



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Efecto del factor ZmIGF sobre la fosforilación de proteínas
ribosomales en ejes embrionarios de maíz
durante la germinación

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

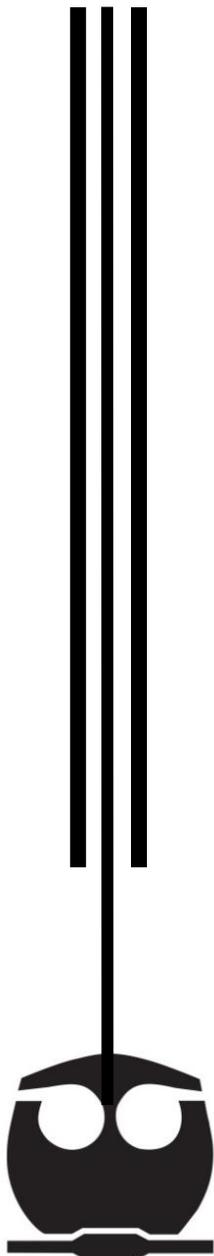
LAURA VANESSA JIMÉNEZ PÉREZ

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Estela Sánchez Quintanar

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.,

2017





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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DRA. ESTELA SÁNCHEZ QUINTANAR

VOCAL: DRA. GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS

SECRETARIO: DRA. CARMEN ADRIANA MENDOZA RODRÍGUEZ

1er. SUPLENTE: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI

2o. SUPLENTE: DRA. MARIA ELENA IBARRA RUBIO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. ESTELA SÁNCHEZ QUINTANAR

(Nombre y firma)

SUPERVISOR TÉCNICO:

DRA. LILIA ANGÉLICA BERNAL GRACIDA

(Nombre y firma)

SUSTENTANTE:

LAURA VANESSA JIMÉNEZ PÉREZ

(Nombre y firma)

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó con el financiamiento de DGAPA con el proyecto PAPIIT IN214214, con el financiamiento de CONACYT con el proyecto 252001 y con el financiamiento de la Facultad de Química con el proyecto PAIP 5000-9123.

ÍNDICE

RESUMEN	6
LISTA DE ABREVIATURAS	7
1. ANTECEDENTES	8
1.1 EL RIBOSOMA Y SUS PROTEÍNAS RIBOSOMALES	8
1.2 EL CONTROL TRADUCCIONAL Y LA FOSFORILACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RIBOSOMALES	14
1.3 LA GERMINACIÓN	19
1.4 LA RUTA TOR EN MAÍZ	20
2. HIPÓTESIS	23
3. OBJETIVO GENERAL	23
4. OBJETIVOS PARTICULARES	23
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	24
6. MATERIALES Y MÉTODOS	25
6.1 EQUIPOS Y REACTIVOS	25
6.2 MATERIAL BIOLÓGICO	25
6.3 EXTRACCIÓN DE RIBOSOMAS CITOSÓLICOS	26
6.4 CUANTIFICACIÓN DE RIBOSOMAS CITOSÓLICOS	26
6.5 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS RIBOSOMALES	26
6.6 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE BRADFORD	27
6.7 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE UV	27
6.8 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS FOSFORILADAS MEDIANTE CROMATOGRFÍA DE AFINIDAD	28
6.9 ELECTROFORESIS SDS-PAGE	29
6.10 WESTERN BLOT	29
6.10.a Titulación de anticuerpos primarios anti-S2, anti-S6, anti-L13 y anti-L29	30
6.10.b Western blot anti-S2, anti-S6, anti-L13 y anti-L29	30
6.10.c Western blot anti-fosfoserina	32
6.11 ELECTROFORESIS DE DOBLE DIMENSIÓN (2 DE)	33

6.12 TINCIÓN CON PRO-Q DIAMOND	34
6.13 IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS	35
7. RESULTADOS	36
7.1 GERMINACIÓN DE SEMILLAS Y EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS RIBOSOMALES	36
7.2 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS FOSFORILADAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD	38
7.3 DETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS RIBOSOMALES S2, S6, L13 y L29 MEDIANTE WESTERN BLOT	39
7.4 DETECCIÓN DE LAS FOSFORILACIONES EN RESIDUOS DE SERINA MEDIANTE WESTERN BLOT	41
7.5 IDENTIFICACIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS RIBOSOMALES CON PRO-Q DIAMOND MEDIANTE ELECTROFORESIS SDS-PAGE	42
7.6 ANÁLISIS DE LA FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS RIBOSOMALES MEDIANTE ELECTROFORESIS DE DOBLE DIMENSIÓN	44
8. DISCUSIÓN	48
9. CONCLUSIONES	53
10. PERSPECTIVAS	54
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

