcadas con [P^{32}] siendo más fácilmente detectable.

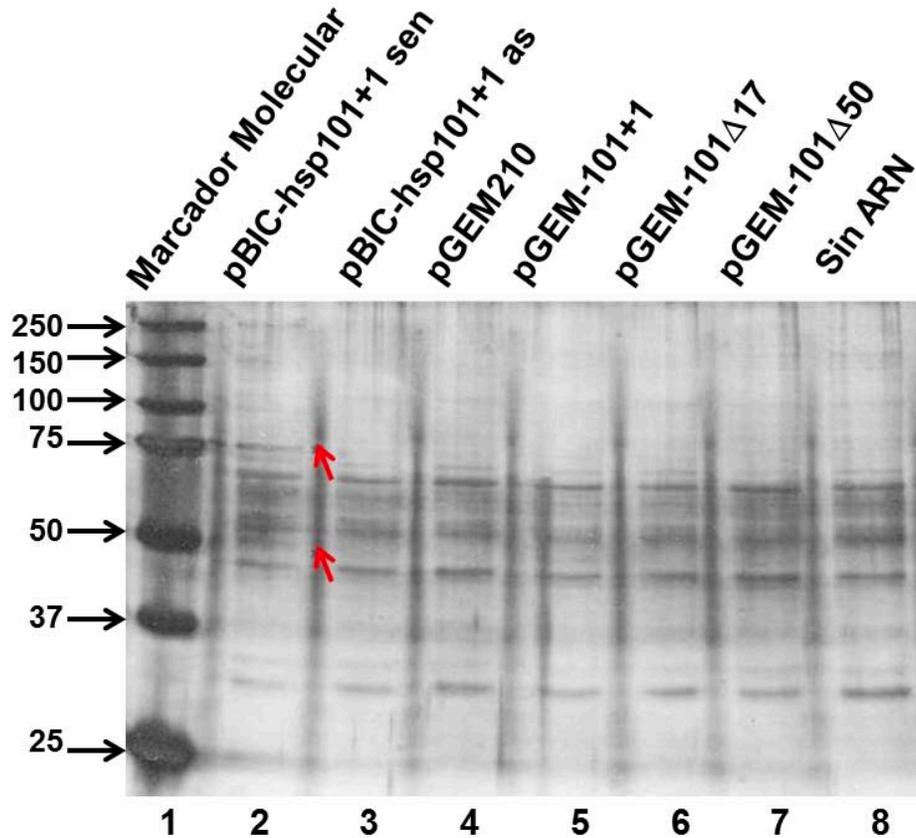


FIGURA 20: Interacción de los complejos proteicos formados con *Hsp101* de maíz. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2; bandas del complejo de *pBIC-Hsp101+1* con RRL; Carril 3: bandas del complejo de *pBIC-Hsp101+1* anti sentido con RRL; Carril 4: bandas del complejo de *pGEM210* con RRL; Carril 5: bandas del complejo de *pGEM-Hsp101+1* con RRL; Carril 6: bandas del complejo *pGEM-Hsp101Δ17* con RRL; Carril 7: bandas del complejo *pGEM-Hsp101Δ50* con RRL, Carril 8: control sin ARN y Carril 9; Proteína total de RRL.

El siguiente paso fue identificar el péptido o los péptidos que se encuentran en las bandas de ~75 kDa y ~50 kDa, y están formando parte del complejo traducción del IRES *Hsp101* de maíz.

LA PROTEÍNA HSP90 FORMA PARTE DEL COMPLEJO TRADUCCIONAL ACTIVO DEL IRES *Hsp101* DE MAÍZ

Para saber que proteínas están formando parte del complejo traduccional del IRES *Hsp101* de maíz. Las bandas que corresponden a ~75 KDa y ~50 KDa (Figura 20 carril 2, flechas rojas) fueron secuenciadas en *Quebec Genomics Center* para que los péptidos fueran identificados por espectrometría de masas (LS/MS/MS), en esta técnica se mide la relación masa-carga (m/z) de cada péptido al ser fragmentados, la fragmentación se produce en el enlace peptídico de los aminoácidos que constituyen el péptido, produciendo una serie de fragmentos de iones llamados b-y, esta serie de iones b-y (espectro MS/MS) generan la representación de la secuencia peptídica, una vez hecho esto, se coincide la secuencia de péptidos con una secuencia ya conocida en una base de datos. Básicamente, este software compara las masas de los fragmentos teóricos calculados a partir de las secuencias de bases de datos a los observados experimentalmente. Esto permite determinar primero la secuencia del péptido y entonces inferir que las proteínas estaban presentes en la muestra de la lista de péptidos observados. En la identificación de la banda de ~75 KDa se obtuvieron 4 péptidos (figura 21 en amarillo), lo que hizo posible identificarla como la chaperona molecular HSP90 aa1 (Figura 21). Recordemos que la proteína purificada del gel proviene de un extracto total de RRL. Sin embargo, la similitud de las proteínas HSP90 AA1 de conejo, ratón, humano y de maíz (Figura 29) es muy elevada.

AOPJ91 (100%), 65,896.2 Da
AOPJ91_MOUSE Hsp90aa1 protein (Fragment) [Mus musculus (Mouse) [10090]]
4 unique peptides, 4 unique spectra, 5 total spectra, 54/565 amino acids (10% coverage)

| | | | | | | |
|-------------------|--------------------|------------|-------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| MPEETQTQDQ | PMEEEEEVETF | AFQAEIAQLM | SLIINTFYSN | KEIFLRELIS | NSSDALDKIR | |
| YESLTDPSKL | DSGKELHINL | IPSKQDR | TLT | IVDTGIGMTK | ADLINNLGTI | AK SGTKAFME |
| ALQAGADISM | IGQFGVGFYS | AYLVAEKVTV | ITKHNDDDEQY | AWESSAGGSF | TVRTDTGPEPM | |
| GRGTKVILHL | KEDQTEYLEE | RRIKEIVKHH | SQFIGYPITL | FVEKERDKEV | SDDEAEEKEE | |
| KEEEEKEKEEK | ESDDKPEIED | VGSDEEEEEK | KDGDKKKKKK | IKEYIDQEE | LNKTKPIWTR | |
| NPDDITNEEY | GEFYK SLTND | WEEHLAVKHF | SVEGQLEFRA | LLFVPRRAPF | DLFENRKKKN | |
| NIKLYVRRVF | IMDNCEELIP | EYLNFI | GVV | DSEDLPLNIS | REMLQQSKIL | KVIRKNLVKK |
| CLELFTELAE | DKENYKKFYE | QFSKNIKLGI | HEDSQNRKKL | SELLRYTSA | SGDEMVSLLKD | |
| YCTRMKENQK | HIYFITGETK | DQVANSAFVE | RLRKHGLEVI | YMIEPIDEYC | VQQLKEFEGK | |
| TLVSVTKEGL | ELPEDEEEKK | KKKKK | | | | |

Figura 21: Secuencia de la proteína que se une al IRES *Hsp101* de maíz. Se secuenció la banda de 75KDa de la figura 20 (flecha), la cual corresponde a la chaperona molecular HSP90 aa1, la cual está formando el complejo traduccional de *Hsp101* de maíz.

En la identificación de la chaperona molecular HSP90 se obtuvieron otras proteínas en las bandas de ~75 KDa y ~50 KDa, los péptidos como se muestra en la figura 27 (Anexo II). Sin embargo, no se le dio importancia debido a que corresponden a proteínas de contaminación como son distintas queratinas y varios péptidos no identificados. Las demás proteínas identificadas se muestran en la tabla 1, dichas proteínas participan en diversas vías metabólicas y no existe reporte de que participen en el proceso traduccional de algún ARNm, por esta razón podemos descartarlas como algún posible ITAF.

Tabla 1: Péptidos identificados en la secuenciación de las bandas de ~75 KDa y ~50 KDa.

| PROTEÍNA | FUNCIÓN |
|-------------------|--|
| Ubiquitina b | Ubiquitinación de proteínas para su degradación por la vía del proteosoma. |
| Glucógeno sintasa | Síntesis de glucógeno. |
| Cadena C de IgG | Anticuerpos. |
| Annexina A3-like | Proteína de unión a fosfolípidos dependiente de calcio. |

Con respecto a la banda de ~50 KDa no se pudo identificar una posible proteína que participe en la traducción del IRES *Hsp101* de maíz (figura 28).

Una vez identificada la proteína HSP90 lo siguiente fue identificar la importancia que esta proteína tiene en el inicio de la traducción dependiente del IRES *Hsp101* de maíz.

SI SE INHIBE LA PROTEÍNA HSP90 NO SE LLEVA A CABO EL INICIO DE LA TRADUCCIÓN POR EL IRES *Hsp101* DE MAÍZ

La secuenciación de las proteínas que interaccionan con el IRES *Hsp101* de maíz, permitió identificar a la banda de ~75 KDa como la chaperona molecular HSP90 (Figura 21). La proteína HSP90 es una chaperona molecular esencial que está involucrada en resistencia a estrés, en transducción de señales y control del

ciclo celular, además interviene en el plegamiento, degradación y transporte de proteínas. La proteína HSP90 es un factor ancestral conservado presente en todos los organismos incluyendo plantas y animales (Chen *et al.* 2006). La familia de la proteína HSP90 se encuentra altamente conservada entre distintos organismos (hongos, plantas y animales), reportándose una homología del 40% en toda su secuencia y aumentando la homología hasta en un 70% entre plantas y animales (Gupta *et al.* 1995), pudiendo tener funciones similares en todos los organismos que la presentan. En la figura 29 (Anexo III) se muestra un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las proteínas HSP90 de humano, maíz, conejo y ratón, mostrando una alta similitud entre su secuencia en estas especies. Además, el inhibidor Radicol interacciona específicamente con la región amino (N) de HSP90 compitiendo con la unión del ATP, ocasionando la pérdida de la función de esta proteína, siendo el Radicol un inhibidor específico para HSP90s de distintas especies.

Con el fin de evaluar de manera funcional la importancia de la proteína HSP90 en la formación del complejo traduccional activo del IRES *Hsp101* de maíz, se hicieron traducciones utilizando el sistema vegetal WGE. Para inhibir la traducción dependiente de *cap* fueron depletados los factores eIF4E y eIF4E, de esta manera no se puede llevar a cabo la unión a la estructura *cap* de los ARNm. Como inhibidor de HSP90 fue agregado Radicol, un inhibidor específico para la familia de las proteínas de HSP90. Además, se realizaron traducciones *in vitro*, agregando la proteína recombinante HSP90 de humano para analizar si aumenta la eficiencia traduccional del IRES *Hsp101* de maíz. Se utilizó HSP90 de humano comercial (Biomart) debido a su alto grado de conservación entre plantas y animales (Gupta *et al.* 1995) y a su alta similitud entre las secuencias (Figura 29). En la figura 22 se observa la traducción independiente de *cap* del ARN de *pBIC-Hsp101+1* en donde únicamente se expresa el reportero LUC, en los carriles 3 y 4 fue agregado Radicol y Anti-HSP90 respectivamente, ambos como inhibidores de la chaperona molecular HSP90. En ambos casos la traducción fue inhibida ya que no se observa las bandas correspondientes a LUC, donde su inicio de la traducción es iniciado de

manera dependiente de IRES. Al adicionar HSP90 al sistema de traducción, no se observó un cambio significativo en la intensidad de la banda de LUC (carril 6), lo cual hace suponer que el sistema de traducción WGE contiene la cantidad suficiente de HSP90 para llevar a cabo la formación del complejo traduccional activo, ya que un aumento en la cantidad no afecta la eficiencia traduccional. Estos resultados nos indican que la chaperona molecular HSP90 es esencial para la formación del complejo de traducción activo.

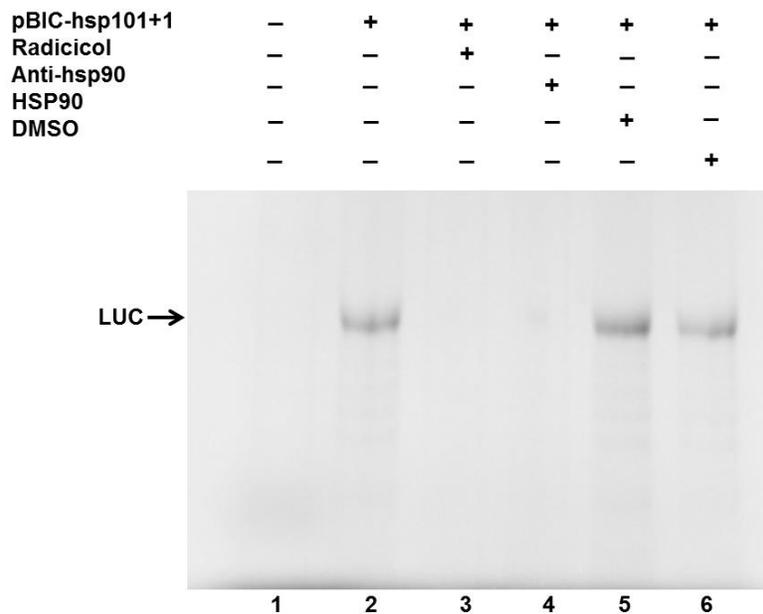


Figura 22: Efecto de HSP90 en el inicio de la traducción de *pBIC-Hsp101+1*. Carril 1: traducción control donde no se agregó ARN de *pBIC-Hsp101+1*, Carril 2: traducción control de *pBIC-Hsp101+1*. Carril 3: Traducción de *pBIC-Hsp101+1* con Radicol como inhibidor de HSP90, Carril 4; Traducción de *pBIC-Hsp101+1* con ab-HSP90 como inhibidor de HSP90, Carril 5; Traducción de *pBIC-Hsp101+1* con HSP90 y Carril 6; Traducción de *pBIC-Hsp101+1* con DMSO.

Con los resultados anteriores la proteína HSP90, al no ser un factor de inicio de la traducción, podría estar participando como un ITAFs del IRES *Hsp101* de maíz. Además, queda la duda de si otro factor reportado en la formación del complejo traduccional activo de otro IRES participa en la formación del complejo traduccional del IRES *Hsp101* de maíz.

EL IRES *Hsp101* DE MAÍZ TIENE PREFERENCIA POR EL eIFiso4G SOBRE eIF4G

Se ha reportado que algunos IRES virales y celulares interactúan con eIF4G para la formación del complejo traduccional activo, por lo cual se realizaron traducciones en el sistema vegetal WGE depletado de los factores eIF4E, eIFiso4E, eIF4G y eIFiso4G con resina m⁷GTP-sefariosa. El sistema de RRL no puede ser utilizado, debido a que la preparación del sistema independiente de *cap*, la proteasa Lb corta a eIF4G, quedando las regiones amino y carboxilo en el sistema. Para realizar las traducciones de *pBIC-Hsp101+1* y evaluar el efecto de eIF4G y eIFiso4G en el inicio de traducción de manera dependiente de IRES, al sistema WGE depletado, le fueron reincorporados los factores recombinantes eIF4G ó eIFiso4G de trigo, para observar con qué factor es más eficiente la traducción dirigida por el IRES *Hsp101* de maíz (Dinkova, *et al.*, 2005).

