



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**Caracterización de las condiciones de interacción y localización celular del  
complejo Med9—eIF4E en *Saccharomyces cerevisiae***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

**DAISY ALÍ SALDAÑA DE LA CRUZ**

TUTOR PRINCIPAL

**Dr. GRECO HERNÁNDEZ RAMÍREZ**  
Instituto Nacional de Cancerología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
**Dra. TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA**  
Instituto de Química, UNAM

**Dr. JOSÉ EFRAÍN GARRIDO GUERRERO**  
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN

Ciudad de México. Julio, 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

*... Antes de convencer al intelecto,  
es imprescindible tocar y predisponer al corazón.*

*B. Pascal.*

## AGRADECIMIENTOS

A mi *alma mater* y al Posgrado en Ciencias Bioquímicas, por haberme brindado la formación académica y las herramientas necesarias para realizar mi maestría.

Al mi tutor, el Dr. Greco Hernández Ramírez, por brindarme la oportunidad de unirme a su equipo de trabajo, por la dirección general de esta tesis realizada en su laboratorio “Traducción y Cáncer”, en el Instituto Nacional de Cancerología. Le agradezco también todo el apoyo, lecciones y confianza.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca (926977) otorgada a lo largo de mi trayecto educativo.

A la Dra. Xóchitl Pérez Martínez, del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, por brindarme un espacio en su laboratorio durante un año, y sobre todo gracias por sus enseñanzas que permitieron que mejorara mi formación profesional.

A la Dra. Yolanda Camacho Villasana, del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, no tengo palabras para agradecer el apoyo, asesoría técnica y su infinita paciencia.

A mi Comité Tutoral, por su asesoría durante el desarrollo de esta tesis, el cual estuvo formado por:

Tzvetanka Dimitrova Dinkova  
José Efraín Garrido Guerrero

Instituto de Química, UNAM  
CINVESTAV

## **DEDICATORIAS**

A mi Luz, guía, pilar y protectora. Tu mereces el mérito de todo lo bueno que he logrado. Té amo mamá.

A mi papá y mis hermanitos, por su apoyo consejo, sacrificios y no escatimar en nada por mi felicidad. Los amo.

A Griselda y Ana, por darme tanto cariño y apoyo durante toda mi vida. Gracias por tanto.

A mis amigos que me acompañaron durante esta etapa y me ayudaron a hacer este trabajo posible. Ale, Dany, Gio, Pau y Vince.

A Alfred, Dian, Gio, Vale, Vane. Por su incondicionalidad y apoyo siempre.

## CONTENIDO

	Página
<b>I. ABREVIATURAS</b>	7
<b>II. INDICE DE FIGURAS</b>	8
<b>III. INDICE DE TABLAS</b>	9
<b>IV. RESUMEN</b>	10
<b>V. INTRODUCCIÓN</b>	
1. Traducción	12
2. El factor del inicio de la traducción 4E	15
3. El mismo “sombrero” para diferentes ocasiones: eIF4E como chaperona multifuncional	17
4. Regulación de la actividad de eIF4E por proteínas de unión	24
5. Proteínas de unión a eIF4E de <i>S. cerevisiae</i>	25
6. Transcripción genética	27
7. Med9	29
8. Proteínas involucradas en el proceso de transcripción que interactúan con eIF4E	29
<b>VI. ANTECEDENTES</b>	31
<b>VII. OBJETIVO GENERAL</b>	33
<b>VIII. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	33
<b>IX. MATERIALES Y METODOS</b>	
1. Cepas	34
2. Medios de cultivo	34

3. Separación de extractos nucleares y citoplásmicos de <i>S. Cerevisiae</i>	35
4. Lisis total celular de <i>S. Cerevisiae</i>	36
5. Cuantificación de la concentración proteica	36
6. <i>Crosslinking</i> químico	37
7. Ensayo de Inmunoprecipitación	38
8. Ensayo de <i>Pull down</i> con <sup>7</sup> metil-GTP-Sepharosa	39
9. Electroforesis desnaturalizante	40
10. Western <i>blot</i>	40
11. Diluciones seriadas 1:10 de cultivos celulares	41
12. Curvas de crecimiento celular	42
<b>X. RESULTADOS</b>	44
<b>XI. DISCUSION</b>	58
<b>XII. CONCLUSIONES</b>	63
<b>XIII. PERSPECTIVAS</b>	63
<b>ANEXO 1</b>	64
<b>XIV. REFERENCIAS</b>	67

## I. ABREVIATURAS

<i>cap</i>	7 metilguanosina ( $m^7GpppN$ )
CBC	Complejo nuclear de unión al cap
CPA	Complejo de corte y poliadenilación del RNA
CPSF	Factor de especificidad de corte y poliadenilación
DTT	Dithiothreitol
eIF-	Factor de inicio de traducción en eucariotes
GTP	Guanosina trifosfato
met-tRNA <sub>i</sub> <sup>met</sup>	RNA de transferencia iniciador
mRNA	RNA mensajero
mRNP	Ribonucleoproteína de RNA mensajero
PABP	Proteína de unión a la cola poli A
PAS	Sitio de poliadenilación
Poli A	Secuencia de adeninas en la región 3' UTR de algunos mRNA
RNA	Ácido ribonucleico
RNP	Ribonucleoproteína
tRNA	RNA de transferencia
UTR	Región no traducida del mRNA

## II. INDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Inicio de la traducción en eucariontes	14
<b>Figura 2:</b> Roles de eIF4E en el metabolismo del mRNA en <i>S. cerevisiae</i> .	19
<b>Figura 3:</b> Roles de eIF4E en el metabolismo del mRNA en <i>S. pombe</i> .	20
<b>Figura 4:</b> Roles de eIF4E en el metabolismo del mRNA en células humanas.	23
<b>Figura 5.</b> Interacción entre Med9 y eIF4E.	31
<b>Figura 6.</b> Estandarización de separación de fracciones celulares en una cepa baja en proteasas	46
<b>Figura 7.</b> Separación de fracciones celulares bajo las respectivas condiciones de cada cepa.	47
<b>Figura 8</b> Localización celular de Med9 y eIF4E en <i>S. cerevisiae</i> .	48
<b>Figura 9.</b> eIF4E no se observa en la fracción nuclear.	49
<b>Figura 10.</b> Al realizar PD eIF4E no se observa en la fracción nuclear	50
<b>Figura 11.</b> eIF4E es reconocido por el anticuerpo producido en el laboratorio	52
<b>Figura 12.</b> Formación del complejo Med9—eIF4E en el crecimiento celular con rafinosa.	53
<b>Figura 13.</b> El complejo Med9—eIF4E se observó en presencia de galactosa y rafinosa.	54
<b>Figura 14.</b> El complejo Med9—eIF4E se observó en presencia de galactosa y rafinosa.	55
<b>Figura 15.</b> Curvas de crecimiento de la cepa $\Delta$ Med9 en medios con rafinosa, galactosa y glucosa	56
<b>Figura 16.</b> El fenotipo de la delección de Med9 se ve afectado de igual forma en las tres fuentes de carbono probadas.	57

**Figura 17.** Modelo de la formación del complejo Med9—eIF4E en galactosa y rafinosa.

61

### III. INDICE DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1.</b> Proteínas involucradas en el proceso de transcripción que se unen a eIF4E	30
<b>Tabla 2.</b> Cepas usadas en este estudio	34
<b>Tabla 3.</b> Condiciones específicas para la separación de las fracciones celulares por cepa.	46

#### IV. RESUMEN

En los organismos eucariontes, el factor del inicio de la traducción eIF4E reconoce la estructura *cap* presente en los mRNAs y, con esta actividad enzimática, cataliza el reclutamiento de los mRNAs a los ribosomas para que inicie su traducción durante la síntesis de proteínas. Así, eIF4E juega un papel crucial en el control de la composición general del proteoma en las células. La visión tradicional de que eIF4E actúa únicamente en la traducción ha cambiado en los últimos años, debido a que nuevas evidencias señalan a eIF4E como una chaperona multifuncional del mRNA acompañándolo a través de diversas etapas debido a su capacidad de unir el *cap*. Se ha encontrado a eIF4E en el núcleo de células humanas donde actúa en la maduración y exportación de mRNA, en cuerpos de procesamiento citoplasmático (cuerpos P) de mamíferos y levaduras donde funciona en el secuestro del mRNA, y en los gránulos de estrés (SG) de levadura donde ayuda al resguardo de mRNP. Estos hallazgos proporcionan nuevas perspectivas sobre roles de eIF4E que van más allá de su papel en el inicio de la traducción para regular el proteoma.

Durante el inicio de la traducción, la actividad de eIF4E está regulada por represores traduccionales llamados proteínas de unión a 4E (4E-BP). Estas proteínas sólo se encuentran en metazoarios y comparten con eIF4G el sitio de unión a eIF4E (4E-BS). Sin embargo, un número creciente de proteínas que interactúan con eIF4E en diferentes organismos se siguen descubriendo, pero debido a que su secuencia o estructura no están relacionadas con las 4E-BP y tampoco están relacionadas filogenéticamente entre sí, se les han denominado proteínas interactoras de 4E (4E-IP). Aunque algunas de ellas actúan como represores traduccionales, un grupo importante de estas tiene papeles dentro de la transcripción. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* sólo dos 4E-IP han sido reportadas, p20 y Eap1, además de las dos isoformas del factor de inicio de la traducción eIF4G.

El objetivo de esta tesis fue estudiar *in vivo* la interacción inédita de eIF4E con Med9 en *Saccharomyces cerevisiae*, una proteína que es parte del complejo de transcripción llamado Mediator. Nuestras observaciones experimentales indican que Med9 es una nueva 4E-IP no descrita antes. En esta tesis estudiamos la localización y las condiciones bajo las cuales se forma el complejo Med9—eIF4E *in vivo* ya que

previamente en un *screening* genómico por doble híbrido (2H) usando eIF4E como sonda se detectó que eIF4E forma un complejo estable con Med9.

Mediante inmunoprecipitación y *pull-down* empleando lisados de *S. cerevisiae* crecidos en medios con rafinosa y galactosa logramos identificar la formación del complejo Med9—eIF4E *in vivo*; sin embargo, en los lisados de las levaduras que crecían en glucosa no se observó interacción entre estas proteínas, sugiriendo que la interacción de estas proteínas está involucrada en el metabolismo de azúcares.

Por otro lado, la información del rol de Med9 es escasa, únicamente se le ha asignado un papel estructural como miembro del complejo mediador de la transcripción dentro del núcleo, y solo un reporte describe que en condiciones de hipoxia Med9 se relocaliza al citoplasma. Por ello, en esta tesis estandarizamos un protocolo para la separación de las fracciones nucleares y citosólica de *S. cerevisiae* para que posteriormente mediante inmunoprecipitación y *pull-down* se pueda identificar si la localización de Med9 y eIF4E se ve afectada cuando las levaduras que crecen en medios con rafinosa y galactosa.

En conclusión, en este trabajo demostramos que la capacidad de integrar múltiples señales sobre el tipo de fuente de carbono durante el crecimiento celular es un determinante crucial en la formación del complejo Med9—eIF4E *in vivo* en *S. cerevisiae*. Mientras que glucosa es un represor para la formación del complejo, otras fuentes de carbono como rafinosa y galactosa permiten las condiciones para la interacción de Med9 y eIF4E. Además, demostramos que Por1 forma parte del complejo uniéndose a eIF4E.

Proponemos un modelo en el que la formación del complejo Por1—Med9—eIF4E ocurre durante el inicio de la señalización para la expresión de genes *GAL* cerca de la mitocondria.

## V. INTRODUCCIÓN

### 1. Traducción

Las proteínas son componentes primarios y esenciales de la vida, y su síntesis es crucial para la existencia de todos los organismos de la Tierra. La síntesis de proteínas, también llamada “traducción”, es el proceso bioquímico por el cual se forma una cadena de aminoácidos o proteína. Esto se logra al interpretar o “traducir” la información genética contenida en los genes, utilizando para ello un código genético a través del cual el aparato de traducción celular (ribosomas y factores de traducción) traduce en aminoácidos la secuencia de nucleótidos contenidos en un mRNA. El orden o secuencia de los nucleótidos en el mRNA define la naturaleza y el orden de los aminoácidos de una proteína (Hershey *et al.*, 2018)

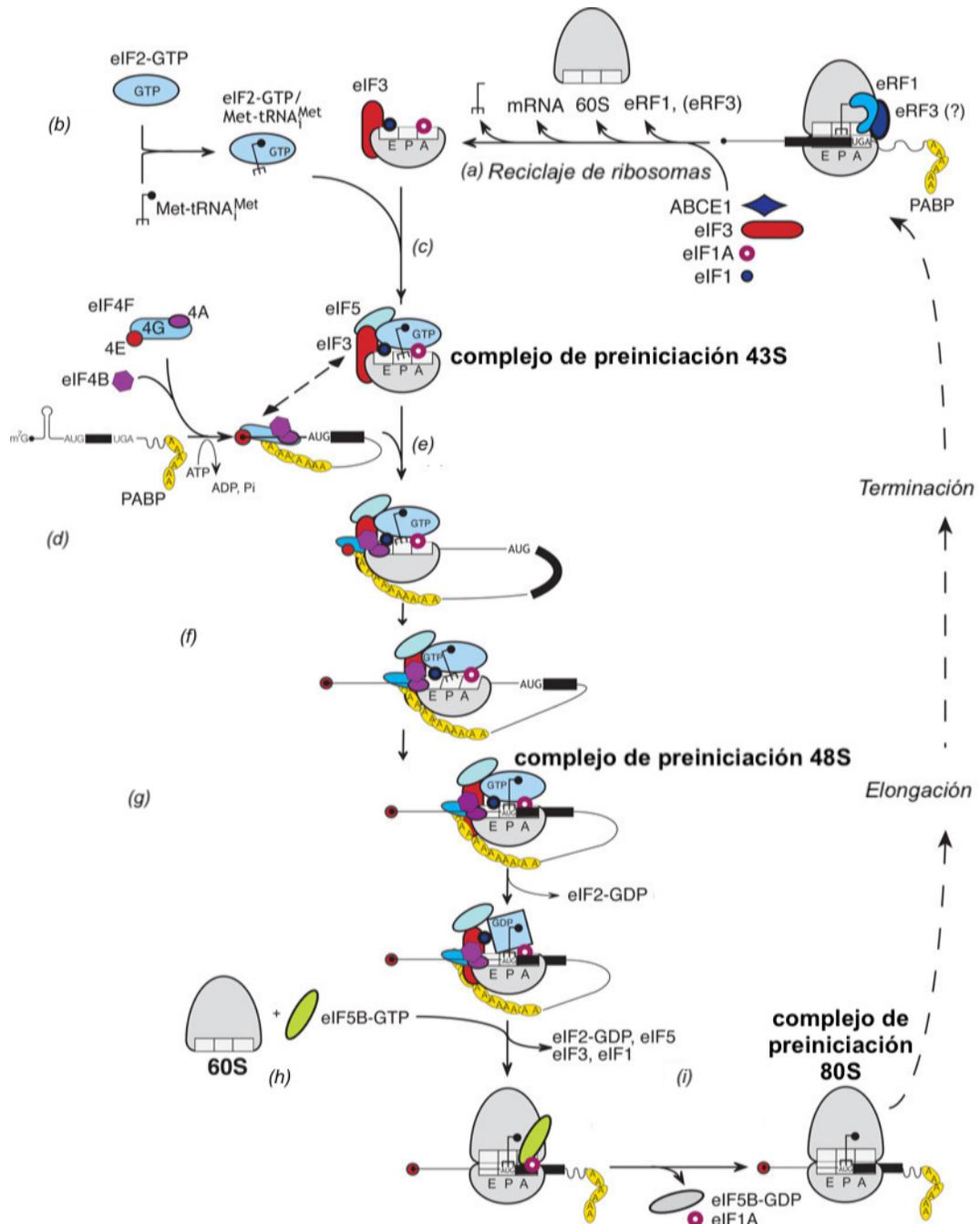
La síntesis de proteínas consume gran parte de la energía celular, y, en consecuencia, los organismos la mantienen estrechamente regulada (Hershey *et al.*, 2018; Sonenberg & Hinnebusch 2009). Las ventajas del control traduccional de mRNA preexistentes incluyen una respuesta rápida de las concentraciones proteicas en ausencia de transcripción para mantener la homeostasis (Hershey *et al.*, 2018).

La traducción es un proceso cíclico compuesto de cuatro etapas: iniciación, alargamiento, terminación y reciclaje de ribosomas (Jackson *et al.*, 2010). Las velocidades de traducción se pueden controlar en cada una de sus cuatro etapas. Sin embargo, su regulación global ocurre predominantemente en la etapa de iniciación, ya que permite un control rápido y reversible de la expresión génica (Sonenberg & Hinnebusch 2009; Jackson *et al.*, 2010).

El inicio de la traducción eucariota (Figura 1) requiere al menos once proteínas denominadas factores de inicio (eIF), las cuales realizan un conjunto de reacciones que dirigen el codón de inicio del mRNA al sitio P del ribosoma (Dever, 2002). Esta etapa comienza con la unión del eIF3, eIF1 y eIF1A a la subunidad 40S del ribosoma desencadenando un cambio conformacional en éste que permitirá la posterior interacción con el mRNA. La subunidad 40S unida a los factores eIF3, eIF1 y eIF1A se une entonces al complejo ternario eIF2-GTP-Met-tRNA (Figura 1b) para dar lugar al complejo de preiniciación denominado 43S (Figura 1c).

La mayoría de los transcritos son traducidos por un mecanismo dependiente del *cap* ( $m^7GpppN$ , donde N es cualquier nucleótido), en el cual la estructura *cap* presente en el extremo 5' del UTR (*untranslated region*) del mRNA es reconocida por el factor eIF4E (Figura 1d). Una vez unido el eIF4E al extremo 5' del mRNA, eIF4E se une a la helicasa eIF4A y a eIF4G. Las tres proteínas unidas (eIF4E, eIF4A y eIF4G) forman el complejo eIF4F. eIF4G es una proteína de andamiaje que también interacciona con eIF3 (que ya está unido al ribosoma) y con la proteína de unión a la cola Poli(A) (PABP), unión que promueve la circularización del mRNA. Una vez establecida la interacción del complejo ribosomal 43S con el mRNA mediante el complejo eIF4F, el complejo 43S realiza un movimiento en dirección 5' a 3' sobre el UTR del mRNA hasta alcanzar el codón de inicio de la traducción (usualmente AUG) (Figura 1f). En su conjunto, las interacciones del mRNA con el eIF4F y el 43S posicionado sobre el AUG iniciador conforman el complejo de preiniciación 48S (Figura 1g). Tras el reconocimiento del AUG por el 43S, el GTP asociado a eIF2 se hidroliza dejando el met-tRNA<sup>met</sup> en el sitio P del ribosoma. La unión de las subunidades ribosómicas es catalizada por eIF5B, y tras la unión de la subunidad 60S (Figura 1h), eIF5B hidroliza su GTP y se libera del ribosoma 80S, que ahora está listo para el siguiente paso de la traducción (Figura 1i), el alargamiento.

Durante el proceso de iniciación, la disponibilidad de eIF4F y su unión al *cap* del mRNA es un factor determinante en la tasa global de la traducción (Sonenberg & Hinnebusch 2009; Jackson *et al.*, 2010).



**Figura 1: Inicio de la traducción en eucariotes.** **a)** el reciclaje de subunidades ribosómicas; **b)** formación del eIF2-GTP-Met-tRNA (complejo ternario); **c)** formación del complejo de preiniciación 43S que comprende una subunidad 40S, eIF1, eIF1A, eIF3, eIF2-GTP-Met-tRNA; **d)** formación de eIF4F y reconocimiento del cap; **e)** unión del complejo 43S al mRNA; **f)** búsqueda del codón de inicio; **g)** reconocimiento del codón de inicio y la formación del complejo de preiniciación 48S; **h)** unión de la subunidad 60S al complejo 48S; **i)** liberación de eIF1A y eIF5B de los ribosomas competentes. (modificado de Jackson *et al.*, 2010).

## 2. El factor del inicio de la traducción 4E

eIF4E es una proteína altamente conservada, desempeña funciones críticas en la regulación de la expresión de proteínas, y su sobreexpresión moderada conduce a un crecimiento desregulado y una transformación maligna de las células (Davis *et al.*, 2019; Culjkovic *et al.*, 2005).

