

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CAMPUS IZTACALA

**Purificación de las proteínas recombinantes
correspondientes a los factores de iniciación de la
traducción eIF-4E y eIF-iso4E de maíz (*Zea mays L.*)**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
.BIOLOGO

PRESENTA :
JULIA AMANDA TORRES ACOSA

ASESORA:
Dra. Estela Sánchez de Jiménez



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.

¿Crees que en el pasado has perdido mucho tiempo, que has dejado de estudiar desde hace varios años, que has desaprovechado valiosas oportunidades y que has cometido errores garrafales? Pues bien, no eres ningún extraterrestre; a todos nos ha sucedido lo mismo, y hemos aprendido de ello. El pasado es valioso sólo como fuente de experiencias; pero no dejes que te ate con su grillete de lamentaciones, ni te escondas en él para huir de tu presente. El ayer es el ayer y nada lo va a modificar. Pero tu presente y futuro te pertenecen, porque la vida comienza cuando uno define lo que realmente quiere de ella.

Es cierto que el tiempo es eterno; pero para ti apenas esta comenzando porque:

“ Hoy es el primer día del resto de tu vida”.

Hoy por fin después de mucho tiempo he llegado al final de este trabajo. Que no es uno más, es el capítulo final de mi educación superior, es el resultado de muchos años de esfuerzo dedicación y aprendizajes.

Pero debo reconocer que durante todos estos años hubo una gran cantidad de personas que de una u otra forma influyeron directamente en la adquisición de este aprendizaje.

Una de las personas que se merecen una mención especial es la Dra. Twetanka Dimitrova Dinkova (Cesy), a quien le agradezco el haberme brindado la oportunidad de trabajar en un laboratorio de investigación, fue quien me dio las bases para el desarrollo de este proyecto y compartió conmigo mucho de su conocimiento. Pero además me brindo su amistad y apoyo.

A la Dra. Estela Sánchez de Jiménez jefa del laboratorio 103 del Departamento de Bioquímica del Edificio E de la Facultad de Química; debo agradecerle el haberme permitido ingresar a su laboratorio y formar parte de su equipo de trabajo, que me inculcó mucha disciplina y sus ganas de trabajar.

A la Facultad de Química en especial a la Coordinación de Superación Académica del SubPrograma 127 por el apoyo brindado para la realización de este trabajo experimental.

A todos mis compañeros del laboratorio 103, por brindarme su confianza, apoyo técnico , conocimientos pero sobretodo su amistad gracias : Raúl, Ricardo, Homero, Martín, Itzel, Jessica, Hilda, Ángel, Gustavo, Miriam, Andrea.

Recuerda siempre:

“Que tu vida no sea
como un barco de vela
que navega
a capricho del viento,
sino como una brújula
firme y segura
que no pierde el rumbo
a pesar
de las tempestades”.

Ezequiel Huerta R.

A Julia y Antonio mis padres quienes han hecho un gran esfuerzo para darme todo lo que necesite, por su apoyo tanto económico como emocional.

A Claus mi hermana que mas que mi hermana a sido mi amiga, que me ha estado siempre a mi lado siempre preocupándose por mi bien, dándome su apoyo y confianza.

A Lalo, Fer, Gabriela y Betty mis hermanos por su apoyo.

A Dafne, Uriel e Iván mis sobrinos que me han enseñado el valor de una sonrisa en momentos difíciles.

“Cuando la mente
de una persona
se estimula
con una nueva idea, jamás vuelve a tomar
su dimensión original”.

Oliver W: Holmes

Debo agradecer también a la UNAM y especialmente a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por haberme brindado la oportunidad de estudiar, de obtener nuevos aprendizajes y por haber conocido a muchas personas valiosas, entre ellos:

El profesor Gabriel Camarena y Gilberto González, que me ayudaron a darme cuenta de mis virtudes, y me dieron su amistad.

A el Dr. Ismael Ledezma Mateos por que me enseñó que siempre debemos querer saber más que el conocimiento es para siempre y además me transmitió ese amor por a la Biología y la intensidad que le ponía a cada una de sus clases.

Ana y Pris por su amistad, pero sobretodo por haber sido como mis hermanas por todos los momentos que compartimos, por sus palabras de aliento y por que a pesar de mis defectos me han aceptado y apoyado.

A los amigos y compañeros que compartieron conmigo momentos tristes y divertidos, a ellos que siempre estuvieron ahí con una frase de aliento, Gracias. Claudia, Elizabeth, Lian, Victor Chacon, Juan Carlos (Oso), Horacio (Choro), Ernesto (Güero), Emilio, Oscar, Roberto, Marcos, Alejandro, Adrian, Pablo y Chucho (Pollo), José Luis, Cesar y Antonio.

A los integrantes del extinto grupo 51, los primeros compañeros de carrera, pero con los que también compartí momento felices: Carlitos, Juan Carlos, Joselo, Said, Daniel, Sergio, Oliver, a Liliana que nos dio una muy buena lección.

A mis inseparables Joel y Luis Araoz, quienes aunque no parezca están ahí.

Finalmente a tres personas muy especiales, que estuvieron conmigo durante el desarrollo de este proyecto, ya que cada uno en su momento me apoyó y alentó para concluirlo;

A Xavier que a pesar de todas las circunstancias que nos han rodeado estas ahí siempre con tu apoyo incondicional y con tu aliento y por lo que pase siempre estarás ahí.

A Gabriel Miranda. Gracias por enseñarme a valorarme y quererme por sobre todas las cosas, por que me enseñaste que todo esta dentro de mi, que valgo por lo que soy y no por lo que aparento , por quererme y ayudarme y apoyarme.

A Guillermo; por ser mi amigo y estar ahí aunque lejos siempre presente.

CONTENIDO

ABREVIATURAS.....	10
RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN.....	13
ANTECEDENTES.....	17
Iniciación de la traducción.....	17
Los complejos eIF4F y eIFiso4F de maíz.....	22
Control traduccional durante la germinación de maíz.....	25
Tecnología del ADN recombinante y su uso.....	26
Obtención, aislamiento y caracterización de proteínas recombinantes.....	28
OBJETIVOS.....	30
Objetivo General.....	30
Objetivo Especifico.....	30
HIPÓTESIS.....	31
MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
Preparación del plásmido y transformación de las células	32
Inducción de la expresión de las proteínas recombinantes GST-4E y GST-iso4E.....	35
Purificación y corte con trombina de las proteínas recombinantes eIF4E y eIFiso4E.....	36
Cuantificación de proteínas (Bradford 1976).....	37
Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante SDS-PAGE (Laemmli, 1970).....	38

Tinción de azul de Coomassie.....	39
Western Blot.....	39
Sistema de Traducción <i>in vitro</i>	40
Aislamiento de ARN total a partir de tejidos ricos en polisacáridos.....	41
RESULTADOS.....	43
DISCUSIÓN.....	56
CONCLUSIONES.....	61
REFERENCIAS.....	62
ANEXO.....	68

ABREVIATURAS

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ARNr: ácido ribonucleico ribosomal

ARNt: ácido ribonucleico de transferencia

ADN: ácido desoxirribonucleico

ATP: Adenosin trifosfato

BMV: virus de bromo mosaico

Cap: ⁷mGpppG

eIF: factor de iniciación eucariótico

eIF4E: factor de iniciación eucariótico 4E

eIFiso4E: isoforma del factor de iniciación eucariótico 4E

GST: Glutation -S- Transferasa

GTP: Guanosin trifosfato

PABP: Proteína de unión a poli A.

PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida

Poli A: cadena poliadenilada

PVDF: difluorido polivinilideno

Sitio P: sitio fosfato

WGE: Extracto de Germen de Trigo

RRL: Lisado de Reticulocitos

RESUMEN

El control traduccional es uno de los pasos más importantes en los procesos involucrados en la regulación del crecimiento y la diferenciación de los organismos eucarióticos.

En la etapa de iniciación de la síntesis de proteínas, algunos mecanismos de regulación incluyen a la proteína de unión a Cap del ARNm; eIF4E. En plantas, este factor tiene dos isoformas, eIF4E y eIFiso4E; las cuales presentan diferencias en abundancia, y funcionabilidad, lo cual plantea nuevas preguntas en relación a su papel en la traducción. Específicamente en maíz, durante la germinación, se han observado patrones de expresión diferencial de estos factores. Esta abundancia relativa de las isoformas eIF4E durante la germinación pudiera estar relacionada con el reclutamiento selectivo de los ARNm para la traducción.

Debido a la dificultad que se ha encontrado para separar la subunidades y las isoformas que componen los complejos eIF4F y eIFiso4F, que contienen a los factores de iniciación eIF4E y eIFiso4E, el objetivo de este proyecto fue lograr la separación de las dos isoformas mediante el uso de la tecnología del ADN recombinante. Se logró inducir la expresión de las proteínas recombinantes GST-eIF4E y GST-eIFiso4E. Una vez inducidas también fueron identificadas y purificadas. Posteriormente se llevó a cabo el corte con trombina de las

proteínas recombinantes producidas correspondientes a eIF4E y eIFiso4E sin degradación significativa. Lograr este objetivo permitirá en un futuro, demostrar el papel que juegan las isoformas de proteína de unión a Cap en plantas dentro de la selección de ARNm y la regulación de la iniciación de la traducción.

INTRODUCCIÓN

El control de la expresión de los genes en eucariotes se da a dos niveles principalmente: transcripcional y traduccional. Se denomina control traduccional a los mecanismos que regulan la expresión genética a nivel de la traducción y tienen un papel muy importante en la regulación del crecimiento y la diferenciación de los organismos eucarióticos (Mathews *et al.*, 2000).

La síntesis de proteínas, se puede separar en tres etapas principales: la iniciación, la elongación y la terminación. En el proceso completo, sin embargo, podemos considerar 5 etapas, añadiendo una antes de la iniciación, que es la activación de los aminoácidos y una después de la terminación, que es la liberación del polipéptido y el procesamiento postraduccional. Las reacciones que se llevan a cabo en cada fase están reguladas por factores proteicos solubles que interactúan con el ribosoma, el ARNm y/o con los aminoacil-ARNt. Durante la iniciación, muchos ARNm son reclutados por el ribosoma mediante el reconocimiento de la estructura cap ($^7\text{mGpppG}$) en el extremo 5' por un grupo de proteínas referidas como el complejo de unión a cap o eIF4F (Raught *et al.*, 2000).