En la figura 23a se observa la traducción dirigida por el IRES *pBIC-Hsp101+1* donde se traduce LUC de manera independiente de *cap*. En el carril 3 donde no fue agregado ningún factor se observa la banda correspondiente a LUC. Su aparición se explica debido a que eIF4G y eIFiso4G se encuentran en exceso y no se eliminan por completo durante el proceso de depletado con la m⁷GTP-sefariosa. La gráfica de la figura 23b muestra los resultados densitométricos de las bandas correspondientes al gel de la imagen 23a, demostrando que al adicionar el factor eIF4G no existe un cambio significativo en la eficiencia traduccional del IRES *Hsp101* de maíz (figura 23a carril 4). Por el contrario, al adicionar eIFiso4G la eficiencia traduccional aumenta en un 50% (figura 23a carril 5), este mismo resultado se obtiene al adicionar ambos factores (figura 23a carril 6). Sin embargo, este cambio se puede deber en su totalidad a eIFiso4G. Para saber si estos valores son estadísticamente significativos se llevó a cabo un análisis ANOVA con el software PRISM (Anexo IV) mostrando que existe un grado de significancia entre el control y eIFiso4G, además de formar dos grupos, el primero con el control + y eIF4G, y el segundo formado por eIFiso4G y eIF4G + eIFiso4G. Con lo cual se fortalece la

importancia de eIFiso4G sobre eIF4G. Estos resultados sugieren que el IRES *Hsp101* de maíz posee una preferencia por eIFiso4G sobre eIF4G para la formación del complejo traduccional activo.

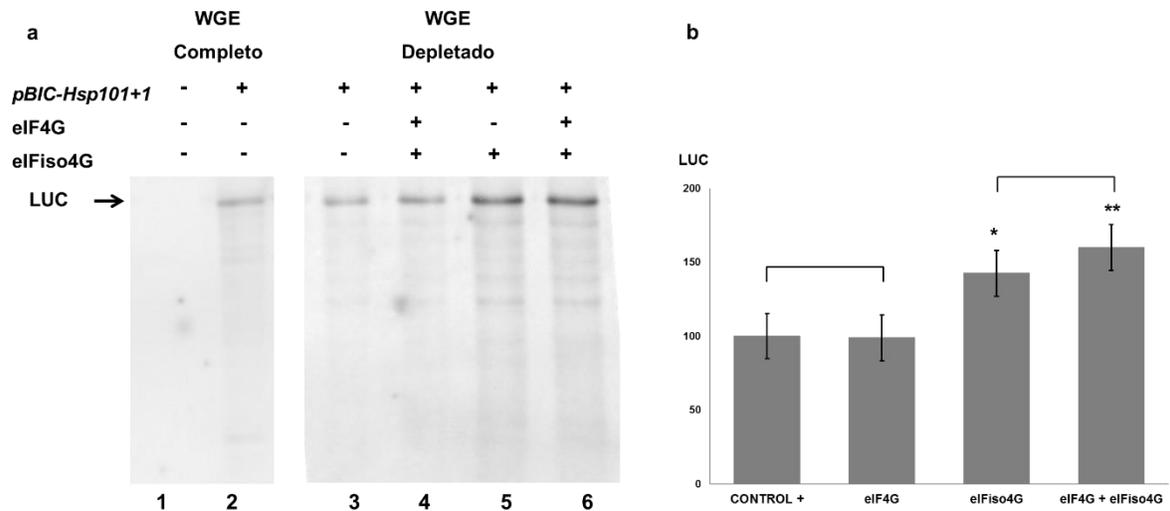


Figura 23: Traducción de *pBIC-Hsp101+1* en un sistema depletado de factores de inicio de la traducción eIF4E, eIFiso4E, eIF4G y eIFiso4G. a) Traducción de *pBIC-Hsp101+1*. Carril 1: Control negativo en un sistema WGE completo. Carril 2: Control positivo en un sistema WGE completo. Carril 3: traducción control de *pBIC-Hsp101+1* sin factores recombinantes. Carril 4: Traducción de *pBIC-Hsp101+1* reincorporando eIF4G recombinante. Carril 5: Traducción de *pBIC-Hsp101+1* reincorporando eIFiso4G recombinante. Carril 6; Traducción de *pBIC-Hsp101+1* reincorporando los factores eIF4G y eIFiso4G recombinantes. b) Grafica donde se muestra la producción promedio y la desviación estándar de LUC, además de los grados de significancia con la prueba ANOVA.

La eficiencia traduccional del IRES *Hsp101* de maíz es mayor cuando al sistema de traducción se le agrega el factor eIFiso4G, que cuando se le agrega el factor eIF4G, por lo cual, el siguiente paso es identificar en qué nucleótidos de la estructura secundaria del IRES *Hsp101* de maíz se pueden estar uniendo ambos factores, junto con el posible ITAF HSP90, además, en el caso de eIF4G y eIFiso4G al ser isoformas podrían unirse en el mismo sitio dentro del IRES *Hsp101* de maíz.

SIMILITUD ENTRE SECUENCIAS 5'UTR DE DISTINTAS *Hsp101* DE GRAMÍNEAS

Los elementos IRES no conservan similitud entre sus secuencias nucleotídicas. Sin embargo, en IRES virales se ha reportado que poseen motivos conservados de 4 – 6 nucleótidos, los cuales son muy importantes en la interacción con elementos que forman el complejo traduccional activo de cada IRES. Por este motivo se llevó a cabo un alineamiento para saber si el IRES *Hsp101* de maíz posee motivos conservados con otras secuencias 5'UTR de ARNm que codifican a la proteína HSP101 de distintas especies de gramíneas.

En la figura 24 se muestra el alineamiento que se realizó entre las secuencias 5'UTR de los mensajes de *Hsp101* de maíz (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum bicolor*), arroz (*Oriza sativa*), trigo (*Triticum aestivum*) y cebada (*Hordeum vulgare*). En el alineamiento se puede observar que existe muy poca similitud entre las secuencias 5'UTR. Sin embargo, es posible identificar 4 regiones conservadas. La primera se encuentra de los nucleótidos 46 a 55, la segunda de los nucleótidos 121 a 128, la tercera de los nucleótidos 138 a 141 y la cuarta de los nucleótidos 146 a él codón de inicio AUG. Además, de la poca similitud entre secuencias de la figura 24 queda la posibilidad de que tengan alguna similitud entre estructuras secundarias. Sin embargo, para identificar esto, se tiene que llevar a cabo análisis funcionales y estructurales para cada una de las secuencias mencionadas. En el mismo alineamiento no se identificó una conservación en los primeros 17 nucleótidos del extremo 5'UTR, los cuales, al ser eliminados, ocasionan la pérdida de la funcionalidad en las construcciones *pBIC-Hsp101 Δ 17* y *pBIC-Hsp101 Δ 50*. Sin embargo, este resultado no puede ser comparado por completo, debido a que las demás secuencias no fueron reportadas como secuencias completas como en el caso de la secuencia 5'UTR de maíz.

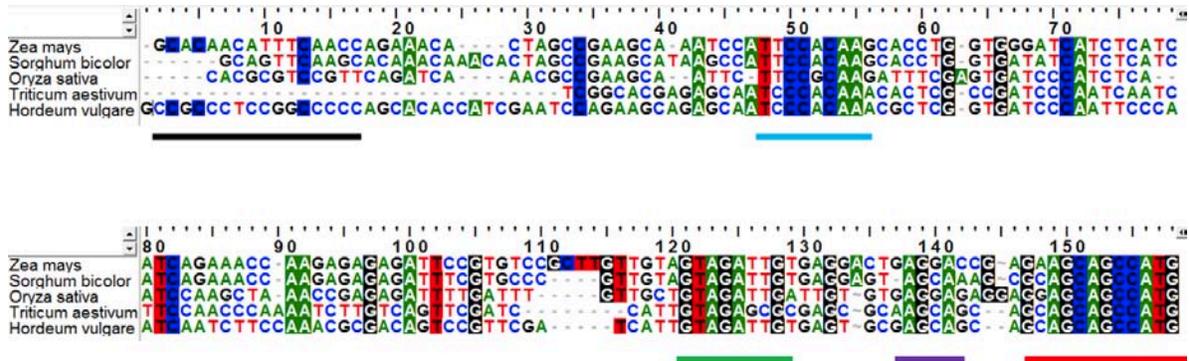


Figura 24: Alineamiento de secuencias 5'UTRs de *Hsp101*. Se alinearon las secuencias de maíz, sorgo, arroz, trigo y cebada, en la parte inferior de las secuencias conservadas se muestra una línea de color para poder ser identificadas.

Al identificar las regiones conservadas del IRES *Hsp101* de maíz con otras regiones 5'UTR de *Hsp101* de gramíneas, estas regiones fueron superpuestas en la estructura secundaria del IRES *Hsp101* de maíz. En la figura 25 dentro de la estructura secundaria funcional del IRES *Hsp101* de maíz, cada región conservada del alineamiento de la figura 24 puede ser identificada por el color del círculo, lo cual puede suponer que existen al menos 4 regiones que podrían estar participando en el reclutamiento de algún eIFs, un ITAFs o la subunidad ribosomal 40S. Además, si se sobrepone la región protegida por alguna proteína de RRL (figura 17, círculo azul), es la misma región donde se localizan 3 posibles sitios conservados en la secuencia, siendo las regiones L1 y SS1 los sitios más expuestos y de mayor flexibilidad en donde posiblemente alguna proteína como HSP90, eIF4G así como eIFiso4G tengan algún sitio de interacción.

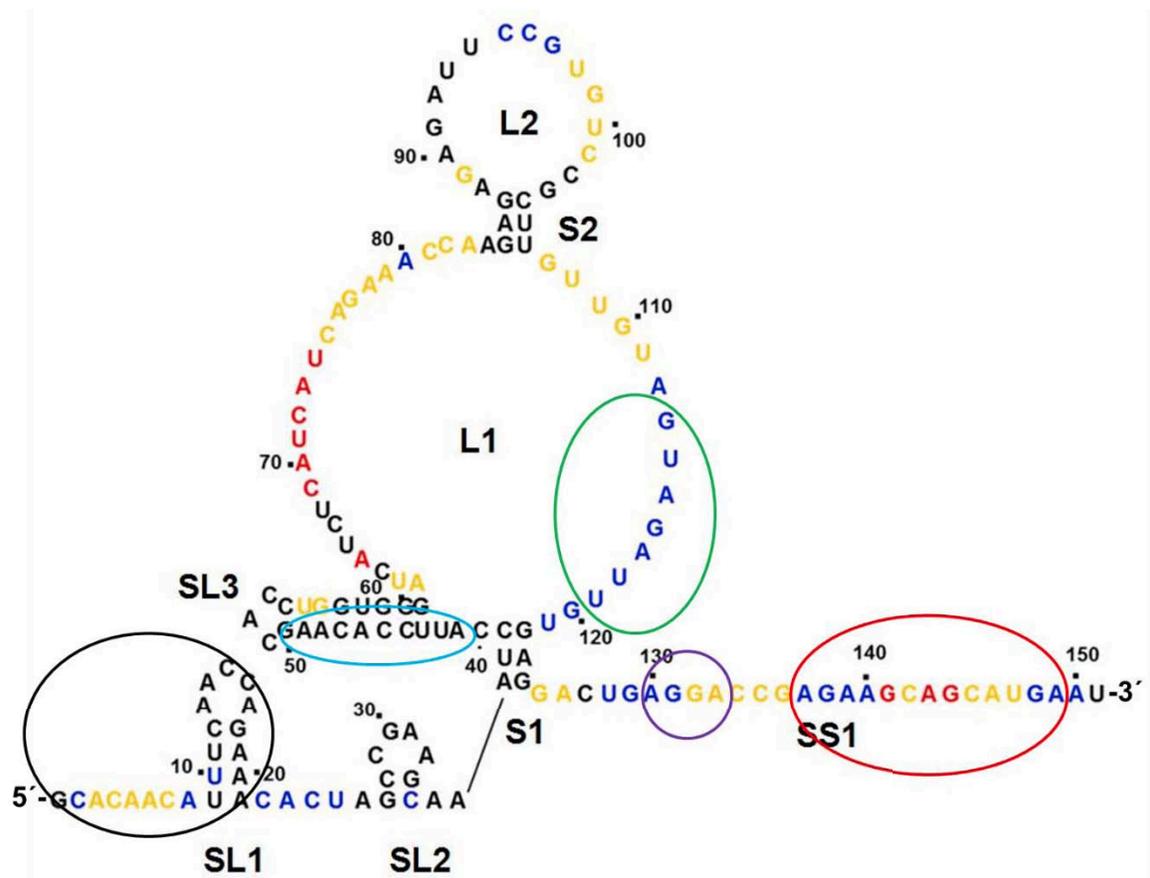


Figura 25: Identificación de las regiones nucleotídicas conservadas en el IRES *Hsp101* de maíz. Las regiones conservadas que se muestran en el alineamiento de secuencias *Hsp101* 5'UTRs de la figura 24 se muestran encerradas en círculos de color correspondiente.

DISCUSIÓN

El inicio de la traducción de los ARNm eucariontes es dependiente del reconocimiento de la estructura *cap* localizada en el extremo 5'UTR por eIF4E (Sonenberg y Hinnebusch 2009). Bajo ciertas condiciones de estrés, la traducción dependiente de *cap* es inhibida. Sin embargo, en estas condiciones algunas proteínas son sintetizadas de manera independiente de *cap*. La activación de la traducción dependiente de IRES facilita la supervivencia celular, los elementos IRES usualmente localizados en el extremo 5'UTR de algunos ARNm celulares y virales, no presentan un grado de similitud en sus secuencias nucleotídicas primarias y en las estructuras de ARN que forman.

En estudios anteriores se ha demostrado que los elementos IRES no tienen ninguna dificultad para ser activados en sistemas de traducción heterólogos (sistema vegetal y sistema animal), ya que los sistemas traduccionales como RRL o WGE no afectan la eficiencia para traducir los mensajes que contienen algún elemento IRES (Zeenko y Gallie 2005; Urwin *et al.* 2000; Woolaway *et al.* 2001; Wong *et al.* 2008). Para la identificación del IRES *Hsp101* de maíz se evaluó la efectividad traduccional de este IRES en ambos sistemas, con esto se demostró que este IRES puede iniciar la traducción de manera eficiente en ambos sistemas (Dinkova *et al.* 2005).