Desde su descubrimiento en 1976 por el grupo de Severo Ochoa (Filipowicz *et al.*, 1976,) y su caracterización bioquímica por el grupo de Aaron Shatkin en 1979-1980 (Sonenberg, *et al.*, 1978; Sonenberg *et al.*, 1979; Sonenberg *et al.*, 1980), por décadas la actividad de eIF4E se ha descrito en la traducción citosólica de mRNAs, en donde eIF4E juega un papel crucial. En asociación con eIF4G, eIF4A forma el complejo eIF4F que permite el reclutamiento del mRNA a traducirse por el complejo ribosomal 43S y la búsqueda del codón de inicio por éste (Sonenberg & Hinnebusch 2009; Jackson *et al.*, 2010). Sin embargo, eIF4E ha demostrado ser un actor mucho más diverso en la regulación postranscripcional ya que los mRNAs pueden ser acompañados por eIF4E durante múltiples etapas de su ciclo de vida. La principal evidencia que demuestra la actividad enzimática de eIF4E más allá de la traducción citosólica es su localización, ya que no está restringida a sitios que contienen ribosomas. Por ejemplo, eIF4E se encuentra en gránulos heterogéneos de ribonucleopartículas citoplasmáticas (RNP) conocidos como cuerpos P, así como en múltiples zonas dentro del núcleo, donde se ha descrito un papel en la exportación de mRNA (Parker & Sheth, 2007; Borden, 2016). Por lo tanto, las funciones de exportación, almacenamiento y traducción de mRNAs por eIF4E contribuyen a la transformación oncogénica de las células ya que se ha visto que eIF4E se encuentra elevado y desregulado en muchos tipos de cáncer, así como en muchas neoplasias hematológicas, como la leucemia mieloide aguda (LMA) y algunos linfomas (Carroll & Borden, 2013).

Al respecto, se ha observado que el aumento de la expresión de eIF4E en las células regula la traducción de varias proteínas involucradas en la estimulación del crecimiento autocrino (PDGF, IGF2), la supervivencia celular (Bcl-2, Bcl-xL), la invasión (MMP-9) y la comunicación con el entorno extracelular (NMDA). Por lo tanto, la modulación traduccional mediada por eIF4E de estos mRNA asociados a malignidad desempeña un papel fundamental tanto en la formación de tumores como en la metástasis (Carroll & Borden, 2013; Mamane *et al.*, 2004).

Por otro lado, se ha reportado que algunas especies tienen varios parálogos de eIF4E que muestran diferentes patrones de expresión en diferentes tejidos que promueven o inhiben la traducción de mRNAs específicos en respuesta de estímulos externos (Hernández & Vazquez-Pianzola, 2005). Curiosamente, algunos ortólogos de eIF4E también están restringidos a linajes filogenéticos específicos. Los mamíferos tienen cuatro isoformas eIF4E, eIF4E (también llamada eIF4E-1a), eIF4E-1b, eIF4E-2 (o 4EHP) y eIF4E-3 (Gillespie *et al.*, 2016). Mientras que eIF4E-1a es el principal factor de traducción, eIF4E-2 actúa probablemente como un represor de la traducción (Zuberek *et al.*, 2016). El papel biológico de eIF4E-1b en células de mamíferos sigue siendo desconocido, y su expresión está limitada a los ovocitos en todas las clases de Tetrapoda (Evsikov & Evsikova, 2008). El papel biológico de los miembros de la familia eIF4E también se ha investigado ampliamente en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, que codifica a cinco parálogos de eIF4E, que muestran diferentes patrones de expresión y mutaciones genéticas para el crecimiento y desarrollo (Keiper *et al.*, 2000). La isoforma IFE-3, es esencial para la embriogénesis y regula la determinación del sexo. IFE-1, que se expresa en línea germinal junto con IFE-3 e IFE-5, que se requieren para la producción de esperma funcional, ya que afecta la expresión de algunas proteínas específicas de los espermatozoides. IFE-2 también funciona en la línea germinal y se expresa principalmente en tejidos somáticos (Keiper *et al.*, 2000).

Otra especie con varios genes eIF4E es *Drosophila melanogaster*, que cuenta con siete genes que codifican ocho isoformas de eIF4E (Hernández *et al.*, 2005; Zuberek *et al.*, 2016). La expresión de estas proteínas varía a lo largo de su desarrollo. Para algunas de ellas, se ha informado un papel específico del tejido. Mientras que eIF4E-1 se requiere para la traducción general en todos los tejidos, eIF4E-3 es una proteína específica de los testículos requerida solo para la espermatogénesis, además expresa a 4EHP como un represor traduccional de mRNAs específicos durante la embriogénesis temprana (Hernández *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2012).

Por su parte, en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* se han descrito dos isoformas de eIF4E (Ptushkina, 2001), mientras que en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se ha identificado un único gen esencial que codifica para eIF4E (Altmann *et al.*, 1987).

La familia de proteínas eIF4E se divide en tres clases, clasificación que se basa en los residuos correspondientes a Trp-43 y Trp-56 de eIF4E de *H. sapiens* (Rhoads, 2009). Los miembros de la Clase I contienen Trp en ambas posiciones; Los miembros de clase II, por ejemplo, 4EHP, nCBP e IFE-4, contienen Tyr, Phe o Leu en la primera posición y Tyr o Phe en la segunda posición; y los miembros de Clase III contienen Trp en la primera posición y Cys o Tyr en la segunda posición (Rhoads, 2009).

La mayoría de las isoformas de eIF4E se unen al *cap* y al eIF4G o a proteínas de unión a 4E (4E-BP), pero a medida que surgieron más miembros de la familia eIF4E, se hizo evidente que las capacidades de unión no se conservaban necesariamente. Por ejemplo, los eIF4E-1 de mamífero (Clase I) se unen al *cap*, eIF4G y 4E-BP, los eIF4E-2 de mamífero (Clase II) se unen solo al *cap* y 4E-BP, y los eIF4E-3 de mamífero (Clase III) unen solo al *cap* y el eIF4G (Rhoads, 2009). eIF4E interactúa con eIF4G a través de varios residuos conservados presentes en el carboxi terminal, ubicado en la superficie dorsal de la proteína, y como actores centrales durante el inicio de la traducción, estas dos proteínas son objetivos para la regulación de la síntesis de proteínas (Matsuo *et al.*, 1997; Rhoads, 2009).

La estructura de eIF4E se asemeja a un guante de béisbol en cuya cavidad el anillo de guanina del *cap* 5' está apilado por las interacciones  $\pi - \pi$  entre las cadenas laterales de los aminoácidos W56 y W102 (los números se refieren al eIF4E de humano) (Tomoo *et al.*, 2003).

### **3. El mismo “sombrero” para diferentes ocasiones: eIF4E como chaperona multifuncional**

eIF4E tiene la capacidad de modular la expresión de proteínas debido a su unión específica con el *cap* a través de cuatro procesos bioquímicos: traducción de mRNA en el citosol, estabilizando el mRNA dentro de los cuerpos de procesamiento (cuerpos P) en levadura, probablemente inhibiendo la degradación del *cap* (Bregues & Parker, 2007), almacenamiento de mRNP dentro de gránulos de estrés en mamíferos (Kedersha *et al.*, 1999) y exportando mRNA específicos del núcleo al citosol (Culjkovic *et al.*, 2006).

El control de la traducción y la degradación de los mRNAs son importantes en la regulación de la expresión de genes. Se ha observado que a menudo muestran una

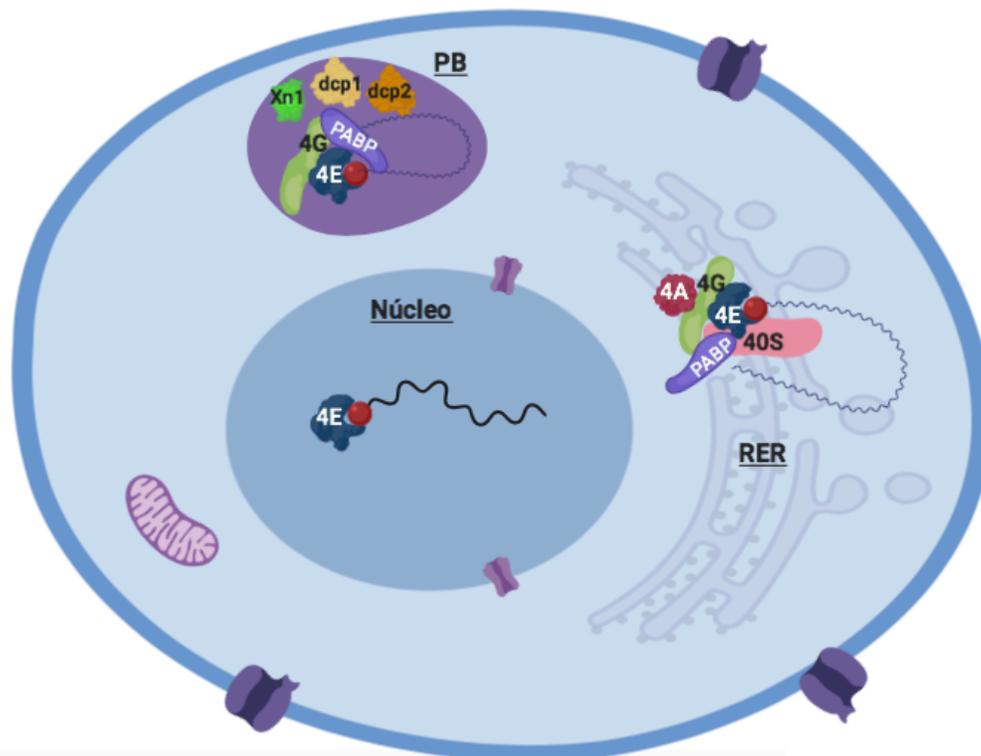
relación inversa, y es durante esta regulación dinámica donde eIF4E y su unión al *cap* de los mRNAs juegan un importante papel (Parker & Sheth, 2007), ya que son importantes para regular tres procesos generales del metabolismo de los mRNA: almacenamiento en cuerpos ribonucleoproteicos (RNP) citoplásmicos, exporte núcleo-citosol y traducción, que ya se mencionó (Figura 2). Vemos que, en estos tres procesos, eIF4E funciona como chaperona de los mRNAs (Kedersha *et al.*, 2005).

Los cuerpos P son agregados de mRNP reprimidos traduccionalmente. Los componentes de estos cuerpos pueden clasificarse en tres clases. Primero, se encuentra un grupo conservado de proteínas encargadas de la degradación del *cap* (*decapping*), que incluye la enzima Dcp1p/Dcp2p, enzimas activadoras y la exonucleasa 5'-3' Xrn1p. La segunda clase pertenece a represores de miRNAs y, por último, un grupo de proteínas de unión al mRNA y algunos factores de traducción como el eIF4E (Coller & Parker, 2004; Kedersha *et al.*, 2005).

En células humanas eIF4E tiene un papel durante la formación del mismo PB, formando un mRNP junto con un subconjunto de factores incluidos rck/p54 y eIF4E-T, el cual reprime la actividad traduccional dentro de los PB, lo que sugiere que estas proteínas participan en el proceso de la degradación de los mRNAs (Andrei, 2005).

En la levadura, el acortamiento de la cola de poli (A) conduce principalmente a la eliminación de la estructura *cap* por la exonucleasa Xrn1p. En *S. cerevisiae* eIF4E, eIF4G1, eIF4G2 y Pab1p se acumulan en los cuerpos P bajo la privación de glucosa y durante la fase estacionaria de crecimiento. Su acumulación sugiere que existe un subconjunto de mRNAs reprimidos pero preparados para volver a ingresar a la traducción mientras Pab1p, eIF4E y eIF4G se mantengan unidos a este (Bregues & Parker, 2007). Los procesos de *decapping* y traducción están mecánicamente conectados y parecen competir entre sí, al menos en levadura (Coller & Parker, 2004). Por ejemplo, disminuir la iniciación de la traducción aumenta la tasa de *decapping* en cuerpos P. Por el contrario, una inhibición durante alargamiento de la traducción conduce a una disminución significativa en la tasa de *decapping* (Tharun & Parker, 2001). La presencia de eIF4E unido a mRNPs dentro de los cuerpos P en *S. cerevisiae* evita la degradación del *cap*, en un sistema llamado "protección del *cap*" por la Xrn1p. Por lo tanto, los mRNAs podrían almacenarse en los cuerpos P en forma de

un mRNA inactivo antes de que se determine su destino en una etapa de remodelación posterior (Bregues & Parker, 2007; Parker & Sheth, 2007).

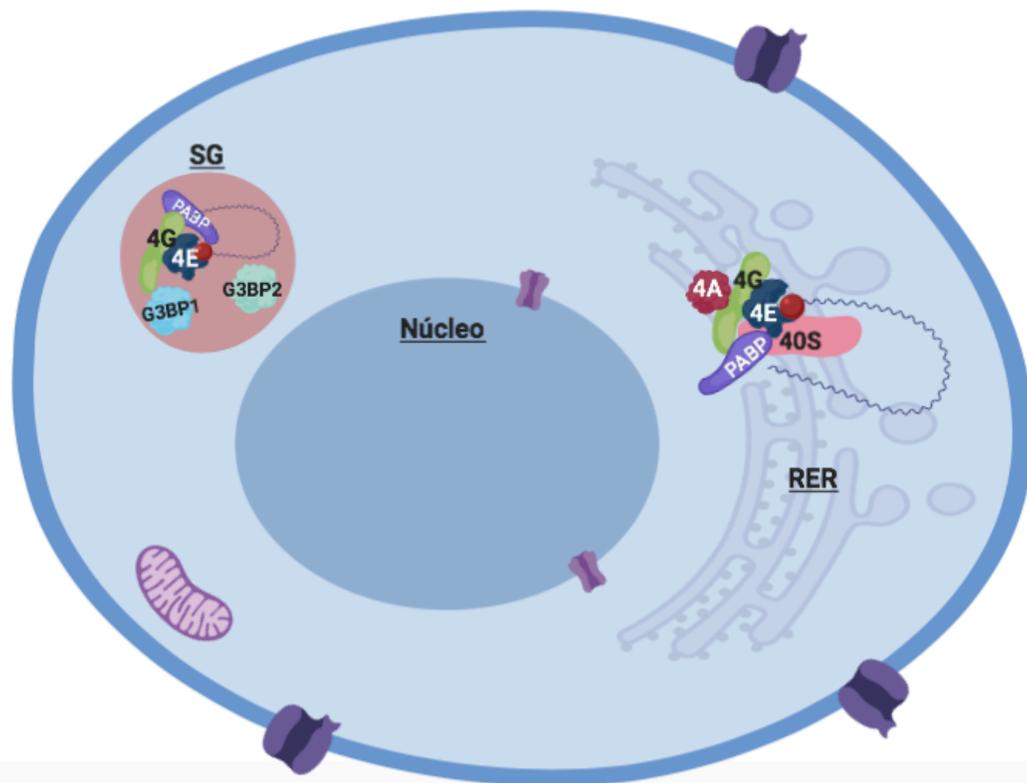


**Figura 2. Roles de eIF4E en el metabolismo del mRNA en *S. cerevisiae*.** En el citosol eIF4E participa durante el inicio de la traducción (Sonenberg, 1988), dentro de los cuerpos P (PB) ayuda a la estabilización del mRNA (Bregues & Parker, 2007), el rol que juega eIF4E dentro del núcleo aún se desconoce (Lang *et al.*, 1994).

Otros gránulos citoplasmáticos que contienen eIF4E en mamíferos son los gránulos de estrés (SG). Los SG se forman en respuesta al estrés que conduce a la fosforilación del factor eIF2 $\alpha$ , pero también pueden formarse en respuesta a defectos en la función eIF4A o eIF4G (Bregues & Parker, 2007; Kedersha *et al.*, 2005) desencadenando un paro traduccional, estos eventos provocan que muchas proteínas involucradas en la traducción asuman funciones auxiliares de "emergencia", activando un proceso de triaje molecular en el que se clasifica el mRNA y se determina su destino (Anderson & Kedersha, 2008). A diferencia de los cuerpos P, los SG contienen la mayoría del complejo de preiniciación 48S y, podrían ser sitios de traducción activa

para algunos mRNA, sin embargo, para la mayoría parece que es un sitio de resguardo para posteriormente volver a la traducción fuera de estos en condiciones favorables. Los SG aún no se han descrito en *S. cerevisiae*, aunque sí en la levadura *S. pombe* (Dunand-Sauthier *et al.*, 2002). Existe evidencia que apunta al desplazamiento de mRNAs específicos y factores del inicio de la traducción entre los cuerpos P y los SG que ayuda a la disminución o el aumento de las tasas de traducción de manera efectiva (Anderson & Kedersha, 2008).

Por lo tanto, en el citoplasma, eIF4E actúa en actividades independientes y dependientes de ribosomas, regulando la expresión génica a través de su capacidad de unión al *cap* (Kedersha *et al.*, 2005; Brengues & Parker, 2007).



**Figura 3. Roles de eIF4E en el metabolismo del mRNA en *S. pombe*.** En el citosol tiene un papel en la traducción y dentro de los gránulos de estrés (SG) juega un rol para el resguardo del mRNA (Dunand-Sauthier *et al.*, 2002)

eIF4E también se encuentra en el núcleo. Desde el primer reporte de la localización nuclear de este factor, diversos estudios han demostrado que hasta el 68% de eIF4E celular puede encontrarse en el núcleo en una amplia variedad de especies que van desde la levadura hasta los humanos. La actividad mejor definida es su función en la exportación de transcripciones específicas en células de humano (Culjkovic *et al.*, 2006; Topisirovic *et al.*, 2009). Se ha demostrado que la vía de exportación de mRNA dependiente de eIF4E es distinta de la exportación de mRNA en masa (Culjkovic *et al.*, 2006).

Si bien hasta hace un par de años se pretendía que la proteína transportadora 4E-T facilitaba la entrada nuclear, ahora se sabe que esta proteína no juega ningún papel en la entrada nuclear mediada por eIF4E, sino que altera la localización de eIF4E en los cuerpos P donde la función de eIF4E todavía no está completamente claro. Aunque la Importina 8 es el único mediador directo de la entrada nuclear eIF4E identificado hasta la fecha, es muy posible que en el futuro se encuentren otras proteínas para el transporte de eIF4E. A pesar de que no existen homólogos de Importina 8 en *S. cerevisiae*, es posible que en levaduras y eucariontes menos complejos, eIF4E use una proteína adaptadora diferente (Volpon., *et al* 2016).

Las interacciones de mRNA con eIF4E nuclear son muy específicas. Por ejemplo, eIF4E se asocia con aproximadamente 3,500 transcritos que típicamente contienen un elemento de ~50 nucleótidos conocido como “elemento de sensibilidad a eIF4E” (4E-SE) en su 3' UTR. Estos mRNAs codifican redes de proteínas que actúan en vías particularmente involucradas en la proliferación, supervivencia e invasión. Curiosamente, la sobreexpresión de eIF4E altera la composición del poro nuclear, lo que conduce a una mayor exportación de los mRNAs con el 4E-SE (Davis *et al.*, 2019; Borden, 2016).