RESUMEN

El ribosoma eucariótico es un organelo formado por rRNA y proteínas ribosomales (PR). Su función es traducir el ácido ribonucleico mensajero (mRNA) a proteínas. Sin embargo, a medida que el conocimiento del ribosoma aumenta, se hace más evidente, que además de su papel esencial en la síntesis de proteínas, podría ser clave en la regulación del tipo de proteínas que se sintetizan, a través de la heterogeneidad ribosomal. Las modificaciones post-traduccionales en las PR, como la fosforilación, forman parte de la heterogeneidad ribosomal. La fosforilación de las proteínas juega un papel esencial en la señalización celular y en la regulación de la actividad de las proteínas celulares. En maíz hay un factor de crecimiento similar a la insulina (ZmIGF), que estimula la germinación de forma selectiva, similar a como ocurre con la insulina en mamíferos. Uno de los efectos más estudiados de la insulina o del ZmIGF es la regulación de la síntesis de proteínas, incluyendo a las PR, mediante la activación de la vía blanco de rapamicina (TOR). Dentro del grupo de investigación se han estudiado los cambios en la composición protéica de los ribosomas durante la germinación del maíz, además de los cambios provocados por el aumento en la concentración del ZmIGF. Como estos grupos de ribosomas tienen un efecto en la velocidad de traducción de ciertos mRNAs, conocer los cambios en la fosforilación de las PR durante la germinación del maíz podría contribuir a explicar el papel funcional de la heterogeneidad ribosomal. En este trabajo se comprobó que la adición de insulina durante la germinación de semillas de maíz modifica de forma específica el estado de fosforilación de algunas proteínas ribosomales. Se estudiaron los patrones de fosforilación durante el proceso de germinación y se observó un incremento en la fosforilación de las PR P0 y P1 y una disminución en la fosforilación de S3 respecto a las semillas sin germinar. Mientras que la adición de insulina durante la germinación aumentó la fosforilación de la proteína P1, sugiriendo que su fosforilación podría estar controlada por la actividad de la vía TOR. Se demostró la heterogeneidad ribosomal a través de la fosforilación y también que la insulina promueve cambios en la fosforilación de algunas PR como posible mecanismo de control traduccional para asegurar una germinación exitosa en el maíz.

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>A. thaliana</i>:	<i>Arabidopsis thaliana</i> .
ATP:	Adenosín trifosfato.
BSA:	Albúmina de suero bovino.
cAMP:	Adenosín monofosfato cíclico.
CHAPS:	3-(3-colamidopropil-dimetilamonio)-propanosulfonato.
cryo-EM:	Criomicroscopía electrónica.
DMSO:	Dimetilsulfóxido.
DNA:	Ácido desoxirribonucleico.
DTT:	Ditiotreitol.
<i>E. coli</i>:	<i>Escherichia coli</i> .
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético.
eEF-2:	Factor de elongación eucariótico 2.
GTPasa:	Guanosina trifosfatasa.
IEF:	Isoelectroenfoque.
IGFs:	Factores de crecimiento similares a la insulina.
IPG:	Gradientes de pH inmovilizados.
mRNA:	Ácido ribonucleico mensajero.
mTOR:	Mammalian target of rapamycin.
-OH:	Radical hidroxilo.
pI:	Punto isoeléctrico.
PO₄³⁻:	Grupo fosfato.
PTMs:	Modificaciones post-traduccionales.
PVDF:	Difluoruro de polivinilideno.
RAPTOR:	Proteína asociada a la regulación de TOR.
rRNA:	Ácido ribonucleico ribosomal.
S6K:	Cinasa de la proteína ribosomal S6.
SDS:	Dodecilsulfato sódico.
SDS-PAGE:	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.
TBS:	Amortiguador salino tris.
TBS-T:	Amortiguador salino tris con tween 20.
TOR:	Target of rapamycin.
tRNA:	Ácido ribonucleico de transferencia.
ZmIGF:	Factor de crecimiento similar a la insulina de <i>Zea mays</i> .

1. ANTECEDENTES

1.1 EL RIBOSOMA Y SUS PROTEÍNAS RIBOSOMALES

El crecimiento de un organismo implica el aumento en el tamaño y/o en la proliferación celular. En ambos casos, las proteínas constituyen el principal componente de las células para llevar a cabo estas funciones. La cantidad de proteínas que pueden ser sintetizadas depende del número de ribosomas presentes en las células, de tal forma que la biogénesis ribosomal es un proceso determinante para el crecimiento de un organismo (Villa *et al.*, 2013).