En plantas superiores, el complejo eIF4F consta de dos subunidades; una de 26 kDa (eIF4E) y una de aproximadamente 220 kDa (eIF4G) (Lax *et al.*; 1985, 1986) En

estos organismos se presenta además un segundo y distinto complejo de unión a Cap llamado eIFiso4F que contiene una subunidad de unión a cap de 28 kDa (eIFiso4E) y una subunidad de 86 kDa (eIFiso4G) (Browning *et al.*, 1992).

La purificación de los complejos eIF4F y eIFiso4F ha sido difícil ya que se han reportado problemas de degradación, fundamentalmente para las subunidades eIF4G y eIFiso4G, aún aplicando numerosos inhibidores de proteasas (Browning *et al.*, 1992). Además, la separación de las dos isoformas de la subunidad pequeña, eIF4E y eIFiso4E, se dificulta por su similitud en masa molecular y punto isoeléctrico (Manjunath *et al.*, 1999), así como por la baja concentración celular de estos factores en las células (Dinkova y Sánchez de Jiménez, 1999).

La subunidad eIF4E presenta dos características que la han hecho un punto importante en la regulación del inicio de la traducción: 1) su concentración es relativamente limitante para las células y 2) hay una correlación positiva entre su nivel de expresión y los índices de traducción *in vitro* (Sonenberg *et al.*, 1996).

En plantas, la presencia de dos isoformas para eIF4E plantea nuevas preguntas en relación a su papel en la traducción. Durante la germinación, en maíz; se han observado patrones de expresión diferencial de estos factores. La isoforma eIFiso4E tiene niveles más altos con respecto a eIF4E en

tejidos quiescentes y es regulado por un mecanismo de regulación traduccional específico durante la germinación (Dinkova y Sánchez de Jiménez, 1999). Esta abundancia relativa de las isoformas eIF4E durante la germinación pudiera estar relacionada con el reclutamiento selectivo de los ARNm para la traducción.

El control traduccional durante la expresión genética es uno de los pasos más importantes en la regulación del crecimiento y diferenciación de organismos eucarióticos (Mathews et al., 2000)

En plantas las condiciones de estrés abiótico, pueden resultar en la represión global de la iniciación traduccional, así como de la traducción selectiva de ARNm codificables para proteínas en condiciones estresantes.

Los mecanismos que regulan el control traduccional son muy diversos y complejos y frecuentemente están relacionados con la fase de iniciación.

El primer punto de selección en un ARNm eucariótico para la traducción es la unión a la estructura cap en el extremo 5' por el factor eIF4E el cual es un factor limitante en células implicadas en la discriminación de ARNm. Sin embargo, múltiples reportes han mostrado la dificultad de obtención de dicho factor nativo, debido a su alta susceptibilidad a ser degradado, aun en presencia de inhibidores de proteasas.

Debido a la importancia de este factor en el desarrollo y crecimiento de los organismos eucarióticos y a la dificultad que se ha encontrado para separar las subunidades y las isoformas que componen los complejos eIF4F y eIFiso4F, es importante buscar alternativas para obtener en alto grado de pureza las isoformas eIF4E y eIFiso4E de maíz en *E.coli*.

La tecnología del ADN recombinante ofrece una buena posibilidad para lograr este objetivo, además de tener los elementos disponibles para lograrlo, estos factores son de bajo peso molecular lo que hace suponer que se puede lograr obtenerlos con la estructura tridimensional adecuada para su funcionamiento. De esta manera se esperaría poder demostrar la participación de estas isoformas de la proteína de unión a Cap de plantas, en la selección de ARNms y su papel en la regulación de la iniciación traduccional.

ANTECEDENTES

Iniciación de la traducción

Varios mecanismos importantes de control traduccional ocurren dentro de la etapa de iniciación en eucariontes. Esta etapa es regulada por proteínas citosólicas, denominadas factores de iniciación eucarióticos (eIF), que participan en dos procesos separados pero concurrentes, uno localizado en el extremo 5' del ARNm y otro en la subunidad menor del ribosoma (40S).

En eucariontes, se han identificado más de nueve factores de iniciación (eIFs), algunos de los cuales están compuestos por varias cadenas polipeptídicas. Esto sugiere que la interacción proteína- proteína juega un papel muy importante en el inicio de la traducción (Browning *et al.*, 1996; Pain *et al.*, 1996).

En eucariontes, la traducción de un ARNm comienza por lo general con el triplete AUG que se encuentra más próximo al 5' Cap en zona consenso. Para formar el complejo de iniciación se requieren los factores de iniciación (eIFs), las subunidades ribosomales, el ARNt iniciador cargado con metionina, el ARNm que será traducido, y la energía suministrada por el GTP y ATP. Los eventos que ocurren dentro de la iniciación de la traducción están representados en la Figura 1 (Gringras *et al.*, 1999), e incluyen:

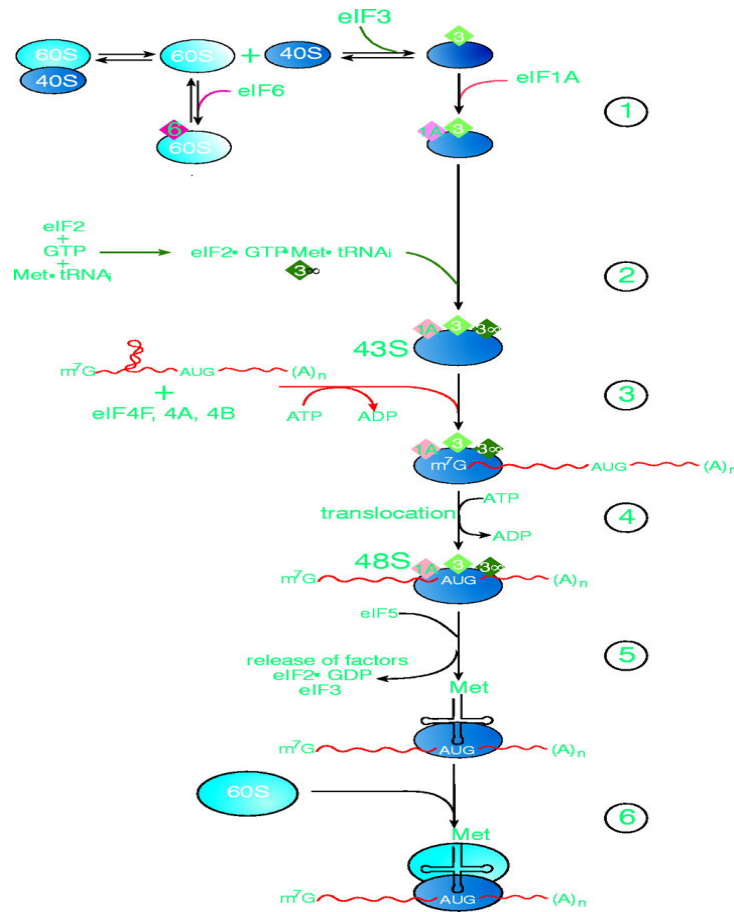


Fig. 1 Mecanismos de Iniciación de la Traducción(Adaptado de Merrick y Hershey, 1996) 1) La disociación del ribosoma en subunidades 40S y 60S, 2) La unión del Met-ARNt inicial a la unidad 40S, formando un complejo de preiniciación 43S, 3) La unión del ARNm al complejo de preiniciación 43S para formar un complejo de iniciación 48S, 4) El escaneo del ARNm para localizar el primer codón AUG en el ARNm que señala el principio del marco de lectura, 5) El apareamiento del anticodón del Met-ARNt iniciador con el codón AUG en el ARNm que señala el principio de la cadena polipeptídica. 6) La unión del complejo de iniciación 48S a la subunidad 60S para finalmente formar el complejo de iniciación 80S con Met-ARNt en el sitio P.

Cabe destacar que en muchos casos el paso limitante en el proceso de la traducción es precisamente la fase de iniciación, razón por la cual es de gran importancia su regulación.

Entre las características estructurales de la mayoría de los ARNm de plantas se destaca que se trata de ARNm monocistrónicos, es decir que codifican para una sola proteína y que contienen regiones no traducibles (UTRs) en los extremos 5' y 3', además de la región codificante. En el extremo 5' contienen una estructura Cap que consiste en un GTP metilado en la posición 7 unido al transcrito por un enlace trifosfato y en el extremo 3' se encuentra una región poliadenilada de longitud variable (poli-A) (Gringras, *et al.*, 1999; Fig. 2). La estructura del Cap y la cola de poli-A actúan como reguladores de la eficiencia de la traducción de manera sinérgica. Estos elementos, junto con las proteínas que se asocian a las regiones 5' y 3' UTR se encuentran en contacto durante la iniciación de la traducción (Gallie *et al.*, 1996). También se ha observado que la cola de poli-A es capaz de estimular la traducción, aún en ausencia de una estructura Cap (Sachs *et al.*, 1997)

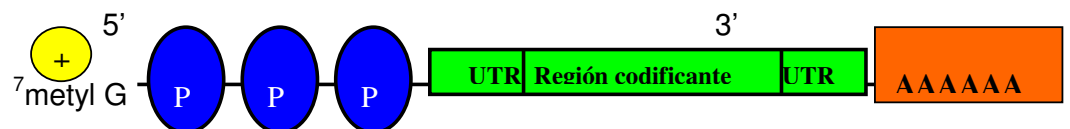
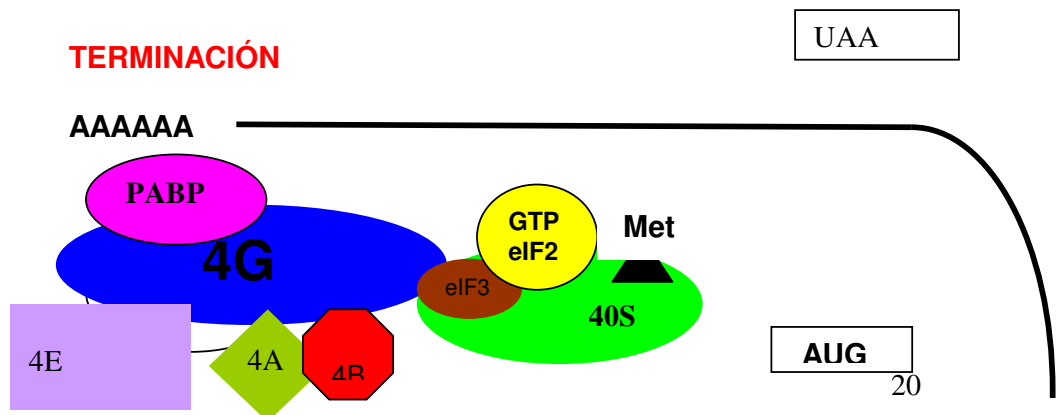


Fig.2 Estructura de un ARNm eucariótico: contiene regiones no traducibles (UTRs) en los extremos 5' y 3', la región codificante, en el extremo 5' contienen una estructura Cap que consiste en un GTP metilado en la posición 7 unido al transcrito por un enlace trifosfato y en el extremo 3' se encuentra una región poliadenilada de longitud variable (poli-A)

En la formación del complejo de preiniciación 43S destaca la participación de dos factores de iniciación. El factor eIF2, el cual se une a GTP o GDP y en presencia de GTP se asocia con el Met-ARNt inicial y el factor eIF3 que se une a la subunidad 40S del ribosoma. Por otra parte se forma un complejo multimérico estable que en trigo (*H. vulgaris*) se encuentra conformado por 10 subunidades proteicas que se asocian con la subunidad ribosomal 40S y estimulan su unión al complejo eIF2-GTP-ARNt (Browning *et al.*, 1996; Figura 3).