El ARNm que codifica la proteína HSP101 de maíz contiene un elemento IRES en su región 5'UTR. En traducciones realizadas en el sistema RRL, este elemento IRES es activado por el corte que causa la proteasa Lb a eIF4G (Dinkova *et al.* 2005). Además, el IRES *Hsp101* de maíz requiere de la secuencia 5'UTR completa para la eficiencia del inicio de la traducción interna (Jiménez-González, 2009). Específicamente se encontró que al retirar los primeros 17 nucleótidos se pierde la función para iniciar la traducción de manera dependiente de IRES, indicando que estos nucleótidos son esenciales para el inicio de la traducción dependiente del IRES *Hsp101* de maíz (figura 9). Resultados similares fueron

reportados para elementos IRES de *Drosophila melanogaster* y *Homo sapiens*. En ambos casos la secuencia completa es requerida para el inicio de la traducción independiente de *cap*, pequeños cortes en la secuencia 5'UTR reducen la actividad IRES de 75% a 95% (Rubtsova *et al.* 2003; Hernández *et al.* 2004).

Para determinar la estructura de los ARNs en especial de los IRES, se utilizan distintos procedimientos como son el uso de softwares informáticos, la cristalografía, la resonancia magnética nuclear, pruebas estructurales enzimáticas y químicas, así como análisis mutacionales (Baird *et al.* 2006). La secuencia nucleotídica del IRES *Hsp101* de maíz anteriormente fue delimitada por un análisis funcional en el sistema RRL en condiciones independientes de *cap* (figura 9), además, se obtuvo la estructura secundaria por medio del software informático mFOLD (figura 10) (Jiménez-González, 2009). La rica diversidad de las estructuras IRES en conjunto con las respuestas a diferentes condiciones ambientales, sugieren que existen múltiples mecanismos que dirigen la función de los IRES (Martínez-Salas *et al.*, 2008; Filbin y Keft, 2009), por este motivo es de suma importancia elucidar las estructuras secundaria de ARN que forman los IRES.

En este trabajo se llevó a cabo una modificación de nucleótidos con NMIA para analizar la estructura secundaria que forma el IRES *Hsp101* de maíz, una metodología que reporta la flexibilidad local de la secuencia de ARN. La estructura secundaria del IRES *Hsp101* de maíz es la primera estructura experimental reportada para un IRES de un ARNm que codifica una proteína de choque térmico de plantas (Figura 16). En el IRES *Hsp101* de maíz se identificaron dominios estructurales que incluyen tres tallos-asa SL1 (9 – 21 nts), SL2 (27 – 34 nts) y SL3 (43 – 61 nts), los cuales se encuentran flanqueados por dos grandes burbujas (Loops), L1 (62 – 84 nts) y L2 (107 – 121 nts) a su vez flanqueados por dos tallos (Stem) cortos, S1 y S2 (87 – 103 nts) y finalmente una región en cadena sencilla (126 a 150 nts) localizada río arriba del codón de inicio AUG (figura 16), siendo esta estructura de ARN diferente a otros elementos IRES reportados (Le Quesne *et al.* 2001; Xia y Holcik 2009; Dotu *et al.*, 2013).

En comparación con la estructura predicha con mFOLD, la estructura experimental posee una mayor flexibilidad gracias a la alta cantidad de nucleótidos en cadena sencilla, lo cual podría aumentar los sitios de unión con elementos *trans* traducionales como eIFs, ITAFs o el ribosoma 40S. La relevancia de la estructura de ARN para la función del IRES se refuerza en que al eliminar el SL1 en la construcción *pBIC-Hsp101Δ17* se inhibe la traducción. Así mismo, la construcción que carece de SL1, SL2 y SL3 en el extremo 5' no puede realizar el inicio de la síntesis de proteínas de una manera efectiva. Estos resultados sugieren que, si la estructura SL1 tiene algún defecto, es incapaz de interactuar con algún elemento que actúa en *trans*, además, de que estas estructuras se mantienen en el modelo obtenidos por el programa mFOLD (Figura 10), así como, en los modelos obtenidos de manera experimental (Figura 14 y Figura 16) reforzando su importancia. También se observa que las regiones de S1 y S2 son más cortas en la estructura experimental, por el contrario de las regiones en cadena sencilla de L1, L2 y SS1 ya que estas son mayores en la estructura experimental, las cuales se encuentran expuestas al ser atacadas por el NMIA. En el caso de las regiones de L1 y SS1 presentan secuencias conservadas con otras regiones 5'UTR de otras gramíneas, además de que los nucleótidos que fueron protegidos por RRL se encuentra en esta regiones (Figura 17), las cuales presumiblemente proporciona sitios de unión para proteínas necesarias para la formación del complejo traduccional activo al estar en una posición cercana al codón de inicio AUG, llevándose a cabo la traducción bajo condiciones de estrés de calor, siendo el principal candidato la proteína HSP90 al poder interactuar directamente con el ARN (Figura 18), además, de que las estructuras S1, S2 y S3 podrían estar proporcionando la unión para algún otro elemento *trans* que estabilice o modifique la estructura secundaria de ARN, o bien proporcione un andamio o faciliten la unión de elementos *trans* que formen parte del complejo traduccional del IRES *Hsp101*, como pueden ser eIF4G y eIFiso4G las cuales podrían posicionarse en una región cercana al codón AUG, como puede ser la región L1 y SS1 (figura 17 y 25).

Datos recientes muestran que los ARNm asociados con respuestas de estrés contienen una mayor proporción de nucleótidos en cadena sencilla en su región 5'UTR, estos se encuentran en estructura de burbuja con una longitud máxima posible (Ding *et al.* 2014), como es la reportada en la estructura de ARN del IRES *Hsp101* de maíz en el presente estudio (figura 16). Por otra parte, se ha observado que la comparación de estructuras de ARN pertenecientes a ARNm activados bajo condiciones de estrés fueron pobremente predichos *in silico*, enfatizando la necesidad de determinar la estructura de ARN bioquímicamente (Baird *et al.*, 2006).

Los reportes muestran que el tamaño y la estructura del IRES son importantes para su función. Sin embargo, las proteínas que se unen a estos elementos también son esenciales para su óptimo funcionamiento. En este trabajo se identificaron al menos dos proteínas, donde los resultados sugieren que las proteínas de ~50 KDa y ~75 KDa interaccionan de manera directa con el ARN, además, de que fueron coprecipitadas por el elemento IRES en condiciones de traducción independiente de *cap* (figuras 18 y 20), aunque también existe la posibilidad de que estas proteínas funcionen como un andamio para que otros elementos se unan de manera indirecta para formar el complejo traduccional activo. Por otra parte, la proteína de ~75 KDa fue identificada como la chaperona molecular HSP90, perteneciente a una antigua familia conservada de factores, la cual se encuentra presente en todos los organismos incluyendo plantas y animales (Chen *et al.*, 2006), esta proteína muestra un alto grado de conservación de aminoácidos entre animales y plantas (Matsumoto *et al.*, 2011) siendo la homología hasta del 70% y ha sido reportada en la formación de gránulos de estrés y cuerpos P en condiciones de estrés (Gupta 1995). El papel activo de HSP90 para formar el complejo traduccional e iniciar la traducción independiente de *cap* fue demostrado por inhibición específica de esta proteína al traducir la construcción *pBIC-Hsp101+1* en presencia de Radicol o anticuerpo contra HSP90 (Figura 22). Además, se ha reportado que HSP90 participa en la formación del complejo traduccional del IRES HCV (Ujino *et al.*, 2012), en este caso HSP90 interacciona con la subunidad eIF3c, previniendo su ubiquitinación y la consiguiente degradación por la vía del

proteosoma. Por estas razones proponemos que HSP90 podría estar participando como un elemento ITAF perteneciente a la traducción del IRES *Hsp101* de maíz.

Evidencias previas (Martínez-Salas *et al.*, 2008) muestran que el factor de iniciación eIF4G es requerido para la traducción independiente de *cap* dirigida por varios elementos IRES tanto celulares como virales. En el caso de la actividad del IRES *Hsp101* de maíz la traducción es más activa al utilizar eIFiso4G comparado con eIF4G. Este resultado se puede explicar ya que el factor generalmente usado en la traducción de ARNm en plantas es el eIFiso4G (Lellis *et al.*, 2010; Mayberry *et al.*, 2011), sugiriendo que esta característica se encuentra presente en IRES de ARNm originarios de plantas. Varios elementos IRES celulares y virales también requieren a eIF4G (López de Quinto y Martínez-Salas 2000; Springgs *et al.* 2009) para el inicio de la traducción. Sin embargo, no hay similitud con la secuencia *Hsp101* de maíz, sugiriendo que la interacción se puede realizar en un dominio estructural de ARN, posiblemente ayudado por la interacción con otros factores como pueden ser HSP90.

CONCLUSIONES

Se obtuvo la estructura secundaria funcional del IRES *Hsp101* de maíz, la cual es la primera estructura reportada de un IRES originario de plantas.

Se identificó la selectividad del factor de traducción eIFiso4G sobre eIF4G para inicial la traducción dependiente del IRES *Hsp101* de maíz.

Se identificó el requerimiento de la chaperona molecular HSP90 para la formación del complejo traduccional activo dependiente del IRES *Hsp101* de maíz.

PERSPECTIVAS

Una vez identificada la estructura secundaria desnuda del IRES *Hsp101* de maíz, es necesario obtener la estructura secundaria que interacciona con la maquinaria traduccional de maíz, para identificar cuáles son los nucleótidos y las regiones del IRES *Hsp101* de maíz que están participando en el reconocimiento de factores *trans* que participen en el inicio de la traducción. Para ello se requieren llevar a cabo ensayos de *toeprint* del IRES *Hsp101+1* de maíz unido a extracto de proteína total de maíz.

Una vez que se identificó la interacción e importancia del factor eIFiso4G y la chaperona molecular HSP90, es necesario realizar pruebas de *toeprint* para identificar en qué nucleótidos se están uniendo estos péptidos y poder identificar dichos nucleótidos como dominios de unión pertenecientes al IRES *Hsp101* de maíz.

Al identificar los nucleótidos del IRES *Hsp101* de maíz en los cuales interaccionen factores como eIFiso4G y la chaperona molecular HSP90, se deben llevar a cabo ensayos mutacionales en estas secuencias de unión, para identificar los nucleótidos que conforman estos dominios e identificarlos en IRES pertenecientes a otras gramíneas.

Se propone realizar ensayos con RNAsas que reconozcan estructuras secundarias específicas para identificar áreas de accesibilidad e interacción con factores de inicio de la traducción, ITAFs, la subunidad ribosomal 40S o con secuencias nucleotídicas pertenecientes al mismo IRES *Hsp101* de maíz. A su vez esto servirá de apoyo para el moldeamiento estructural en condiciones de interacción con elementos que participen en la formación del complejo traduccional activo del IRES *Hsp101* de maíz.

BIBLIOGRAFÍA

- Baird, S. D.**, Turcotte, M., Korneluk, R. G., and Holcik, M. 2006. Searching for IRES. RNA. 12:1755-1785.
- Chadmond, N.**, Deforges, J., Ulryck, N. and Sargueil, B. 2014. 40S recruitment in the absence of eIF4G / 4A by EMCV IRES refines the model for translation initiation on the archetype of Type II IRESs. Nucleic Acids Res. 42:10373-10384.
- Chen, B.**, Zhon, D. and Monteiro, A. 2006. Comparative genomics and evolution of the HSP90 family of genes across all kingdoms of organisms. BMC Genomic. 7:156.
- Cobbold, L. C.**, Spriggs, K. A., Haines, S. J., Dobbyn, H. H., Hayes, C., de Moor, C. H., Lilley, K. S., Bushell, M. and Willis, A. E. 2008. Identification of Internal Ribosome Entry Segment (IRES)-trans-Acting Factor for the Myc Family of IRES. Mol. Cell. Biol. 28:40-49.
- Ding, Y.**, Tang, Y., Kwok, C. K., Zhan, Y., Bevilacqua, P. C. and Assmann, S. M. 2014. In vivo genome-wide profiling of RNA secondary structure reveals novel regulatory features. Nature. 505:696-700.
- Dinkova, T. D.**, Zepeda, H., Martínez-Salas, E., Martínez, L. M., Nieto-Sotelo, J. and Sánchez de Jiménez, E. S. 2005. Cap-independent translation of maize *Hsp101*. Plant J. 41:722-731.
- Dotu, I.**, Lozano, G., Clote, P. and Martínez-Salas, E. 2013. Using RNA inverse folding to identify IRES-like structural subdomain. RNA Biology. 10:1842-1852.
- Echevarria-Zomeno, S.**, Yanguéz, E., Fernández-Bautista, N., Castro-Sanz, A. B., Ferrando, A., 2013. Regulation of translation Initiation under biotic and abiotic stresses. Int J Mol Sci. 14:4670-4683.
- Fernandez, N.**, García-Sacristan, A., Ramajo, J., Briones, C. and Martínez-Salas, E. 2011. Structural analysis provides insights into the modular organization of picornavirus IRES. Virology. 409:251-261.

- Fernández-Miragall, O.** and Martínez-Salas, E. 2003. Structural organization of a viral IRES depends on the integrity of the GNRA motif. *RNA*. 9:1333-1344.
- Filbin, M. E.** and Kieft, J. S. 2009. Toward a structural understanding of IRES RNA function. *Curr Opin Struc Biol*. 19:267-276.
- Firth, A. E.** and Brierley, I. 2012. Non-canonical translation in RNA viruses. *J Gen Virol*. 93:1385-1409.
- Gallie, D. O.** 2001. Cap-independent translation conferred by the 5' leader of tobacco etch virus is eukaryotic initiation factor 4G dependent. *J Virol* 75:12141-12152.
- Gallie, D. R.,** Caldwell, C. and Pitto, L. 1995. Heat shock disrupts cap and poly(A) tail function during translation and increases mRNA stability of introduced reported mRNA. *Plant Physiol*. 108:1703-1713.
- Graber, T. E.** and Holcik, M. 2007. Cap-independent regulation of gene expression in apoptosis. *Mol BioSyst*. 3:825-834.
- Gingras, A. C.,** Raught, B. and Sonenberg, N. 1999. eIF4G initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem*. 68:913-963.
- Gupta, R. S.** 1995. Phylogenetic analysis of the 90 KDa heat shock family of protein sequences and an examination of the relationship among, animal, plants and fungi species. *Mol Biol Evol*. 12:1063-1073.
- Hellen, C. U.** and Sarnow, P. 2001. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev*. 15: 1593–1612.
- Hernandez, G.,** Vázquez-Pianzola, P., Sierra, J. M., and Rivera-Pomar, R. 2004. Internal ribosome entry site drives cap-independent translation of reaper and heat shock protein 70 mRNAs in *Drosophila* embryos. *RNA*. 10: 1783-1797.
- Hernandez, G.** 2008. Was the initiation of translation in early eucakaryotes IRES-driven? *Trends Biochem Sci*. 33(2):58-64.
- Hershey, J. W. B.** and Merrick, W. C. 2000. Pathway and mechanism of initiation of protein synthesis En: Sonenberg, N., Hershey, J. W. B., and Mathews, M. B., (eds), *Translational Control of Gene Expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY pp. 33–38.