El 4E-SE actúa en la exportación de mRNA reclutando cofactores involucrados en la exportación dependiente de eIF4E, incluida la proteína de repetidos pentatricopeptídicos rica en leucina (LRPPRC), que se une directamente al 4E-SE y al receptor de poro nuclear CRM1 (receptor de exportación para esta vía). De hecho, esta ruta de exportación de mRNA no requiere el receptor de exportación de mRNA en masa TAP/NXF1, y la eliminación de TAP/NXF1 no afecta la exportación de las transcripciones con el 4E-SE, mientras que la leptomicina B (inhibidora de CRM1) sí lo

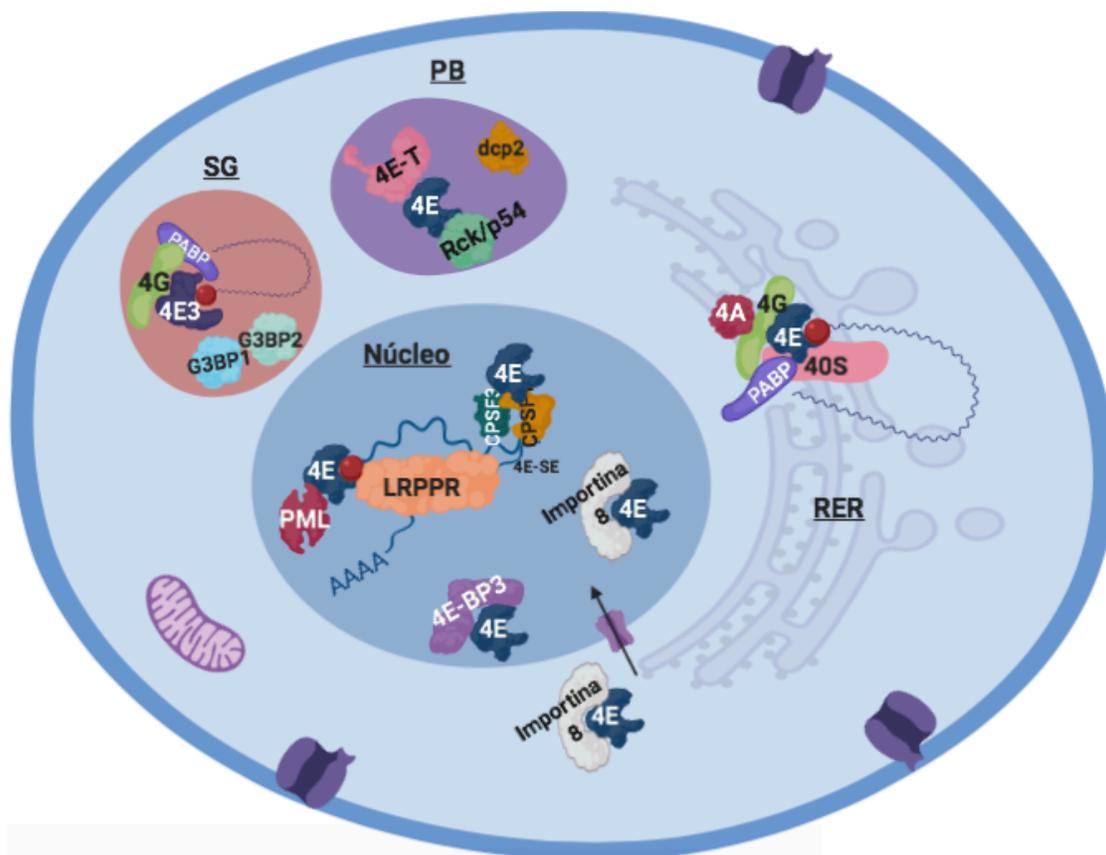
hace. eIF4E solo se asocia con mRNAs después del empalme y en ausencia del complejo nuclear de unión al cap (CBC) compuesto por CBP20 y CBP80, al reclutar a un conjunto de proteínas y formar un mRNP, este es exportado por CRM1 (Davis *et al.*, 2019; Borden, 2016).

La asociación de LRPPRC con eIF4E sugiere un posible mecanismo para la comunicación entre la expresión génica postranscripcional y la producción de energía en la célula. Esto se debe a que LRPPRC también se encuentra en las mitocondrias, donde tiene una función crítica en la expresión de mRNA (Topisirovic *et al.*, 2009). Por su parte, la capacidad de eIF4E para reprogramar el complejo de poros nucleares comúnmente empleados para la exportación indica que eIF4E puede emplear múltiples estrategias para producir un entorno propicio para la exportación los de mRNAs blanco (Davis *et al.*, 2019; Borden, 2016).

En la exportación nuclear, el mRNA típicamente requiere en el extremo 3' una cola poliadenilada, así como un *cap* m7G en el extremo 5'. La maduración del mRNA implica el corte del extremo 3' y la poliadenilación (CPA) del RNA, un proceso que comienza con el corte de un dinucleótido CA localizado cerca de una señal de poliadenilación (PAS), seguida de la adición de adeninas por la enzima poli(A) polimerasa. La maquinaria de CPA consta de varios cofactores incluyendo los complejos de corte y poliadenilación (CPSF), que se unen al sitio PAS. En un estudio reciente se encontró que eIF4E promueve la expresión de varios factores en el núcleo de CPA, además interactúa con la enzima de corte CPSF3 que promueve la poliadenilación del extremo 3' de RNAs específicos. En total, seis transcritos de la maquinaria de CPA son objetivos de eIF4E, esto planteó dos nuevas posibilidades para eIF4E, ya que podría modular la escisión indirectamente a través de sus efectos en la maquinaria de escisión, o podría tener un papel aún por definir en el procesamiento de sus transcripciones de exportación ya que la regulación al alza de la expresión de proteínas CPSF ocurre cuando eIF4E se encuentra unido a sus transcritos en el núcleo, los requisitos incluyen la enzima de escisión de CPSF3 y el sitio de escisión de CA dentro del sitio de PAS canónico, 4E-SE y el eIF4E. El requisito del 4E-SE en los modelos de RNA sugiere que las funciones de CPA y exportación de RNA nuclear podrían estar funcionalmente conectadas con sustratos que se canalizan en la ruta de exportación de RNA dependiente de eIF4E, de hecho, al agilizar la formación del

extremo 3' hace que estos mRNA sean mejores sustratos para la exportación y en última instancia, aumentan sus niveles de proteína. Por lo tanto, esta actividad proporciona un marco de canalización mediante el cual eIF4E estimula el procesamiento de objetivos para hacerlos mejores sustratos para sus actividades de exportación y traducción (Davis *et al.*, 2019).

Colectivamente, estas observaciones sugieren que eIF4E escolta mRNAs específicos y a través de varias interacciones (Figura 4). De esta manera, eIF4E podría considerarse una chaperona del *cap*, al menos para un subconjunto de mRNAs. En dicho modelo, todas las funciones de eIF4E deben considerarse en combinación para comprender realmente su impacto final sobre el proteoma.



**Figura 4. Roles de eIF4E en el metabolismo del mRNA en células humanas.** En el citosol eIF4E participa durante el inicio de la traducción, el papel de eIF4E dentro de los cuerpos P (PB) aún no está claro (Andrei, 2005). En el núcleo eIF4E está involucrado en la maduración y el transporte de mRNA (Davis *et al.*, 2019; Topisirovic *et al.*, 2009).

#### 4. Regulación de la actividad de eIF4E por proteínas de unión

Una familia de proteínas de unión a eIF4E (4E-BP) regulan negativamente el inicio de la traducción dependiente del *cap*, debido a que secuestran a eIF4E (Richter & Sonenberg, 2005). eIF4G interactúa con la superficie dorsal de eIF4E a través del denominado sitio de unión a eIF4E (4E-BS). Este motivo se caracteriza por una secuencia canónica mínima YXXXXL $\phi$  (donde X es cualquier aminoácido y  $\phi$  es cualquier aminoácido hidrófobo). Esta secuencia, que se ha extendido recientemente a YX (R/K) XXL $\phi$  (R/K/Q), que también está presente en 4E-BPs, de modo que la unión de las 4E-BPs o eIF4G a eIF4E es mutuamente excluyente (Marcotrigiano *et al.*, 1999).

Las 4E-BP se encuentra en todos los Metazoos excepto Nematoda. Actualmente se han descrito tres 4E-BP en vertebrados; 4E-BP1, 4E-BP2 y 4E-BP3, cuya región central de 35 aminoácidos se encuentra altamente conservada, además del sitio de unión a eIF4E. Cada 4E-BP alberga dos sitios de fosforilación TOR canónicos (Hernández *et al.*, 2016). Debido a la presencia del 4E-BS, los 4E-BP compiten con eIF4G para unirse al mismo sitio conservado de residuos hidrófobos en la superficie dorsal de eIF4E, bloqueando así el inicio de la traducción (Peter *et al.*, 2015; Toribio *et al.*, 2019). Por otro lado, la unión de los 4E-BP a eIF4E está regulada por su estado de fosforilación específico dependiente de mTOR. Los 4E-BP hipofosforilados interactúan fuertemente con eIF4E, mientras que la hiperfosforilación de las 4E-BP, en respuesta a la estimulación celular por hormonas y factores de crecimiento anula su interacción con eIF4E (Richter & Sonenberg, 2005).

Además de 4E-BP, se ha descrito un número creciente de proteínas que interactúan con eIF4E (4E-IP) en especies filogenéticamente no relacionadas a las 4E-BPs. Es importante destacar que el hecho de poseer un sitio canónico de unión a eIF4E no da como resultado la unión de estas proteínas con eIF4E, lo que implica que los residuos flanqueantes también son muy importantes en aquellas proteínas que unen a eIF4E (Kamenska *et al.*, 2014; Hernández *et al.*, 2016).

Las 4E-IP además de tener un papel como inhibidores del inicio de la traducción, se ven envueltas en diferentes procesos como el ensamblaje de RNP, el transporte de RNA, el empalme alternativo o el recambio de mRNA. La mayoría de los 4E-IP no están filogenéticamente relacionados entre sí o con los 4E-BP, sin embargo, la mayoría de estas proteínas utilizan el 4E-BS, o uno similar, para poder interactuar con eIF4E

(Hernández *et al.*, 2016). Las funciones en otros procesos y la variabilidad en el motivo utilizado para interactuar con eIF4E, indica que la unión a eIF4E evolucionó independientemente en diferentes grupos taxonómicos, por lo tanto, la unión a eIF4E parece ser un mecanismo universal de suma importancia para controlar la síntesis de proteínas (Hernández *et al.*, 2016; Kamenska *et al.*, 2014).

En la actualidad ningún ortólogo a 4E-BP se ha encontrado en levadura. Sin embargo, en *S. cerevisiae* existen cuatro proteínas que interactúan con eIF4E: Eap1p, p20 y dos isoformas del factor de iniciación de la traducción eIF4G (eIF4G1 y eIF4G2) (De la Cruz *et al.*, 1997; Arndt *et al.*, 2018). A pesar de que p20 y Eap1p inhiben el inicio de la traducción dependiente del *cap*, ninguna de ellas comparte una homología de secuencia entre sí o con 4E-BP, excepto por el motivo de unión con eIF4E (Grüner *et al.*, 2018; Cridge *et al.*, 2010).

## 5. Proteínas de unión a eIF4E de *S. cerevisiae*

### p20

La proteína p20 (codificada por el gen no esencial *CAF20*) se describió inicialmente como un represor de la traducción dependiente del *cap*. Esta proteína solo existe en especies de levadura del subfilo *Saccharomycotina*. p20 se fosforila en múltiples residuos de serina y treonina. Es un análogo funcional de las 4E-BP, sin embargo, a diferencia de estas, el motivo de unión a eIF4E se encuentra en su extremo N terminal, no en el medio de la proteína (Arndt *et al.*, 2018; De la Cruz *et al.*, 1997).

La eliminación de p20 revierte los fenotipos de crecimiento lento y sensibilidad al frío causados por mutaciones en los factores del inicio de la traducción, como eIF4B, eIF4E o eIF4G1, mientras que su sobreexpresión tiene el efecto contrario. También parece desempeñar un papel en la degradación del mRNA, ya que su eliminación suprime los fenotipos causados por la eliminación de genes que codifican dos factores implicados en la degradación del mRNA (Pat1p y la helicasa DHH1) (Cridge *et al.*, 2010).

Estudios recientes muestran que p20 interactúa directamente con el mRNA mediante una región cargada positivamente de la proteína, y que dicha región es prescindible para la interacción de p20 y eIF4E. Además, el complejo eIF4E/p20 se une más fuerte al mRNA con *cap* que eIF4E solo y tiene un efecto estimulante sobre la

traducción *in vitro*. Por el contrario, el complejo eIF4E/p20 inhibe la traducción de mRNA sin *cap*. Estos datos argumentan en contra de que p20 actúe exclusivamente como un inhibidor de la traducción, más bien p20 desempeña un papel más complejo, actuando como un regulador negativo y positivo de la síntesis de proteínas bajo diferentes condiciones en las que se encuentre la levadura (Arndt *et al.*, 2018).

Arndt propone que el complejo ternario eIF4E/p20/mRNA puede existir en un equilibrio dinámico con otros complejos compuestos por eIF4E y eIF4G o Eap1 con el mRNA, y que diversas condiciones fisiológicas (por ejemplo, privación de nutrientes, calor, sequía, *etc.*) pueden hacer que este equilibrio cambie hacia el inicio de la traducción, la degradación del mRNA o algún otro proceso celular (Arndt *et al.*, 2018).

### **Eap1p**

*EAP1* es un gen no esencial en la levadura cuyo producto, Eap1p, fue identificado por Cosentino *et al.* en el año 2000. La delección de *EAP1* confiere resistencia parcial a la rapamicina (inhibe la actividad TOR1 y TOR2, lo que resulta en un bloqueo de inicio de traducción y detención en la fase G<sub>1</sub>), indicando que Eap1p actúa como un homólogo funcional de 4E-BP uniéndose a eIF4E compitiendo con eIF4G e inhibiendo la traducción dependiente de *cap* (Cosentino *et al.*, 2000). Al igual que p20 comparte homología solo en el motivo de unión a 4E, sin similitud general entre las 4E-BP. Recientemente, se describió que eIF4G y Eap1p comparten un modo de unión eIF4E conservado, como se describe para eIF4G y las 4E-BP, haciendo contacto en la superficie dorsal y lateral de eIF4E, Eap1p interactúa por el 4E-BS y a través de otro motivo no canónico. Estas adaptaciones moleculares de Eap1p para modular la afinidad con eIF4E, pueden ser para competir eficazmente con eIF4G y regular el inicio de la traducción dependiente del *cap* (Cosentino *et al.*, 2000; Grüner *et al.*, 2018).

Casi simultáneamente al descubrimiento de que Eap1p funciona como una 4E-BP, Chial *et al.*, 2000. Descubrieron una función independiente de esta proteína. Ellos identificaron que esta proteína interactúa con el cuerpo del polo del huso (SBP). La falta de inserción del cuerpo del polo del huso recién formado en la envoltura nuclear conduce a que Eap1p inhiba específicamente la traducción del mRNA de POM34 que codifica una proteína de membrana del poro nuclear. Esto sugieren que Eap1p lleva a cabo una función independiente de eIF4E para mantener la estabilidad genética, lo más

probable es que involucre SPB, además, la eliminación de EAP1 no es letal, pero provoca un aumento de la tasa de aneuploidía y un fenotipo sensible a la temperatura. Eap1p también forma parte de un mecanismo regulador mediante el cual la traducción se regula negativamente cuando se inhibe la síntesis de lípidos (Chial *et al.*, 2000).

Se ha descrito la participación de Eap1p en la aceleración de la degradación de mRNA específicos al aumentar a través de su interacción con diversas proteínas involucradas en el *decapping*. Además, se ha demostrado que Eap1 interactúa con la helicasa Dhh1 bajo privación de nitrógeno y permite la traducción directa de algunos mRNAs relacionados con la autofagia. Eap1 (como p20) solo existe en especies de levadura del subfilo Saccharomycotina (Grüner *et al.*, 2018).

## 6. Transcripción genética

La transcripción es el punto de control primario para la expresión génica, y por lo tanto determina la función y la identidad celular. Este proceso se encuentra altamente regulado en cada uno de sus tres pasos: iniciación, alargamiento y terminación (Sainsbury *et al.*, 2015). Muchas proteínas y diversas características de la cromatina están involucradas en estos pasos regulatorios para asegurar que en cada célula la maquinaria transcripcional sea reclutada y activada en genes específicos (Conaway, 2012).

La transcripción del genoma eucariota se lleva a cabo mediante la RNA polimerasa nuclear I (Pol I), Pol II y Pol III. Mientras que Pol I transcribe el precursor de rRNA, Pol III transcribe pequeños RNA no codificantes como los tRNA (Sainsbury *et al.*, 2015). Pol II es una enzima de 12 subunidades que transcribe genes que codifican proteínas para producir mRNA (Hahn, 2004).

Para el inicio, un conjunto de factores generales de la transcripción reconoce el ADN del promotor y forma una plataforma asimétrica para la unión de Pol II y la incorporación de los factores generales restantes. Estos factores incluyen a TFIID que contiene la proteína de unión a caja TATA (TBP) y varios factores asociados a TBP (Hahn & Young, 2011). Cuando la Pol II se une a los factores generales forma el complejo de preiniciación (PIC). La transición del PIC al complejo abierto implica un cambio conformacional dramático dependiente de la helicasa TFIIH. Con el complejo promotor abierto, la cadena de plantilla de DNA pasa cerca del sitio activo de Pol II y

puede programar la síntesis de la cadena de RNA (Hahn & Young, 2011; Sainsbury *et al.*, 2015).

La transcripción eucariota se rige, en gran parte, por los factores de transcripción (TF), los TF son proteínas especiales capaces de unirse al DNA de una manera específica y regular la transcripción (Lambert *et al.*, 2018). Estas proteínas se ensamblan en las secuencias promotoras y potenciadoras en todo el genoma durante el inicio de la transcripción. Un rasgo característico de los promotores y potenciadores es la presencia de motivos de secuencia que permiten que múltiples TF se unan a través de la misma región (Allen & Taatjes, 2015). Además de los dominios de unión a DNA específicos, los TF típicamente poseen dominios de activación separados que interactúan con coactivadores de la transcripción. Los coactivadores de la transcripción tienen la capacidad de interactuar con los TF y facilitar la transcripción, un ejemplo de estos coactivadores es el complejo mediador de la transcripción. (Allen & Taatjes, 2015).

### **Complejo mediador de la transcripción**

La transcripción génica por la RNA polimerasa II requiere el complejo mediador de la transcripción (MC), el MC funciona como un puente entre los TF y la maquinaria de Pol II. En la levadura *S. cerevisiae*, el MC comprende 25 subunidades asignadas a cuatro módulos llamados: cabeza, medio, cola, estos tres módulos carecen de actividad enzimática y el módulo quinasa compuesto por cuatro subunidades que incluyen Cdk8 y ciclina C (Larivière *et al.*, 2013; Tsai *et al.*, 2014). Todas las subunidades del MC de levadura tienen homólogos en insectos y mamíferos, sin embargo, un conjunto de 17 subunidades se conserva en todos los eucariotas y forma el núcleo del módulo medio para el ensamblaje de otras subunidades (Hahn & Young, 2011).

El complejo mediador interacciona físicamente con una gran cantidad de proteínas reguladoras de la transcripción, incluidos TF, la RNA Pol II, los factores de iniciación generales y los factores de alargamiento de la transcripción. Como consecuencia de estas interacciones, MC es un objetivo principal de las señales reguladoras de la transcripción que se integran y transmiten a la maquinaria de transcripción de una manera promotora y específica del gen logrando regular la Pol II tanto en las etapas de iniciación como durante el alargamiento de la transcripción (Tsai *et al.*, 2014; Conaway

*et al.*, 2013). A pesar de su importancia crítica, los mecanismos moleculares por los cuales el MC afecta la transcripción son poco conocidos. La comprensión de los mecanismos por los cuales el MC regula la transcripción requerirá una comprensión de su organización de subunidades, comportamiento conformacional e interacciones que debido a su tamaño, complejidad y flexibilidad actualmente representa un gran desafío para su análisis estructural (Tsai *et al.*, 2014; Hahn & Young, 2011).

## **7. Med9**

Med9 es una proteína pequeña codificada por el gen no letal *Med9/CSE2*, su eliminación afecta la segregación cromosómica, así como la transcripción basal y los coactivadores de la transcripción activada (Xiao *et al.*, 1993; Baidoobonso *et al.*, 2007). Estudios han demostrado que Med9 es necesaria para la transcripción de un número relativamente pequeño de genes, 175 regulados positivamente y 209 genes regulados negativamente (Takahashi *et al.*, 2009).

Med9 forma parte del módulo medio del complejo mediador. El módulo medio comprende cuatro subunidades esenciales, Med4, Med7, Med10 y Med21, y tres subunidades no esenciales, Med1, Med9 y Med31 (Poss *et al.*, 2013), a pesar de que se conocen los componentes de este complejo aún no está claro cómo se ensambla Med9 en el módulo medio, y en qué medida Med9 contribuye al mantenimiento de la integridad estructural del MC (Takahashi *et al.*, 2009).