INICIACION

Fig. 3 Modelo del mecanismo de unión de la subunidad 40S al ARNm. El factor eIF2, el cual se une a GTP o GDP y en presencia de GTP se asocia con el Met-ARNt inicial y el factor eIF3 que se une a la subunidad 40S del ribosoma. En la unión del complejo 43S con el ARNm y el escaneo para localizar el codón de iniciación están involucrados principalmente el complejo eIF4F conformado por tres polipéptidos; una subunidad pequeña, conocida también como proteína de unión a Cap (eIF4E), una subunidad grande (eIF4G) que contiene sitios de unión para eIF4E, eIF4A, eIF3 y PABP (proteínas de unión a la cola de poli-A) , la subunidad 40S, que se encuentra formando un complejo con eIF2, GTP y el Met-ARNm iniciador, se une a la región no traducible 5' del ARNm para escanearla.

En la unión del complejo 43S con el ARNm y el escaneo para localizar el codón de iniciación están involucrados principalmente el complejo eIF4F conformado por tres polipéptidos; una subunidad pequeña, conocida también como proteína de unión a Cap (eIF4E), una subunidad grande (eIF4G) que contiene sitios de unión para eIF4E, eIF4A, eIF3 y PABP (proteínas de unión a la cola de poli-A) , siendo eIF4A otro factor de iniciación que actúa como una ATPasa dependiente de ARN y una helicasa dependiente de ATP, que elimina las estructuras secundarias en la región 5' no traducida

del transcrito. Después de la remoción de estas estructuras, la subunidad 40S, que se encuentra formando un complejo con eIF2, GTP y el Met-ARNm iniciador, se une a la región no traducible 5' del ARNm para escanearla. En este proceso, la unión de eIF4G es un paso crítico para la asociación entre el ARNm y la subunidad ribosomal 40S. La proteína de unión al Cap (eIF4E) se une a la región amino-terminal de eIF4G, mientras que la parte central de este factor se asocia con el complejo multimérico eIF3. De esta manera eIF4G forma un puente entre la estructura cap del ARN y la subunidad 40S. El factor 4G no afecta la afinidad de 4E por el Cap, sino que es un punto limitante en la formación del complejo de iniciación que involucra interacciones proteína-proteína evitando que el ARNm se libere. La subunidad 60S se une a la 40S con el ARNm y el Met.-ARNt de iniciación en la posición P de la subunidad ribosomal. La reacción requiere del factor eIF5 que estimula la hidrólisis de la molécula de GTP unida a eIF2 (Gallie, 1996).

Los complejos eIF4F y eIFiso4F de maíz

Una de las grandes diferencias entre el proceso de traducción en plantas y otros eucariontes radica en la estructura y función de eIF4F. En maíz se han aislado dos isoformas del factor de iniciación eIF4F. El complejo eIF4F que consta de dos subunidades una proteína pequeña de unión a cap de 26 kDa

(eIF4E) y una grande de 220 kDa (eIF4G). Alternativamente el complejo eIFiso4F, es una isoforma que está conformada por una subunidad pequeña de unión a cap de 28 kDa, eIFiso4E y una grande de 86 kDa, eIFiso4G (Browning, 1996). A diferencia del complejo eIF4F de mamíferos, los polipéptidos que forman estos complejos en maíz no se pueden separar más que en condiciones desnaturalizantes (Sha *et al.*, 1995).

Se han logrado aislar a partir de extractos crudos de maíz dos isoformas del factor eIF4E, cuyos pesos moleculares oscilan en 32 kDa para eIFiso4E y 30 kDa para eIF4E (Dinkova y Sánchez de Jiménez, 1999)

El reconocimiento de Cap en la iniciación por el eIF4E es esencial para la traducción de ARNms cap-dependientes. Además se ha comprobado que la disminución de eIF4E de extractos celulares, reduce drásticamente la traducción de ARNm, actividad que se restaura por adicción de eIF4E nativa purificada o de su forma recombinante expresada bacterianamente (Gringras, *et al.*, 1999).

Por otro lado, se ha encontrado que el complejo eIF4F de maíz, restaura la actividad traduccional más eficientemente en WGE (Wheat Germ Extract) depletado que en RRL(Lisado de Reticulocitos de Conejo) a los que se les han eliminado sus factores 4F endógenos, (90 vs 70%) (Dinkova y Sánchez de Jiménez, 1999).

Se ha demostrado que eIFiso4F tiene la misma función que

eIF4F. Mediante la sustitución de la isoforma en un sistema de traducción *in vitro* deficiente en eIF4F se observó que eIFiso4F sostiene la unión de la subunidad 40S al ARNm, además de presentar actividad de ATPasa dependiente de ARN y de helicasa dependiente de ATP en presencia de eIF4A (Browning *et al.*, 1996).

Los anticuerpos de germen de trigo contra eIF4F no reaccionan con eIFiso4F de germen de trigo, ni viceversa, lo que indica que las subunidades no son producto una de la otra (Browning *et al.*; 1996). En estudios hechos en ejes embrionarios de maíz se usaron anticuerpos policlonales contra eIF4F de germen de trigo y se observó que reaccionan con las proteínas correspondientes de maíz (Dinkova y Sánchez de Jiménez, 1999). Esto indica una gran conservación de estas proteínas a través de la evolución.

La cantidad de eIFiso4F en germen de trigo es de 3 a 5 veces mayor que la cantidad de eIF4F (Browning *et al.*, 1996), mientras que en maíz se han demostrado diferencias en los niveles de expresión de ambas isoformas durante la germinación del maíz. Se observó que el nivel de eIF4E se incrementa después de las primeras 12 horas de germinación, en tanto que la isoforma eIFiso4E se mantiene constante durante todo el proceso; y para el final de la germinación, los niveles de ambas son altos y comparables entre sí (Dinkova y Sánchez de Jiménez, 1999).

Otras diferencias que se han detectado entre ambas isoformas son su afinidad por ⁷mGTP, su preferencia por estructuras secundarias o lineares en el ARNm, además de las diferencias en su abundancia ya mencionadas (Carberry y Goss, 1991; Sha *et al*, 1995) .

Control traduccional durante la germinación del maíz

Existen antecedentes que indican que la expresión de las dos isoformas del factor eIF4F en plantas pudiera estar relacionado con un mecanismo de selección del tipo de ARNm que va a ser traducido en dependencia de la afinidad de los mensajeros presentes por las isoformas de eIF4E y eIF4G, y de la abundancia relativa de estas isoformas (Carberry y Goss, 1991). Sin embargo, los estudios realizados hasta este momento incluyen solamente ensayos de traducción *in vitro* de ARNms sintéticos utilizando las isoformas de los complejos eIF4F y eIFiso4F (Gallie y Browning, 2001).

Para esclarecer la importancia biológica de la presencia de diferentes isoformas para estos factores de traducción se requiere el análisis de la actividad de cada isoforma para ARNm celulares específicos.

Los patrones de expresión de eIFiso4E y eIF4E son de relevancia en la germinación, pues ya se ha demostrado que los ARNm almacenados contienen subpoblaciones de mensajes Cap-dependientes y Cap-independientes (Sánchez

de Jiménez *et al.*, 1997)

Se han descrito dos etapas durante la germinación de semillas: una etapa temprana en la que tiene lugar la reiniciación de la actividad metabólica y el inicio de la elongación de la radícula que está apoyada prioritariamente por la traducción de mensajes almacenados, la cual en maíz abarca de las primeras seis a doce horas después de iniciada la imbibición, y una segunda etapa cuando se presenta la protusión de la radícula y que comprende un período de crecimiento que requiere la síntesis de nuevos ARNm. Varios antecedentes sugieren que existen mecanismos selectivos en las células que modulan la traducción de los mensajeros almacenados (Sánchez de Jiménez y Aguilar, 1984; Bewley y Black, 1994). Se ha demostrado que en embriones de trigo y en algunas otras especies se observan cambios cualitativos en el grupo de ARNm dentro de pocas horas de iniciada la germinación. Además, algunos de los mensajeros almacenados en los embriones son traducidos en etapas tardías de la germinación (Kermone, 1990).

Tecnología de ADN recombinante y su uso

Lo que se ha denominado tecnología del ADN recombinante o ingeniería genética, se refiere a la unión artificial de moléculas de ADN o de partes de estas moléculas que no se encuentran juntas en la naturaleza. Este tipo de tecnología se está utilizando actualmente para producir peptidos activos de

aplicación médica, e incluso algunos alimentos actualmente ya presentes en los supermercados.

La tecnología del ADN recombinante comenzó con el descubrimiento de las endonucleasas de restricción, enzimas capaces de cortar el ADN en secuencias específicas. Los cortes generados por las enzimas de restricción permiten la unión de distintas moléculas de ADN mediante otras enzimas las denominadas ADN ligasas. Por otro lado, se encontró que moléculas relativamente pequeñas de ADN eran capaces de introducirse en una célula mediante el proceso denominado transformación. Este tipo de moléculas que incluye a los plásmidos, fagos, cósmidos y también a los cromosomas artificiales de levadura, son denominados genéricamente vectores de clonación. Estas moléculas de ADN permiten contener dentro de sí fragmentos de ADN de diferentes organismos y tamaños, conocidos como insertos. Una vez unido el inserto con el vector, la unidad de clonación se transfiere al interior de una célula, dentro de la cual la molécula de ADN recombinante se replica, obteniéndose decenas de copias idénticas conocidas como clones. Al replicarse las células hospederas, las células descendientes heredan el material genético recombinante, que puede experimentalmente ser recuperado, purificarse y analizarse (Lehninger *et al.*, 1993 y Lewin 2003). El ADN clonado puede transcribirse y traducirse *in vitro*, lo que permite estudiar el ARN y/o la proteína

correspondientes, y por lo tanto la función para la cual codifica dentro del organismo. Las proteínas recombinantes son aquellas que se fabrican a partir de ARNs procedentes de dos fuentes distintas mediante ingeniería genética, y a través de métodos de reproducción no habitual.