Los ribosomas son complejos macromoleculares responsables de la síntesis de proteínas en todos los organismos vivos. Un ribosoma proveniente de bacterias o arqueas se conforma por una subunidad ribosomal grande 50S y una subunidad ribosomal pequeña 30S, que juntas constituyen el ribosoma 70S. Sus contrapartes eucarióticas se conforman respectivamente por la subunidad ribosomal grande 60S y la subunidad ribosomal pequeña 40S formando el ribosoma 80S. Los ribosomas 70S de procariontes y 80S de eucariontes contienen más de 50 proteínas ribosomales diferentes y tres o cuatro cadenas de ácido ribonucleico ribosomal (rRNA) (Figura 1) (Melnikov *et al.*, 2012).

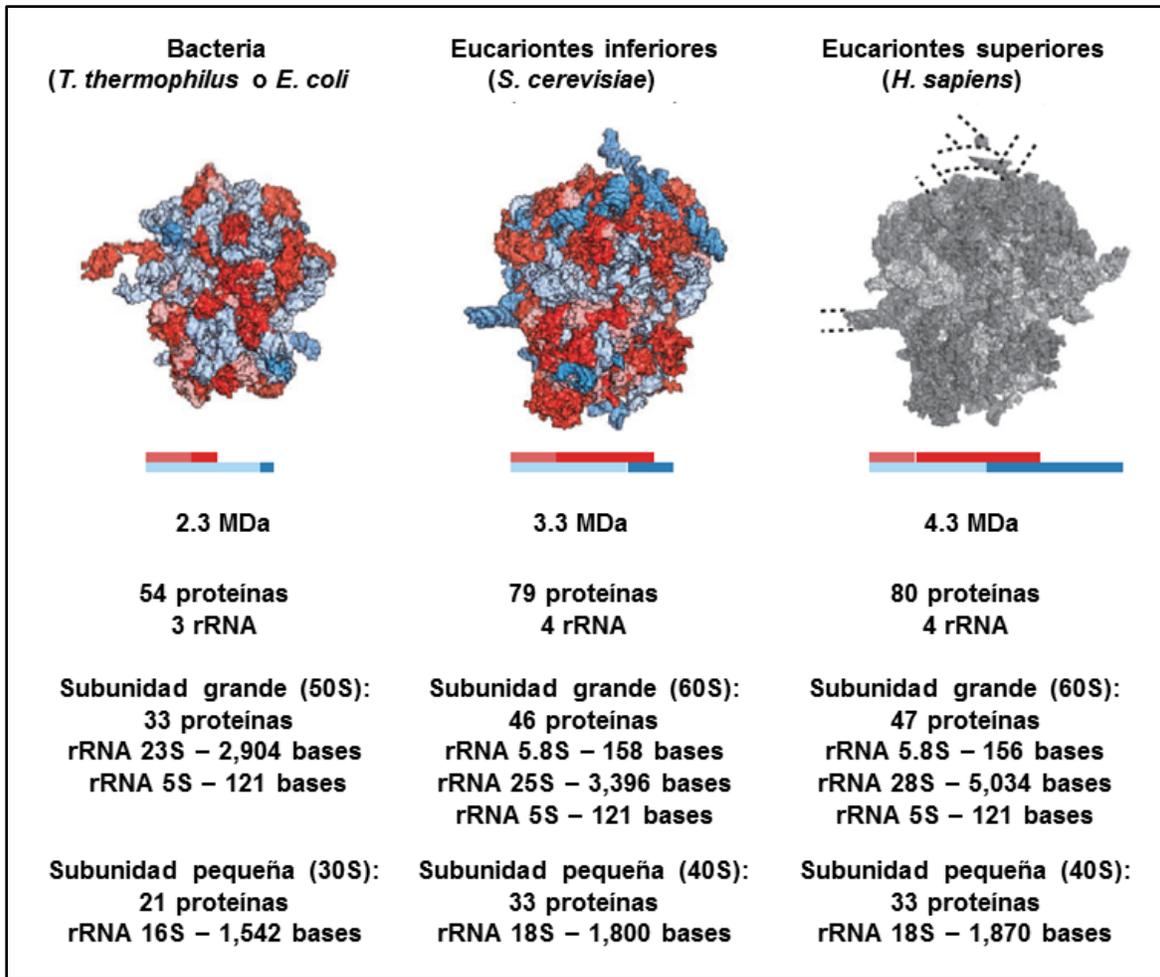


Figura 1. Composición de los ribosomas bacterianos y eucarióticos. Los ribosomas bacterianos y eucarióticos comparten estructuras conservadas compuestas por ácido ribonucleico ribosomal (rRNA) (azul claro) y proteínas ribosomales (naranja). Además de estas estructuras, los ribosomas contienen su propio grupo de proteínas ribosomales (rojo) y segmentos de expansión del rRNA (azul fuerte). Las líneas punteadas indican posiciones de los tallos flexibles de los ribosomas que usualmente están desordenados en las estructuras de rayos-X. En lugar de la estructura ribosomal humana, se muestra la estructura 80S de levaduras. Imágenes basadas en estructuras de rayos-X y criomicroscopía electrónica (cryo-EM). (Imagen tomada de Melnikov *et al.*, 2012 con algunas modificaciones).