- Hinnebusch, A. G.** 2006. eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes. *Trends Biochem Sci.* 31:553-562.
- Jackson, R. J.** 2000. Comparative view of initiation site selection mechanisms In: Sonenberg, N., Hershey, J. W. B., and Mathews, M. B., (eds.), *Translational control of Gene Expression* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 127–183.
- Jackson, R. J.**, Hellen, C. U. and Pestova, T. V. 2010. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulations. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 11:113-127.
- Jang, S. K.**, Krausslich, H. G., Nickling, M. J., Duke, G. M., Palmenberg, A. C. and Wimmer, E. 1988. A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J Virol.* 62:2636-2643
- Jiménez-González, A. S.** 2009. Identificación de la región funcional del IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) del ARNm de la proteína HSP101 de maíz. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM.
- Kahvejian, A.**, Roy, G. and Sonenberg, N. 2001. The RNA closed-loop-model: the function of PABP and PABP-interacting protein in mRNA translation. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol.* 66:293-300.
- King, H. A.**, Cobbold, L. C., and Willis, A. E. 2010. The role of IRES trans-acting factors in regulating translation initiation. *Biochem Soc Trans.* 38:1581-1586.
- Komar, A. A.**, Mazumder, B., and Merrick, W. C. 2012. A new framework for understanding IRES-mediated translation. *Gene.* 502:75-86
- Komar, A. A.** and Hatzoglou, M. 2005. Internal Ribosome Entry Site in cellular mRNA: Mystery of their existence. *J. Biol. Chem.* 25:23242-23428.
- Komar, A. A.** and Hatzoglou, M. 2012. Cellular IRES-mediated translation: the war of ITAFs in pathophysiological states. *Cell Cycle.* 10:229-240.
- Le Quesne, J. P.**, Stoneley, M., Fraser, G. A. and Willis, A. E. 2001. Derivation of a structural model for the c-myc IRES. *J Mol Biol.* 310:111-126.

- LeFebvre, A. K.**, Koorneva, .N. L., Trutschl, M., Cvek, U., Duzan, R. D., Bradley, S. A., Hershey, J. W. and Rhoads, R. E. 2006. Translation initiation factor eIF4G-1 binds to eIF3 through the eIF3e subunit. *J Biol Chem.* 281:22917-22932.
- Lellis, A. D.**, Allen, M. L., Aertker, A. W., Tran, J. K., Hillis, D. M., Harbir, C. R., Caldwell, C., Gallie, D. R. and Browning, K. S. 2010. Deletion of the eIFiso4G subunit of the Arabidopsis eIFiso4F translation initiation complex impairs health and viability. *Plant Mol Biol.* 74:249-263.
- Lopez de Quinto, S.** and Martinez Salas, E. 2000. Interaction of the eIF4G initiation factors with the aphthovirus IRES is essential for internal translation initiation in vivo. *RNA.* 6:1380-1392.
- Mardanov, E. S.**, Zamchuk, L. A., Skulachev, M. V. and Ravin, N. V. 2008. The 5' untranslated region of the maize alcohol dehydrogenase gene contains an internal ribosome entry site. *Gene.* 420:11-16.
- Martínez-Salas, E.**, López de Quinto, S., Ramos, R. and Fernández-Miragall, O. 2002. IRES elements: Features of the RNA structure contributing to their activity. *Biochim.* 84: 755-763.
- Martínez-Salas, E.**, Ramos, R., La Fuente E. and López de Quinto, S. 2001. Functional interactions in internal translation initiation directed by viral and cellular IRES elements *J. General Virol,* 82: 973–984.
- Martinez-Salas, E.**, Pacheco, A., Serrano, P. and Fernández, N. 2008. New insights into internal ribosome entry site elements relevant for viral gene expression. *J Gen Virol.* 89:611-626.
- Martinez-Salas, E.**, Pineiro, D. and Fernández, N. 2012. Alternative mechanisms to initiate translation in eukaryotic mRNAs. *Comp Func Gen.* 2012:391546.
- Masutani, M.**, Sonenberg, N., Yokoyama, S. and Imataka, H. 2007. Reconstitution reveals the functional core of mammalian eIF3. *EMBO J.* 26:3373-3383.
- Mathews, M. B.**, Sonenberg, N. and Hershey, J. W. B. 2000. Origins and principles of translational control. En: Sonenberg N, Hershey J. W. B., Mathews MB (eds.) *Translational Control of gene expression.* Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, NY. 1-31.

- Matsumoto, K.**, Minami, M., Shinosaki, F., Suzuki, Y., Abe, K. Zenno, S., Matsumoto, S. and Minami, Y. 2011. HSP90 is involved in the formation of P-bodies and stress granules. *Biochem Biophys Res Commun.* 407:720-724.
- Mayberry, L. K.**, Allen, M. L., Nitka, K. R., Campebell, L., Murphy, P. A. et al. 2011. Plant cap-binding complexes eukaryotic initiation factors eIF4F and eIFiso4F: molecular specificity of subunit binding. *J Biol Chem.* 286:42566-42574.
- Patrick, R. M.** and Browning, K. S. 2012. The eIF4F and eIFiso4F complexes of plants: an evolutionary perspective. *Comp Func Gene.* 2012:287814
- Pelletier, J.** and Sonenberg, N. 1988. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature.* 334: 320–325.
- Pestova, T. V.**, Lomakin, I. B., Lee, J. H., Choi, S. K., Dever, T. E. and Hellen, C. U. 2000. The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature.* 403:332-335.
- Richter, J. D.** and Sonenberg, N. 2005. Regulation of cap dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature.* 433:477-480.
- Rubtsova, M. P.**, Sizova, D. V., Dmitriev, S. E., Ivanov, D. S., Prassolov, V. S. and Shatsky, I. N. 2003. Distinctive properties of the 5'-untranslated region of human hsp70 mRNA. *J. Biol Chem.* 278: 22350-22356.
- Semler, B. L.** and Waterman, M. L. 2008. IRES-mediated pathways to polysomes: nuclear versus cytoplasmic routes. *Trends Microbiol.* 16:1-5.
- Skulachev, M. V.**, Ivanov, P. A., Karpova, O. V., Korpela, T., Rodionova, N. P., Dorokhov, Y. L. and Atabekov, J. G. 1999. Internal initiation of translation directed by the 5' - untranslated region of the tobamovirus subgenomic RNA I(2). *Virology.* 263:139-154
- Sonenberg, N.**, Hinnebusch, A. G. 2009. Regulation of translation regulation in eukariotes: mechanism and biological targets. *Cell.* 136:731-745.

- Springgs, K. A.**, Bushell, M., Mitchell, S. A. and Willis, A. E. 2005. Internal ribosome entry segment-mediated translation during apoptosis: the role of IRES-trans-acting factors. *Cell Death Differ.* 12:585-591.
- Springgs, K. A.**, Cobbold, L. C., Jopling, C. L., Cooper, R. E., Wilson, L. A., Stoneley, M., Coldwell, M. J., Poncet, D., Shen, Y. C., Morley, S. J., Bushell, M. and Willis A. E. 2009. Canonical initiation factor requirement of the Myc family of internal ribosome entry segment. *Mol Cell Biol.* 29: 1565-1574.
- Stoneley, M.** and Willis. A. E. 2004. Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression. *Oncogene.* 23, 3200–3207.
- Sweeney, T. R.**, Abaeva, I. S., Pestova, T. V. and Hellen, C. U. 2014. The mechanism of translation initiation on Type I *Picornavirus* IRESs. *EMBO J.* 33:76-92.
- Thivierge, K.**, Nicaise, V., Dufresne, P. J., Cotton, S., Laliberte. J. F., LeGall, O. and Fortin, M. G. 2005. Plants virus RNAs coordinated recruitment of conserved host functions by (+) ssRNA viruses during early infection events. *Plant Physiol.* 138:1822-1827.
- Ujino, S.**, Nishitsuji, H., Sugiyama, R., Suzuki, H., Hishiki, T. Sugiya, K., Shimotohno, K. and Takaku, H. 2012. The interaction between human initiation factor eIF3 subunit c and heat-shock protein 90: a necessary factor for translation mediated by the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *Virus Res.* 163:390-395.
- Urwin, P.**, Yi, L., Martin, H., Atkinson, H., and Gilmartin, P. M. 2000. Functional characterization of the EMCV IRES in plants. *Plant J.* 24:583-589.
- Von der Haar, T.**, Gross, J. D., Wagner, G. and McCarthy, J. E. 2004. The mRNA cap-binding protein eIF4E in post-transcriptional gene expression. *Nat Struc Mol Biol.* 11:503-511.
- Wals, D.** and Mohr, I. 2011. Viral subversion of the host protein synthesis machinery. *Nat Rev Microbiol.* 9:860-875.

- Wang, Q. S.** and Jan, E. 2014. Switch from Cap- to Factorless IRES-Dependent 0 and +1 Frame translation during cellular stress and Dicistrovirus Infection. *PLoS One*. 9(8):e103601
- Woolaway, K. E.**, Lazaridis, K., Belsham, G. J., Carter, M. J. and Roberts, L. O. 2001. The 5' untranslated region of *Rhopalosiphum padi* virus contains an internal ribosome entry site which functions efficiently in mammalian, plant, and insect translation system. *J Virol*. 75:10244-10249.
- Wong, S. M.**, Koh, D. C., and Liu, D. 2008. Identification of plant virus IRES. *Meth Mol Biol*. 451: 125-133.
- Xia, X.** and Holcik, M. 2009. Strong eukaryotic IRESs have weak secondary structure. *PLoS One*. 4: e4136.
- Yangez, E.**, Castro-Sanz, A. B., Fernández-Bautista, N. Oliveros, J. C., and Castellano, M. M. 2013. Analysis of genome-wide changes in the transcriptome of *Arabidopsis* seedling subjected to heat stress. *PLoS One*. e71425
- Zeenko, V.** and Gallie, D. R. 2005. Cap-independent translation of tobacco etch virus is conferred by an RNA pseudoknot in the 5'-leader. *J Biol Chem*. 280:26813-26824.
- Zucker, M.** 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*. 31(13): 3406-3415.

APÉNDICES

APÉNDICE I: MAPA DEL VECTOR DE CLONACION *pGEM-T Easy*

Se muestra el mapa del plásmido de clonación *pGEM-T Easy* de PROMEGA en el cual fueron insertadas las amplificaciones del IRES *Hsp101* de maíz en sentido de la T7 RNA polimerasa, para posteriormente purificar los fragmentos para ser insertados en el vector pBIC (Figura 9b).

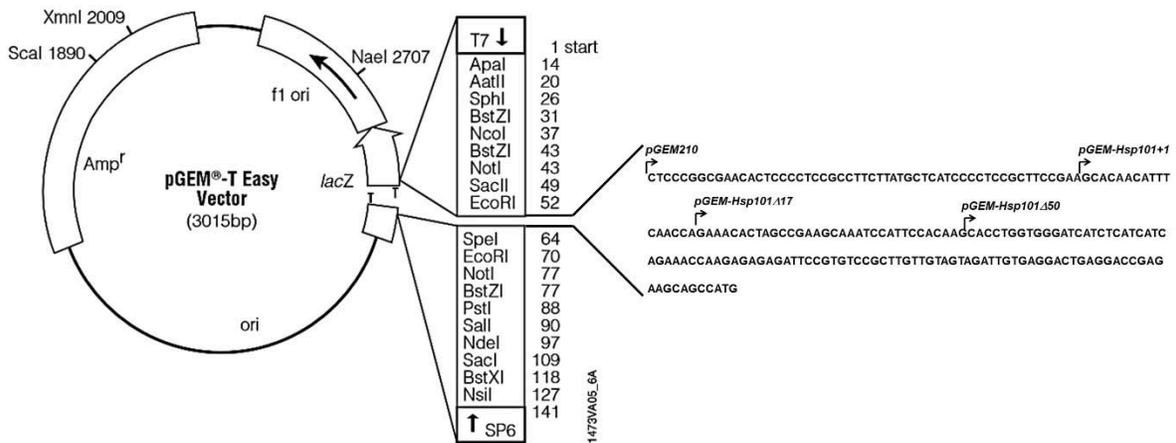


Figura 26: Representación esquemática del vector de clonación *pGEM-T Easy* de PROMEGA, se puede observar el sitio múltiple de clonación y los sitios de reconocimiento para la T7 RNA polimerasa y SP6 RNA polimerasa. Además, en la parte derecha se observan las secuencias correspondientes a *pGEM210*, *pGEM-Hsp101+1*, *pGEM-Hsp101Δ17* y *pGEM-Hsp101Δ50*.

APÉNDICE II: PÉPTIDOS IDENTIFICADOS EN LAS BANDAS DE ~75 KDa Y ~50 KDa

Se muestran los péptidos identificados en la banda correspondiente a ~75 KDa (figura 20), en donde se identificó a la proteína HSP90, una proteína perteneciente a una familia altamente conservada, la cual se ha identificado en mamíferos como conejo, ratón y humano. Además, se identificaron distintos péptidos correspondientes a contaminación como son queratina.

| # | Visible? | Starred? | Bio View: Identified Proteins (8/11) | Accession Number | Molecular Weight | Protein Grouping Ambiguity |
|---|-------------------------------------|-------------------------------------|---|--------------------|------------------|----------------------------|
| | | | Probability Legend | | | |
| | | | over 95% | | | |
| | | | 80% to 94% | | | |
| | | | 50% to 79% | | | |
| | | | 20% to 49% | | | |
| | | | 0% to 19% | | | |
| 1 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | A0PJ91_MOUSE Hsp90aa1 protein (Fragment) [Mus musculus (Mouse) [10090]] | A0PJ91 (+20) | 66 kDa | 100% |
| 2 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | F1PYU9_CANFA Uncharacterized protein [Canis familiaris (Dog) (Canis lupus familiaris) F1PYU9 (+10)] | F1PYU9 (+10) | 58 kDa | 94% |
| 3 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | A4US66_PIG Ubiquitin B [Sus scrofa (Pig) [9823]] | A4US66 (+99) | 24 kDa | 94% |
| 4 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | K2C1_PANTR Keratin, type II cytoskeletal 1 [Pan troglodytes (Chimpanzee) [9598]] | A5A6M6 (+51) | 65 kDa | 94% |
| 5 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | cDNA FLJ78504, highly similar to Homo sapiens keratin 6A (KRT6A), mRNA n=1 Tax=H...A8K2I0 (+26) | | 60 kDa | 94% |
| 6 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | Q9TRF7_RABIT Glycogen synthase (Fragment) [Oryctolagus cuniculus (Rabbit) [9986]] | Q9TRF7 | 2 kDa | 94% |
| 7 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | IG GAMMA CHAIN C REGION [Oryctolagus cuniculus [9986]] | UPI000180D49C (+1) | 25 kDa | 94% |
| 8 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | Keratin, type I cytoskeletal 16 n=2 Tax=Homo sapiens RepID=K1C16_HUMAN | P08779 (+1) | 51 kDa | 88% |

Figura 27: Listado de proteínas identificadas en la banda correspondiente a ~75 KDa.