Dentro de las aplicaciones de la tecnología de ADN recombinante podemos destacar las siguientes: diagnóstico prenatal de enfermedades genéticas, diagnóstico de enfermedades genéticas en niños y adultos, susceptibilidad a sufrir un tipo determinado de cáncer familiar, terapia génica, biotecnología, entre otras.

Obtención, aislamiento y caracterización de proteínas recombinantes

El primer paso en la técnica del ADN recombinante consiste en aislar el ARN mensajero que codifica para una proteína concreta y obtener su correspondiente ADN complementario (ADNc). Este ADNc es amplificado por PCR y se inserta en un vector génico el cual replicado en una célula hospedera, sirve de vehículo de expresión para la producción de una molécula recombinante (Lehninger *et al.*, 1993). Una vez transformadas con el vector las células del hospedero (en general la bacteria *Escherichia coli*), el cultivo se hace crecer hasta que alcanza los niveles de producción adecuados de la proteína

recombinante. En ocasiones, para facilitar las distintas etapas del proceso, la inducción y el posterior aislamiento, es conveniente expresar la proteína de interés enlazada a otra cadena polipeptídica, que puede ser la de una proteína completa o bien un fragmento peptídico. En este caso, se produce una proteína de fusión. Posteriormente, la proteína así expresada debe ser purificada hasta homogeneidad del péptido de fusión, haciendo uso de sus propiedades físico-químicas, peso molecular, solubilidad, carga, etc.

Para que la proteína recombinante sustituya eficazmente a la proteína obtenida de la fuente biológica natural, es esencial comprobar que sus propiedades moleculares son equivalentes. Por ese motivo, la caracterización estructural y funcional de la proteína recombinante es una etapa crítica a la hora de valorar el sistema de expresión utilizado. La expresión recombinante de ADN proporciona un sistema de producción prácticamente ilimitada de proteínas altamente homogéneas, cuya presencia en la naturaleza sea escasa o, en todo caso, su aislamiento de la fuente original, implique dificultades. Además se pueden preparar, por mutagénesis dirigida, derivados de esas moléculas que posean propiedades específicas de estabilidad o actividad biológica modificadas (Watson *et al.*, 1992)

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Establecer las condiciones óptimas para la inducción en *E. coli* de proteínas de fusión recombinantes de los factores de iniciación traduccional eIF4E y eIFiso4E de maíz (*Zea mays L.*), lograr su identificación y purificar las proteínas recombinantes correspondientes.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Inducir la expresión en *E. coli* de las proteínas de fusión recombinantes GST-eIF4E y GST-eIFiso4E de maíz cuyas secuencias fueron clonadas en el vector de expresión pGEXT4
- Purificar las proteínas de fusión recombinantes GST-eIF4E y GST-eIFiso4E de las proteínas bacterianas contaminantes.
- Separar la proteína GST de las proteínas eIF4E y eIFiso4E
- Identificar mediante anticuerpos las proteínas eIF4E y eIFiso4E puras

HIPOTESIS

Si el proceso de inducción de las proteínas recombinantes eIF4E y eIFiso4E de maíz en *E. coli* es el adecuado se lograrán establecer las condiciones óptimas de purificación. Por tanto se podrán obtener estos factores de iniciación puros, con la estructura tridimensional adecuada, sin degradación significativa y en cantidades suficientes para probar su actividad, en sistemas de traducción *in vitro*.

MATERIAL Y METODOS

La transformación de las células de *E.coli* fue realizada en un trabajo anterior en el laboratorio 103 del Edificio E de la Facultad de Química por Jonathan Max Berny Arellano y la Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova usando un plásmido pGEX recombinante, el cual está estructurado de la siguiente manera:

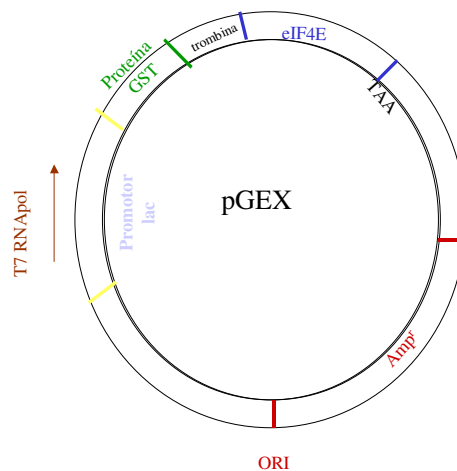


Figura 4 Estructura del plásmido: presenta un sitio de inicio de replicación (ORI), sitio de resistencia a ampicilina, un sitio de corte para proteasa trombina, un promotor lac inducible, la proteína de interés (eIF4E) y la proteína GST

El método usado para la propagación y amplificación del inserto se basó en lo siguiente:

- A) Preparación de las células competentes y transformación bacteriana (Bloom et, al., 1995), al cual

se le hicieron algunos ajustes para una alta eficiencia de transformación.

- B) Transformación Bacteriana (Maniatis, 1982)
- C) Aislamiento de plásmidos por Minipreparación y aislamiento de plásmidos a gran escala con alta pureza por Melton Prep (Maniatis, 1982)
- D) Separación de ácidos nucleicos (ADN) por electroforesis en gel de agarosa al 1 % (Maniatis, 1982)
- E) Purificación del inserto (Maniatis, 1982)

Las proteínas de fusión más utilizadas son la Glutation-S-transferasa (GST) y tag de Histidina (GIBCOBRL). En este trabajo se usó la GST (Gene Fusión System) es un sistema integrado para la expresión, purificación y detección de proteínas de fusión producidas en *E. coli*. El sistema consiste de tres componentes: plásmido pGEXT4, módulos de purificación GST y el módulo de detección GST. Las proteínas de fusión son purificadas desde lisados bacterianos de células transformadas por cromatografía de afinidad usando Glutation Sefarosa 4B contenida en el módulo de purificación de GST. Las proteínas de fusión pueden ser detectadas por medio de ensayos colorimétricos, o inmunoensayos. El sistema tiene muchas aplicaciones, tales como: inmunología molecular, la

producción de vacunas, estudios de interacciones proteína-proteína e interacciones DNA-proteína.

Los vectores pGEX poseen:

- ❖ Un promotor tac inducible químicamente y con nivel de expresión alto
- ❖ Un gen interno lac I^a para usar solo como huésped a *E.coli*
- ❖ Las condiciones de elusión óptimas para las proteínas de fusión desde una matriz de afinidad minimizando efectos sobre antigenicidad y actividad funcional.
- ❖ sitios de reconocimiento de proteasa Trombina o factor Xa para separar la proteína de los productos de fusión.

La expresión de la proteína desde un plásmido pGEX es bajo el control del promotor tac, el cual es inducido usando el isopropil β -D. - Tiogalactósido análogo a la lactosa (Fig.4). Los cultivos se mantienen a 28°C para la expresión de las proteínas de fusión por varias horas. Después de la inducción, las células son lisadas por sonicación. Los lisados bacterianos son limpiados de residuos celulares por centrifugación. Posteriormente el lisado limpio es aplicado a la resina Glutation Sefarosa 4B, la cual se encarga de separar la proteína de fusión de las proteínas bacterianas restantes; después las proteínas de fusión son colocadas en una matriz ⁷mGTP Sefarosa, ésta es lavada con buffer y removidas todas

las proteínas no específicas que estuvieran unidas (Watson, *et al.*, 1992)

Inducción de la expresión de las proteínas recombinantes GST- eIF4E y GST- eIFiso4E

Las bacterias transformadas con el vector mencionado con resistencia a ampicilina y conteniendo la proteína de fusión GST, se plaquearon en medio LB sólido (peptona de caseína purificada 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, agar 15 g/l) con ampicilina a una concentración de 100 µg/ml, y se incubaron a 37°C, 12 h. Se inoculó una colonia en medio LB líquido (peptona de caseína purificada 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l) con ampicilina a una concentración de 100 µg/ml incubando a 28°C toda la noche. Al día siguiente, fueron inoculados 160 µl de este cultivo, en 125 ml de medio LB líquido con ampicilina a una concentración de 50 µg/ml; incubando 5 h a 28°C hasta obtener una absorbancia a 600 nm de 0.5 a 0.6. Para Inducir la expresión de las proteínas recombinantes en el cultivo, se agregaron 0.25 mM de IPTG (isopropil β-D tiogalactósido) y se incubó por 3 h más a 28°C. Finalmente el cultivo bacteriano se centrifugó durante 10 min. a 3600 rpm

Purificación y corte con trombina de las proteínas recombinantes eIF4E y eIFiso4E

Para eliminar el medio LB residual se lavaron las células en buffer PBS 1x (HEPES 20 mM, EDTA 0.1 M, DTT 1mM, glicerol

20% y una tableta cocktail de inhibidores de proteasas [complete™ B]. Recuperando el paquete celular mediante centrifugación 10 min. a 3600 rpm. y resuspendiéndolo en 8 ml de PBS 1x. Alicuotando la suspensión celular en tubos eppendorf por 1 ml. Sonicando la suspensión celular de cada tubo con un sonicador de punta (Fisher Scientific 0550 Sonic Dismembrator), 1 vez por 20 seg. A cada tubo se le agregó triton X-100 a una concentración final de 1% y se incubó en agitación suave durante 30 min. a 4°C. Esta suspensión se centrifugó por 10 min. a 3600 rpm. Dado que la proteína recombinante tenía una región de GST es necesario hidrolizar esta fracción para obtener la proteína deseada. El sobrenadante se recuperó y se le agregaron 125 µl de Glutation Sefarosa 4B al 50% (resina que reconoce y pega a la proteína GST) incubando a temperatura ambiente 1 h con agitación suave. La resina se lavó con PBS 1X 3 veces y se centrifugó 3 min. a 3600 rpm para eliminar las fracciones proteicas que no se pegaron a la resina, se le agregaron al sobrenadante 50 µl de trombina por 950 µl de PBS 1x con la finalidad de cortar la proteína de fusión (GST) y se incubó esta suspensión 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave. Centrifugando la suspensión celular a 500 g por 5 min., obteniendo en el eluato la proteína de interés. El eluato se concentró con Centricom 30 (Amicon Centricon™ 30 microconcentrator) para eliminar las proteínas residuales y

obtener la proteína pura, la cual se concentra con centricom 10 (Amicon Centricon™ 10 microconcentrator). Se lava en “batch” la Glutation Sefarosa (5 veces con PBS 1x y 3 veces con Tris HCl 50 mM. La proteína de fusión se eluyó con 200 μ l de Glutation reducido en Tris-HCl 50 mM con agitación suave durante toda la noche y se obtuvo la GST (proteína con la que estaba fusionada la proteína de interés) y la proteína de interés.