Las proteínas ribosomales son sintetizadas en el citoplasma y después son transportadas hacia el núcleo para asociarse junto con el rRNA y formar las subunidades ribosomales pequeña y grande (Lorení y Ricciardi, 2014). Las subunidades ya formadas son a su vez regresadas al citoplasma donde realizan su función.

En cuanto a la nomenclatura de las proteínas ribosomales, para facilitar la comparación entre los ribosomas de diferentes especies, se ha adoptado un sistema basado en nombrar a las proteínas de arqueas y eucariontes en función de los nombres de las proteínas de *Escherichia coli* (*E. coli*) siempre y cuando sean homólogas entre sí. Esto se debe a que las proteínas ribosomales de *E. coli* fueron las primeras en ser aisladas y secuenciadas completamente. Las proteínas ribosomales asociadas a la subunidad ribosomal pequeña se nombran con el prefijo “S” (por small en inglés) y aquellas que estén asociadas a la subunidad ribosomal grande se nombran con el prefijo “L” (por large en inglés). Las proteínas ribosomales que se encuentren en los tres dominios (bacteria, arquea y eucariontes) tendrán un prefijo “u” (por universal), las proteínas ribosomales que solo estén presentes en bacterias tendrán un prefijo “b” (por bacterias) y aquellas proteínas ribosomales que solo se encuentren en eucariontes tendrán un prefijo “e” (por eucariontes) (Figura 2) (Ban *et al.*, 2014; Yusupova y Yusupov, 2016).