La localización celular de Med9 había sido descrita únicamente dentro del núcleo, con roles estructurales y/o funcionales como parte del MC, sin embargo, en 2012 Dastidar *et al.* encontraron que, en respuesta a la hipoxia y la reoxigenación, Med9 se relocaliza en el citoplasma de una manera rápida en levadura, sugiriendo que la relocalización de diversas proteínas está regulada bajo estrés de oxígeno (Dastidar *et al.*, 2012).

## **8. Proteínas involucradas en el proceso de transcripción que interactúan con eIF4E**

Como se ha mencionado anteriormente el número de proteínas que interactúan con eIF4E continúa expandiéndose en diversos grupos taxonómicos (Hernández *et al.*, 2016; Kamenska *et al.*, 2014), y, aunque algunas tienen un papel como represores

traduccionales un gran número de estas proteínas tiene un papel dentro del proceso de transcripción (Hernández *et al.*, 2010; Hernández, G *et al.*, 2016).

A continuación, en la tabla 1 se enlistan las proteínas de diversos grupos taxonómicos con papeles dentro de la transcripción que se unen a eIF4E.

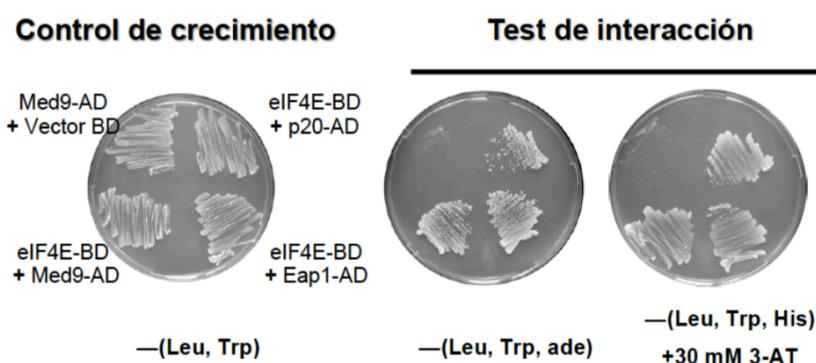
**Tabla 1.** Proteínas en el proceso de transcripción y maduración del mRNA que se unen a eIF4E.

<b>Proteína (TF)</b>	<b>Organismo</b>	<b>Parálogo 4E</b>	<b>Referencia</b>
Bicoid	<i>Drosophila</i>	4E-HP	Cho <i>et al.</i> , 2005
BTF3	<i>Arabidopsis</i>	eIF(iso)4E eIF4E	Freire, 2005
CPSF1	Humano	eIF4E	Davis <i>et al.</i> , 2019
CPSF3	Humano	eIF4E	Davis <i>et al.</i> , 2019
DDX3	Humano	eIF4E	Shih, 2007
EMX2	Ratón	eIF4E	Nedelec <i>et al.</i> , 2004
HOXA9	Humano	eIF4E	Topisirovic, 2005
LRPPRC	Humano	eIF4E	Topisirovic <i>et al.</i> , 2009
PREP1	Ratón	4E-HP	Villaescusa <i>et al.</i> , 2009
PRH	Humano	eIF4E	Topisirovic, 2003

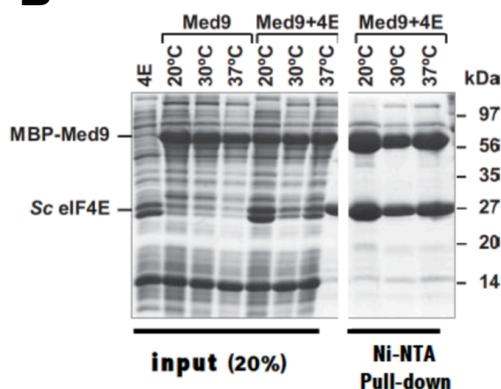
## VI. ANTECEDENTES

En colaboración con el Dr. Hans Trachsel (Universidad de Berna, Suiza), se realizó un *screening* genómico por el sistema del doble híbrido (2H) usando eIF4E como sonda. Se encontró que eIF4E forma un complejo estable con Med9 (Figura 5A), interacción que posteriormente se ha validado por *pull-down* de proteínas recombinantes (Figura 5B).

### A



### B



**Figura 5. Interacción entre Med9 y eIF4E. A)** Ensayo de doble híbrido (2H) que muestra la interacción entre eIF4E y Me9 de *S. cerevisiae*. Med9 se encuentra en el vector Activator Domain (AD). En el vector Binding Domain (BD) se encuentran clonados *Eap1* y *p20* como controles positivos. El control negativo es el vector BD vacío. **B)** Experimentos de *Pull down* con proteínas recombinantes que muestran la interacción entre Med9 y eIF4E. Las proteínas fueron expresadas en *E. coli* (MBP-Med9 y eIF4E-His6x) y purificadas a partir de lisados totales usando resina de níquel-agarosa.

En 2002 Ho *et al.* realizaron la identificación de complejos proteicos por espectrometría de masas de alto rendimiento (HMS-PCI) en *S. cerevisiae*, donde al etiquetar Med9 con un *tag* HA, sobreexpresarla y purificarla por experimentos de inmunoprecipitación con anticuerpos anti-HA, la encontraron formando un complejo con eIF4E y Por1. Para este proyecto, fue de particular relevancia el hallazgo de que nuevas proteínas forman un complejo con eIF4E y podrían interactuar físicamente con eIF4E.

Los datos de nuestro laboratorio mostrados en la Figura 5, validan esta interacción y, además, demuestran que Med9 y eIF4E interactúan físicamente. Sin embargo, carecemos por completo de estudios que analicen el papel biológico de esta interacción física, que no ha sido descrita a la fecha.

## VII. OBJETIVO GENERAL

Comprobar la formación del complejo Med9—eIF4E en *S. cerevisiae*, así como identificar las condiciones bajo las que se forma el complejo *in vivo*.

## VIII. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comprobar la interacción Med9—eIF4E *in vivo* en *S. cerevisiae*.
2. Identificar las condiciones para la formación del complejo *in vivo*.
3. Estandarizar un protocolo para la separación de fracciones citosólica y nuclear de *S. cerevisiae*.

## IX. MATERIALES Y METODOS

### 1. Tabla 2. Cepas usadas en este estudio.

Nombre	Genotipo
BY4742 (wt)	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>
JDC123	<i>cdc8-110 imp2::ura4 leu1-32 ade6-M210 h –</i>
923	<i>BY4742; MAT<math>\alpha</math>; ura3<math>\Delta</math>0; leu2<math>\Delta</math>0; his3<math>\Delta</math>1; lys2<math>\Delta</math>0; YNR010w :: kanMX4, pvTURA3-Med9-V5</i>
922	<i>BY4742; MAT<math>\alpha</math>; ura3<math>\Delta</math>0; leu2<math>\Delta</math>0; his3<math>\Delta</math>1; lys2<math>\Delta</math>0; YNR010w :: kanMX4</i>
1165	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52, trp1::hisG, his3::hisG; eIF4E::KanX</i>

### 2. Medios de cultivo

#### YPD

Extracto de levadura	1%
peptona	2%
Dextrosa	2%

#### YPGal

Extracto de levadura	1%
peptona	2%
Galactosa	2%

#### YPRaf (1L)

Extracto de levadura	1%
peptona	2%
Rafinosa	2%

#### -URA Glucosa

Base nitrogenada	sin	0.67%
aminoácidos		
Drop out sin uracilo		770mg/L
Dextrosa		2%

#### -URA Galactosa

Base nitrogenada	sin	0.67%
aminoácidos		
Drop out sin uracilo		770mg/L
Galactosa		2%

#### -URA Rafinosa

Base nitrogenada	sin	0.67%
aminoácidos		
Drop out sin uracilo		770mg/L
Rafinosa		2%

### 3. Separación de extractos nucleares y citoplásmicos de *S. cerevisiae*

#### **Buffer BA**

HEPES-KOH pH7.4	30 mM
KOAc	100 mM
Mg(OAc) <sub>2</sub>	2 mM
DTT	2 mM
Tableta inhibidora de proteasas Roche EDTA libre	1

Se saturó un precultivo de 5 mL durante 6 horas a 30°C de la cepa deseada para inocular 50 mL de medio y se dejó crecer el cultivo hasta una  $OD_{600} = 1.2 - 1.6$ . Posteriormente, se centrifugó a 3,600 rpm durante 5 minutos. El pellet se lavó con 500 uL de *Buffer* BA centrifugando a 2,300 rpm 5 minutos para resuspender el pellet en 500 uL de *Buffer* BA nuevamente. Se agregaron perlas de vidrio (frías) en relación 1:1 con el volumen para lisar las levaduras en intervalos de 30 segundos agitando en vortex (evitando llegar a la velocidad máxima) y 30 segundos en hielo, se realizaron 3 repeticiones y se centrifugó a 2,300 rpm durante 15 minutos para recuperar el sobrenadante. Posteriormente el sobrenadante se centrifugó a 6,800 rpm durante 25 minutos a 4°C y se separaron las fracciones celulares:

Sobrenadante= Fracción citosólica

Pellet= Fracción nuclear

Se le realizaron 2 lavados al pellet (fracción nuclear) con 500 uL de *Buffer* BA y centrifugando a 6,800 rpm por 5 minutos, finalmente se resuspendió el pellet en 50 uL de *Buffer* BA.

#### 4. Lisis total celular de *S. cerevisiae* (Ho *et al.*, 2002).

##### **Buffer Lisis**

HEPES-KOH pH7.4	50 mM
NaCl	150 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
EDTA	1 mM
DTT	0.5 mM
Deoxicolato de Sodio	0.5 mM
Tritón X100	0.5%
Tableta inhibidora de proteasas Roche EDTA libre	1

Se saturó un precultivo de 5 mL durante 6 horas a 30°C de la cepa deseada para inocular el medio y se dejó crecer el cultivo hasta una OD<sub>600</sub> =1.2 - 1.6. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 3,600 rpm durante 5 minutos y el pellet se lavó con 500 uL de *Buffer* de lisis centrifugando a 2,300 rpm 5 minutos, Se pesó el pellet tras eliminar el sobrenadante para suspenderlo en *Buffer* de lisis en relación 1g/1mL. Posteriormente, se agregaron perlas de vidrio (frías) en relación 1:1 con el volumen, y lisamos las levaduras en intervalos de 30 segundos agitando en vótex (evitando llegar a la velocidad máxima) y 30 segundos en hielo, se realizaron 4 repeticiones, se centrifugó a 13,500 rpm durante 15 minutos y finalmente se recuperó el sobrenadante que contiene el lisado celular.

#### 5. Cuantificación de la concentración proteica

##### **Método de Lowry modificado, Markwell *et al.*, 1987.**

<b>Solución A</b>		<b>Solución B</b>		<b>Solución C</b>		<b>Solución D</b>	
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2%	Cu <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	4%	Se mezclaron 100 volúmenes de		Se mezcló 1 volumen de reactivo	
NaOH	0.4%			Solución A con 1		de Folin con 1	
Na <sub>2</sub> tartrato	0.16%			volumen de solución B		volumen de agua	
SDS	1%						

La curva de calibración se realizó por duplicado con una solución de albúmina a una concentración de 1 mg/mL, de esta se hizo una serie de diluciones tomando 10, 20, 30, 40, 50, 80, 70, 80, 90 y 100 uL y un control sin albúmina. Se diluyeron los lisados a

cuantificar en una relación 1:5 en H<sub>2</sub>O destilada estéril, de la dilución tomamos 10 uL para cuantificar las proteínas se siguieron los siguientes puntos para todas las muestras:

- Se ajustó la muestra con H<sub>2</sub>O destilada estéril a 1 mL
- Adición de 3 mL de solución C e incubación por 10 minutos a TA
- Adición de 300 ul de solución D e incubación por 30 minutos a TA
- Se midió la absorbancia de todas las muestras a una longitud de onda de 740 nm.

### **Método de Bradford**

Las cuantificaciones se realizaron determinando la concentración a partir de una curva estándar de albúmina de suero bovino (*BSA Pierce, no. Cat. 23209*) llevándola a concentraciones de 10, 25, 50 y 80 pg, y un control sin albúmina, la curva de calibración se realizó por duplicado. La cuantificación se realizó usando el reactivo *Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent (no. Cat. 500-0006)* añadiéndolo en los lisados a cuantificar previamente diluidos en una relación 1:1000 en H<sub>2</sub>O destilada estéril y cuantificando su absorbancia a una longitud de onda de 595 nm.

### **6. Crosslinking químico**

Se realizó empleando DSP (*dithiobis[succinimidylpropionate]*); *Thermo Scientific. (No. Cat. 22585)*. Preparamos el *crosslinker* en solución (*STOCK* al 25 mM en DMSO). Para ello se pesó 10 mg de DSP y se disolvió en 1mL de DMSO:

$$(0.025 \text{ mol/L}) (0.001\text{L}) (404.42 \text{ g/mol}) = 10 \text{ mg}$$

Se adicionaron 1000 ug de lisado y se aforó con *buffer* CBB a 500 uL. (El *buffer* CBB también funciona como *buffer* de reacción; es decir, sus componentes presentan compatibilidad con el *crosslinker*). Se adicionó el *crosslinker* en stock para obtener una concentración final de 5 mM:

$$(500 \text{ uL}) (5 \text{ mM}) / (25 \text{ mM}) = 100 \text{ uL}$$

La mezcla se dejó incubando por 2 horas a 4°C y finalmente para bloquear la reacción se adicionó Tris pH 7.5 a una concentración final de 50 mM dejando incubar en hielo por 15 minutos.

## 7. Ensayo de Inmunoprecipitación

### **Buffer IP**

KCL	100 mM
HEPES-KOH pH7.6	20 mM
EDTA pH 8.0	1 mM
Glicerol	10%
Tritón X100	0.1%
PMSF	0.2 mM
Tableta inhibidora de proteasas Roche EDTA libre	1

Primero se preequilibraron 80 uL de la resina de Proteína G-Sepharosa resuspendida en etanol centrifugando a 2,500 rpm a 4°C por 2 minutos, el sobrenadante (etanol) se eliminó desde el fondo del tubo usando doble punta. Se adicionaron 0.5 mL de *buffer* IP frío a la resina para centrifugar nuevamente a 2,500 rpm a 4°C por 2 minutos y eliminar el sobrenadante desde la superficie. Se adicionó 1 mL de *buffer* IP frío y se dejó rotando 5 minutos a 4°C para equilibrar, nuevamente se centrifugó a 2,500 rpm a 4°C durante 2 minutos y eliminamos sobrenadante desde el fondo con doble punta. Después se llevó a cabo el preclear adicionando 1000 ug del lisado, incubando por 30 minutos en rotación a 4°C, se centrifugó 2 minutos a 2500 rpm a 4°C para recuperar únicamente el sobrenadante. La Inmunoprecipitación se llevó a cabo con el sobrenadante recuperado en una nueva resina equilibrada añadiendo 1ug del anticuerpo seleccionado y se dejó rotando durante 2 horas a 4°C (si se requiere puede rotarse durante toda la noche a 4°C). Finalmente se lavó la resina dejando los tubos en posición vertical sobre hielo para sedimentarla durante 15 minutos, posteriormente se eliminó el sobrenadante desde la superficie y se adicionó 1 mL de *buffer* IP dejándolo sobre hielo otros 15 minutos nuevamente para sedimentar, el lavado se repitió una vez

más, se eliminó el sobrenadante desde el fondo del tubo con doble punta y se añadieron 45 uL del *buffer* de carga 2X.

### 8. Ensayo de *Pull down* con <sup>7</sup>metil-GTP-Sepharose

#### **Buffer CBB**

KCL	100 mM
HEPES-KOH pH7.6	20 mM
EDTA pH 8.0	0.2 mM
Glicerol	10%
Tritón X100	0.1%
PMSF	0.2 mM
B-Mercaptoetanol	7mM
Tableta inhibidora de proteasas Roche EDTA libre	1

Se preequilibró 80 uL de la resina de <sup>7</sup>metil-GTP-Sepharosa resuspendida, para centrifugar a 2500 rpm a 4°C durante 2 minutos. Se eliminó el sobrenadante (etanol) con la pipeta al fondo del tubo usando doble punta. Se adicionó 1 mL de *buffer* CBB frío, se centrifugó nuevamente a 2,500 rpm a 4°C por 2 minutos y eliminamos el sobrenadante desde la superficie. Se le adicionó 1 mL de *buffer* CBB frío dejándolo rotar por 5 minutos a 4°C para equilibrar. Posteriormente centrifugamos nuevamente a 2,500 rpm a 4°C por 2 minutos para elimina el sobrenadante desde el fondo con doble punta. El *Pull Down* se realizó añadiendo 1000 ug de lisado a la resina equilibrada y añadiendo GTP 0.1mM dejando incubar durante 2 horas a 4°C. Finalmente se realizaron los lavados de la resina dejando los tubos en posición vertical en hielo para sedimentar por 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante desde la superficie y se añadió 1 mL de *buffer* CBB frío dejándolo sobre hielo por 15 minutos (se repitió el lavado 2 veces más). En el último lavado se eliminó el sobrenadante desde el fondo con doble punta y se añadieron 45 uL del *buffer* de carga 2X.

## 9. Electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE)

Preparación del gel SDS-PAGE 15%:

Acrilamida 30%	Tris 2 M pH 6.8
Bisacrilamida 0.3%	
H2O	SDS 20%
Tris 2 M pH 8.8	APS 10%
Tris 2 M pH 8.8	TEMED

### **Buffer de carga 2X**

SDS	4%
Glicerol	20%
Azul de bromofenol	0.2%
B-Mercaptoetanol	2%

Las muestras para el SDS-PAGE se resuspendieron en el *buffer* de carga 2X y se calentaron por 5 minutos a 100°C, las resinas (IP, PD) se calentaron por 6 minutos. La electroforesis se realizó a 100 V hasta que el colorante salió del gel.

## 10. Western blot

### **Buffer de Transferencia**

Tris	25 mM
Glicina	250 mM
SDS	0.1%
Metanol	20%

### **Solución de lavado**

TRIS pH7.6	1 M
NaCl	5 M
EDTA	0.5 M
Tween-20	1%

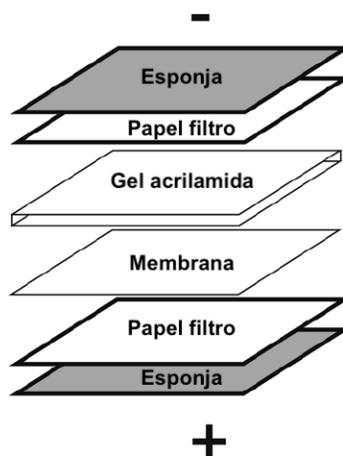
### **Solución de blot**

Se prepara con la solución de lavado

Leche baja en grasas (svelty) 2%

\*Anticuerpo

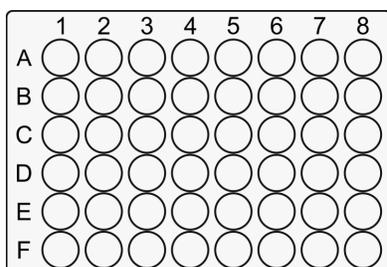
Las proteínas separadas por SDS-PAGE se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa. La transferencia se realizó acomodando el gel y la membrana de nitrocelulosa como se muestra a continuación:



Se transfirió el gel entre 1 o 2 horas a 30 V en *buffer* de transferencia. Posteriormente, se bloqueó la membrana con la solución de *blot* sin anticuerpo y tras 1 hora se incubó durante una hora a temperatura ambiente la membrana con la solución de *blot* usando el \*anticuerpo deseado. Cuando el anticuerpo era acoplado a peroxidasa se incubó durante 2 horas. La membrana se lavó con solución de lavado por 15 minutos, repitiendo el lavado dos veces más para volver a incubar la membrana durante una hora a temperatura ambiente con la solución de *blot* con el anticuerpo secundado acoplado a peroxidasa, nuevamente se realizaron 3 lavados y se reveló por quimioluminiscencia la presencia del anticuerpo siguiendo las indicaciones del Kit Pierce ECL Western bid (Pierce). La quimioluminiscencia se detectó con el equipo LICOR C-DiGit Blot Scanner o con película de rayos X BioMax XAR Film (Kodak).