Cuantificación de proteínas (Bradford 1976)

El ensayo de cuantificación de proteínas está basado en el cambio de color del colorante Coomassie brilliant blue G-250 en respuesta a diferentes concentraciones de proteína. El colorante se une primariamente a residuos de aminoácidos básicos (especialmente arginina) y a residuos aromáticos. El ensayo es de gran utilidad para cuantificar proteínas y polipéptidos con masas moleculares mayores de 3000 a 5000, dependiendo de los grupos cargados. Las lecturas de la reacción colorimétrica se llevan a cabo a 595 nm.

A partir de los sobrenadantes obtenidos de cada muestra se tomó una alícuota de 5 μ l que se hizo reaccionar con el reactivo de Bradford, la lectura de absorbancia fue extrapolada a una curva patrón, para poder así, obtener los μ g/ μ l de proteína total en cada muestra.

Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

El análisis de proteínas en geles de poliacrilamida es una técnica que permite observar proteínas presentes en un extracto celular como bandas separadas en un soporte sólido de acuerdo a sus pesos moleculares. Este método se basa en la propiedad de las proteínas de poseer una carga y masa que les permite desplazarse por medio de una corriente eléctrica. Con base en una comparación de las bandas de proteína con marcadores de peso molecular conocido se puede determinar el tamaño aproximado de las proteínas de interés.

Para determinar los cambios en el proceso de purificación de las proteínas eIF4E y eIFiso4E, se utilizaron 20 µg de proteína total de hidrolizado celular determinada por el método de Bradford. Se realizaron electroforesis en geles de SDS-PAGE usando geles al 12 % de poliacrilamida; aplicando una corriente de 15 mA. Los geles se tiñeron en azul de Coomasie.

Tinción con Azul de Coomasie

Una vez corrido el gel se coloca en un recipiente con solución de tinción, si la solución es fresca por 2 h pero si es de varios días toda la noche. Pasado este tiempo, se elimina la solución de tinción se agrega solución de destinción hasta eliminar todo el exceso de Coomasie y se puedan observar las bandas perfectamente teñidas. El gel se coloca sobre papel filtro y se

seca por 90 min.

Western Blot

Las muestras de proteína en el gel separadas por electroforesis se transfirieron en membranas de PVDF aplicando una corriente de 1.5 mA/cm^2 usando un sistema de transferencia semi-seco (Mansfield, 1994). Para bloquear la membrana se utilizó leche descremada Svelty^{MR} al 5 % en TBS (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, NaCl 0.15 M, 0.1 % Tween). Para la detección de las proteínas de fusión se utilizó el anticuerpo contra GST (Amersham Corp.) a una dilución de 1:1000.

También se utilizaron anticuerpos contra los factores eIF4E y eIFiso4E de trigo amablemente donados por K.S. Browning (Universidad de Texas, Austin), los cuales se usaron a una dilución de 1:1000. Para el revelado se usó un segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa (Sigma), diluido a 1:3000. La reacción fue visualizada por fluorescencia (Sistema ECL, Amersham).

Sistema de Traducción *in vitro*

Para realizar los ensayos de traducción *in vitro*, se usó un Kit de Traducción *in vitro*; WGE (Extracto de Germen de Trigo) (Promega) El primer paso consistió en eliminar los factores de inducción endógenos del extracto de germen de trigo, lo cual se hizo con la resina ⁷mGTP Sefarosa, la cual se agregó en

una relación 3/1 con respecto al (WGE). Con agitación suave a 4 °C por 1 h.; posteriormente se centrifugó a 1000 rpm por 1 min. y se recuperó el sobrenadante obteniendo así, el extracto de germen de trigo sin sus factores de inducción endógenos. La mezcla de traducción se preparó utilizando los componentes recomendados por el proveedor (Promega). El ensayo se montó de la usando como ARN del virus de Bromo mosaico (BMV) y un ARN extraído de ejes secos de maíz, y el Extracto de Germen de Trigo (WGE) proporcionado por el proveedor (PROMEGA), el cual se uso tanto completo (WGE+) como depletado de sus factores de inducción endógenos (WGE-). El índice de traducción *in vitro* se detectó por incorporación de [³⁵S] a las proteínas que se precipitan con TCA midiendo la radiactividad con líquido de centelleo PPO-Tolueno. La diferencia de cuentas (cpm) en el T₀ (inicio de la reacción) y T₁ (60 min.) incubada a 25 °C es la medida como efectividad de la traducción.

Aislamiento de ARN total a partir de tejidos ricos en polisacáridos (Cheng and Seeman , 1998)

Se molieron con N₂ líquido 0.4 g de tejido, se transfirieron a un tubo de 10 ml (Corex), añadiendo 4.5 ml de buffer de extracción y agitando. Se centrifugó a 23000 g, ó 15000 rpm. por 20 min. a 4°C. El sobrenadante (SN)se transferió a tubo de 30 ml (Corex con tapa) utilizando una pipeta pasteur),

añadiendo 0.4 ml de NaAc 2 M y agitando. Se añadieron 4 ml de fenol ácido, se agitó y se agregaron 0.8 ml de cloroformo/isoamil alcohol se agitó, y se incubo en hielo, 20 min. Posteriormente se centrifugó a 23000 g ó 15000 rpm , 20 min. a 4°C JA-20. Se transfirió a tubos de ultracentrifuga 30 ml , añadiendo un volumen igual de KAc 2 M agitando e incubando en hielo, mínimo 30 min. Se centrífugo a 44000 g, 20 min. A 4°C ó 26000 rpm 60Ti. Se transfirió el sobrenadante a tubo de 10 ml (Corex), añadiendo un volumen igual de isopropanol helado se agitó y se incubó a –20 °C, por 45 min. Se centrífugo a 2700 g o 8000 rpm, 20 min. a 4 °C. El precipitado , se lavó 1x con 1 ml de EtOH 70 % helado. Se resuspendió en 400 µl H₂O-DEPEC y se transfirió a un tubo eppendorff de 1.5 ml, añadiendo 100 µl LiCl 10 e incubando a 4°C al menos 2 h. Se centrífugo a 12000 g ó 14000 rpm, en microcentrifuga, 20 min. a 4°C. El precipitado se lavó 2x con 1 ml de EtOH absoluto helado y se resuspendió en 200 µl de TEN, se añadieron 500 µl de EtOH absoluto helado y se incubó a –20°C, mínimo 15 min. Se centrífugo a 12000 g ó 14000 rpm 20 min. 4 °C. El precipitado, se lavó 2x con 1 ml EtOH 70 % helado, se resuspendió en 50-100 µl de TE. Se midieron las absorbancias a 230, 260 y 280 nm, y se observó la integridad en electroforesis de Agarosa

❖ Absorbancia 260/230 > 2.0

❖ Absorbancia 260/280 > 1.5

$$\mu\text{g/ml de ARN} = \text{Abs}_{260\text{nm}} \times 40 \times \text{dilución}$$

RESULTADOS

El primer objetivo propuesto consistió en inducir la expresión de las proteínas recombinantes GST- eIF4E y GST- eIFiso4E de maíz , en bacterias *E.coli* transformadas.

Las células se transformaron de acuerdo a la metodología indicada. Después de lavadas las células fueron sonicadas y centrifugadas la proteína soluble fue analizada por electroforesis y teñida por azul de Coomasie. Acorde a los patrones de electroforesis que se muestran en la (Fig.5A), se observa el incremento en una banda de aproximadamente 48 kDa que corresponde a eIF-4E unida a la GST, y en el siguiente carril una banda de 52 kDa correspondiente a eIF-iso4E unida a GST. Estas masas moleculares no corresponden a las referidas para el factor de iniciación eIF4E y eIFiso4E, pero debemos considerar que estamos obteniendo la proteína recombinante como una proteína de fusión usando a GST. Esta proteína tiene una masa aproximada de 25 kDa. El incremento indicado no se observa en células no inducidas con IPTG (Fig.5Ay 5B)

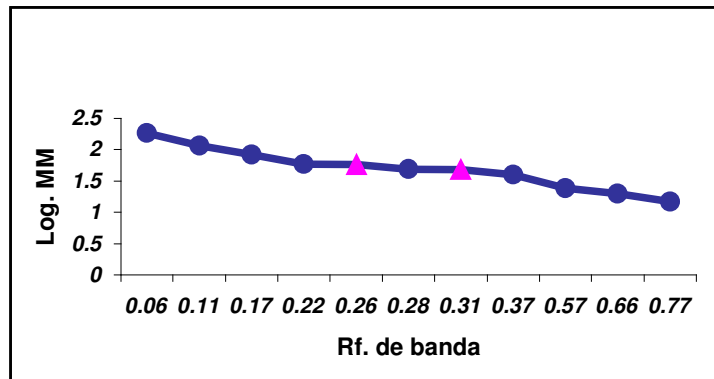
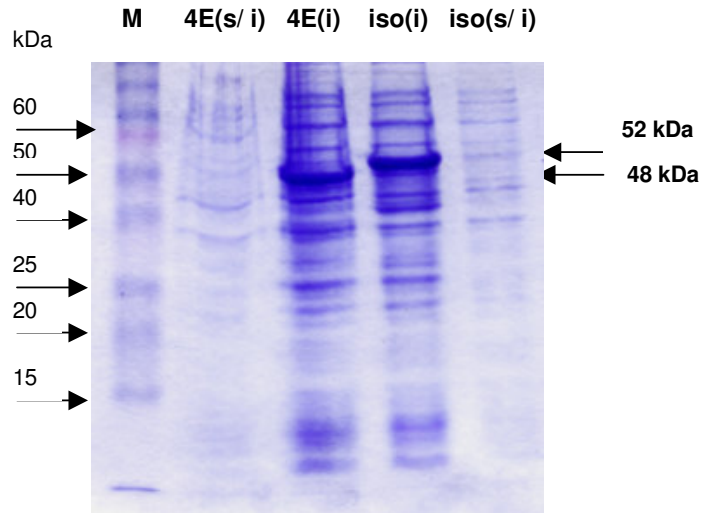


Fig.5A Patrones de electroforesis que muestran la inducción de las proteínas de fusión GST-eIF-4E y GST-eIF-iso4E (M): marcador de peso molecular, 4E(s/i): células eIF-4E no inducidas, 4E(i): inducción de la eIF-4E, iso (i): inducción de la eIF-iso4E; iso (s/i): células eIF-iso4E no inducidas. Fig.5B Gráfica que muestra la interpolación de as masas moleculares de cada proteína inducida marcadas en amarillo, eIF4E=0.26 y elFiso4E = 0.31

Los datos que se muestran en el gel (Fig.5A) se pudieron comprobar con la gráfica donde se muestra la relación

existente entre los logaritmos de las masas moleculares (Marcador de masa molécula) y los $R_f = (\text{abs. banda} / \text{frente de corrida})$. Es una curva se interpolaron los datos experimentales correspondientes a las proteínas eIF4E y eIFiso4E aun fusionadas con la proteína GST (Fig.5B) $eIF-4E = 47.86 \text{ kDa} - 25 \text{ kDa (GST)} = 22.86 \text{ kDa}$, $eIF-iso4E = 52.48 \text{ kDa} - 25 \text{ kDa (GST)} = 27.86 \text{ kDa}$. El experimento tuvo 5 replicas y las concentraciones de proteína obtenida oscilan entre $0.3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ para eIF4E y $0.4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ para eIFiso4E, obteniendo aproximadamente $300 \mu\text{l}$ de cada factor. Estos datos sugieren que la transformación fue exitosa, no hubo degradación y el IPTG funcionó como inductor.