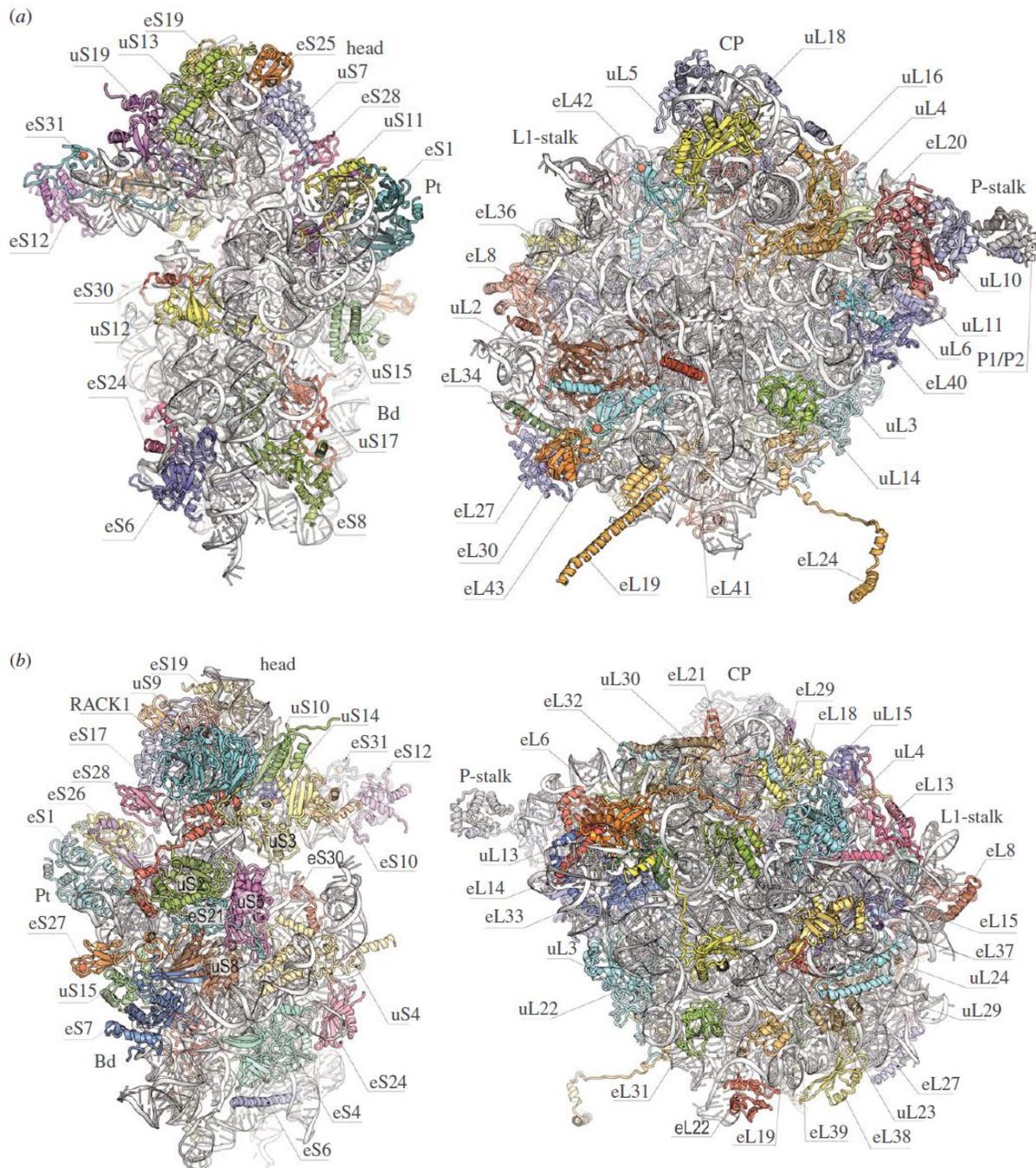


Figura 2. Arquitectura de las subunidades ribosomales (subunidad 40S en el lado izquierdo y subunidad 60S en el lado derecho) con la nueva nomenclatura para las proteínas. Las proteínas ribosomales presentes en los tres tipos de organismos existentes (bacterias, arqueas y eucariontes) tienen un prefijo “u”. Las proteínas específicas de bacterias tienen un prefijo “b”. Las proteínas específicas de eucariontes tienen un prefijo “e”. (a) Vista de la interface de las subunidades 40S y 60S. En la imagen se muestra la cabeza (head), el cuerpo (Bd) y la plataforma (Pt) de la subunidad 40S así como la protuberancia central (CP), el tallo L1 (L1-stalk) y el tallo P de la subunidad 60S (P-stalk). (b) Vista del lado soluble de las subunidades 40S y 60S (Imagen tomada de Yusupova y Yusupov, 2016).

El estudio de la relación entre la estructura y la función de los ribosomas en bacterias y arqueas ha tenido un progreso impresionante en esta última década, debido a la dilucidación de estructuras cristalinas de los ribosomas en alta resolución (Korostelev y Noller, 2007; Steitz, 2008), lo cual ha permitido estudiar los cambios en la estructura y composición de los ribosomas de un mismo organismo cuando está presente algún factor de cambio (Byrgazov *et al.*, 2013). La heterogeneidad ribosomal se basa en estos principios, en la cual ocurren cambios en la estructura o composición de las cadenas de rRNA y/o en las proteínas ribosomales que conforman al ribosoma (Gilbert, 2011). Por ejemplo, algunos estudios en los ribosomas eucarióticos demuestran que, dependiendo del tipo de tejido y de las condiciones fisiológicas, se altera la estequiometría de las proteínas ribosomales de un organismo y que esto a su vez, puede alterar la eficiencia traduccional del ácido ribonucleico mensajero (mRNA) (Mauro y Edelman, 2002; Gilbert, 2011; Xue y Barna, 2012; Sauert *et al.*, 2015).

Los ribosomas eucarióticos tienen secuencias de rRNAs y de proteínas ribosomales conservadas desde organismos como las levaduras hasta los humanos (Venema y Tollervey, 1999). Sin embargo, además de estos componentes conservados, los ribosomas pueden variar en la composición o en el estado de modificación de sus proteínas ribosomales de diferentes maneras.

El estudio de los ribosomas en plantas constituye un reto considerando que el grado de heterogeneidad en estos organismos es particularmente alto (Giavalisco *et al.*, 2005). Mientras que cada una de las proteínas ribosomales en los mamíferos están usualmente representadas por un solo gen de expresión (Sugihara *et al.*, 2010) y en las levaduras por uno o dos genes de expresión, que usualmente codifican para proteínas idénticas (McIntosh y Warner, 2007), la situación es más compleja en plantas superiores. Por ejemplo, el estudio del genoma de *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) reveló que ninguna de sus 80 proteínas ribosomales había sido codificada por solo una secuencia del gen, la mayoría fueron codificadas por tres o cuatro genes (Barakat *et al.*, 2001). Esta variabilidad en las proteínas ribosomales también se puede ver afectada por

estímulos en el ambiente, en *A. thaliana* se probó que existen cambios en la abundancia de los parálogos de las proteínas ribosomales en respuesta a la presencia de sacarosa (Hummel *et al.*, 2012).

En maíz, se ha visto una gran variabilidad en los niveles de transcritos de mRNAs que codifican para las proteínas ribosomales ácidas P1, P2A, P2B y P3 entre distintos órganos y tejidos (Szick y Bailey, 2001). Así como cambios en la abundancia de algunas proteínas ribosomales como L2, L21 y L29 cuando las plantas de maíz se desarrollan en distintas condiciones de luz y oscuridad (Zhao *et al.*, 1999). De igual forma, las proteínas ribosomales pueden ser susceptibles a numerosas modificaciones post-traduccionales como la fosforilación, metilación, acetilación y ubiquitinación, contribuyendo de esta forma a la heterogeneidad ribosomal (Kruiswijk *et al.*, 1978; Spence *et al.*, 2000; Szick y Bailey, 2001).