### 11. Diluciones seriadas 1:10 de cultivos celulares

Se crecieron 2 mL de medio inoculado de la cepa deseada a 30°C durante una noche, al día siguiente en tubos eppendorf de 1.5 mL pesados previamente se centrifugó 1 mL de cada cultivo a 14,000 rpm por un minuto y se eliminó todo el sobrenadante, posteriormente se pesaron nuevamente los tubos para estimar el peso del botón celular y se diluyó con H<sub>2</sub>O destilada estéril para que queden las células a una concentración de 0.02 g/ mL. Para realizar las diluciones seriadas se utilizó una placa de ELISA como la que se muestra a continuación:



Dentro de los pozos (A2, A3, A4, A5, A6... B2, B3, B4, B5, B6...) se agregaron 135 uL de H<sub>2</sub>O destilada estéril con pipeta multicanal, en el primer pozo de cada fila (A1, B1...) se agregaron 150 uL de la solución celular a 0.02 g/ mL, con pipeta multicanal se tomaron 15 uL de cada primer pozo (A1, B1 ...) y se transfirieron al siguiente pozo (A2, B2...) se homogenizó con la misma pipeta y este paso se repitió hasta la columna 6. Se sumergió un replicador en los pozos de la placa y se imprimió en las cajas con medio, para esterilizar el replicador se sumergió en etanol y posteriormente fue flameado. Finalmente, se dejaron creciendo las células a la temperatura deseada (22°C, 30°C y 37°C).

## 12. Curvas de crecimiento celular

Se saturó un precultivo de 2 mL durante una noche a 30°C de la cepa deseada para inocular el medio. Una vez que se saturaron los precultivos se inocularon 125 mL de medio nuevo con todo el precultivo saturado y se dejó crecer el cultivo durante una noche a 30°C para saturar el cultivo. Posteriormente, se midió la OD<sub>600</sub> del cultivo y se ajustaron tres nuevos cultivos de 50 mL a las siguientes OD<sub>600</sub>

- Cultivo 1: OD<sub>600</sub>= 0.01
- Cultivo 2: OD<sub>600</sub>= 0.1
- Cultivo 3: OD<sub>600</sub>= 1

El cálculo que se realizó para ajustar las OD fue el siguiente:

$$\frac{0.01 (50 \text{ mL})}{OD_{600} \text{ del cultivo saturado}} = \text{mL de precultivo para inocular}$$

Cuando se inocularon los tres cultivos se midió la  $OD_{600}$  para verificar que el medio si estuviera en la OD correcta y se incubaron a  $30^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se midió la  $OD_{600}$  cada hora hasta que el cultivo 1 llegó a una  $OD_{600}$  igual al cultivo 2 y el cultivo 2 llegó a una  $OD_{600}$  igual al cultivo 3. Finalmente se graficaron los resultados.

## X. RESULTADOS

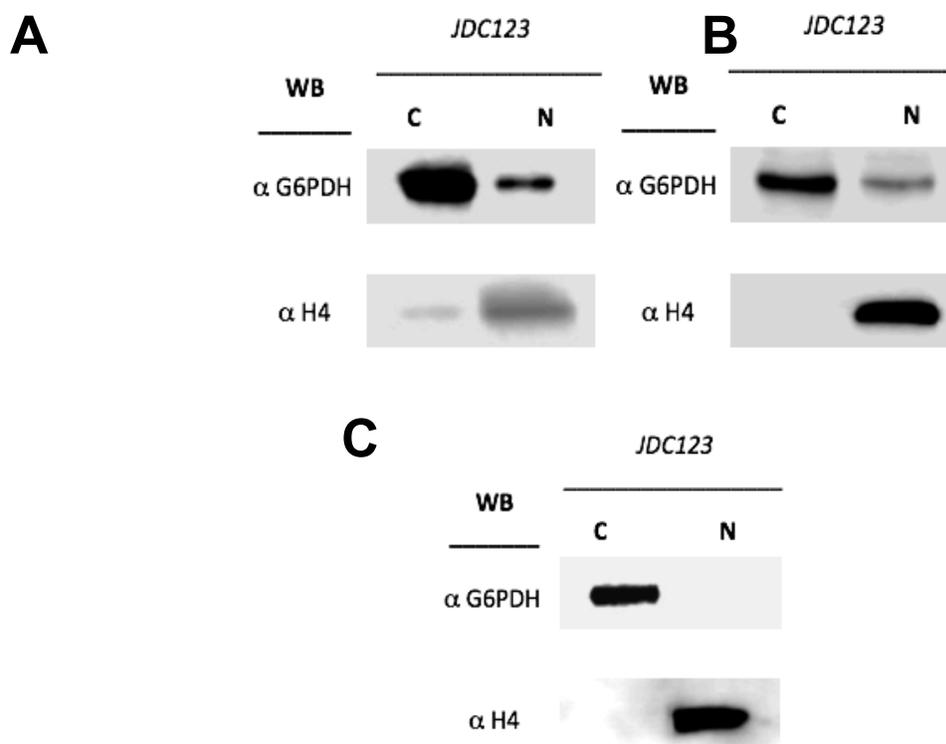
### **En condiciones de crecimiento estándar Med9 se encuentra en la fracción nuclear y eIF4E en las fracciones nuclear y citoplásmica**

Comenzamos preguntándonos en qué fracción celular se está llevando la interacción de eIF4E y Med9 in vivo, ya que, como se ha mencionado anteriormente, eIF4E tiene importantes roles tanto fuera como dentro del núcleo, mientras que el papel de Med9 se ha descrito principalmente dentro núcleo. En 2012 Dastidar *et al.* describieron que, en respuesta a la hipoxia y rápida reoxigenación, Med9 se relocaliza en el citoplasma (Dastidar et al., 2012), este trabajo es el primero en describir la relocalización de Med9 ya que anteriormente únicamente se sabía de su papel como miembro del MC.

Para identificar la localización celular de estas proteínas estandarizamos un protocolo para la separación de las fracciones nuclear y citosólica empleando una cepa de *S. cerevisiae*, baja en proteasas (JDC123). Comenzamos dejando crecer la levadura en cultivo YPD a una OD<sub>600</sub>= 0.9-1.0, para la lisis elegimos un método mecánico con perlas de vidrio (.5mm) durante 10 minutos a 4°C en buffer CBB suplementado (véase en materiales y métodos) que incluía deoxicolato de sodio 0.1mM para lisar la pared celular, separamos las fracciones celulares a una velocidad de 13,000 rpm durante 25 minutos. Utilizamos dos controles para comprobar que dichas fracciones no estuvieran contaminadas: Histona 4 (H4) como control de pureza citosólica y Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) como control de pureza nuclear. El resultado del ensayo usando esta metodología no fue satisfactorio ya que, aunque logramos enriquecer cada una de las fracciones celulares no logramos una separación limpia, las proteínas de control de pureza se encontraban en ambas fracciones (Figura 6A). Así que para optimizar el protocolo de separación realizamos un par de modificaciones, utilizamos la misma OD<sub>600</sub>= 0.8-0.1, conservamos el método mecánico con perlas de vidrio (.5mm) para lisar disminuyendo el tiempo de lisis a 3 minutos y cambiamos a un buffer menos agresivo para trabajar (Buffer A), separando las fracciones celulares a la misma velocidad, 13,000 rpm durante 25 minutos. En esta ocasión logramos aislar la fracción citosólica, sin embargo, la fracción nuclear aún se encontraba contaminada (Figura 6B).

Finalmente, el ensayo que nos dio el mejor resultado fue al realizar un aumento en la OD600 del cultivo a 1.2-1.4 conservando el método de lisis durante 3 minutos con buffer BA y separando las fracciones celulares a 13,000 rpm durante 25 minutos (véase el protocolo final “Separación de extractos nucleares y citoplásmicos de *S. cerevisiae*” en materiales y métodos). Como se puede ver en la Figura 4C, logramos separar con gran eficiencia la fracción nuclear y citosólica de la cepa JDC123 sin tener contaminación proteica de alguno de nuestros controles (G6PDH y H4).

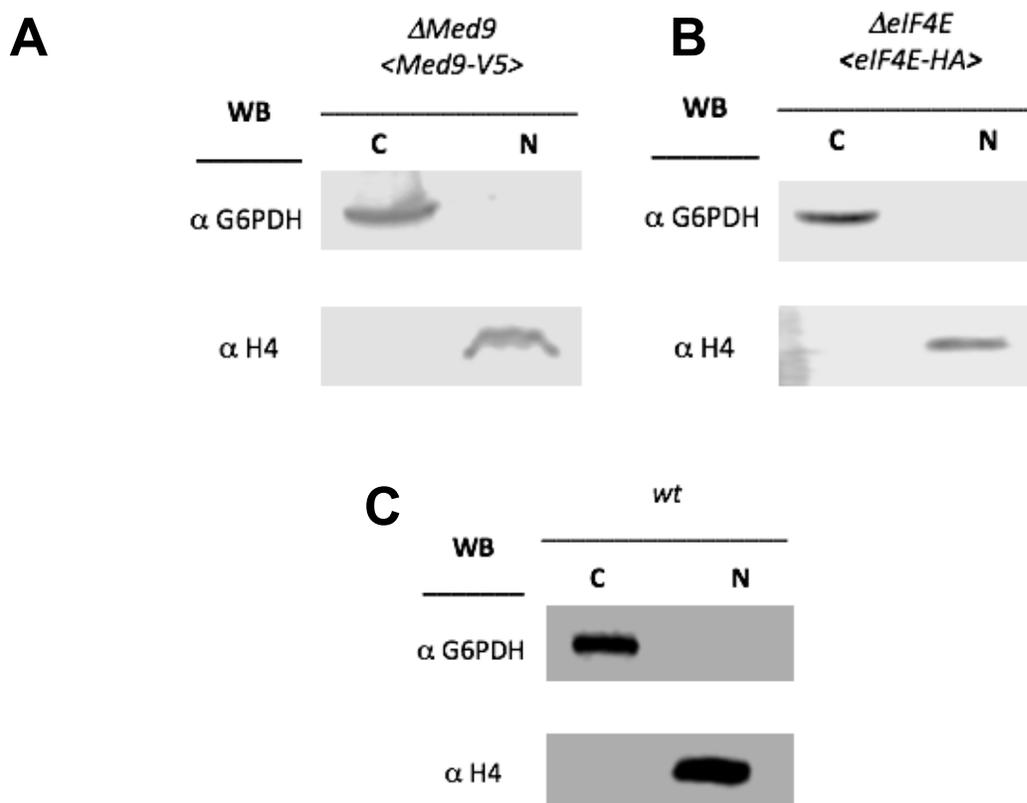
Para identificar la localización celular de Med9 y eIF4E, utilizamos dos cepas de *S. cerevisiae*, una con Med9 marcado con el epítotope V5 (Med9-V5) y otra con eIF4E con el epítotope HA (eIF4E-HA) a las que llamamos 923 y 1165 respectivamente. Ambas con el gen endógeno respectivo deletado expresando los genes a partir de plásmidos. En estas cepas se llevó a cabo el protocolo previamente concretado, sin embargo, notamos que ambas requerían un ajuste para aislar adecuadamente la fracción nuclear. En la tabla 1 se muestran las condiciones específicas para la separación de las fracciones celulares de las cepas utilizadas para este trabajo mientras que en la Figura 7 se pueden ver los resultados de la separación de las fracciones celulares en diferentes cepas con sus condiciones específicas.



**Figura 6. Estandarización de separación de fracciones celulares en una cepa baja en proteasas.** **A)** Ensayo a una  $OD_{600}$  = 0.9-1.0 usando 50 mL de medio, lisis mecánica con perlas de vidrio por 10 en *buffer* CBB suplementado, separando las fracciones a 13,000 rpm durante 25 minutos. Tanto la fracción citosólica (**C**) como la nuclear (**N**) se encuentran contaminadas con los controles de pureza. **B)** Ensayo con disminución del tiempo de lisis (3 minutos) y cambio de *buffer* (*Buffer A*). Se logró aislar la fracción citosólica (**C**) con la fracción nuclear (**N**) contaminada. **C)** Protocolo final de separación de fracciones celulares, aumento a una  $OD_{600}$  = 1.2-1.4 del cultivo celular. Fracciones celulares aisladas. Se muestran Western *blots* (*WB*) usando los anticuerpos indicados a la izquierda de cada *blot* y lisados nucleares o citoplásmicos de las cepas indicadas.

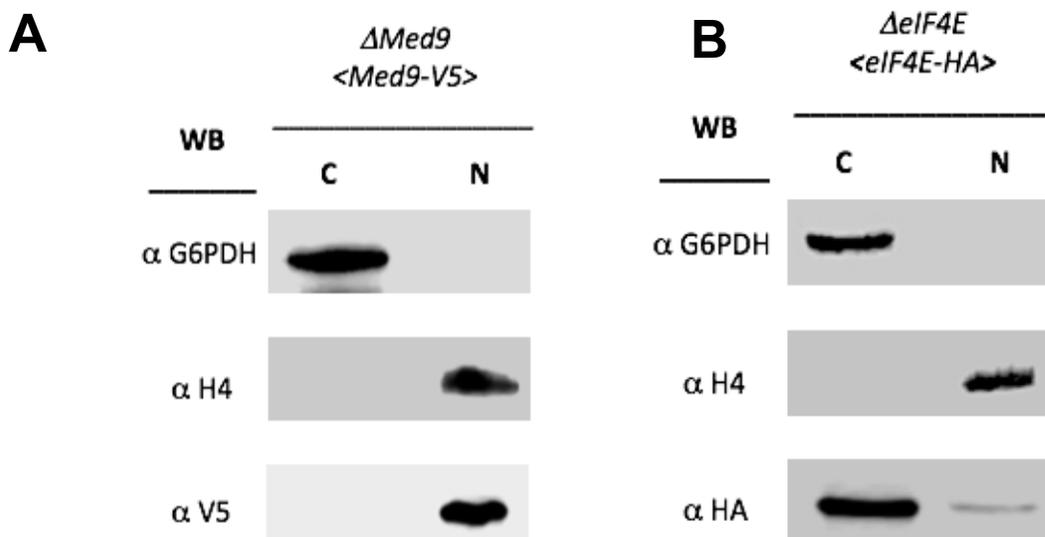
**Tabla 3.** Condiciones específicas para la separación de las fracciones celulares por cepa. La composición del *buffer* BA\* se puede ver en materiales y métodos.

Cepa	$OD_{600}$	<i>Buffer</i>	Tiempo de lisis
<i>JDC123</i>	1.2-1.4	BA*	3 minutos
<i>wt</i>	1.2-1.4	BA*	3 minutos
922/923	1.4-1.6	BA*	3 minutos
1165	1.4-1.6	BA*	2 minutos



**Figura 7. Separación de fracciones celulares bajo las respectivas condiciones de cada cepa. A)** Separación en la cepa 923 a una  $OD_{600}=1.4$  de 50 mL de medio de cultivo. Se lisó durante 3 minutos. **B)** Separación en la cepa 1165 a una  $OD_{600}=1.6$  lisando durante 2 minutos. **C)** Separación en la cepa wt a una  $OD_{600}=1.2$  lisando durante 3 minutos. Fracciones celulares aisladas. Se muestran Western blots (WB) usando los anticuerpos indicados a la izquierda de cada blot y lisados nucleares o citoplásmicos de las cepas indicadas.

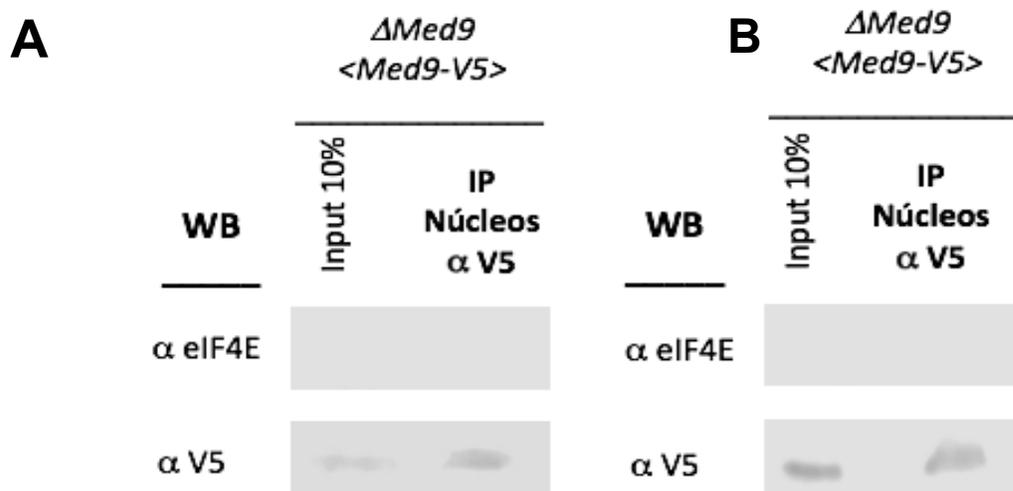
Bajo las condiciones específicas para la separación de las fracciones celulares de las cepas  $\Delta med9 \langle pvTURA3-Med9-V5 \rangle$  (923) y  $\Delta eIF4E \langle p301-eIF4E-HA \rangle$  (1165) observamos que la localización celular de Med9 y eIF4E coincide con la información previa. Med9 únicamente se encuentra dentro de núcleo en condiciones normales de crecimiento (Figura 8A) y respecto a eIF4E ocurrió lo mismo, ya que encontramos a esta proteína en el citoplasma principalmente y una pequeña porción se puede observar dentro del núcleo (Figura 8B).



**Figura 8. Localización celular de Med9 y eIF4E en *S. cerevisiae*.** **A)** Med9-V5 se localiza únicamente en el núcleo (N) en condiciones de crecimiento estándar (2% Glucosa, 30°C,  $OD_{600} = 1.5$ ). **B)** eIF4E-HA se localiza en el citoplasma y una pequeña fracción dentro del núcleo (N) en condiciones de crecimiento estándar (2% Glucosa, 30°C,  $OD_{600} = 1.0$ ). Se muestran Western blots (WB) usando los anticuerpos indicados a la izquierda de cada blot y lisados nucleares o citoplásmicos de las cepas indicadas.