El segundo objetivo consistió en purificar las proteínas de fusión recombinantes GST-eIF4E y GST-eIFiso4E, a fin de separar a las proteínas bacterianas de las proteínas contaminantes. Se llevaron a cabo una serie de lavados en "batch" con buffer PBS, posteriormente se sonicaron y centrifugaron las células bacterianas. Esta separación fue exitosa y no se observó degradación significativa de las proteínas. Sin embargo, se presentaron algunos problemas durante el procedimiento, ya que se detectó una gran pérdida de proteínas debido a la formación de cuerpos de inclusión insolubles, los cuales se quedaban en el precipitado (Fig.6). Esto disminuía de manera considerable el rendimiento final de la purificación. Para evitar esta pérdida, fue necesario cambiar

las condiciones de inducción. Los cambios más importantes consistieron en modificar la temperatura de crecimiento de la bacteria de 30 a 28 °C, así como cambiar la concentración del inductor (IPTG) a 0.25 mM. La decisión de cambiar las condiciones anteriormente descritas fue debido a que éstas son las variables más susceptibles a ser modificadas y además hay datos que mencionan a la temperatura como un factor determinante para la formación de cuerpos de inclusión teniendo como un máximo 30 °C. Con estas condiciones se logró disminuir la pérdida de las proteínas recombinantes hasta un 50 % . Sin embargo seguían presentándose, por lo que fue necesario buscar otros métodos de purificación. Se probó un método para separar la proteína de los cuerpos de inclusión usando un SDS-PAGE no reductor (Stern *et al.*, 1993), pero éste no fue muy adecuado ya que a diferencia de nosotros se usó un vector diferente, la transformación se hizo en levaduras para inducir las proteínas eIF4E en humano y esto ocasionó diferencias. Dado que la proteína obtenida estaba muy degradada, se decidió utilizar el método ya establecido mencionado anteriormente.

Los resultados de la purificación de las proteínas recombinantes se pueden observar en la placa de inmunodetección de eIF-4E (Fig.6)

y eIFiso4E (no se muestra) con anticuerpos contra GST, se logró inducir la proteína (Cind), aunque una gran parte se está quedando en el precipitado (Pp) formando cuerpos de inclusión, otro tanto no se está pegando a la resina GST(U), pero a pesar de esta proteína que se está perdiendo, estamos obteniendo la proteína (4E), aunque se observa una banda muy tenue; la banda corresponde a 48 kDa aproximadamente, porque la proteína aun no ha sido separada de la proteína de fusión GST (Fig.6).



Fig.6 Inmunodetección de la proteína recombinante GST-eIF-4E durante la purificación (Cind. :células inducidas, Pp: Precipitado de las proteínas después de sonicar las células inducidas para eliminar proteínas bacterianas contaminantes, U: sobrenadante después de incubar con la resina Glutation Sefarosa 4B , representa a la fracción proteica no unida a la resina , GST-eIF4E: proteína recombinante eIF4E fusionada a la GST. Se uso un anticuerpo anti-GST.

Para identificar si las proteínas purificadas correspondían a las proteínas esperadas, en primer lugar se hizo una inmunodetección contra GST que es la proteína a la cual se fusionó la proteína de interés para lograr su mejor purificación (Fig.6). Una vez que se comprobó que la proteína correspondía a la esperada, aun fusionada a la GST, se procedió a hacer el corte con trombina para poder separar la proteína GST de las proteínas correspondiente a los factores de iniciación, para ello se usó el método proporcionado por el proveedor (Amersham Corp.) aplicando diferentes tiempos de incubación. La proteína fusionada se incubó con la trombina hasta un tiempo máximo de 24 horas y un mínimo de 2, sin observar diferencias considerables en la proteína obtenida, por lo que se decidió adoptar el tiempo mínimo de incubación.

Una vez purificadas las proteínas eIF4E y eIFiso4E se sometieron a una inmunodetección usando los anticuerpos eIF4E y eIFiso4E de trigo, amablemente donados por K.S. Browning, Universidad de Texas, Austin, comprobando que efectivamente las proteínas purificadas correspondían a las proteínas de interés eIF4E y eIFiso4E (Figs. 7,8).

En la placas de inmunodetección de eIF-4E con anticuerpos contra eIF4E de conejo (Fig.7), se observa que la proteína obtenida tiene un alto grado de pureza, ya que en el carril (4E) se distingue una sola banda correspondiente a la proteína de aproximadamente 26 kDa, la banda es muy marcada y no se

observa una degradación significativa. En la inmunodetección con anticuerpos contra la proteína eIFiso4E de conejo (Fig.8), se observa claramente la banda esperada, la cual es correspondiente al factor iso4E, una proteína de aproximadamente 28 kDa, y no se observa degradación.

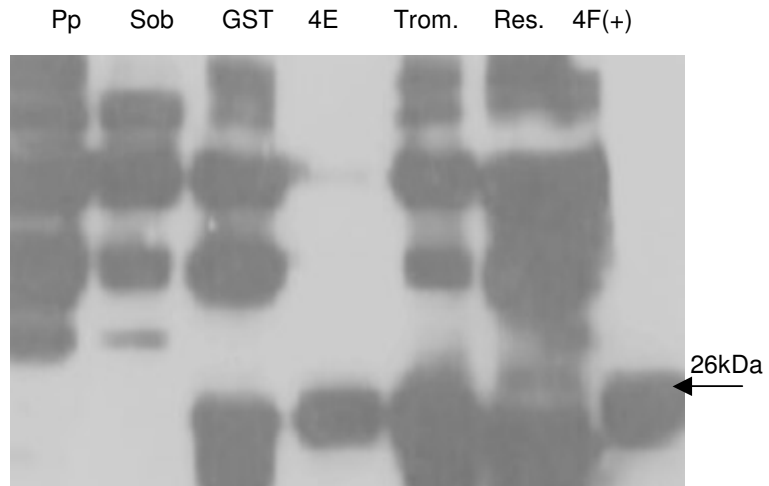


Fig.7 Inmunodetección con anticuerpos vs. eIF4E: en el carril (4E) se observa el reconocimiento de la proteína pura de 26 kDa y en el 4F+ esta el factor 4F de maíz. (Pp: Precipitado de las proteínas después de sonicar las células inducidas para eliminar proteínas bacterianas contaminantes, Sob: sobrenadante después de incubar con la resina Glutation Sefarosa 4B , representa a la fracción proteica no unida a la resina, GST: representa la proteína GST a la que estaba fusionada la proteína eIF4E, Trom: es la fracción de proteasa trombina que se usó para separar la proteína GST de nuestra proteína de interés eIF4E, Res: fracción de resina libre después de obtener la proteína de interés).

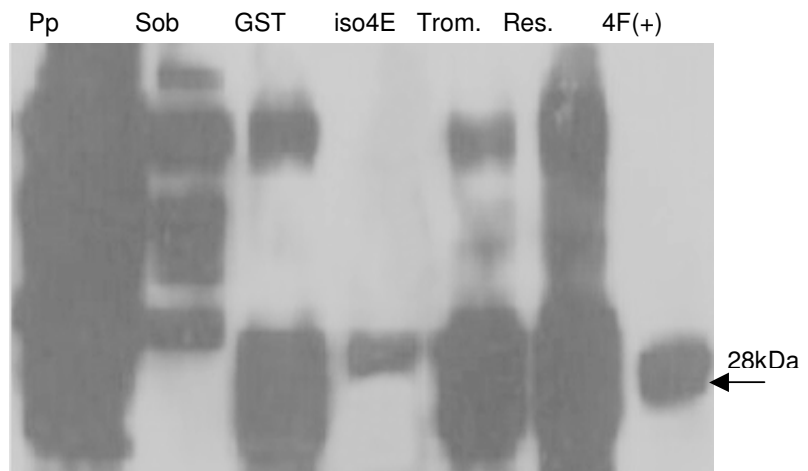


Fig. 8 Inmunodetección con anticuerpos vs. eIFiso4E: en el carril (iso) se muestra la proteína de 28 kDa y en el (4F+) tenemos como control al factor iso4F de maíz. (Pp: Precipitado de las proteínas después de sonicar las células inducidas para eliminar proteínas bacterianas contaminantes, Sob: sobrenadante después de incubar con la resina Glutation Sefarosa 4B , representa a la fracción proteica no unida a la resina, GST: representa la proteína GST a la que estaba fusionada la proteína eIFiso4E, Trom: es la fracción de proteasa trombina que se usó para separar la proteína GST de nuestra proteína de interés eIFiso4E, Res: fracción de resina libre después de obtener la proteína de interés.

Una vez logrados los objetivos propuestos para obtener los dos factores de iniciación recombinantes, se inició la estandarización de las condiciones necesarias para probar la actividad de los mismos ya purificados en un sistema de traducción *in vitro*. Para ello, primero se aislaron los ARNm totales de ejes secos de maíz por el método descrito. Se comparó la eficiencia de traducción de ARNm de maíz contra los del ARNm de BMV (virus de bromo mosaico) que se usa como control en el sistema de trigo (WGE) de traducción *in vitro* (Promega).