La heterogeneidad ribosomal en plantas representa un potencial probablemente debido a la naturaleza sésil de las mismas y a su necesidad por adaptarse a los cambios en las condiciones ambientales, a diferencia de los animales, quienes tienen mayor capacidad para evadir estas fluctuaciones (Cramer *et al.*, 2011; Carroll, 2013).

Sin embargo, para poder entender el porqué de estos cambios en los componentes ribosomales es necesario comprender la función que cada uno de ellos desempeña, motivo por el cual se han desarrollado numerosas investigaciones al respecto.

En general, las proteínas ribosomales juegan papeles críticos en la biogénesis y en la función de los ribosomas (de la Cruz *et al.*, 2015), por lo que ha sido de importancia el estudio de cada una de las estructuras y procesos relacionados con los ribosomas. Dentro de las principales funciones de las proteínas ribosomales están la interacción con los residuos de rRNA durante la biogénesis del ribosoma, el establecimiento y la estabilización de las subunidades ribosomales, la interacción con los mRNAs y los factores de traducción, para el plegamiento de los polipéptidos recién sintetizados, entre otras funciones (Stahl, 2001; Savada y

Bonham, 2014; Lu *et al.*, 2015). Así mismo, los residuos de algunas proteínas ribosomales periféricas conservadas tanto en procariontes como en eucariontes, están involucrados en la interacción con otros componentes moleculares, como factores de inicio de la traducción y chaperonas moleculares (Melnikov *et al.*, 2012).

En adición a la participación esencial que tienen las proteínas ribosomales en la biogénesis ribosomal y en la producción de proteínas durante el desarrollo celular, se han podido elucidar algunas funciones bioquímicas, celulares y fisiológicas de las proteínas ribosomales independientes de la maquinaria ribosomal (Zhou *et al.*, 2015). Estudios previos han demostrado que la reducción en los niveles de algunas proteínas ribosomales, pueden causar efectos perjudiciales en el desarrollo y fisiología de un organismo. En plantas, como *A. thaliana*, se ha visto que las mutaciones en el gen de las proteínas ribosomales S18 y S13 afectan la viabilidad de los embriones o el desarrollo de la planta (Van *et al.*, 1994; Ito *et al.*, 2000).

El estudio de las estructuras de los ribosomas eucarióticos mediante rayos-X de alta resolución y criomicroscopía electrónica (cryo-EM) han sido fundamentales en el desarrollo de modelos más detallados para comprender el papel que tienen las proteínas ribosomales en la estructura, función y asociación ribosomal (Yusupova y Yusupov, 2014).

1.2 EL CONTROL TRADUCCIONAL Y LA FOSFORILACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RIBOSOMALES

La síntesis de proteínas es uno de los procesos biológicos de mayor consumo de energía que está estrictamente regulado. Las células eucarióticas utilizan mecanismos complejos para regular la síntesis de proteínas que generalmente involucran múltiples niveles de control. El control de la expresión genética a nivel de la traducción permite que las células tengan mecanismos para promover o reprimir rápidamente la síntesis de proteínas específicas en respuesta a señales

de desarrollo y/o del medio ambiente. Estos mecanismos de control traduccional son especialmente importantes en las plantas, en donde la velocidad de la traducción debe de responder rápidamente a las fluctuaciones de las condiciones ambientales (Muench *et al.*, 2012).

La combinación de los mecanismos transcripcionales, post-transcripcionales, traduccionales y post-traduccionales permiten a la planta balancear la síntesis y la degradación de proteínas de forma regular para poder cubrir sus necesidades de desarrollo, energéticas y frente a los cambios del medio ambiente (Edwards *et al.*, 2012; Galland *et al.*, 2014).

Las modificaciones post-traduccionales (PTMs) en las proteínas ribosomales como la fosforilación, metilación y acetilación están involucradas en el procesamiento del ribosoma y en el control de la traducción. Se ha visto que en los organismos eucarióticos cerca del 5% de su genoma codifica para enzimas involucradas en las PTMs (Walsh, 2006).

La fosforilación de las proteínas involucra la generación de un grupo éster entre el radical hidroxilo (-OH) de un aminoácido y un grupo fosfato (PO_4^{3-}) que normalmente se transfiere desde una molécula de adenosín trifosfato (ATP).