Se muestran los péptidos identificados en la banda correspondiente a ~50 KDa (figura 20), en donde se identificaron péptidos correspondientes a contaminación, como son queratinas, no se pudo identificar algún otro péptido que pudiera estar participando en la formación de la maquinaria traduccional.

| # | Visible? | Starred? | MS/MS View: Identified Proteins (9/10) | Accession Number | Molecular Weight | Protein Grouping Ambiguity |
|---|-------------------------------------|-------------------------------------|---|------------------|------------------|----------------------------|
| | | | Probability Legend: | | | |
| | | | over 95% | | | |
| | | | 80% to 94% | | | |
| | | | 50% to 79% | | | |
| | | | 20% to 49% | | | |
| | | | 0% to 19% | | | |
| 1 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | Keratin, type I cytoskeletal 10 n=1 Tax=Homo sapiens RepID=K1C10_HUMAN | P13645 (+5) | 60 kDa | 100% |
| 2 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | K2C1_PANTR Keratin, type II cytoskeletal 1 [Pan troglodytes (Chimpanzee) [9598]] | A5A6M6 (+1) | 65 kDa | 100% |
| 3 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | cDNA FLJ78504, highly similar to Homo sapiens keratin 6A (KRT6A), mRNA n=1 Tax=Homo sapiens RepID=A8K2I0_HUMAN | A8K2I0 (+25) | 60 kDa | 100% |
| 4 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | B3KML9_HUMAN cDNA FLJ11352 fis, clone HEMBA1000020, highly similar to Tubulin beta-2C chain [Homo sapiens (Human) [9606]] | B3KML9 (+25) | 45 kDa | 100% |
| 5 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | A4US66_PIG Ubiquitin B [Sus scrofa (Pig) [9823]] | A4US66 (+99) | 24 kDa | 86% |
| 6 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | A5A759_PIG Keratin 2A [Sus scrofa (Pig) [9823]] | A5A759 | 66 kDa | 86% |
| 7 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | A6MKH1_CALJA Annexin A3-like protein (Fragment) [Callithrix jacchus (White-tufted-ear marmoset) [9483]] | A6MKH1 (+44) | 15 kDa | 86% |
| 8 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | F1SAP3_PIG Uncharacterized protein [Sus scrofa (Pig) [9823]] | F1SAP3 (+27) | 20 kDa | 86% |
| 9 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | Q9TRF7_RABIT Glycogen synthase (Fragment) [Oryctolagus cuniculus (Rabbit) [9986]] | Q9TRF7 | 2 kDa | 86% |

Figura 28: Listado de proteínas identificadas en la banda correspondiente a ~50 KDa..

APÉNDICE III: ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE DISTINTAS HSP90

En la figura 29 se muestra el alineamiento que se realizó entre las secuencias de aminoácidos de las proteínas HSP90 comercial de humano (gi|153792590|), HSP90 de maíz (gi|225903795|), HSP90 de conejo gi|291410975|) y HSP90 de ratón (gi|62825873|). En el alineamiento se puede observar que existe una similitud elevada entre las secuencias, siendo factible el uso de HSP90 de humano en los experimentos de traducción en donde se evaluó el efecto de esta proteína en el inicio de traducción medio por el IRES Hsp101 de maíz (Figura 22).

APÉNDICE IV: ANALISIS ANOVA DE LA TRADUCCION DIRIGIDA POR EL IRES *Hsp101* DE MAÍZ EN EL SISTEMA WGE INCORPORANDO eIF4G Y/O eIFiso4G

Para verificar si los resultados de la traducción del IRES *Hsp101* de maíz adicionando eIF4G ó eIFiso4G son estadísticamente significativos, se llevó a cabo una prueba ANOVA con el software PRISM. Para lo cual se consideró las siguientes hipótesis:

H0: Control = eIF4G = eIFiso4G = eIF4G + eIFiso4G

H': Control ≠ eIF4G ≠ eIFiso4G ≠ eIF4G + eIFiso4G

Para llevar a cabo el análisis ANOVA, se utilizaron los resultados densitométricos obtenidos en la traducción dirigida por el IRES *Hsp101* de maíz en condiciones independientes de *cap*, las cuales fueron realizadas en el sistema WGE depletado de eIF4E y eIFiso4E (Figura 23 y Tabla 2).

Tabla 2.- Resultados densitométricos de las traducciones dirigidas por el IRES *Hsp101* de maíz en el sistema de traducción WGE depletado de los factores eIF4E y eIFiso4E (Figura 23).

| Repetición | Control + | eIF4G | eIFiso4G | eIF4G + eIFiso4G |
|------------|-----------|-------|----------|------------------|
| 1 | 97 | 83 | 132 | 155 |
| 2 | 119 | 124 | 172 | 183 |
| 3 | 84 | 89 | 124 | 142 |

En la tabla 3 se muestra el resumen del análisis de ANOVA con un valor P de 0.05%, en los resultados se observa que el valor de $P < 0.05$, con esto se desecha la H0 y se acepta la H' que indica que al menos uno de los resultados es diferente.

Tabla 3: Resumen del análisis ANOVA de los resultados densitométricos de las traducciones dirigidas por el IRES *Hsp101* de maíz en el sistema de traducción WGE depletado de los factores eIF4E y eIFiso4E (Figura 23).

| ANOVA table | SS | DF | MS | F (DFn, DFd) | P value |
|-----------------------------|-------|----|-------|--------------------------|------------|
| Treatment (between columns) | 8565 | 3 | 2855 | F (1.672, 3.343) = 83.50 | P = 0.0015 |
| Individual (between rows) | 3602 | 2 | 1801 | F (2, 6) = 52.67 | P = 0.0002 |
| Residual (random) | 205.2 | 6 | 34.19 | | |
| Total | 12373 | 11 | | | |

Para identificar cuáles son los resultados diferentes estadísticamente, se llevó a cabo una prueba de comparación múltiple de Tukey. En la tabla 4 se observa el resumen de la prueba de Tukey, indicando que existe un grado de significancia entre el control + vs eIFiso4G (asterisco) y dos grados de significancia entre el control + vs eIF4g + eIFiso4G. Además, podemos ver la formación de dos grupos en donde no existen cambio significativo entre las muestras control + vs eIF4G y entre eIFiso4G vs eIF4g + eIFiso4G (Figura 23).

Tabla 4: Resumen de la comparación múltiple de Tukey de las traducciones dirigidas por el IRES *Hsp101* de maíz en el sistema de traducción WGE depletado de los factores eIF4E y eIFiso4E (Figura 23).

| Tukey's multiple comparisons test | Mean Diff. | 95% CI of diff. | Significant? | Summary |
|-----------------------------------|------------|------------------|--------------|---------|
| CONTROL + vs. eIF4G | 1.333 | -42.55 to 45.22 | No | ns |
| CONTROL + vs. eIFiso4G | -42.67 | -79.84 to -5.496 | Yes | * |
| CONTROL + vs. eIF4G + eIFiso4G | -60.00 | -73.86 to -46.14 | Yes | ** |
| eIF4G vs. eIFiso4G | -44.00 | -75.24 to -12.76 | Yes | * |
| eIF4G vs. eIF4G + eIFiso4G | -61.33 | -100.2 to -22.48 | Yes | * |
| eIFiso4G vs. eIF4G + eIFiso4G | -17.33 | -41.45 to 6.780 | No | ns |



Functional and Structural Analysis of Maize Hsp101 IRES

Augusto Samuel Jiménez-González¹, Noemí Fernández², Encarnación Martínez-Salas^{2*}, Estela Sánchez de Jiménez^{1*}

¹ Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, México, ² Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas –Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

Abstract

Maize heat shock protein of 101 kDa (HSP101) is essential for thermotolerance induction in this plant. The mRNA encoding this protein harbors an IRES element in the 5'UTR that mediates cap-independent translation initiation. In the current work it is demonstrated that hsp101 IRES comprises the entire 5'UTR sequence (150 nts), since deletion of 17 nucleotides from the 5' end decreased translation efficiency by 87% compared to the control sequence. RNA structure analysis of maize hsp101 IRES revealed the presence of three stem-loops toward its 5' end, whereas the remainder sequence contains a great proportion of unpaired nucleotides. Furthermore, HSP90 protein was identified by mass spectrometry as the protein preferentially associated with the maize hsp101 IRES. In addition, it has been found that eIFiso4G rather than eIF4G initiation factor mediates translation of the maize hsp101 mRNA.

Citation: Jiménez-González AS, Fernández N, Martínez-Salas E, Sánchez de Jiménez E (2014) Functional and Structural Analysis of Maize Hsp101 IRES. PLoS ONE 9(9): e107459. doi:10.1371/journal.pone.0107459

Editor: Thomas Preiss, The John Curtin School of Medical Research, Australia

Received: June 20, 2014; **Accepted:** August 17, 2014; **Published:** September 15, 2014

Copyright: © 2014 Jiménez-González et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All data are contained within the paper.

Funding: This work was supported by the Dereución General de Apoyo al Personal Academico (DGAPA), UNAM, grant IN212910, CONACYT México scholarship 173696, and Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), grant BFU2011-25437. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: estelas@unam.mx (ESDJ); emartinez@cbm.csic.es (EMS)

Introduction

Maize heat shock protein of 101 kDa (HSP101) mRNA encodes a chaperone essential for thermo-tolerance induction in maize (*Zea mays L.*) [1]. We have previously shown that this mRNA harbors an Internal Ribosome Entry Site (IRES) element on its 5' untranslated region (5'UTR) which mediates cap-independent translation initiation in cell free lysates [2]. In the later study, cap-dependent translation was inhibited through the proteolysis of eIF4G induced by the action of the Lb protease.

Most eukaryotic mRNAs contain a cap structure (m⁷GpppN, where N represents any nucleotide) at its 5'UTR end. The cap structure is recognized by the eIF4F initiation factor consisting of eIF4A, eIF4G and eIF4E [3]. The eIF4E protein binds directly to the cap structure of the mRNA. Therefore, it is essential for cap-dependent translation initiation and recruitment of the translational machinery.

IRES elements are nucleotide sequences, often located within the 5' UTR of some mRNAs, which mediate initiation of translation under conditions that compromise cap-dependent initiation [4,5]. However, IRES elements do not present extensive sequence similarities, although some IRES contain short sequences acting as conserved motifs that are exposed in the IRES structure guiding its recognition by the translational machinery [6,7].

Under certain stress conditions including heat shock, cap-dependent translation initiation is severely inhibited [8]. On the other hand, cellular mRNAs containing IRES are activated by physiological stimulus under stress conditions that generally compromise cap-dependent translation, such as gamma-radiation,

apoptosis, heat stress or viral infections [9,10]. Coincident with these stress signals, translation of a subset of mRNAs encoding proteins such as transcription factors, growth factors and survival proteins that are functional under cellular stress [5,11] remain unabated, providing selective advantage to mRNAs that initiate translation using a cap-independent mechanisms [12].

IRES-mediated translation depends on its primary sequence as well as on its RNA structural organization. Generally, deletions, insertions or substitutions can severely decrease its activity [13], although a few examples have been reported in which mutations increase its translation efficiency [14,15]. Therefore, IRES elements provide an alternative mechanism for translation initiation that depends on the recognition of the RNA by the 40S ribosomal subunit to form the active translational complex [16]. This process is usually aided by translation initiation factors (eIFs) and IRES-transacting factors (ITAFs), with the exception of the IRES element present in the intergenic region of dicistroviruses that is independent of eIFs [17].

Sessile organisms, such as plants, cannot avoid adverse environmental conditions. Therefore, diverse mechanisms for gene expression regulation that allow adequate responses to stress conditions have been developed in order to facilitate translation of certain factors mediating survival in response to adverse environments [18]. IRES-dependent translation mechanisms have been identified in viral RNAs that infect plants [19–24] as well as in cellular mRNAs encoding the heat shock protein HSP101 or the alcohol dehydrogenase (ADH) [2,25]. However, little is known about the RNA structural organization of these IRES elements.

To gain insights about the relationship between RNA structure and IRES function of plant mRNAs, we carried out a functional

and structural analysis of maize hsp101 IRES. These studies identified critical stem-loops needed for IRES activity. In addition, mass spectrometry identification of factors bound to hsp101 IRES element revealed HSP90 as a factor specifically associated to the IRES competent complex under cap-independent conditions. Finally, *in vitro* translation of hsp101 mRNA showed selectivity for eIFiso4G rather than eIF4G translation initiation factor.

Results

Functional analysis of the maize hsp101 IRES

In order to identify the minimal region of the maize hsp101 IRES driving internal initiation of translation, 5' end deletions of the IRES sequence inserted in pBIC-5 construct were generated. The pBIC-5 construct, containing an active maize hsp101 IRES [2], harbors 60 nts belonging to the genomic region upstream of the transcription start site (+1) (Figure 1a). Thus, to verify whether these extra 60 nts altered the hsp101 IRES activity, a construct named 101+1 (starting at the +1 transcription start site) was generated. In addition, 5' end deletions of 77 and 110 nts were introduced in constructs 101Δ17 and 101Δ50, respectively (Figure 1a). These sequences were inserted in the pBIC bicistronic vector in which translation of the first reporter gene (CAT) is cap-dependent while translation of the second reporter gene (LUC) is cap-independent (Figure 1b). pBIC-5, 101+1, 101Δ17 and 101Δ50 RNAs synthesized *in vitro* were translated using the rabbit reticulocyte lysate (RRL) translation system in a cap-dependent manner. In parallel, translation of these RNAs was analyzed in lysates expressing the Lb protease of FMDV, as previously done with the pBIC-5 IRES sequence [2]. This protease cleaves eIF4G [26], rendering the cell-free translation system cap-independent. In the presence of Lb protease, LUC protein was synthesized from RNAs pBIC-5 and, particularly, 101+1 (insert in Figure 1c). In contrast, very low levels of luciferase were detected in lanes loaded with reaction products driven by 101Δ17 RNA. The fold-increase of LUC protein synthesis was plotted to compare translation initiation efficiency among the different IRES constructs. To this end, the intensity of LUC polypeptide was normalized to the value obtained for pBIC-5 RNA (the construct with proven IRES activity) set to 100% (Figure 1c). Translation efficiency of luciferase from mRNA 101+1 was three fold higher than the control RNA pBIC-5 in the presence of Lb. In contrast, translation efficiency of mRNAs 101Δ17 and 101Δ50 decreased severely (83% and 90%, respectively) in comparison to the control pBIC-5 (Figure 1c). These results demonstrated that the complete 5'UTR sequence of hsp101 RNA was required for IRES-dependent translation initiation under conditions that compromise cap-dependent initiation, here illustrated by Lb protease coexpression.

Given that the sequence in 101+1 RNA was identified as the authentic maize hsp101 IRES functional region, we analyzed the secondary structure of this RNA in order to identify potential RNA motifs mediating internal initiation, likely shared with other IRES elements.