El sistema de traducción se montó de acuerdo a las condiciones proporcionadas por el proveedor (Promega) y se obtuvieron los siguientes resultados:

a) ARNm

De acuerdo a los patrones de electroforesis en agarosa de la muestra ARNm obtenido de ejes de maíz mostró alta calidad en cuanto a su pureza y ausencia apreciable de degradación, el cual fue usado en el sistema de traducción *in vitro*.

b) El sistema de WGE fue usado en todos los casos, ya sea completo ó depletado de sus factores 4E de iniciación, los cuales fueron reemplazados por las proteínas recombinantes juntas o cada una por separado.

c) En todos los casos se aplicó igual cantidad del precursor radiactivo [³⁵S] – metionina.

Los resultados de la traducción *in vitro* de WGE completo y el depletado de sus factores eIF4F endógenos, mostraron que el sistema completo incorpora mayor cantidad de [³⁵S] – Met, mientras que el depletado da un valor muy bajo comparativamente (Cuadro 1). Estos eran los resultados esperados, ya que de acuerdo con (Pestova *et al.*, 2001) , en plantas el complejo eIF4F; y en este caso el factor eIF4E y su isoforma son muy importantes para el inicio de la traducción en algunos mensajes *Cap* dependientes, Por tanto al depletar del extracto estos factores, los niveles de traducción descienden considerablemente de 77,258 cpm a 17,692 cpm en (BMV) y de 5,500 cpm a 2,300 cpm en maíz (Fig. 9A y 9B). Sin embargo, en esas figuras se observa que no se elimina completamente la traducción en el sistema depletado, esto se debe a que existen algunos mensajes llamados *Cap* independientes, entre los que se encuentran los ARNm que contienen IRES (sitios de entrada interna al ribosoma) en su región 5' UTR. Con estos resultados se demostró que al eliminar los factores eIF4E endógenos del extracto de germen de trigo (WGE), los niveles de traducción disminuyen considerablemente hasta en un 80% en BMV y un 50% en ARNm de maíz (Fig. 9A y 9B). Además muestran que existe una notable disminución en la eficiencia de traducción al comparar el ARNm de BMV que contiene el Kit comercial y el ARNm de maíz (Fig.9C)

TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN DE LOS TRATAMIENTOS	T0 (inicio de reacción)	T1 (60 min. después del inicio de la reacción)
WGE +BMV	Control +, presenta todos los componentes del sistema	2646cpm	77258cpm
WGE-BMV	Control-, el extracto de WGE fue depletado de sus factores eIF4E y eIFiso4E endógenos	2069cpm	17692cpm
WGE+maíz	Control +, presenta todos los componentes del sistema	1517cpm	5500cpm
WGE-maíz	Control-, el extracto de WGE fue depletado de sus factores eIF4E y eIFiso4E endógenos	1428cpm	2300cpm

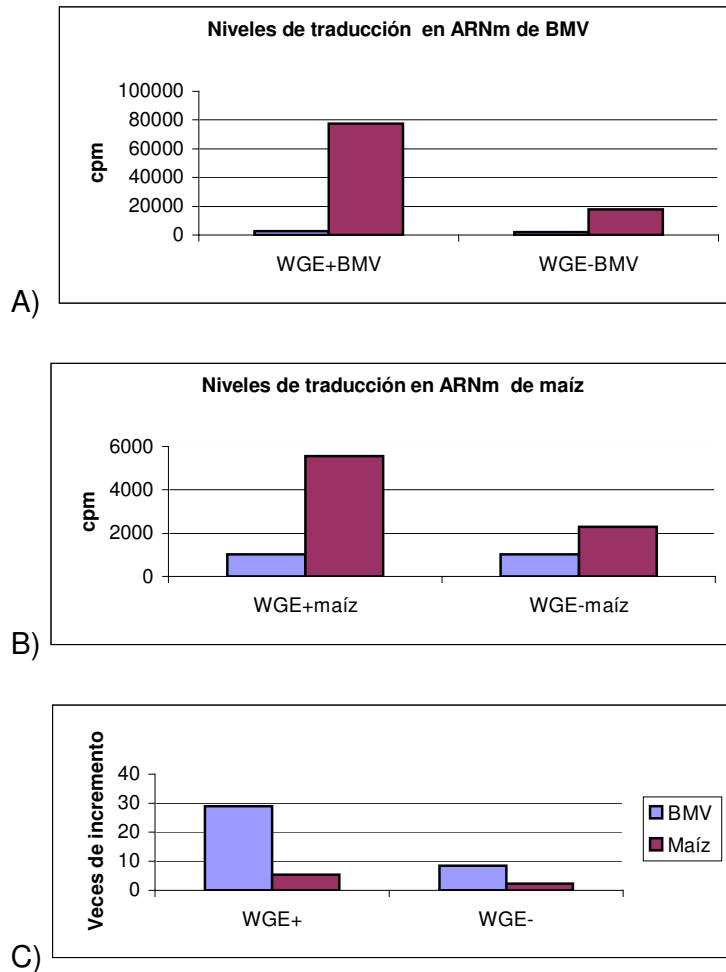


Fig. 9A: Índice de traducción en BMV, 9B: Índice de traducción en maíz Fig 9C: Comparación de la eficiencia de traducción BMV vs. ARNm de Maíz, expresado en veces de incremento en la incorporación de marca en las proteínas. WGE+BMV= Extracto de germen de trigo con factores eIF4E endógenos, WGE-BMV= Extracto de Germen de trigo depletado de Factores eIF4E endógenos con ARNm de BMV, WGE+maíz= Extracto de Germen de trigo con factores eIF4E endógenos y usando ARNm de maíz, WGE-maíz= Extracto de Germen de Trigo depletado de factores eIF4E endógenos.

DISCUSIÓN

El principal objetivo de este trabajo fue obtener el factor de iniciación de la traducción eIF4E y su isoforma eIFiso4E como proteínas recombinantes.

De acuerdo con los resultados obtenidos el objetivo se cumplió satisfactoriamente. Evitando así los problemas evidenciados en los múltiples reportes acerca de las dificultades de extracción y separación de las subunidades que conforman el complejo eIF4F y del cual forman parte las proteínas de interés .

Desde 1992 Browning y colaboradores plantearon la dificultad de purificar los complejos eIF4F y eIFiso4F, debido a problemas de degradación, fundamentalmente para las subunidades eIF4G y eIFiso4G, aún aplicando numerosos inhibidores de proteasas. Por otra parte, la separación de las dos isoformas de la subunidad pequeña, eIF4E y eIFiso4E, se dificulta por su similitud en masa molecular y punto isoeléctrico (Manjunath *et al.*, 1999), así como por la baja concentración celular de estos factores en las células (Dinkova y Sánchez de Jiménez, 1999).

Sha *et al.*, 1995 reportaron que los polipéptidos que conforman el complejo eIF4F de maíz solo se pueden separar por condiciones desnaturizantes, lo cual puede afectar su funcionalidad.

Se ha demostrado que cuando se presentan dificultades para purificar una proteína por métodos convencionales, es

necesario emplear nuevas técnicas de purificación que muchas veces son más efectivas. La expresión de proteínas recombinantes proporciona un sistema de producción prácticamente ilimitada de proteínas altamente homogéneas, cuya presencia en la naturaleza sea escasa o, en todo caso, su aislamiento de la fuente original, implique dificultades (Watson *et al.*, 1992) En este caso, dadas las dificultades antes mencionadas, se consideró que la obtención de los factores de iniciación por el camino del ADN recombinante sería una buena alternativa.

Sin embargo, el proceso presentó varios problemas a lo largo del procedimiento. Los principales problemas que se presentaron durante la purificación de estas proteínas radicaron en la formación de cuerpos de inclusión (Fig. 6), los cuales son dímeros o multímeros de alto peso molecular de la proteína y cuya purificación y solubilización es muy difícil, puesto que requiere de agentes caotrópicos y una subsiguiente restauración de la actividad biológica (Stern *et al.*, 1993). Este fenómeno disminuyó considerablemente el rendimiento de la purificación, por lo que se implementaron algunas modificaciones en las condiciones de inducción de la proteína recombinante, tales como cambio en la temperatura de crecimiento, la concentración del inductor (IPTG), entre otras. Algunas de estas innovaciones fueron exitosas y se logró incrementar hasta en un 50% el rendimiento de la purificación,

con relación al rendimiento obtenido originalmente. Sin embargo no se logró eliminar totalmente la formación de cuerpos de inclusión los cuales siguieron presentándose aunque en menor proporción.

Para que la proteína recombinante sustituya eficazmente a la proteína nativa, es necesario comprobar que sus propiedades moleculares son equivalentes. Por ese motivo, la caracterización estructural y funcional de la proteína recombinante es una etapa crítica a la hora de valorar el sistema de expresión utilizado.

Las modificaciones postraduccionales que se presentan en algunas proteínas, son determinantes para saber si una proteína puede o no ser expresada como recombinante. Ya que debe conservar la misma actividad biológica que una proteína obtenida de manera natural y si una de estas modificaciones es determinante para la actividad biológica funcional de la proteína, pues deberá buscarse un vector de expresión y un sistema hospedero que estén más relacionados con el organismo de origen de la proteína que se busca, o intentar hacer la modificación accesoria en un sistema *in vitro*. De lo contrario el uso del ADN recombinante no es aconsejable a menos que solo se desee verificar la secuencia del gen o hacer anticuerpos contra la proteína deseada.

En el caso del factor eIF4E en mamíferos la fosforilación se ha considerado que podría ser importante para su actividad

(Browning *et al.*, 1996). Sin embargo está en discusión este tema ya que se ha visto que la fosforilación no es determinante para la expresión *in vitro* y puede unir a ARNm o ARNm análogos a Cap aun sin que el 4E esté modificado. Por otra parte, el análisis cristalográfico de la estructura sugiere que la fosforilación juega un papel importante en la regulación de la interacción eIF4F-ARNm (Raught *et al*, 2000). En el caso de las proteínas de unión a Cap en plantas , los sitios y efectos de la fosforilación sobre la síntesis de proteínas son aún desconocidos (Browning *et al.*, 1996).

Como se mencionó anteriormente se considera parte importante de un estudio como el aquí presentado comprobar la actividad biológica de las proteínas recombinantes eIF4E y eIFiso4E formadas para lo cual, en este caso se hace necesario medir los niveles de traducción *in vitro*. Con ese propósito, en este trabajo se inició este estudio planteando la estandarización de un método que sirviera para este propósito. Como se indicó en resultados los niveles de traducción *in vitro* sistema de WGE completo y el depletado de sus factores eIF4E endógenos, ya fuera con ARNm endógeno o viral proporcionaron los resultados esperados en diferencia de traducción de acuerdo con (Pestova *et al.*, 2001). En plantas el complejo eIF4F, en este caso el factor eIF4E y su isoforma, son muy importantes para el inicio de la traducción en mensajes *Cap* dependientes. Por ello, al depletar del extracto

WGE estos factores, los índices de traducción descienden considerablemente (Fig. 9A y 9B), aunque no se elimina completamente la traducción, probablemente debido a que existen algunos mensajes Cap independientes o IRES (sitios de entrada interna al ribosoma) dependientes; los cuales no requieren de la presencia del Cap para ser traducidos.