Hasta la fecha, se han identificado cerca de 300 sitios de fosforilación en las proteínas ribosomales de organismos eucarióticos y la mayoría de las fosforilaciones ocurren en residuos de serina, treonina o tirosina, aunque, en procariontes también se han encontrado fosforilaciones en residuos de histidina, arginina o lisina (Fox, 2016). El estado de fosforilación de las proteínas ribosomales ha demostrado ser crucial para la regulación de las interacciones entre proteínas y para la actividad en el inicio de la traducción (Muench *et al.*, 2012).

En los organismos eucarióticos, especialmente en las plantas, se han reportado diversos cambios en la fosforilación de las proteínas ribosomales cuando hay un factor externo que altera el ambiente (Turkina *et al.*, 2011; Boex-Fontvieille, *et al.*, 2013; Carroll, 2013).

Kruiswijk *et al.*, (1978) descubrieron la fosforilación de seis proteínas ribosomales (P0, P1, P2, L24, S5 y S6) en levaduras, desde entonces, la mayoría de las investigaciones se han enfocado en el estudio específico de la proteína ribosomal S6, que en eucariontes superiores se ha visto su fosforilación en cinco diferentes residuos de serina. Se ha visto que la velocidad de fosforilación de la proteína ribosomal S6 está regulada por la vía blanco de la rapamicina (TOR) (Yerlikaya *et al.*, 2016). La proteína ribosomal S6 puede ser fosforilada por la cinasa de la proteína ribosomal S6 (S6K) y a su vez la S6K puede fosforilarse por otras cinasas como la proteína TOR, específicamente por el complejo formado por TOR y la proteína asociada a la regulación de TOR (RAPTOR) (Meyuhas, 2015; Fonseca *et al.*, 2016).

La proteína S6 reside en la interface de la subunidad 40S, yuxtapuesta con la subunidad grande 60S, donde aparentemente hace contacto con el rRNA 28S. En esta región ocurren muchos procesos centrales relacionados con la traducción como la unión del mRNA y el ácido ribonucleico de transferencia (tRNA), además de la asociación con varios factores de inicio y de elongación de la traducción (Meyuhas, 2015). La fosforilación de S6 induce y estabiliza los cambios conformacionales en el ribosoma lo que permite la asociación diferencial del ribosoma con otras proteínas o mRNAs (Meyuhas, 2000).

También se sabe que la modificación en la fosforilación de S6 es un paso clave en el control traduccional, ya que tiene efectos drásticos sobre el crecimiento celular y sobre la formación de polisomas en células de maíz (Sánchez de Jiménez, *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 2003).

En plantas, sólo algunas proteínas ribosomales se han identificado como susceptibles a fosforilación. Estas investigaciones han involucrado ensayos con fósforo radiactivo (Pérez *et al.*, 1993; Beltrán *et al.*, 2002) o análisis proteómicos para la identificación de la fosforilación en las proteínas ribosomales (Turkina *et al.*, 2011; Boex-Fontvieille, *et al.*, 2013). En levaduras también se han realizado inmunodetecciones para identificar la fosforilación de algunas proteínas ribosomales (Bou *et al.*, 2000; Bautista y Zinker, 2014).

En *A. thaliana* se reportó un aumento en el grado de fosforilación de las proteínas ribosomales S6, L29 y P1 en hojas recolectadas durante el día en comparación de las que se recolectan en la noche, indicando que la fosforilación diferencial de estas proteínas puede contribuir a la modulación de la síntesis de proteínas en plantas durante la noche (Turkina *et al.*, 2011). Posteriormente se identificaron 25 sitios nuevos de fosforilación en las proteínas ribosomales de hojas de *A. thaliana* sometidas a diferentes condiciones fotosintéticas. Algunas proteínas ribosomales, como la S14A y la L13D, se vieron afectadas significativamente, disminuyendo sus niveles de fosforilación en presencia de luz durante su desarrollo (Boex-Fontvieille *et al.*, 2013). En la Tabla 1 se presentan las proteínas ribosomales susceptibles a fosforilación que han sido reportadas en distintos tejidos de *A. thaliana*.

Tabla 1. Proteínas ribosomales fosforiladas de *Arabidopsis thaliana*. Se presentan diferentes isoformas de algunas proteínas ribosomales que se han encontrado fosforiladas en *A. thaliana*, con sus respectivos datos de peso molecular y punto isoeléctrico (Barakat *et al.*, 2001; Boex-Fontvieille, *et al.*, 2013; Carroll, 2013).