**La cantidad de eIF4E es muy reducida en los lisados nucleares y requiere un sistema de detección sensible a poca señal al realizar WB**

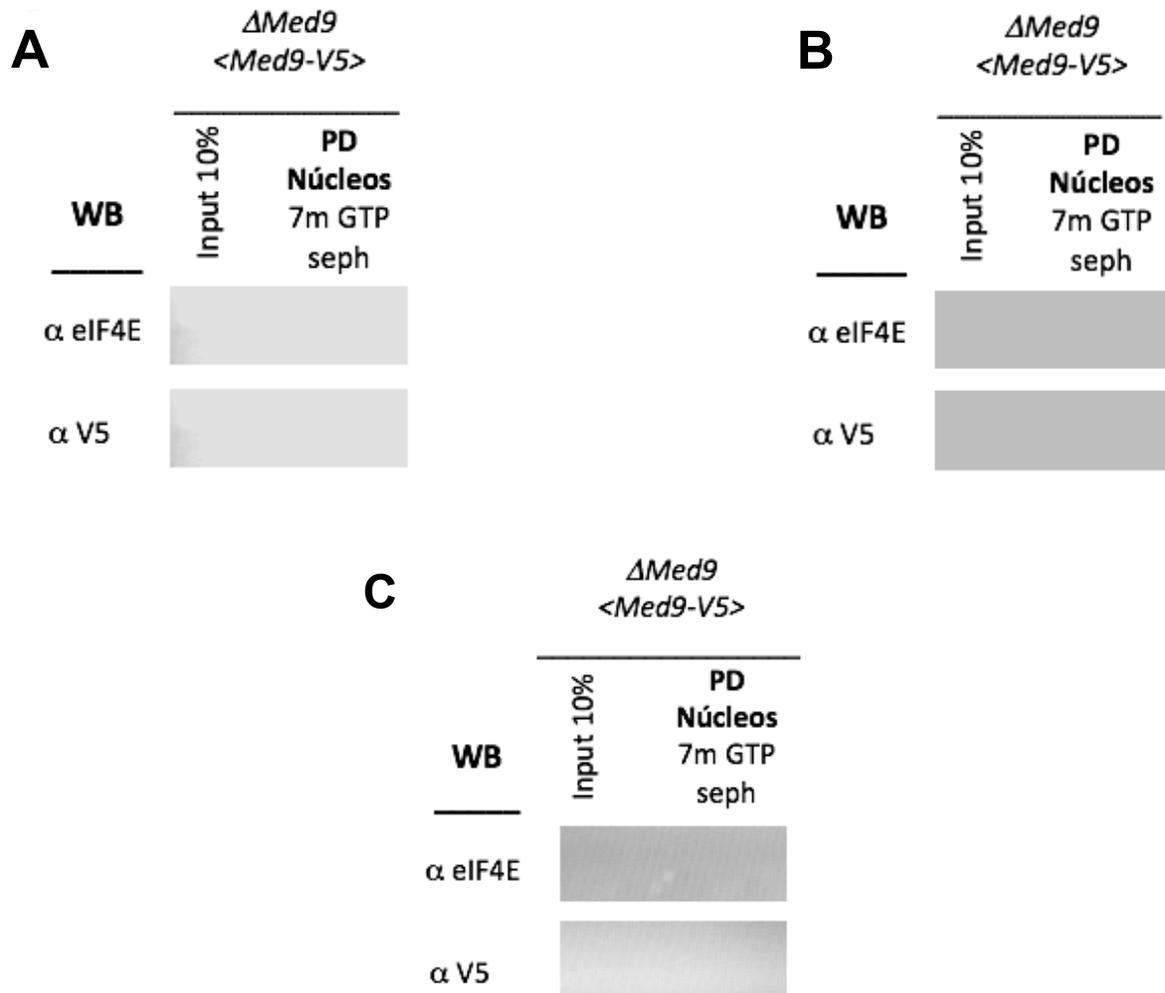
Con la premisa de que ambas proteínas (eIF4E y Med9) se encuentran en la fracción nuclear en condiciones estándar (2% Glucosa, 30°C,  $OD_{600} = 1.5$ ), decidimos realizar un ensayo de inmunoprecipitación (IP) usando anticuerpo anti-V5 con la fracción nuclear de la cepa  $\Delta med9 \langle pvTURA3-Med9-V5 \rangle$  para detectar si la interacción se está llevando a cabo dentro del núcleo, sin embargo notamos que no se observa a eIF4E en el control de lisado nuclear (*input*) y tampoco interactuando con Med9 (Figura 9A), así que decidimos repetir la IP con anticuerpo anti-V5 duplicando el tiempo de incubación pasando de dos a cuatro horas la incubación de la resina Proteína G-sepharosa con el anticuerpo anti-V5 y el lisado nuclear para aumentar la probabilidad de observar a eIF4E. Al realizar el WB obtuvimos el mismo resultado, no pudimos detectar a eIF4E (Figura 9B).



**Figura 9. eIF4E no se observa en la fracción nuclear. A)** IP de la fracción nuclear usando anticuerpo anti-V5, incubación por 2 h de la resina Proteína G-sepharosa con anticuerpo anti-V5 y el lisado nuclear. No se observa a eIF4E en la fracción nuclear. **B)** IP de la fracción nuclear usando anticuerpo anti-V5, incubación por 4 horas de la resina Proteína G-sepharosa con anticuerpo anti-V5 y el lisado nuclear. No se observa a eIF4E en la fracción nuclear. Se muestran Western *blots* (WB) usando los anticuerpos indicados a la izquierda de cada *blot* y lisados nucleares de las cepas indicadas.

Ya que se ha descrito que la cantidad de eIF4E en *S. cerevisiae* dentro del núcleo es significativamente menor respecto a la que se encuentra en el citosol (Lang. *et al.*, 1993) decidimos realizar un ensayo de *Pull down* (PD) con la resina  $^7$ metil-GTP-Sepharosa, que une específicamente a eIF4E, para enriquecer la cantidad de eIF4E que pudiéramos tener en el lisado de la fracción nuclear y poder observar de esta forma la interacción, si es que esta ocurre dentro del núcleo, sin embargo, no pudimos observar a eIF4E (Figura 10A). Hicimos dos ensayos más intentando enriquecer a eIF4E en la fracción nuclear realizando un par de modificaciones. Realizamos nuevamente un PD con la resina  $^7$ metil-GTP-Sepharosa, esta vez incubándola durante toda la noche (14 horas) a 4°C con el lisado nuclear, no obstante, el resultado fue la ausencia de eIF4E en la fracción nuclear (Figura 10B). Finalmente realizamos PD con la resina  $^7$ metil-GTP-Sepharosa incubándola durante dos horas con el lisado nuclear, esta vez realizando previamente al PD un *crosslinking* químico con DSP a una

concentración de 5mM. El resultado fue el mismo, eIF4E no se observa en la fracción nuclear (Figura 10C).

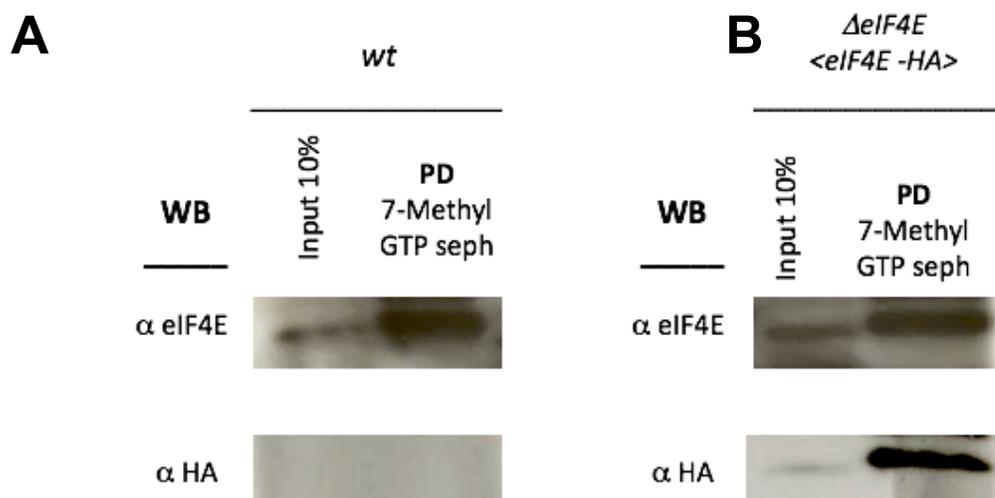


**Figura 10. Al realizar PD eIF4E no se observa en la fracción nuclear. A)** PD <sup>7</sup>metil-GTP-Sepharosa con la fracción nuclear, incubación por 2 horas de resina y lisado nuclear. No se observa a eIF4E en la fracción nuclear. **B)** PD <sup>7</sup>metil-GTP-Sepharosa con la fracción nuclear, incubación *overnight* (14 horas) de resina y lisado nuclear. No se observa a eIF4E en la fracción nuclear. **C)** PD <sup>7</sup>metil-GTP-Sepharosa con la fracción nuclear +DSP 5mM, incubación por 2 horas de resina con lisado nuclear. No se observa a eIF4E en la fracción nuclear. Se muestran Western *blots* (WB) usando los anticuerpos indicados a la izquierda de cada *blot* y lisados nucleares o totales de las cepas indicadas.

El hecho de no poder observar a eIF4E en los lisados nucleares al realizar WB con el anticuerpo anti-eIF4E, nos hizo suponer que el impedimento para detectarlo podría ser por cuestiones de sensibilidad del anticuerpo o nuestro sistema de revelado usando el LI-COR C-DiGit Blot Scanner. Debido a que el anticuerpo para detectar eIF4E fue generado previamente en el laboratorio, decidimos realizar dos ensayos por duplicado de PD con <sup>7</sup>metil-GTP-Sepharosa, usando lisados totales de la cepa *wt* y la cepa  $\Delta eIF4E$  <p301-eIF4E-HA>, revelando un ensayo con LI-COR C-DiGit Blot Scanner y el duplicado revelándolo con soluciones reveladores sobre película de rayos X en cuarto oscuro.

En el ensayo que se realizó con la cepa *wt* hicimos un WB con el anticuerpo anti-eIF4E que al revelar sobre película de rayos X en cuarto oscuro reconoció adecuadamente a la proteína (Figura 11A). En el ensayo donde usamos la cepa  $\Delta eIF4E$  <p301-eIF4E-HA> realizamos un WB con anticuerpo anti-eIF4E que al revelar sobre película de rayos X observamos el reconocimiento adecuado de eIF4E y al realizar un WB usando un anti-HA observamos una banda al mismo peso que las anteriores (Figura 11B). Con este ensayo inferimos que el anticuerpo sí reconoce adecuadamente a eIF4E y que el LI-COR C-DiGit Blot Scanner es poco sensible para detectar la señal de esta proteína cuando se encuentra en pocas cantidades como en el *input* o la fracción nuclear ya que en los WB que se revelaron en paralelo con este equipo no pudimos observar señal en los *inputs* del ensayo en paralelo que se realizó a los resultados de la Figura 9.

Por esta razón en la mayoría de nuestros *blots* no se puede observar la señal de eIF4E en los *inputs* o al realizar PD <sup>7</sup>metil-GTP-Sepharosa con la fracción nuclear, pero sí cuando se realiza un PD <sup>7</sup>metil-GTP-Sepharosa son los lisados totales.

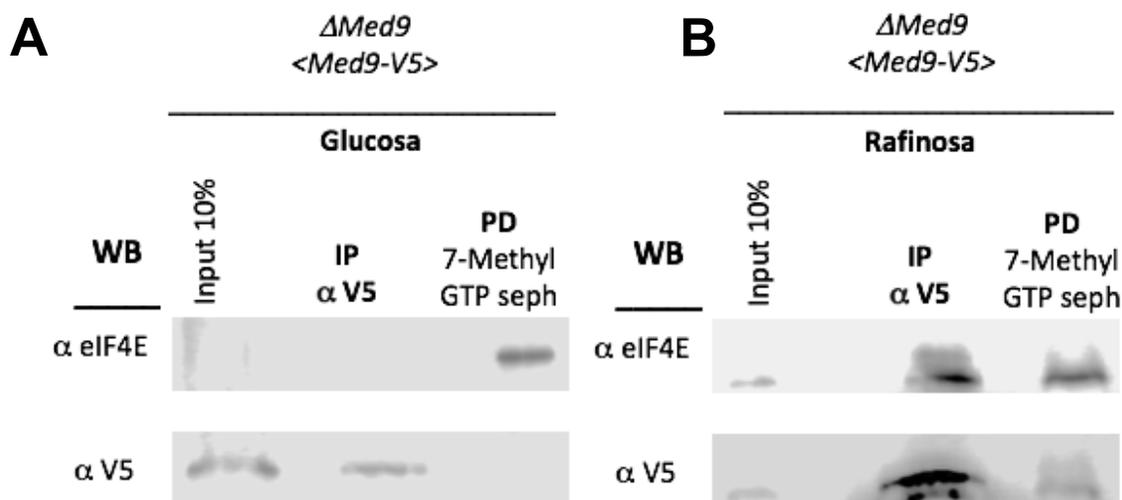


**Figura 11. eIF4E es reconocido por el anticuerpo producido en el laboratorio.** **A)** *Pull down* (PD) con resina  $^7$ metil-GTP-Sepharosa del lisado total de la cepa *wt* crecida en un medio con glucosa al 2%, posterior *Western blot* y revelado sobre película de rayos X. Reconocimiento de eIF4E por el anticuerpo anti-eIF4E producido en el laboratorio. **B)** *Pull down* (PD) con resina  $^7$ metil-GTP-Sepharosa del lisado total de la cepa  $\Delta eIF4E$   $\langle p301-eIF4E-HA \rangle$  crecida en un medio con galactosa al 2%, posterior *Western blot* y revelado sobre película de rayos X. Reconocimiento de eIF4E por el anticuerpo anti-eIF4E producido en el laboratorio y por un anti-HA comercial.

### El complejo Med9—eIF4E se forma en presencia de rafinosa, pero no de glucosa

Debido a que existía un antecedente del 2002 donde Ho *et al.* observaron un complejo compuesto por eIF4E, Med9 y Por1 creciendo la levadura en medio con rafinosa, decidimos usar las mismas condiciones de crecimiento empleadas y la metodología para obtener el lisado total utilizando la cepa  $\Delta med9$   $\langle pvTURA3-Med9-V5 \rangle$ . Realizamos una IP usando el anticuerpo anti-V5. En paralelo, realizamos un PD con la resina  $^7$ metil-GTP-Sepharosa.

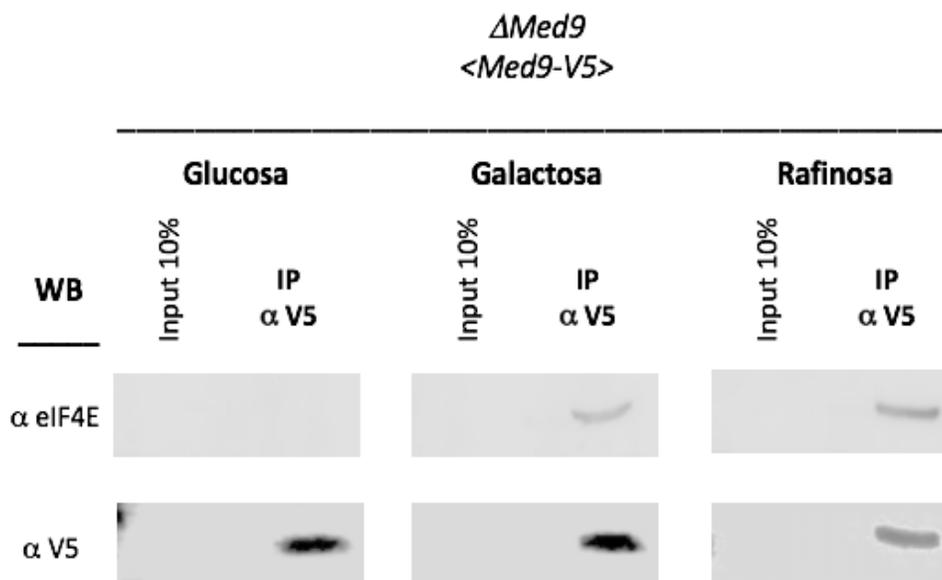
Al realizar ambos ensayos creciendo la levadura en 50 mL de cultivo con rafinosa al 2%, pudimos observar la formación del complejo Med9—eIF4E a una  $OD_{600} = 1.4$  (Figura 12B). No obstante, cuando replicamos el mismo ensayo creciendo la levadura en presencia de glucosa al 2% no se formó el complejo (Figura 12A).



**Figura 12. Formación del complejo Med9—eIF4E en el crecimiento celular con rafinosa.** **A)** Las células se crecieron en medio con glucosa al 2%. No se observó interacción de Med9-V5 con eIF4E endógeno. **B)** Crecimiento celular en medio con rafinosa al 2%. Se observó interacción de Med9-V5 con eIF4E endógeno. Se muestran Western *blots* (WB) usando los anticuerpos indicados a la izquierda de cada *blot* y revelando con LI-COR C-DiGit Blot Scanner. Se emplearon lisados totales de las cepas indicadas.

### **El complejo Med9—eIF4E se forma en presencia de rafinosa o galactosa e interactúa con Por1**

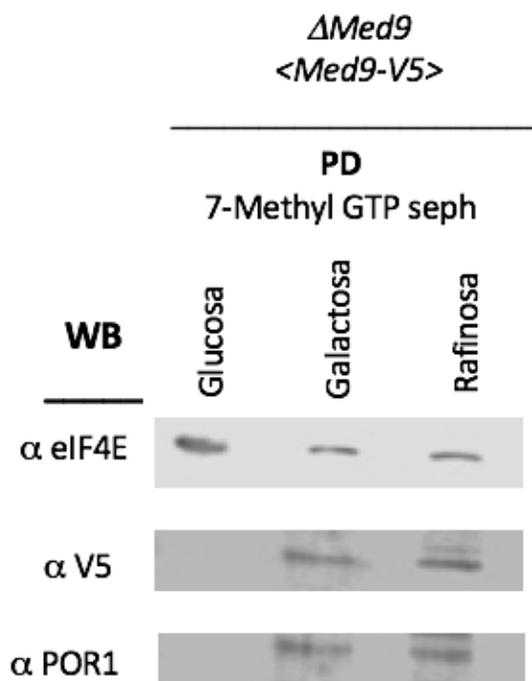
El resultado anterior, donde pudimos observar el complejo Med9—eIF4E en un medio con rafinosa nos hizo preguntarnos si la capacidad de integrar múltiples señales sobre el tipo de fuente de carbono durante el crecimiento celular era un determinante en la formación del complejo Med9—eIF4E. Por ello, decidimos probar una fuente de carbono más, la galactosa. En este ensayo, incluimos además de galactosa las dos fuentes de carbono probadas anteriormente al 2% mediante PD<sup>7</sup>metil-GTP-Sepharosa. Al realizar la IP anti-V5 observamos la formación del complejo Med9—eIF4E cuando se crece el cultivo en un medio con galactosa y comprobamos la interacción cuando la fuente de carbono es rafinosa (Figura 13), nuevamente no observamos la interacción en glucosa.



**Figura 13. El complejo Med9—eIF4E se observó en presencia de galactosa y rafinosa.** Se realizaron IP usando anticuerpos anti-V5 con lisados totales de las cepas con el genotipo mostrado. Las células se crecieron en medio con glucosa al 2%, galactosa al 2% y rafinosa al 2%. Se observó interacción de Med9-V5 con eIF4E endógeno en los ensayos realizados con los lisados de galactosa y rafinosa. Se muestran Western *blots* (WB) usando los anticuerpos indicados a la izquierda de cada *blot* y revelando con LI-COR C-DiGit Blot Scanner.

Debido a que Ho *et al.* (2002) reportaron que en el complejo que identificaron entre Med9 y eIF4E también se encuentra la porina mitocondrial 1 (Por1), sentimos curiosidad por comprobar si esta proteína también se encuentra en el complejo en otra fuente de carbono, para ello replicamos el ensayo con lisados totales de la cepa *Δmed9* <*pvTURA3-Med9-V5*>, realizando PD con la resina <sup>7</sup>metil-GTP-Sepharosa probando las tres fuentes de carbono anteriormente seleccionadas para hacer un Western *blot* utilizando un anticuerpo anti-Por1.

Nuestros resultados indican que cuando eIF4E y Med9 interaccionan Por1 también se encuentra unida a eIF4E, sin embargo, Por1 no puede unirse a eIF4E en glucosa, curiosamente la fuente de carbono donde el complejo Med9—eIF4E no se observa (Figura 14).