Secondary structure of maize IRES hsp101

To characterize the secondary structure in solution of maize hsp101 functional IRES, 101+1 RNA was treated with N-methylisatoic anhydride (NMIA), which reacts with the single-stranded 2'-hydroxylic groups of nucleotides to form a stable 2'-O-*aduct* [27]. This modification was identified by primer extension reaction as reverse transcriptase (RT) stop sites [28] (Figure 2a). The intensity of RT stops were quantified by densitometry and then normalized to the intensity of the full-length product obtained

in each RT reaction set to 100%. Four ranges of reactivity were chosen, colored black, blue, yellow and red (0, >20, >50 and < 50, respectively) in Figure 2b. Secondary structure of the functional maize hsp101 IRES was obtained by using the values for NMIA reactivity in the mFOLD software; nucleotides are presented in a color scale reflecting their reactivity to NMIA (Figure 2c). The RNA structure revealed a large proportion of nucleotides that are reactive to NMIA, thereby unpaired, with the exception of 3 stem-loops located at the 5' end of the RNA. The first hairpin comprises nucleotides 9–21, thus including most of the 17 nucleotides whose deletion leads to a loss of IRES activity. Together, these results demonstrate the importance of this hairpin for internal translation initiation. Furthermore, consistent with the defective phenotype of the deletion of the first hairpin, a construct lacking 50 nucleotides at the 5' end eliminating the 3 hairpins also yielded fully defective IRES elements.

Isolation of RRL proteins bound to IRES under cap-independent conditions

Once the secondary structure of the functional region of maize hsp101 IRES was elucidated, we set up to identify candidate proteins potentially interacting with this element. For this, poly(A)-tailed RNAs were generated to capture the proteins that bind to maize hsp101 IRES taking advantage of the poly(A) affinity to oligo dT cellulose. In addition, untreated and Lb protease-treated lysates were used to favor cap-dependent or cap-independent conditions, respectively. No differences were observed in the pattern of proteins purified with the RNAs tested using untreated lysates (Figure 3a). In contrast, two bands of ~50 kDa and ~75 kDa were specifically associated to 101+1 sense RNA using the Lb-treated RRL (red arrows in Figure 3b). Notably, these bands were absent in samples pulled down with the antisense 101+1as RNA. These results indicate that the 75 and 50 kDa factors specifically interact with the authentic hsp101+1 RNA. Lack of binding of these factors to the RNAs derived from pGEM-T 101+1, 101Δ17 and 101Δ50 could be explained at least in part by differences in the RNA structure induced by 30 nt polylinker sequence located at their 3' end that preclude their interaction. Mass spectrometry (LS/MS/MS) identification of these bands revealed that the ~75 kDa band was the molecular chaperone HSP90 (Figure 3c), as demonstrated by the presence of 4 unique peptides (yellow marks in Figure 3c). The second protein could not be unambiguously identified. We conclude that HSP90 protein forms part of the maize hsp101 IRES translational complex assembled under cap-independent conditions.

Functional relevance of HSP90, eIF4G and eIFiso4G in maize hsp101 translation

To confirm that the HSP90 protein was involved in maize hsp101 IRES-driven translation, we conducted cap-independent *in vitro* translation assays. Additionally, two potential inhibitory reagents were added to the translation system. One of them, radicicol is an HSP90 specific ligand [29]. The second one was a specific antibody HSP90 (anti-HSP90 Ab). Under cap-independent conditions both, Radicicol and anti-HSP90 Ab inhibited translation of the 101+1 mRNA was (Figure 4). These data revealed the importance of HSP90 for maize hsp101 mRNA translation. However, addition of commercial purified human HSP90 protein to the system did not affect translation efficiency of 101+1 (Figure 4), suggesting that the level of HSP90 protein present in the lysate is sufficient for IRES activity.

Plants have two isoforms of eIF4G, being eIFiso4G preferentially used for translation initiation of mRNAs with 5'UTR stable

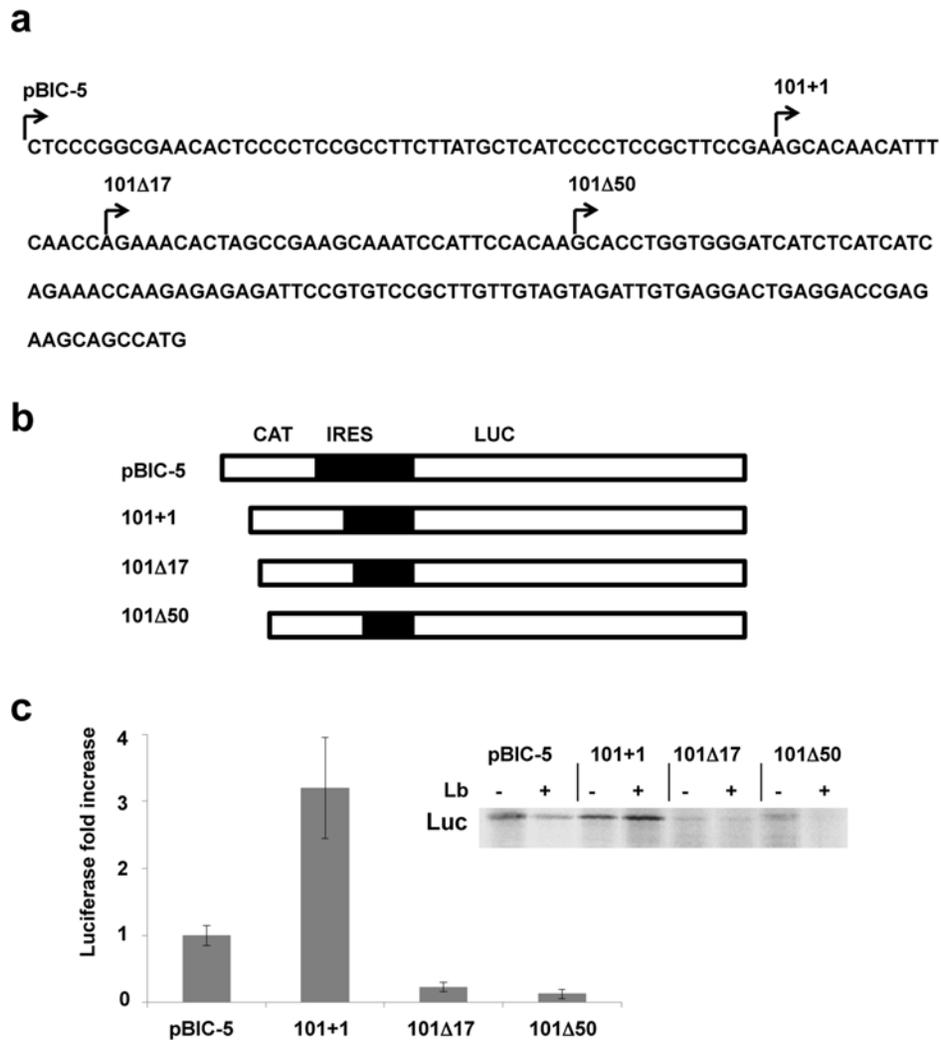


Figure 1. Functional analysis of the maize hsp101 IRES. a) Maize *Hsp101* 5'UTR sequence. Arrows indicate the first nucleotide of the fragments used to identify the functional IRES region. b) Schematic representation of the bicistronic constructs pBIC-5 plasmid was used as positive control. *Hsp101* fragments (sense orientation) were inserted between the chloramphenicol acetyl transferase (CAT) and luciferase (Luc) reporter genes. c) Translation efficiency of the mutant IRES elements in RRL. Equal amounts of *in vitro* synthesized RNAs pBIC-5, 101+1, 101Δ17 or 101Δ50 were used to program translation using Lb-untreated (-) RRL or Lb-treated (+) RRL. Proteins were resolved by SDS-PAGE and visualized by autoradiography of dry gels. Synthesis of luciferase driven by the indicated IRES elements in the presence or absence of the Lb protease is shown on the insert. The histogram shows the intensity of luciferase translation efficiency driven by the indicated RNAs in the presence of Lb (cap-independent). doi:10.1371/journal.pone.0107459.g001

secondary structure, with hypermethylated cap structures or actively involved in IRES-dependent translation [30,31]. Thus, since many viral and cellular IRES elements depend on eIF4G factor, we investigated the role of eIF4G and eIFiso4G factors for maize hsp101 translation. For this purpose, *in vitro* translation assays were performed using the wheat germ system (WGE) depleted from either eIF4F or eIFiso4F (eIF4E-eIF4G and eIFiso4E-eIFiso4G, respectively) using m⁷GTP-sepharose. Then, addition of wheat recombinant eIF4G or eIFiso4G to the translation system was conducted to determine whether any of these factors affected hsp101 IRES-directed translation. No significant difference in hsp101 translation efficiency was observed when eIF4G was added to the system compared to the depleted lysate. However, translational efficiency increased by 40% when eIFiso4G was added to the translation system compared to the control. Furthermore, hsp101 translation efficiency increased by 60% when both factors were added to the system (Figure 5). These

results suggest that there is selectivity on the use of factors used to initiate translation, and that maize hsp101 IRES has preference for eIFiso4G over eIF4G to form the active translational complex.

Discussion

Eukaryotic mRNA translation initiation depends on the cap structure located at the 5' end [3]. However, under conditions that inhibit cap-dependent translation, activation of IRES-dependent translation facilitates cell survival. IRES elements, usually located at the 5' UTR of some mRNAs of eukaryotic cells and their viruses, do not present extensive similarities in their primary sequence or RNA structure. Therefore, definition of the boundaries of IRES elements as well as their structure has to be experimentally delimited case by case. This can be accomplished by functional analysis of the candidate sequences, using cap-independent translation conditions [11]. Earlier studies have shown that some IRES elements are active in heterologous systems

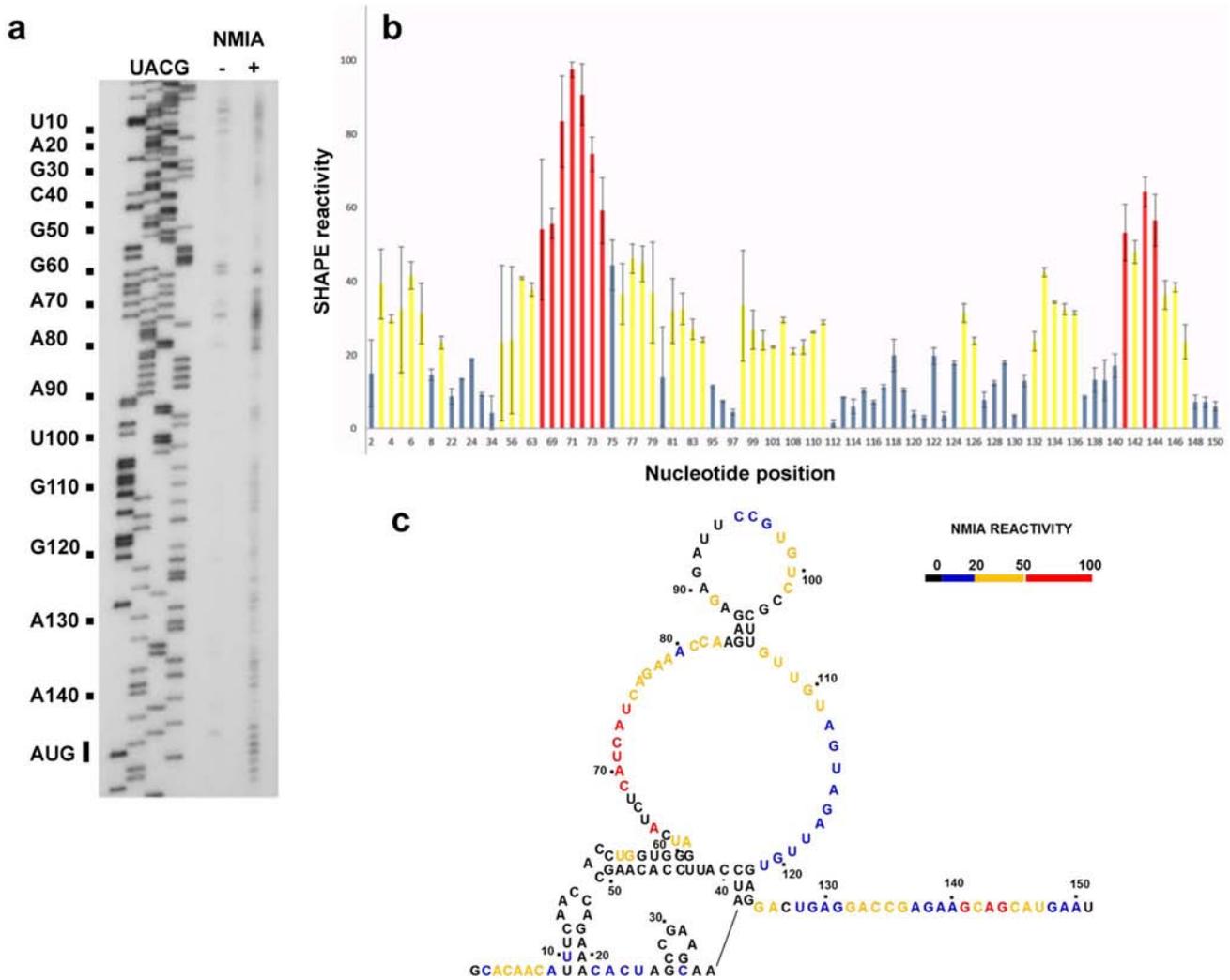


Figure 2. SHAPE structural analysis of maize hsp101 IRES. a) Primer extension analysis of 101+1 RNA. The first four lanes (UACG) show hsp101+1 sequence, obtained with the 5' end labeled primer. Lanes 5 and 6 show the primer extension products obtained with 101+1 RNA untreated (-) or treated (+) with NMIA, respectively b) SHAPE reactivity of 101+1 RNA. Reactivity was normalized relative to the full-length product (set to 100%). Blue bars represent values <20; yellow bars represent values <50 and red bars represent values >50. c) Maize hsp101 IRES secondary structure. Colors of the nucleotides reflect SHAPE reactivity values. doi:10.1371/journal.pone.0107459.g002

[20,32–34]. In agreement with this, the maize hsp101 mRNA contains an IRES element which is active under eIF4G cleavage induced by the Lb protease activity in RRL [2]. In the current study, and using the same system, it is shown that deletions or insertions at the 5' end of the authentic hsp101 5'UTR affect the translation efficiency. Thus, the entire 5'UTR sequence of the heat shock proteins message (about 150 nts long) is required for efficient internal initiation of translation. Specifically, we have found that three stem-loops within the first 50 nucleotides are essential for IRES-dependent translation initiation (Figure 1). Similar results were reported for the hsp70 IRES element of *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens*. In both cases, the complete sequence is required for cap-independent translation, since short deletions of the 5'UTR reduced IRES activity by 75% to 95% [35,36].