Este sistema mostró ser muy importante y dependiente de la presencia de los factores eIF4E y eIFiso4E y por tanto servirá para probar el grado de funcionabilidad de las proteínas correspondientes obtenidas por la técnica del ADN recombinante.

CONCLUSIONES

- ❖ Se logró la inducción de las proteínas recombinantes GST-eIF-4E y GST-eIF-iso4E
- ❖ Se logró la purificación de las proteínas recombinantes eIF4E y eIFiso4E sin degradación significativa después de cortar la proteína GST unida.
- ❖ Se pudo comprobar que las proteínas eIF4E y eIFiso4E recombinantes purificadas efectivamente corresponden a las proteínas de maíz
- ❖ Se estableció la estandarización de la técnica de traducción *in vitro* para poder comprobar que las proteínas recombinantes obtenidas presentan actividad dentro de un sistema de traducción *in vitro* competente.

REFERENCIAS

- ❖ Bloom, M.V., freyer, G.A., Micklos, D.A: (1995). Laboratory DNA Science: An Introduction to Recombinant DNA techniques and Methods of Genome Analysis Laboratory manuals. The Benjamin/Cummins Publishing Company. Inc. Menlo Park California. 330-366.
- ❖ Bewley, J.D. and Black , M. (1994). Seeds. Physiology of Development and Germination. Plenum Press. NY. USA.
- ❖ Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method foe the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal.Biochem. 72:248-251
- ❖ Browning, K.S., Webster, C., Roberts, J.K.M. and Ravel, J.M. (1992). Identification of and Isoenzyme Form of Protein Synthesis Initiation and Elongation Factors in Plants. J. Biol. Chem. 267:10096-10100
- ❖ Browning, K.S. (1996). The Plant Translational Apparatus. Plant Mol. Biol. 32:107-144
- ❖ Carberry SE, Goss DJ (1991) Wheat Germ Initiation Factors 4F and (iso)4F Interarct Differently with Oligoribonucleotide Analogues of Rabbit α Globin mRNA. Biochemistry 30: 4542-4545

- ❖ Cheng S-H. and Seeman J.R. (1998). In: RNA isolation and characterization protocols (Rapley R. and Manning D.L. eds), Humana Press, N.J., 1998, pp27-3

- ❖ Dinkova D.T., and Sánchez de Jiménez, E. (1999). Differential expression and regulation of translation initiation factors 4E and iso4E during maize germination. *Physiol. Plant.* 107: 419-425

- ❖ Gallie, D.R. (1996). Translational Control of Cellular and Viral mRNAs. *Plant Mol. Biol.* 32: 145-158

- ❖ Gringras A.C., Raught B. And Sonenberg N. 1999. eIF4 Initiation Factors Effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 913-963

- ❖ Hershey J.W.B. (1991) Translational control in mammalian cell. *Annu Rev Biochem* 60:717-755

- ❖ Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685

- ❖ Lax, S.R., Fritz, W., Browning, K., and Ravel, J. 1985. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 82:330-333

- ❖ Lax, S.R., Lauer, S.J., Browning, K.S: and Ravel, J.M. 1986. Purification and Properties of Protein Synthesis Initiation and Elongation Factors from Wheat Germ.

Meth. Enzymol. 118: 109-128

- ❖ Lehninger L.A., Nelson L. D .y Cox M.M. 1993. Principles of Biochemistry. 2da. Edición. Worth Publishers. New York 28:984-1112.
- ❖ Lewin B. 2003. Genes V. University Press. Oxford.
- ❖ Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982). In: Molecular Cloning laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York.
- ❖ Manjunath S., Williams A., Bailey J. (1999). Oxygen deprivation stimulates Ca^{2+} mediated phosphorylation of mRNA cap-binding protein eIF4E in maize roots. Plant Journal 19 (1): 21-30.
- ❖ Mansfield, M. A. (1994). Protein blotting using polyvinylidene fluoride membranes, In: protein Blotting: A practical approach (Dunbar, B.S. ed.). IRL Press, Oxford, N.Y.
- ❖ Mathews M.B., Sonenberg N. and Hershey J.W.B. (2000) Origins and targets of translational control. In Translational Control (Hershey, J.W.B., Mathews M.B. and Sonenberg, N., eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp.1-9
- ❖ Merrick W.C. and Hershey J.W.B. 2000. Initiation of Protein Synthesis. Translational Control of Gene Expression. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp: 30-75

- ❖ Pain, V.M.(1996). Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells. *Eur. J. Biochemistry*. 236:747-771.
- ❖ Pestova V. T., Kolupaeva G.V., Lomakin B.I., Pilipenko V.E., Shatsky N.I., Agol I.V. and Hellen U.T.C.(2001). Molecular mechanisms of Translation initiation in eukaryotes. *PNAS*.98(13):7029-7036.
- ❖ Raught, B., Gringras, A.C., Sonenberg, N. (2000) regulation of ribosomal recruitment in eukaryotes. In: Sonenberg N, Hershey JWB and Mathews MB (eds), *Translational a control of gene expression* CSHL Press, USA. 245-294.
- ❖ Sánchez de Jiménez, E, and Aguilar R. (1984) Protein Synthesis Pattern: Relevance of old and new messenger RNA in germinating maize embryos . *Plant Physiol*. 75:231-234
- ❖ Sánchez de Jiménez , E. , Aguilar, R. and Dinkova, T. (1997). S6 ribosomal protein phosphorylation and translation of stored mRNA in maize. *Biochimie*. 79:187-194.
- ❖ Stern B. D., Wilson M. and Jagus R.(1993). Use of Nonreducing SDS-PAGE for Monitoring Renaturation of Recombinant Protein Synthesis Initiation Factor, eIF-4 α . *Prot. Expr. Purif*. 4:320-327
- ❖ Sha, M., Wnang, Y., Xiang, T., van Heerden, A., Browning, K.S and Goss, D.J. (1995). Interaction of

Wheat Germ Protein Synthesis Initiation Factor eIF(iso)4F and Its Subunit p28 and p86 with m⁷GTP and mRNA Analogues. J.Biol.Chem. 270:29904-29909

- ❖ Sachs A.N., Sarnow P. and Hentze. (1997). Starting at the Beginning, Middle, and End: Translation Initiation in Eukaryotes. Cell 89:831-838

- ❖ Sonenberg, N.(1996). mRNA 5' Cap-binding Protein eIF4E and Control of Cell Growth. In Translational Control (Hershey, J.W.BG., Mathews, M.B. and Sonenberg, N.eds.) NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp.245-269.

- ❖ Watson, J. Gilman, N., Wittkowski, J. & Zoller, M., 1992, Recombinant DNA, Scientific American Books, New York.

ANEXO

Solución de Tinción Azul de Coomasie	500 ml
Azul de Coomasie R-25-025 25%	1.25 g
Metanol 50%	250 ml
Ácido acético 7%	35ml
Agua destilada hasta llegar a 500 ml	
Solución de destinción	500 ml
Ácido acético 7 %	35 ml
Metanol 30 %	150ml
Agua destilada	315ml

Sistema de Traducción *in vitro*

Extracto de Germen de Trigo

Mantener los reactivos en hielo

Preparación de ARN muestra

Calentar el ARNm a 67°C por 10 min. Inmediatamente colocar en hielo

Procedimiento de Traducción

Componentes:

Extracto de Germen de Trigo	25µl
Mezcla de aminoácidos sin metionina, 1mM	4µl
ARN sustrato en agua libre de nucleasas (0.5µg/ µl)	2µl
Acetato de Potasio 1M	0-7µl
RNasin® Inhibidor de ribonucleasa (40u/µl)	1µl
[³⁵ S] metionina	<u>2.5µl</u>
Agua libre de nucleasas para llevar a un volumen	50 µl

Se incuban las reacciones de traducción a 25°C por 60 min.

Se detiene la reacción, se cuentan los papeles.

Se analizan los resultados de la Traducción: Después de determinar el porcentaje de incorporación en las proteínas con marcador radiactivo, los productos de la traducción se analizan por electroforesis en un gel desnaturizante.

Aislamiento de ARN total a partir de tejidos ricos en polisacáridos

BUFFERS Y REACTIVOS

Citrato de Sodio 0.75 M , pH 7 (ajustar con ácido cítrico),
preparar con H₂O DEPC

N-lauroylsarcosine 10 %

Buffer Tiocianato de guanidina: disolver a 65 °C 250 g de
tiocinato de guanidina. 293 ml de H₂O estéril desionizada

17.6 ml de citrato de sodio 0.75 M---- Preparar

26.4 ml N-lauroylsarcosine 10 % ----- Preparar

Buffer de extracción: por cada 5 ml de B de tiocinato de
guanidina

36 µl de β mercaptoetanol

0.08 g de polyvinylpyrrolidone

Cloroformo /isoamilalcohol 49:1 (v/v)

Acetato de sodio 2 M , pH 4 ajustar con ácido acético preparar
con H₂O DEPC

Acetato de potasio 2 M, pH 4.8 ajustar con ácido acético
preparar con H₂O DEPC

Disolver 19.63 g de KAc en 25 ml de H₂O DEPC

Añadir HAc hasta pH 4.8. Llevar a 100 ml con H₂O DEPC

Fenol ácido: disolver 500 g de fenol en 500ml de H₂O DEPC

Alicuotar en 50-100 ml y guardar a -20°C. Cuando esta en uso
guardar a 4°C hasta 1 mes.

Etanol 100 % y 70 %-----Preparar con H₂O DEPC

Isopropanol 100%

Cloruro de Litio LiCl 10 M con H₂O DEPC

H₂O DEPC (0.1 % DEPC)-----Preparar primero toda la noche
agitar, esterilizar 1 h . Luego usar.

Buffer TEN: 10 mM Tris-HCl, pH 7.5

150 mM NaCl

1 mM EDTA

Buffer TE : 10 mM Tris-HCl ph 7.5

1 mM EDTA

Material de vidrio: probetas , corex y morteros : tratar con
H₂SO₄ concentrado, lavar bien luego con H₂O destilada, tapar
con papel aluminio y hornear a 200 °C toda la noche.

Tubos de ultracentrifuga: 15' con 3 % H₂O₂ preparado con H₂O-
DEPC lavar 2x con H₂O-DEPC