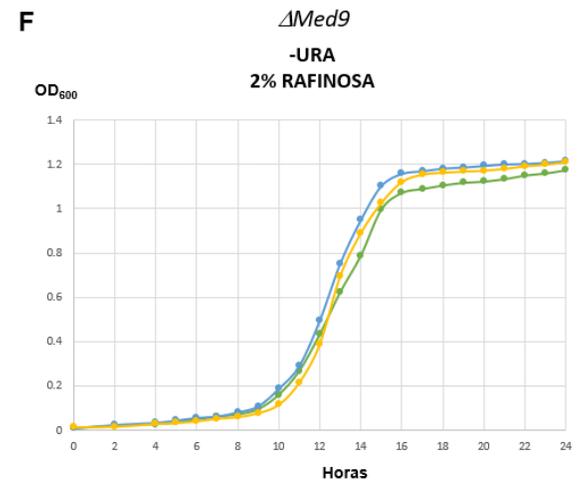
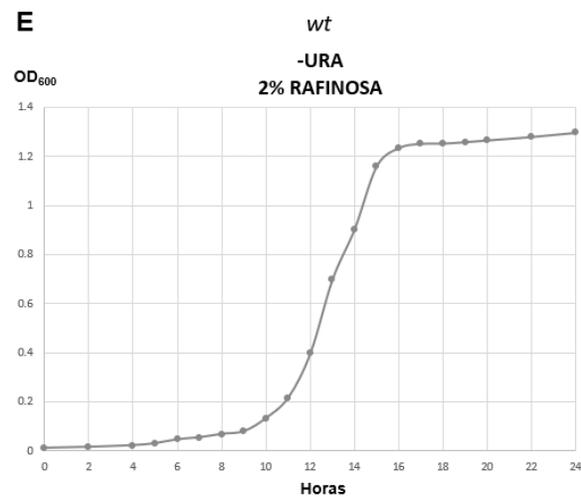
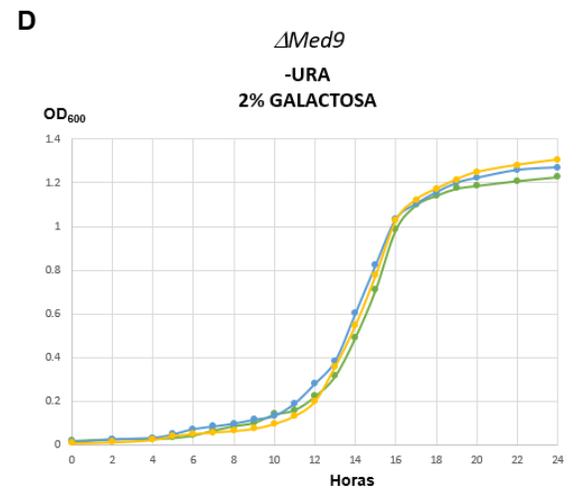
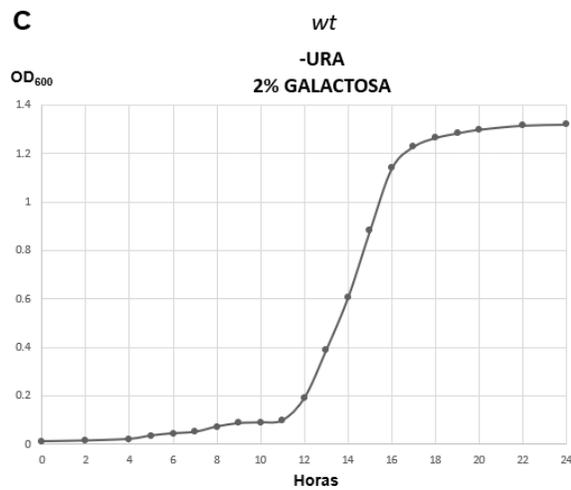
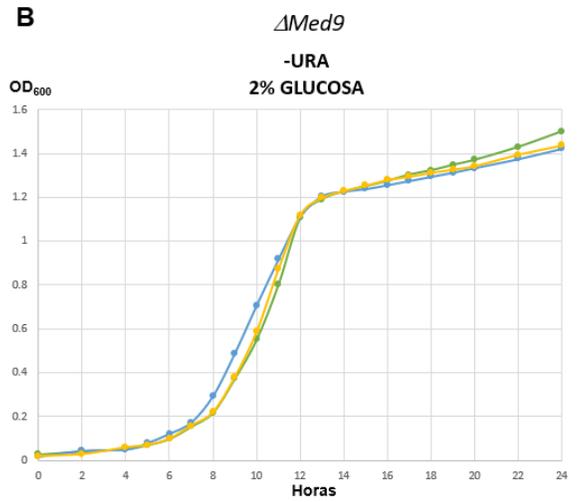
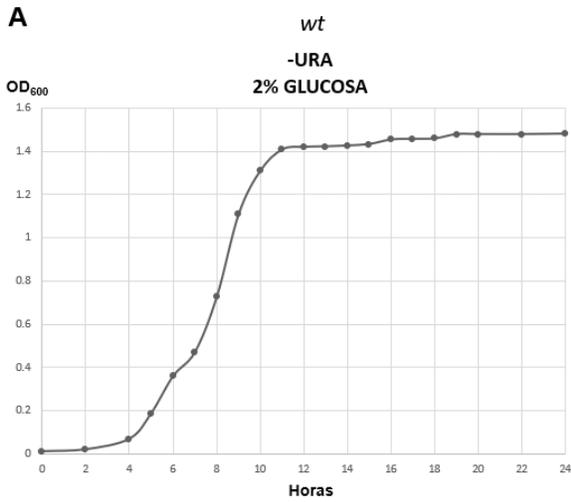


**Figura 14. El complejo Med9—eIF4E se observó en presencia de galactosa y rafinosa.** Se realizaron *Pull down* con lisados totales de la cepa con el genotipo mostrado. En las fuentes de carbono donde se observa el complejo Med9—eIF4E la proteína Por1 también se encuentra presente. Se muestran Western blots (WB) usando los anticuerpos indicados a la izquierda de cada *blot*.

### Rafinosa y galactosa retrasan el crecimiento de la cepa *Δmed9*

Para comparar el crecimiento de la cepa *Δmed9* en galactosa, rafinosa y glucosa se realizaron curvas de crecimiento en dichas fuentes de carbono a temperatura estándar de crecimiento (30°C) y en agitación constante. Se graficó el incremento de la OD<sub>600</sub> del cultivo respecto al tiempo para identificar las fases de crecimiento de los diferentes cultivos (Figura 15).

Al comparar los gráficos, identificamos que mientras en glucosa se llegó a la fase estacionaria a las 12 horas, curiosamente las fuentes de carbono donde se observa la interacción Med9—eIF4E, rafinosa y galactosa, se retrasó la llegada a la fase estacionaria a 15 y 16 horas respectivamente (Figura 15 B-15C). Las tablas con los datos originales de las curvas de crecimiento se muestran en el Anexo 1.

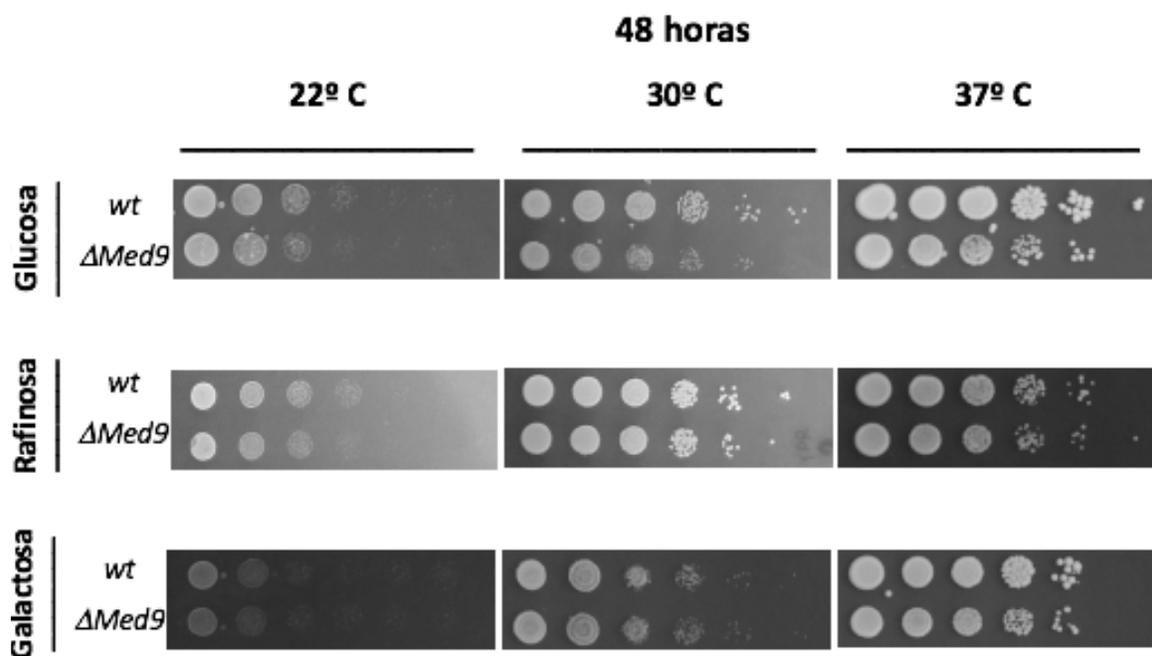


**Figura 15. Curvas de crecimiento de la cepa  $\Delta med9$  en medios con rafinosa, galactosa y glucosa. A)** Crecimiento en un medio con glucosa. Se llegó a la fase lag a las 6 horas y a la fase estacionaria a las 12 horas. **B)** Crecimiento en un medio con galactosa. Se llegó a la fase

lag a las 9 horas y a la fase estacionaria a las 16 horas. **C)** Crecimiento en un medio con rafinosa, se llega a la fase lag a las 9 horas y a la fase estacionaria a las 15 horas.

### El fenotipo de la cepa $\Delta med9$ se afecta por la fuente de carbono

Para evaluar si la fuente de carbono disponible afecta el fenotipo de la delección de MED9 reportado en glucosa a temperatura estándar de crecimiento (30°C), *Temperatura ambiente* (22°C) y *heat shock* (37°C). Las sensibilidades de temperatura de la cepa *wt* se compararon con MED9 nulo ( $\Delta med9$ ) mediante diluciones seriadas con la cepa sobre las 3 fuentes de carbono en las que previamente probamos la interacción. Nuestros resultados indican que el fenotipo de la delección de Med9 reportada en glucosa se mantiene en rafinosa y galactosa, disminuyendo su crecimiento respecto a la cepa *wt* (Figura 16).



**Figura 16. El fenotipo de la delección de *Med9* se ve afectado de igual forma en las tres fuentes de carbono probadas.** Se crecieron la cepa *wt* y  $\Delta med9$  en placas de agar YPD, YPRaf, YPGal y cada placa se incubó durante 2 días a la temperatura estándar (30°C), *cold shock* (22°C) y *heat shock* (37°C). En la parte derecha de cada panel, se muestran la cepa y la fuente de carbono.

## XI. DISCUSIÓN

Med9 es una de las 25 proteínas que forman el MC de *S. cerevisiae*, y pocos son los estudios que se han realizado para cada una de estas subunidades. Las proteínas Med15 y Med17 de *S. cerevisiae* cuyo rol se limitaba a ser estructural dentro del MC, se demostró que al crecer la levadura en galactosa, estas interactúan con Gal4 y dicha interacción es importante para la activación de genes *GAL* (Björklund & Gustafsson, 2005). En esta tesis demostramos que Med9 tiene un rol que va más allá de formar parte de la estructura del MC, ya que como se puede ver en la Figura 13, cuando crecimos la levadura en un medio con galactosa o rafinosa, pudimos observar mediante experimentos de inmunoprecipitación que Med9 interacciona con eIF4E. Dicha interacción es interrumpida cuando crecimos la levadura en un medio con glucosa.

Cuando la glucosa es accesible, *S. cerevisiae* prefiere un metabolismo fermentativo a pesar de la presencia de oxígeno y reprime la respiración, el uso de fuentes alternativas de carbono y la gluconeogénesis (Kayikci & Nielsen, 2015). Esta represión catabólica se transmite a la maquinaria celular mediante una gran cantidad de interacciones proteicas reguladoras entrelazadas, también llamadas vías de señalización (Timson, 2007). La galactosa es utilizada por *S. cerevisiae* mediante su conversión a glucosa-6-fosfato en una reacción catalizada por las enzimas de la vía de Leloir (Frey, 1996). Este circuito es regulado mediante la expresión de los genes *GAL*, controlados por una red que implica actividades de activación y represión, de los genes reguladores específicos *GAL3*, *GAL4* y *GAL80* (Timson, 2007).

La importancia de las interacciones proteicas para la regulación del metabolismo de azúcares en *S. cerevisiae* es esencial, y en esta tesis demostramos que para la formación del complejo *in vivo* Med9—eIF4E la levadura debe crecer en medios que activen la expresión de genes *GAL*. La rafinosa, una fuente de carbono donde también observamos la formación del complejo Med9—eIF4E *in vivo* (Figura 13), aumenta ~1000 veces los niveles de expresión del gen *GAL1* por encima del nivel observado en presencia de glucosa, una estimulación que se debe principalmente a la actividad de Gal4 (Sood & Brickner, 2017).

Como se ha mencionado ya, una gran cantidad de interacciones proteicas regulan la activación de los genes *GAL* en *S. cerevisiae* para metabolizar azúcares

como rafinosa y galactosa. En esta tesis describimos la formación de complejos que no se forman en presencia de glucosa e involucren proteínas del MC. A medida que más estudios se realicen para dichas proteínas es muy probable que encontremos más interacciones involucradas en el metabolismo de azúcares.

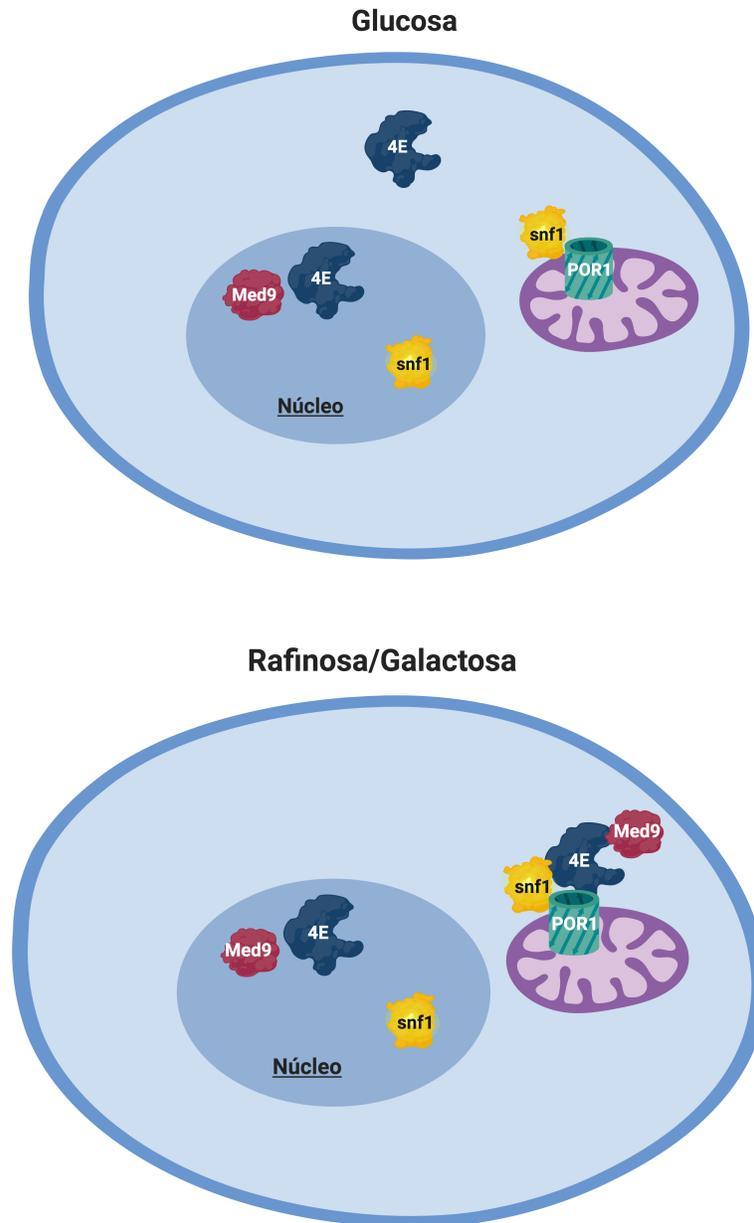
La delección del gen *Med9* parece afectar el crecimiento en rafinosa y galactosa comparando con las levaduras que crecen en glucosa a diferentes temperaturas, como se muestra en la Figura 16, galactosa y rafinosa retardan la llegada a la fase lag y exponencial de crecimiento así como la fase de adaptación a la fuente de carbono que en glucosa resultó de 5 horas, en el dichas fuentes de carbono se alarga hasta 9 horas, además como se observa en la Figura 17, el fenotipo se afecta ligeramente en galactosa y rafinosa, disminuyendo el crecimiento, sugiriendo que su interacción con eIF4E está involucrada en el crecimiento de la levadura en medios con galactosa y rafinosa. Otra evidencia que apunta a que la formación del complejo Med9—eIF4E se encuentra involucrado en el metabolismo de azúcares es la presencia de la proteína mitocondrial Por1 en este complejo. Por1 es parte del canal aniónico dependiente del voltaje mitocondrial, y juega un papel clave en la mediación de la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial a pequeños metabolitos, incluidos ATP, ADP y AMP; además, Por1 contribuye al control positivo de la proteína quinasa Snf1. Estudios apuntan a que la activación de Snf1 se correlaciona con una mayor proporción de AMP-ATP *in vivo*, y, se demostró que el ADP protege a Snf1 de la defosforilación en su treonina *in vitro*. Con base en ello se sugirió que el complejo Snf1 con las porinas mitocondriales de levadura responde a niveles absolutos de ADP en lugar de a las relaciones ADP-ATP, sugiriendo que la capacidad de interactuar con las proteínas POR y la proximidad a la superficie mitocondrial podría colocar a Snf1 en una posición ideal para detectar la limitación de glucosa/energía. Por ejemplo, a medida que disminuyen los niveles de glucosa, los niveles de ADP podrían aumentar más bruscamente en la superficie mitocondrial, por lo que es un buen lugar para monitorear cambios en la concentración de precursores energéticos (Strogolova *et al*, 2012).

Se requiere a Snf1 para promover la expresión de muchos genes represibles por glucosa en *S. cerevisiae*, y está demostrado que las cepas que portan una mutación en Snf1 no pueden crecer en galactosa o rafinosa (Celenza & Carlson, 1984). Se cree que Snf1 interactúa con Por1 para detectar la limitación de glucosa/energía, ya que a

medida que disminuyen los niveles de glucosa, los niveles de ADP aumentan en la superficie mitocondrial, por lo que allí inicia la señalización para la activación de genes reprimidos (Strogolova *et al*, 2012). Recientemente se ha reportado en *Arabidopsis thaliana* un homólogo de Snf1 de *S. cerevisiae* que inhibe la traducción al fosforilar eIF4E (Bruns *et al*, 2019).

Como se puede observar en la Figura 14, Por1 forma un complejo proteico con eIF4E y Med9 únicamente cuando la levadura crece en presencia de galactosa o rafinosa. Estas fuentes de carbono son precisamente en las que Por1 se involucra en la regulación de activación de genes *GAL* a través de su interacción con Snf1.

Con los datos obtenidos en esta tesis, junto con las observaciones hechas por otros grupos de investigación aquí mencionadas, proponemos un modelo en el que cuando la levadura requiere metabolizar galactosa y rafinosa, eIF4E se une a Med9 e interaccionan con Por1 adosados a la membrana mitocondrial externa, y este complejo coopera en la señalización para la activación de genes *GAL* ya que eIF4E, Med9 y Snf1 pueden internarse en el núcleo activando la expresión de dichos genes (Fig. 16).



**Figura 17. Modelo de la formación del complejo Med9—eIF4E en galactosa y rafinosa.** Arriba se muestra la localización de las proteínas cuando la levadura crece en glucosa. *Abajo* se muestra la formación del complejo Med9—eIF4E—Por1 al crecer la levadura en galactosa o rafinosa, proponemos que el complejo se forma adosado a la membrada externa mitocondrial donde regularía algún paso de la expresión de los genes reprimidos por glucosa.

Un dato adicional que refuerza el modelo propuesto en este trabajo, es el hecho de que en el screening genómico por doble híbrido (datos aún no publicados) se encontró que eIF4E forma un complejo con Stf2; Esta proteína de localización mitocondrial, además de sus propiedades antioxidantes, es uno de los dos factores estabilizadores de la F0F1-ATPasa mitocondrial inactiva, uniéndose al sector F0 de la ATPasa y facilitando la acción inhibitoria de Inh1p y Stf1p; La localización de esta proteína y su interacción con eIF4E sugiere que si bien eIF4E podría aproximarse a la mitocondria para formar complejos, eIF4E podría estar involucrado en la señalización de procesos respiratorios y/o metabólicos.

Como se ha mencionado anteriormente eIF4E es una proteína multifuncional cuyos roles en el metabolismo del RNA en diversos organismos continúan descubriéndose. En esta tesis describimos un rol para esta proteína completamente novedoso ya que hasta el momento no hay reportes de eIF4E como parte de la señalización para el metabolismo de azúcares. Nuestras observaciones son el primer reporte de la participación de eIF4E y de Med9 en el cambio de la utilización de fuente de carbono.

Aunque las observaciones experimentales que hicimos en esta tesis apuntan claramente a que el complejo Med9—eIF4E está involucrado en el metabolismo de azúcares, aún queda mucho por dilucidar; por ejemplo, falta comprobar experimentalmente cómo es que el complejo Med9—eIF4E—Por1 podría intervenir en la expresión de genes reprimidos por glucosa *in vivo* y si Snf1 podría estar involucrado en el complejo. Asimismo, falta comprobar que el complejo Med9—eIF4E—Por1 efectivamente se forma adosado a la membrana externa de la mitocondria. Una explicación alternativa es que el complejo Med9—eIF4E—Por1 se forme en el citosol o en el núcleo. Finalmente, también hay que dilucidar experimentalmente el papel de eIF4E y Med9 en el complejo Med9—eIF4E—Por1.