The rich diversity of IRES structures in conjunction with their response to different conditions suggests the existence of multiple mechanisms driving IRES function [13,17]. Therefore, it is very important to elucidate their RNA structure. Here we have used

nucleotide modification by NMIA to analyze the secondary structure of the hsp101 IRES, a methodology that reports local flexibility of RNA. The maize hsp101 IRES secondary structure is the first experimental IRES structure reported for plant heat shock mRNAs (Figure 2). Structural domains identified in the maize hsp101 IRES include three stem-loops SL1 (9–21 nts), SL2 (27–34 nts) and SL3 (43–61 nts). This is followed by two large loops L1 (62–84 nts) and L2 (107–121 nts) flanked by 2 short stems, S1 and S2 (87–103 nts). Finally, a single-stranded region (126 to 150 nts) is located upstream of the AUG start codon (Figure 2). This RNA structure differs from other IRES elements [37–39]. In support of the biological relevance of this region, it is worth mentioning that the nucleotide sequence of this mRNA region is highly conserved among different *Zea mays* sequences deposited in databases, despite being outside of the coding region.

The relevance of RNA structure for IRES function is supported by the fact that deletions of the stem-loop SL1 in construct 101Δ17 abrogated translation. Likewise, the construct lacking the three stem-loops at the 5' end also failed to drive protein synthesis. This

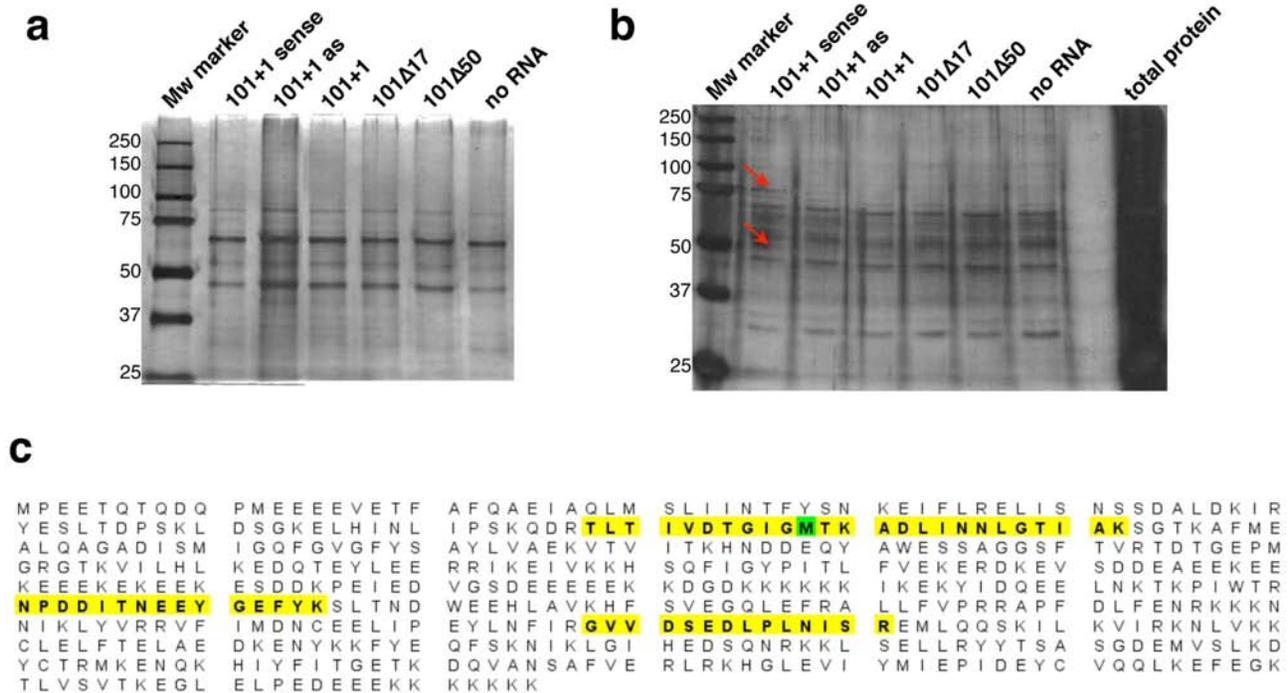


Figure 3. Identification of proteins associated to maize hsp101 IRES. Purification of IRES-protein complexes using RRL translation system (a), or Lb-treated RRL translation system (b) with RNAs indicated at the top. Equal amounts of samples containing the proteins that coprecipitated with the indicated RNAs were loaded on SDS-PAGE and detected by silver staining. Red arrows depict two bands specifically copurifying with 101+1 sense RNA using the Lb-treated RRL. c) Sequence of the 75 kDa protein that binds to maize hsp101 IRES. The 75 kDa band (indicated by an arrow in lane 2 of panel b) was sequenced and identified as the molecular chaperone HSP90. The results yielded 4 unique peptides (shaded in yellow), 4 unique spectra, 5 total spectra, 54/565 amino acids (10% coverage). doi:10.1371/journal.pone.0107459.g003

result suggests that a defective structure lacking SL1 is unable to interact with a *trans*-acting element. Conversely, the large single-stranded region presumably provides the binding site of proteins necessary to form the active translational complex under heat

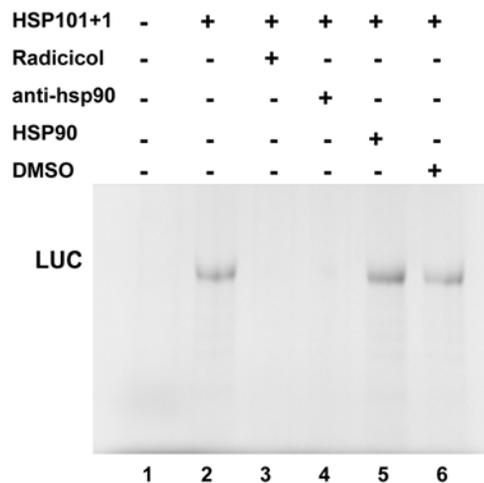


Figure 4. Effect of HSP90 protein on hsp101+1 translation initiation. Equal amounts of *in vitro* synthesized RNAs 101+1 were used to program translation using RRL in the presence of Radicicol (lane 3), anti-HSP90 (lane 4), HSP90 protein (lane 5), or DMSO (lane 6). Proteins were resolved by SDS-PAGE and visualized by autoradiography of the dry gel. Synthesis of luciferase driven by the indicated IRES elements in the presence of the Lb protease (cap-independent). doi:10.1371/journal.pone.0107459.g004

stress conditions, including HSP90 and the product of hsp101 message. Along this idea, recent data have shown that mRNAs associated with stress responses tend to have more single-stranded nucleotides at the 5'UTR, longer maximal loop length and higher free energy [40], as found in the RNA structure of the hsp101 IRES reported in the current study. On the other hand, it has been also noted that comparison of RNA structures of mRNA activated under stress response were poorly predicted *in silico*, emphasizing the need to determine the RNA structure biochemically.

Our results showed that the length and structure of the IRES is important for its function. However, IRES-binding proteins are also essential. Our experimental approach identified two proteins (50 kDa and 75 kDa) that were coprecipitated with the IRES element. The 75 kDa protein was identified as the molecular chaperone HSP90, a protein belonging to a family of ancient conserved factors found in all organisms including plants and animals [41], which has been reported to form stress granules and P-bodies under stress conditions [42]. This protein shows a large degree of amino acid conservation between animals and plants [43]. The active role of HSP90 to form the translational complex and initiate cap-independent translation was demonstrated by absence of translation of hsp101+1 in the presence of radicicol or the HSP90 antibody (Figure 4). HSP90 has also been reported to participate in the formation of the translational complex of the hepatitis C virus (HCV) IRES [44]; in this case, HSP90 interacts with the eIF3c subunit, preventing its ubiquitination and thus, impairing its degradation by the proteasome pathway.

Previous evidences has shown that eIF4G initiation factor is required for cap-independent translation driven by various IRES

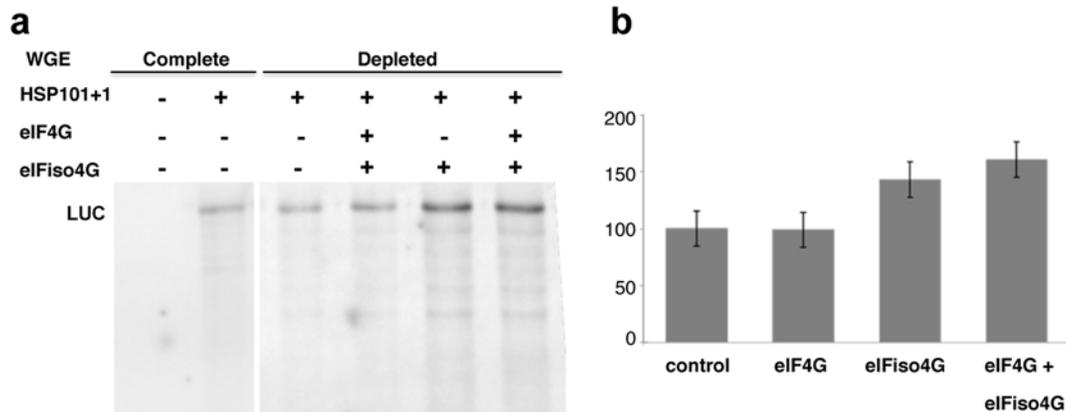


Figure 5. Hsp101+1 translation in a wheat system (WGE) depleted from eIF4E, eIFiso4E, eIF4G and eIFiso4G. a) Maize hsp101 translation in the complete WGE system. Lane 1: background signal obtained without added RNA (negative control); lane 2: hsp101+1-driven translation products (positive control). Maize hsp101 translation in the depleted WGE system: hsp101+1-driven translation (3); hsp101+1 translation adding recombinant eIF4G factor (4); hsp101+1 translation adding recombinant eIFiso4G factor (5); hsp101+1 translation adding both eIF4G and eIFiso4G (6). b) Histogram of cap-independent translation efficiency of RNA 101+1 when eIF4G and eIFiso4G are added to the system. Values represent the mean (\pm SD) of three independent assays. doi:10.1371/journal.pone.0107459.g005

elements [13]. In the case of maize hsp101 IRES activity, eIFiso4G was more active than eIF4G. This result might be explained by the fact that the factor generally used for plant mRNA translation is eIFiso4G [30,45] suggesting that this characteristic also prevails for IRES from plant mRNAs. This is in accordance with the fact that hsp101 IRES is specific to maize and thus, conserves a preference for factors from the same origin. Some cellular and viral IRES elements also require eIF4G factor [46–48] for translation initiation. However, there are no sequence similarities with the maize hsp101 IRES sequence, suggesting that the interaction can be based on a structural RNA domain, possibly helped by the interaction with other interacting factors.

Our results raised the possibility that SL1 could provide the binding-site for proteins such as HSP90 or eIFiso4G, a possibility that needs to be tested in the future. Interestingly, the results obtained in the current work suggest that transfer of the IRES hsp101 of maize to other plant mRNAs could confer translational advantage under heat stress and thus, alleviate problems of thermo-tolerance in plants.

In summary, this work reports the first experimental secondary structure of the IRES of a cellular mRNA of plants (hsp101), the participation of HSP90 in the maize IRES hsp101 complex and finally, the preference for eIFiso4G for translation initiation under cap-independent conditions.

Material and Methods

Constructs

The IRES sequence amplification reactions were performed as previously reported [2] using the PXE101 plasmid with the hsp101 cDNA as template including the 5'UTR region (Figure 1a). Recognition sequence for the restriction enzyme *SacI* was added to the primers used in the amplification reactions. Construct hsp101+1 was generated with the pair of primers forward hsp101+1 5'-CGAGCTCGCACAAACATTTCAACCAGA-3'/reverse RV101* 5'-AGCAGCCATGAATCCGGACAACCTCTC-GACG-3'. For constructs hsp101 Δ 17 and hsp101 Δ 50, the pair of primers forward hsp101-A 5'-CGAGCTCGAAACACTAGCC-GAAGCAA-3'/reverse RV101* and forward hsp 101-B 5'-CGAGCTCCACCTGGTGGGATCATCTC-3'/reverse RV101* respectively, were used. PCR products were inserted into the

pGEM-T EASY cloning vector to generate pGEM-101+1, pGEM-101 Δ 17 and pGEM-101 Δ 50, respectively. The fragments were then excised with *SacI* to replace the IRES sequence in pBIC-5 generating pBIC-hsp101+1, pBIC-hsp101 Δ 17 and pBIC-hsp101 Δ 50 constructs. RNAs derived from pGEM-T constructs were synthesized using T7 RNA polymerase with Pst1 linearized plasmids. Bicistronic RNAs pBIC-5, 101+1, 101 Δ 17 and 101 Δ 50 synthesized *in vitro* using HpaI linearized plasmids and T7 RNA polymerase [2].

In vitro translation

Cap-dependent and cap-independent translation was examined either in rabbit reticulocyte lysate (RRL) or Wheat Germ Extract (WGE). For cap-dependent translation analysis, a mix of RRL (17.5 μ l), RNasin (1 μ l), amino acids mix without methionine (1 μ l), the bicistronic RNA (100 ng) and [35 S] methionine (1 μ l, 10 μ Ci) was prepared in a final volume of 35 μ l with DEPC-treated water. The mix was incubated 60 min at 30°C; at the end of the reaction, 1 μ l of each sample was obtained and the synthesized proteins were resolved by SDS-PAGE. Gels were dried and exposed to a phosphorscreen to be analyzed by the QUANTITY ONE software (BIORAD). Values represent the mean (\pm SD) of three independent assays.

To generate the cap-independent RRL translation system, 50 ng of mRNA encoding the Lb protease of FMDV, a protein that cleaves eIF4G preventing cap-dependent translation [14], was added to the RRL mix and incubated at 30°C for 15 minutes. Subsequently, 100 ng of each bicistronic mRNA were added to the mix and incubated for another 45 minutes prior to analyze the translation products as indicated above. When indicated, the HSP90 inhibitors, Radicicol (SIGMA) and HSP90 antibody (Santa Cruz), or the commercially purified HSP90 protein (100 ng) (BIOMART) were added to the hsp101 IRES-driven translation in separate reactions.

Similarly, WGE was used either complete (cap-dependent) or eIF4E and eIFiso4E-depleted (cap-independent). For cap-independent translation, eIF4E and eIFiso4E were depleted from WGE using m⁷GTP sepharose [49]. To this end, 150 μ l of m⁷GTP sepharose were centrifuged at 1500 rpm for 1 min to eliminate the supernatant and the resin was washed twice with 2

volumes of m^7 GTP buffer (100 mM KCl, 20 mM HEPES, pH7.6, 0.2 mM EDTA, 10% glycerol, 0.05 mM PMSF, 0.5 mM DTT). Then, 50 μ l of WGE were added to the resin and the mix was incubated for 30 minutes at 4°C with gentle shaking. Finally, the sample was centrifuged at 1500 rpm for 1 min at 4°C, the supernatant was recovered and used as the WGE depleted lysate. The translation reaction mix contained 12.5 μ l of WGE depleted, 1 μ l RNasin, 1 μ l of amino acids mix without methionine, 100 ng of hsp101+1 RNA, 1 μ l [35 S] methionine (10 μ Ci), 100 ng of eIF4G or eIFiso4G and DEPC-treated water to reach a volume of 25 μ l. The mix was incubated for 60 min at 25°C. Newly synthesized proteins were resolved by SDS-PAGE loading 1 μ l of each sample. Gels were dried and exposed to a phosphorimager screen.

Determination of the maize hsp101 IRES secondary structure by Selective 2'-Hydroxyl Acylation Primer Extension (SHAPE)

In order to determine the IRES secondary structure, hsp101+1 RNA was synthesized with T7 RNA polymerase using pBIC-hsp101+1 plasmid linearized with *BbuI* [50]. SHAPE reactivity assays were carried out as described [27] with some modifications [28]. Briefly, hsp101+1 RNA (2 pmol) were resuspended in 12 μ l 0.5X TE buffer, heated for 2 min at 95°C and then cooled for 2 min at 4°C; 6 μ l of 3.3-RNA folding mix (333 mM HEPES, pH 8.0, 20 mM MgCl₂, 333 mM NaCl) were added and incubated for 20 min at 37°C. This mix was divided into two tubes (9 μ l in each tube); 1.5 μ l NMIA (65 mM) [27] was added to one of the tubes (+) and 1.5 μ l DMSO to the other (-). Either reaction was incubated for 45 min at 37°C. At the end of the incubation period, 90 μ l H₂O, 4 μ l 5 M NaCl, 1 μ l glycogen (20 mg/ml), 2 μ l 100 mM EDTA, pH 8 and 350 μ l absolute ethanol were added to each reaction tube. Samples were precipitated and the pelleted RNA was resuspended in 20 μ l 0.5X TE. Ten microliters of each RNA sample, NMIA (+) and (-), were transferred to a 200 μ l tube; 0.5 μ l of the [32 P]-5' labeled oligonucleotide (GGCC³²TTTCTTTATGTTTTTGCG) using polynucleotide kinase (PROMEGA) were added and incubated first, for 5 min at 65°C, then for 5 min at 35°C and finally at 4°C for 1 min. Three microliters of reverse transcriptase (RT) Superscript III buffer, 1U RNasin, 0.25 μ l 100 mM DTT, 1.5 μ l 10 mM dNTPs and 0.25 μ l H₂O were added to each sample and further incubated for 1 min at 52°C. Then, 0.25 μ l Superscript III RT

(INVITROGENE) was added and the mix and incubated for 30 min at 52°C. At the end of the reaction, 0.4 μ l of 4 M NaOH were added to each sample. Samples were precipitated by adding 1 volume of AcNH₄, 1 μ l glycogen and 75 μ l absolute ethanol. Pellets were resuspended in 10 μ l H₂O plus 4 μ l formamide buffer (90% formamide). Primer extension products were resolved on denaturing 6% polyacrylamide 7 M urea gels, in parallel to a sequence ladder prepared with the same 5'-end-labeled primer. Gels were dried and exposed to a radiography film for quantification. SHAPE reactivity data was analyzed as described [50].

Purification of IRES-associated proteins

In order to identify the proteins interacting with hsp101 IRES (either sense hsp101+1 or antisense orientation inserted in the bicistronic constructs), 101+1, 101 Δ 17 and 101 Δ 50 RNAs (derived from pGEM-T EASY), were synthesized adding a poly-A tail using poly-A polymerase (AMBION) as described by the manufacturer. From each RNA sample, 2.5 μ g were transferred to 100 μ l of binding buffer (10 mM Tris, pH 7.5, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂) containing 30 μ l oligo dT sepharose. Samples were incubated for 30 min at 4°C with gentle shaking and then washed twice with binding buffer to remove unbound RNA. Then, 100 μ g of RRL and 10 μ g total RNA (nonspecific competitor) were added to a final volume of 100 μ l binding buffer and incubated for 60 min at 4°C with gentle shaking. Samples were washed twice with binding buffer followed by washing buffer (10 mM Tris, pH 7.5, 100 mM KCl, 0.5 mM MgCl₂) to remove unbound proteins to the IRES-oligo dT sepharose complex. IRES-protein complexes were resolved by SDS-PAGE and visualized by silver staining in triplicate experiments. Thin slices containing differential IRES-bound proteins were excised and identified by mass spectrometry (LC/MS/MS) at Quebec Genomics Center.

Acknowledgments

The authors acknowledge Sara Jiménez López (Universidad Nacional Autónoma de México) for generously provided eIF4G and eIFiso4G recombinants proteins.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ESdJ ASJG. Performed the experiments: ASJG NF. Analyzed the data: ASJG NF EMS ESdJ. Contributed to the writing of the manuscript: ESdJ EMS.

References

- Nieto-Sotelo J, Martinez LM, Ponce G, Cassab GI, Alagon A, et al. (2002) Maize HSP101 plays important roles in both induced and basal thermotolerance and primary root growth. *Plant Cell* 14: 1621–1633.
- Dinkova TD, Zepeda H, Martinez-Salas E, Martinez LM, Nieto-Sotelo J, et al. (2005) Cap-independent translation of maize Hsp101. *Plant J* 41: 722–731.
- Sonenberg N, Hinnebusch AG (2009) Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136: 731–745.
- Komar AA, Hatzoglou M (2011) Cellular IRES-mediated translation: the war of ITAFs in pathophysiological states. *Cell Cycle* 10: 229–240.
- Spriggs KA, Bushell M, Willis AE (2010) Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. *Mol Cell* 40: 228–237.
- Cobbold LC, Spriggs KA, Haines SJ, Dobbyn HC, Hayes C, et al. (2008) Identification of internal ribosome entry segment (IRES)-trans-acting factors for the Myc family of IRESs. *Mol Cell Biol* 28: 40–49.
- Stoneley M, Willis AE (2004) Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression. *Oncogene* 23: 3200–3207.
- Yanguéz E, Castro-Sanz AB, Fernandez-Bautista N, Oliveros JC, Castellano MM (2013) Analysis of genome-wide changes in the translome of Arabidopsis seedlings subjected to heat stress. *PLoS One* 8: e71425.
- Baird SD, Turcotte M, Korneluk RG, Holcik M (2006) Searching for IRES. *RNA* 12: 1755–1785.
- Martinez-Salas E (2008) The impact of RNA structure on picornavirus IRES activity. *Trends Microbiol* 16: 230–237.
- Martinez-Salas E, Pineiro D, Fernandez N (2012) Alternative Mechanisms to Initiate Translation in Eukaryotic mRNAs. *Comp Funct Gen* 2012: 391546.
- Graber TE, Holcik M (2007) Cap-independent regulation of gene expression in apoptosis. *Mol BioSystems* 3: 825–834.
- Martinez-Salas E, Pacheco A, Serrano P, Fernandez N (2008) New insights into internal ribosome entry site elements relevant for viral gene expression. *J Gen Virol* 89: 611–626.
- Martinez-Salas E, Saiz JC, Davila M, Belsham GJ, Domingo E (1993) A single nucleotide substitution in the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus leads to enhanced cap-independent translation in vivo. *J Virol* 67: 3748–3755.
- Chappell SA, LeQuesne JP, Paulin FE, deSchoolmeester ML, Stoneley M, et al. (2000) A mutation in the c-myc-IRES leads to enhanced internal ribosome entry in multiple myeloma: a novel mechanism of oncogene de-regulation. *Oncogene* 19: 4437–4440.
- Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 113–127.
- Filbin ME, Kieft JS (2009) Toward a structural understanding of IRES RNA function. *Curr Opin Struct Biol* 19: 267–276.
- Echevarria-Zomeno S, Yanguéz E, Fernandez-Bautista N, Castro-Sanz AB, Ferrando A, et al. (2013) Regulation of Translation Initiation under Biotic and Abiotic Stresses. *Int J Mol Sci* 14: 4670–4683.

19. Jaag HM, Kawchuk L, Rohde W, Fischer R, Emans N, et al. (2003) An unusual internal ribosomal entry site of inverted symmetry directs expression of a potato leafroll polerovirus replication-associated protein. *Proc Nat Acad Sci USA* 100: 8939–8944.
20. Koh DC, Wong SM, Liu DX (2003) Synergism of the 3'-untranslated region and an internal ribosome entry site differentially enhances the translation of a plant virus coat protein. *J Biol Chem* 278: 20565–20573.
21. Zelenko V, Gallie DR (2005) Cap-independent translation of tobacco etch virus is conferred by an RNA pseudoknot in the 5'-leader. *J Biol Chem* 280: 26813–26824.
22. Dorokhov YL, Ivanov PA, Komarova TV, Skulachev MV, Atabekov JG (2006) An internal ribosome entry site located upstream of the crucifer-infecting tobamovirus coat protein (CP) gene can be used for CP synthesis in vivo. *J Gen Virol* 87: 2693–2697.
23. Karetnikov A, Lehto K (2007) The RNA2 5' leader of Blackcurrant reversion virus mediates efficient in vivo translation through an internal ribosomal entry site mechanism. *J Gen Virol* 88: 286–297.
24. Fernandez-Miragall O, Hernandez C (2011) An Internal Ribosome Entry Site Directs Translation of the 3'-Gene from Pelargonium Flower Break Virus Genomic RNA: Implications for Infectivity. *PLoS One* 6: e22617.
25. Mardanova ES, Zamchuk LA, Skulachev MV, Ravin NV (2008) The 5' untranslated region of the maize alcohol dehydrogenase gene contains an internal ribosome entry site. *Gene* 420: 11–16.
26. Kirchweger R, Ziegler E, Lamphear BJ, Waters D, Liebig HD, et al. (1994) Foot-and-mouth disease virus leader proteinase: purification of the Lb form and determination of its cleavage site on eIF-4 gamma. *J Virol* 68: 5677–5684.
27. Wilkinson KA, Merino EJ, Weeks KM (2006) Selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension (SHAPE): quantitative RNA structure analysis at single nucleotide resolution. *Nat Protoc* 1: 1610–1616.
28. Fernandez N, Garcia-Sacristan A, Ramajo J, Briones C, Martinez-Salas E (2011) Structural analysis provides insights into the modular organization of picornavirus IRES. *Virology* 409: 251–261.
29. Uehara Y (2003) Natural product origins of Hsp90 inhibitors. *Current Cancer Drug Targets* 3: 325–330.
30. Mayberry LK, Allen ML, Nitka KR, Campbell L, Murphy PA, et al. (2011) Plant cap-binding complexes eukaryotic initiation factors eIF4F and eIF4E: molecular specificity of subunit binding. *J Biol Chem* 286: 42566–42574.
31. Patrick RM, Browning KS (2012) The eIF4F and eIF4E Complexes of Plants: An Evolutionary Perspective. *Comp Funct Gen* 2012: 287814.
32. Woolaway KE, Lazaridis K, Belsham GJ, Carter MJ, Roberts LO (2001) The 5' untranslated region of *Rhopalosiphum padi* virus contains an internal ribosome entry site which functions efficiently in mammalian, plant, and insect translation systems. *J Virol* 75: 10244–10249.
33. Urwin P, Yi L, Martin H, Atkinson H, Gilmartin PM (2000) Functional characterization of the EMCV IRES in plants. *Plant J* 24: 583–589.
34. Wong SM, Koh DC, Liu D (2008) Identification of plant virus IRES. *Meth Mol Biol* 451: 125–133.
35. Rubtsova MP, Sizova DV, Dmitriev SE, Ivanov DS, Prassolov VS, et al. (2003) Distinctive properties of the 5'-untranslated region of human hsp70 mRNA. *J Biol Chem* 278: 22350–22356.
36. Hernandez G, Vazquez-Pianzola P, Sierra JM, Rivera-Pomar R (2004) Internal ribosome entry site drives cap-independent translation of reaper and heat shock protein 70 mRNAs in *Drosophila* embryos. *RNA* 10: 1783–1797.
37. Le Quesne JP, Stoneley M, Fraser GA, Willis AE (2001) Derivation of a structural model for the c-myc IRES. *J Mol Biol* 310: 111–126.
38. Dotu I, Lozano G, Clote P, Martinez-Salas E (2013) Using RNA inverse folding to identify IRES-like structural subdomains. *RNA Biology* 10: 1842–1852.
39. Xia X, Holcik M (2009) Strong eukaryotic IRESs have weak secondary structure. *PLoS One* 4: e4136.
40. Ding Y, Tang Y, Kwok CK, Zhang Y, Bevilacqua PC, et al. (2014) In vivo genome-wide profiling of RNA secondary structure reveals novel regulatory features. *Nature* 505: 696–700.
41. Chen B, Zhong D, Monteiro A (2006) Comparative genomics and evolution of the HSP90 family of genes across all kingdoms of organisms. *BMC Genomics* 7: 156.
42. Gupta RS (1995) Phylogenetic analysis of the 90 kDa heat shock family of protein sequences and an examination of the relationship among animals, plants, and fungi species. *Mol Biol Evol* 12: 1063–1073.
43. Matsumoto K, Minami M, Shinozaki F, Suzuki Y, Abe K, et al. (2011) Hsp90 is involved in the formation of P-bodies and stress granules. *Biochem Biophys Res Commun* 407: 720–724.
44. Ujino S, Nishitsuji H, Sugiyama R, Suzuki H, Hishiki T, et al. (2012) The interaction between human initiation factor eIF3 subunit c and heat-shock protein 90: a necessary factor for translation mediated by the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *Virus Res* 163: 390–395.
45. Lellis AD, Allen ML, Aertker AW, Tran JK, Hillis DM, et al. (2010) Deletion of the eIF4G subunit of the Arabidopsis eIF4F translation initiation complex impairs health and viability. *Plant Mol Biol* 74: 249–263.
46. Kolupaeva VG, Pestova TV, Hellen CU, Shatsky IN (1998) Translation eukaryotic initiation factor 4G recognizes a specific structural element within the internal ribosome entry site of encephalomyocarditis virus RNA. *J Biol Chem* 273: 18599–18604.
47. Lopez de Quinto S, Martinez-Salas E (2000) Interaction of the eIF4G initiation factor with the aphthovirus IRES is essential for internal translation initiation in vivo. *RNA* 6: 1380–1392.
48. Spriggs KA, Cobbold LC, Jopling CL, Cooper RE, Wilson LA, et al. (2009) Canonical initiation factor requirements of the Myc family of internal ribosome entry segments. *Mol Cell Biol* 29: 1565–1574.
49. Gallie DR, Browning KS (2001) eIF4G functionally differs from eIF4E in promoting internal initiation, cap-independent translation, and translation of structured mRNAs. *J Biol Chem* 276: 36951–36960.
50. Fernandez N, Fernandez-Miragall O, Ramajo J, Garcia-Sacristan A, Bellora N, et al. (2011) Structural basis for the biological relevance of the invariant apical stem in IRES-mediated translation. *Nucleic Acids Res* 39: 8572–8585.