## XII. CONCLUSIONES

Se identificaron dos condiciones específicas de fuentes de carbono bajo las que se observa la formación del complejo Med9—eIF4E *in vivo*: Rafinosa y galactosa. Además se demostró que la formación de dicho complejo no ocurre cuando la levadura crece en medios con glucosa y también identificamos que la porina mitocondrial Por1 se encuentra formando parte del complejo uniéndose a eIF4E.

## XIII. PERSPECTIVAS

1. Se debe comprobar si Med9 y eIF4E se relocalizan cuando *Saccharomyces cerevisiae* crece en galactosa y rafinosa.
2. Es necesario que en el futuro se compruebe si el complejo Med9—eIF4E—Por1 se forma adosado a la mitocondria como proponemos en este trabajo, o, si la interacción ocurre en el citosol o núcleo de la levadura.
3. También se debe definir experimentalmente cómo es que el complejo Med9—eIF4E—Por1 podría intervenir en la expresión de genes reprimidos por glucosa *in vivo*
4. Comprobar si Snf1 está involucrado en el complejo Med9—eIF4E—Por1

**ANEXO 1**  
**DATOS DE CURVAS DE CRECIMIENTO DE S. CEREVISIAE EN DIFERENTES**  
**FUENTES DE CARBONO**

GLUCOSA		<i>cepa <math>\Delta med9</math></i>			GLUCOSA		<i>cepa wt</i>	
		EXP1	EXP2	EXP3				
HORAS	OD	OD	OD	OD	HORAS	OD		
0	0.028	0.016	0.019		0	0.01		
2	0.042	0.043	0.027		2	0.019		
4	0.053	0.049	0.058		4	0.068		
5	0.071	0.079	0.069		5	0.187		
6	0.099	0.121	0.098		6	0.358		
7	0.155	0.173	0.158		7	0.469		
8	0.219	0.294	0.22		8	0.724		
9	0.374	0.489	0.381		9	1.106		
10	0.552	0.708	0.588		10	1.308		
11	0.803	0.918	0.874		11	1.406		
12	1.108	1.112	1.12		12	1.418		
13	1.191	1.205	1.197		13	1.42		
14	1.226	1.227	1.229		14	1.424		
15	1.25	1.238	1.253		15	1.431		
16	1.274	1.256	1.28		16	1.452		
17	1.303	1.275	1.294		17	1.455		
18	1.322	1.294	1.312		18	1.457		
19	1.347	1.313	1.327		19	1.477		
20	1.37	1.334	1.343		20	1.477		
22	1.429	1.375	1.395		22	1.477		
24	1.5	1.422	1.437		24	1.479		

GALACTOSA				cepa $\Delta med9$			GALACTOSA				cepa wt	
		EXP1	EXP2	EXP3								
HORAS		OD	OD	OD	HORAS		OD		HORAS		OD	
0	0.019	0.012	0.008		0	0.012						
2	0.027	0.025	0.012		2	0.015						
4	0.029	0.032	0.023		4	0.022						
5	0.033	0.048	0.041		5	0.036						
6	0.044	0.072	0.05		6	0.045						
7	0.067	0.084	0.058		7	0.051						
8	0.087	0.097	0.064		8	0.073						
9	0.102	0.115	0.074		9	0.087						
10	0.14	0.132	0.096		10	0.09						
11	0.16	0.189	0.132		11	0.099						
12	0.222	0.279	0.199		12	0.193						
13	0.315	0.383	0.358		13	0.391						
14	0.492	0.601	0.546		14	0.608						
15	0.711	0.823	0.775		15	0.884						
16	0.987	1.034	1.027		16	1.141						
17	1.099	1.104	1.123		17	1.23						
18	1.143	1.157	1.172		18	1.266						
19	1.175	1.2	1.215		19	1.285						
20	1.188	1.223	1.248		20	1.3						
22	1.21	1.259	1.281		22	1.317						
24	1.228	1.271	1.305		24	1.321						

RAFINOSA		<i>cepa Δmed9</i>			RAFINOSA		<i>cepa wt</i>	
		EXP1	EXP2	EXP3				
HORAS	OD	OD	OD	OD	HORAS	OD		
0	0.009	0.01	0.016		0	0.011		
2	0.021	0.025	0.018		2	0.015		
4	0.029	0.035	0.03		4	0.022		
5	0.035	0.045	0.035		5	0.03		
6	0.05	0.057	0.042		6	0.046		
7	0.063	0.063	0.054		7	0.054		
8	0.072	0.082	0.061		8	0.068		
9	0.096	0.109	0.079		9	0.079		
10	0.161	0.188	0.117		10	0.133		
11	0.268	0.291	0.216		11	0.216		
12	0.434	0.496	0.39		12	0.397		
13	0.625	0.754	0.698		13	0.698		
14	0.789	0.95	0.891		14	0.904		
15	0.997	1.104	1.027		15	1.161		
16	1.072	1.159	1.122		16	1.235		
17	1.09	1.171	1.155		17	1.252		
18	1.106	1.183	1.164		18	1.253		
19	1.118	1.188	1.169		19	1.259		
20	1.123	1.195	1.173		20	1.266		
21	1.134	1.202	1.181		22	1.28		
22	1.151	1.204	1.193		24	1.297		

#### XIV. REFERENCIAS

1. Allen, B. L., & Taatjes, D. J. (2015). The Mediator complex: a central integrator of transcription. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(3), 155–166.
2. Altmann, M. *et al.* (1987). mRNA cap-binding protein: cloning of the gene encoding protein synthesis initiation factor eIF-4E from *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 7(3), 998–1003.
3. Anderson, P. & Kedersha, N. (2008). Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends in Biochemical Sciences*, 33(3), 141–150.
4. Andrei, M. A. (2005). A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies. *RNA*, 11(5), 717–727.
5. Arndt, N. *et al.* (2018). Properties of the ternary complex formed by yeast eIF4E, p20 and mRNA. *Scientific Reports*, 8(1), 1-11.
6. Baidoobonso, S.M., *et al.* (2007) Med19(Rox3) regulates Intermodule interactions in the *Saccharomyces cerevisiae* mediator complex. *J. Biol. Chem.* 282, 5551– 5559.
7. Björklund, S., & Gustafsson, C. M. (2005). The yeast Mediator complex and its regulation. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(5), 240–244.
8. Borden, K. (2016). The eukaryotic translation initiation factor eIF4E wears a “cap” for many occasions. *Translation*, 4(2).
9. Brengues, M. & Parker, R. (2007). Accumulation of Polyadenylated mRNA, Pab1p, eIF4E, and eIF4G with P-Bodies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 18(7), 2592–2602.
10. Bruns, A. N., Li, S., Mohannath, G., & Bisaro, D. M. (2019). Phosphorylation of Arabidopsis eIF 4E and eIF iso4E by Sn RK 1 Inhibits Translation. *The FEBS Journal*.
11. Carroll, M. & Borden, K. (2013). The oncogene eIF4E: Using biochemical insights to target cancer. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 33(5), 227–238.
12. Celenza, J. L., & Carlson, M. (1984). Cloning and genetic mapping of SNF1, a gene required for expression of glucose-repressible genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 4(1), 49–53.
13. Chial, H. *et al.* (2000). Yeast Eap1p, an eIF4E-associated protein, has a separate function involving genetic stability. *Current Biology*, 10(23), 1519–1522.
14. Cho, P. F., *et al.* (2005). A New Paradigm for Translational Control: Inhibition via 5'-3' mRNA Tethering by Bicoid and the eIF4E Cognate 4EHP. *Cell*, 121(3), 411–423.
15. Collier, J., & Parker, R. (2004). Eukaryotic mRNA decapping. *Annual Review of Biochemistry*, 73(1), 861–890.

16. Conaway, J. W. (2012). *Introduction to Theme "Chromatin, Epigenetics, and Transcription."* *Annual Review of Biochemistry*, 81(1), 61–64.
17. Conaway, R. C., & Conaway, J. W. (2013). The Mediator complex and transcription elongation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(1), 69–75. doi:10.1016/j.bbagr.2012.08.017
18. Cosentino, G. *et al.* (2000). Eap1p, a novel eukaryotic translation initiation factor 4E-associated protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 20(13), 4604–13.
19. Cridge, A. *et al.* (2010). Identifying eIF4E-binding protein translationally controlled transcripts reveals links to mRNAs bound by specific PUF proteins. *Nucleic Acids Research*, 38(22), 8039–8050.d
20. Culjkovic, B. *et al.* (2005). eIF4E promotes nuclear export of cyclin D1 mRNAs via an element in the 3'UTR. *The Journal of Cell Biology*, 169(2), 245–256.
21. Culjkovic, B. *et al.* (2006). eIF4E is a central node of an RNA regulon that governs cellular proliferation. *The Journal of Cell Biology*, 175(3), 415–426.
22. Dastidar, R., *et al.* (2012). The nuclear localization of SWI/SNF proteins is subjected to oxygen regulation. *Cell & Bioscience*, 2(1), 30.
23. Davis, M. *et al.* (2019). Nuclear eIF4E stimulates 3'-end cleavage of target RNAs. *Cell*, 27(5), 1397–1408.
24. De la Cruz, J. *et al.* (1997). The p20 and Ded1 proteins have antagonistic roles in eIF4E-dependent translation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(10), 5201–5206.
25. Dever, T. (2002). Gene-Specific Regulation by General Translation Factors. *Cell*, 108(4), 545–556.
26. Dostie, J. *et al.* (2000). A novel shuttling protein, 4E-T, mediates the nuclear import of the mRNA 5' cap-binding protein, eIF4E. *The EMBO Journal*, 19(12), 3142–3156.
27. Dunand-Sauthier. *et al.* (2002). Sum1, a Component of the Fission Yeast eIF3 Translation Initiation Complex, Is Rapidly Relocalized During Environmental Stress and Interacts with Components of the 26S Proteasome. *Molecular Biology of the Cell*, 13(5), 1626–1640.
28. Evsikov, A. & Evsikova, C. (2008). Evolutionary origin and phylogenetic analysis of the novel oocyte-specific eukaryotic translation initiation factor 4E in Tetrapoda. *Development Genes and Evolution*, 219(2), 111–118.

29. Filipowicz, W. *et al.* (1976) A protein binding the methylated 5'-terminal sequence, m7GpppN, of eukaryotic messenger RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(5), 1559–1563.
30. Freire, M. A. (2005). Translation initiation factor (iso) 4E interacts with BTF3, the  $\beta$  subunit of the nascent polypeptide-associated complex. *Gene*, 345(2), 271–277.
31. Frey, P. (1996). The Leloir pathway: a mechanistic imperative for three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose. *FASEB J*, 10(4):461-470.
32. Gillespie, K. *et al.* (2016). Expansion of eIF4E and 4E-BP family members in Deuterostomes. In: *Evolution of the protein synthesis machinery and its regulation* (Eds. Greco Hernández and Rosemary Jagus). Suiza. Springer. pp. 165-186.
33. Grüner, S. *et al.* (2018). Structural motifs in eIF4G and 4E-BPs modulate their binding to eIF4E to regulate translation initiation in yeast. *Nucleic Acids Research*, 46(13), 6893–6908.
34. Hahn, S. (2004). *Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery*. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(5), 394–403.
35. Hahn, S., & Young, E. T. (2011). *Transcriptional Regulation in Saccharomyces cerevisiae: Transcription Factor Regulation and Function, Mechanisms of Initiation, and Roles of Activators and Coactivators*. *Genetics*, 189(3), 705–736.
36. Hartree, E. F. (1972). Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, 48(2), 422–427.
37. Hernández, G *et al.* (2016). Evolution of eIF4E-Interacting proteins. In: *Evolution of the Protein Synthesis Machinery and Its Regulation*. (Eds. Greco Hernández and Rosemary Jagus). Suiza. Springer. pp. 207-220.
38. Hernández, G. & Vazquez-Pianzola, P. (2005). Functional diversity of the eukaryotic translation initiation factors belonging to eIF4 families. *Mechanisms of Development*, 122(7-8), 865–876.
39. Hernández, G. *et al.* (2005). Functional analysis of seven genes encoding eight translation initiation factor 4E (eIF4E) isoforms in *Drosophila*. *Mechanisms of Development*, 122(4), 529–543.
40. Hernandez, G. *et al.* (2012). Eukaryotic initiation factor 4E-3 is essential for meiotic chromosome segregation, cytokinesis and male fertility in *Drosophila*. *Development*, 139(17), 3211–3220.
41. Hernández, G., *et al.* (2010). Origins and evolution of the mechanisms regulating translation initiation in eukaryotes. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(2), 63–73.

42. Hershey, J. *et al.* (2012). Principles of translational control: An overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(12).
43. Ho, Y. *et al.* (2002). *Systematic identification of protein complexes in Saccharomyces cerevisiae by mass spectrometry*. *Nature*, 415(6868), 180–183.
44. Jackson, R. *et al.* (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature*, 11(2), 113–127.
45. Kamenska, A. *et al.* (2014). eIF4E-binding proteins: new factors, new locations, new roles. *Biochemical Society Transactions*, 42(4), 1238–1245.
46. Kayikci, Ö., & Nielsen, J. (2015). Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 15(6), fov068.
47. Kedersha, N. *et al.* (1999). RNA-Binding Proteins Tia-1 and Tiar Link the Phosphorylation of Eif-2 $\alpha$  to the Assembly of Mammalian Stress Granules. *The Journal of Cell Biology*, 147(7), 1431–1442.
48. Kedersha, N. *et al.* (2005). Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *The Journal of Cell Biology*, 169(6), 871–884.
49. Keiper, B. *et al.* (2000). Functional Characterization of Five eIF4E Isoforms in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(14), 10590–10596.
50. Lambert, S. A., Jolma, A., Campitelli, L. F., Das, P. K., Yin, Y., Albu, M., ... Weirauch, M. T. (2018). *The Human Transcription Factors*. *Cell*, 172(4), 650–665.
51. Lang V, et al. (1994) Initiation factor eIF-4E of *Saccharomyces cerevisiae*. Distribution within the cell, binding to mRNA, and consequences of its overproduction. *J Biol Chem* 269(8):6117-23
52. Lang, B. et al. (1993). Initiation Factor eIF-4E of *Saccharomyces cerevisiae*. *The journal of biological chemist*. 269(8), 6117-6123.
53. Larivière, L. *et al.* (2013). Model of the Mediator middle module based on protein cross-linking. *Nucleic Acids Research*, 41(20), 9266–9273.
54. Livingstone, M. *et al.* (2010). Mechanisms governing the control of mRNA translation. *Physical Biology*, 7(2).
55. Mamane, Y. *et al.* (2004). eIF4E—from translation to transformation. *Nature Oncogene*, 23(18), 3172–3179.
56. Marcotrigiano, J. *et al.* (1999). Cap-Dependent Translation Initiation in Eukaryotes Is Regulated by a Molecular Mimic of eIF4G. *Cell*, 3(6), 707–716.
57. Matsuo, H. *et al.* (1997). Structure of translation factor eIF4E bound to m7GDP and interaction with 4E-binding protein. *Nature*, 4(9), 717–724.

58. Nedelec, S., et al. (2004). Emx2 homeodomain transcription factor interacts with eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) in the axons of olfactory sensory neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(29), 10815–10820.
59. Parker, R. & Sheth, U. (2007). P Bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Cell*, 25(5), 635–646.
60. Peter, D. et al. (2015). Molecular architecture of 4E-BP Translational Inhibitors Bound to eIF4E. *Cell*, 57(6), 1074–1087.
61. Poss, Z. et al. (2013). The Mediator complex and transcription regulation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 48(6), 575–608.
62. Ptushkina, M. (2001). A second eIF4E protein in *Schizosaccharomyces pombe* has distinct eIF4G-binding properties. *Nucleic Acids Research*, 29(22), 4561–4569.
63. Rhoads, R. (2009). eIF4E: New family members, new binding partners, new roles. *Journal of Biological Chemistry*, 284(25), 16711–16715.
64. Richter, J. & Sonenberg, N. (2005). Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature*, 433(7025), 477–480.
65. Sainsbury, S., et al. (2015). *Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(3), 129–143.
66. Shih, J.-W., et al. (2007). Candidate tumor suppressor DDX3 RNA helicase specifically represses cap-dependent translation by acting as an eIF4E inhibitory protein. *Oncogene*, 27(5), 700–714.
67. Sonenberg, N & Hinnebusch, A. (2009). Regulation of translation initiation in eukaryotes: Mechanisms and biological targets. *Cell*, 136(4), 731–745.
68. Sonenberg, N. (1988). Cap-Binding Proteins of Eukaryotic Messenger RNA: Functions in Initiation and Control of Translation. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 173–207.
69. Sonenberg, N. et al. (1978). A polypeptide in eukaryotic initiation factors that crosslinks specifically to the 5'-terminal cap in mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(10), 4843–4847.
70. Sonenberg, N. et al. (1979). Eukaryotic mRNA cap binding protein: purification by affinity chromatography on sepharose-coupled m7GDP. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(9), 4345–4349.
71. Sonenberg, N. et al. (1980). Differential stimulation of capped mRNA translation in vitro by cap binding protein. *Nature*, 285(5763), 331–333.

72. Sood, V., & Brickner, J. H. (2017). Genetic and Epigenetic Strategies Potentiate Gal4 Activation to Enhance Fitness in Recently Diverged Yeast Species. *Current Biology*, 27(23), 3591–3602.
73. Strogolova, V., Orlova, M., Shevade, A., & Kuchin, S. (2012). Mitochondrial Porin Por1 and Its Homolog Por2 Contribute to the Positive Control of Snf1 Protein Kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 11(12), 1568–1572.
74. Takahashi, H., *et al.* (2009). *Saccharomyces cerevisiae* Med9 comprises two functionally distinct domains that play different roles in transcriptional regulation. *Genes to Cells*, 14(1), 53–67.
75. Tharun, S. & Parker, R. (2001). Targeting an mRNA for decapping. *Molecular Cell*, 8(5), 1075–1083.
76. Timson, D. (2007). Galactose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology & Molecular Biology*, 1(1), 63-73.
77. Tomoo, K. *et al.* (2003). Structural Features of Human Initiation Factor 4E, Studied by X-ray Crystal Analyses and Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Molecular Biology*, 328(2), 365–383.
78. Topisirovic, I. (2003). The proline-rich homeodomain protein, PRH, is a tissue-specific inhibitor of eIF4E-dependent cyclin D1 mRNA transport and growth. *The EMBO Journal*, 22(3), 689–703.
79. Topisirovic, I. *et al.* (2009). Molecular dissection of the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) export-competent RNP. *The EMBO Journal*, 28(8), 1087–1098.
80. Topisirovic, I., *et al.* (2005). Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Activity Is Modulated by HOXA9 at Multiple Levels. *Molecular and Cellular Biology*, 25(3), 1100–1112.
81. Toribio, R. *et al.* (2019) A novel eIF4E-interacting protein that forms non-canonical translation initiation complexes. *Nature Plants*, 5(12), 1283–1296.
82. Tsai, K.-L., *et al.* (2014). Subunit Architecture and Functional Modular Rearrangements of the Transcriptional Mediator Complex. *Cell*, 157(6), 1430–1444.
83. Villaescusa, J. C., *et al.* (2009). Cytoplasmic Prep1 Interacts with 4EHP Inhibiting Hoxb4 Translation. *PLoS ONE*, 4(4), e5213.
84. Volpon, L. *et al.* (2016). Importin 8 mediates m7G cap- sensitive nuclear import of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(19), 5263–5268.

85. Xiao, Z. et al. (1993) CSE1 and CSE2, two new genes required for accurate mitotic chromosome segregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 13(8), 4691–4702.
86. Zuberek, J. et al. (2003). Phosphorylation of eIF4E attenuates its interaction with mRNA 5' cap analogs by electrostatic repulsion: Intein-mediated protein ligation strategy to obtain phosphorylated protein. *RNA*, 9(1), 52–61.
87. Zuberek, J. et al. (2016) Diverse cap-binding properties of *Drosophila* eIF4E isoforms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Proteins and Proteomics*, 1864(10), 1292–1303.