Proteína Ribosomal	Peso Molecular (kDa)	Punto Isoeléctrico (pI)
L3A	44.6	11
L6B, L6C	26, 26.1	11.2, 11.2
L11A, L11B, L11C, L11D	20.9, 20.9, 21.1, 20.9	10.7, 10.8, 10.8, 10.8
L13B, L13D	23.8, 23.5	11.7, 11.7
L29A	7.0	12.0
P0B, P0C	34.1, 34.4	4.8, 4.9
P1A, P1B, P1C	11.2, 11.0, 11.2	4.1, 4.0, 4.1
P2A, P2B, P2D	11.4, 11.4, 11.0	4.4, 4.4, 4.2
P3A, P3B	11.8, 11.9	4.2, 4.3
S2C	30.9	11.1
S3aA, S3aB	29.9, 29.8	10.6, 10.5
S6A, S6B	28.4, 28.1	11.4, 11.5
S9B	23.0	10.9
S10A	19.4	10.5
S14A, S14B	16.3, 16.3	11.3, 11.3
S17	16.0	10.8
S27A, S27B, S27C	9.5, 9.5, -	9.1, 8.7, -
RACK1B	35.8	6.6

Otras proteínas ribosomales en plantas susceptibles a la fosforilación son las proteínas P o también conocidas como proteínas ribosomales ácidas P1, P2 y P3. Estas proteínas son interesantes debido a que su concentración fuera del ribosoma es mucho más alta que la de la mayoría de las otras proteínas ribosomales dependiendo en parte del estado metabólico de la célula, además son las únicas proteínas ribosomales que se pueden encontrar libres en el citoplasma (Fox, 2016). Las proteínas ácidas se encuentran fosforiladas cuando están unidas al ribosoma y desfosforiladas cuando están libres en el citoplasma. Son categorizadas con base en las similitudes de sus secuencias primarias. En bacterias y levaduras solo hay dos grupos P1 y P2, mientras que en plantas además de las anteriores hay un tercer grupo P3 (Kang *et al.*, 2016).

Las proteínas ribosomales ácidas forman una estructura lateral junto con la proteína ribosomal P0 en la subunidad grande 60S, conocida como tallo ribosomal. Para establecer la estructura del tallo ribosomal se ha visto que en levaduras, P1A forma un dímero con P2B y a su vez P2A forma otro dímero con P1B. Cada dímero se une con la proteína ribosomal P0 a través de la interacción con P2 formando una estructura pentamérica (Liljas, 2004; Krokowski *et al.*, 2006). El tallo ribosomal está localizado en el lado del ribosoma donde ocurren las interacciones con mRNAs, tRNAs y factores de traducción durante la síntesis de proteínas (Ballesta y Remacha, 1996; Wahl y Möller, 2002). Esta estructura participa en el proceso de elongación del péptido durante la traducción mediante la interacción con el dominio de la guanosina trifosfatasa (GTPasa) y con el factor de elongación eucariótico 2 (eEF-2) en el ribosoma (Bargis-Surgey *et al.*, 1999; Uchiumi y Kominami, 1992).

En raíces de plántulas de maíz, se reportó que las proteínas ribosomales ácidas (P1, P2A y P3) disminuyen su estado de fosforilación cuando la planta se somete a condiciones de anoxia (Szick y Bailey, 2001).

1.3 LA GERMINACIÓN

El proceso de germinación de una semilla es una fase crítica en el ciclo de vida de la planta debido a su gran vulnerabilidad a enfermedades y a estrés ambiental. El éxito de la germinación de una semilla y el establecimiento normal de una plántula son características determinantes para la propagación de las diversas especies de plantas, lo cual tiene mucha relevancia en plantas que son de importancia económica y ecológica (Shu *et al.*, 2015).

Durante la germinación, las semillas sufren grandes cambios morfológicos debido a su posterior transformación en plántulas normales, lo que implica que haya cambios drásticos en la expresión genética a nivel transcriptómico y proteómico (Holdsworth *et al.*, 2008; Weitbrecht *et al.*, 2011).

La germinación va a depender en parte del estado de desarrollo, maduración y desecación de la semilla. Después de la maduración, la semilla es sujeta a la etapa de desecación y es durante esta etapa que los aminoácidos y algunos azúcares son acumulados para ser utilizados en el inicio de la germinación (Han y Yang, 2015).

La germinación comienza con la imbibición de la semilla madura y seca y termina con la protrusión de la radícula. La imbibición de la semilla restablece la actividad metabólica en el eje embrionario y uno de los primeros eventos que ocurre durante esta etapa es la integración del aparato traduccional y la síntesis de proteínas, ya que son requeridos para llevar a cabo el crecimiento y establecimiento de la plántula (Aguilar y Sánchez, 1984). En semillas de *A. thaliana* y de arroz se ha visto que la adición de inhibidores de la traducción limita el proceso de germinación (Rajjou *et al.*, 2004; He *et al.*, 2011).

Durante el proceso de germinación de *A. thaliana* y arroz, la síntesis de proteínas comienza en la etapa de imbibición mediante la traducción de mRNAs almacenados en la semilla seca, movilizandolos y activando metabolitos (Rajjou *et al.*, 2012). Posteriormente la síntesis de proteínas continúa con la traducción de mRNAs recién sintetizados (Nakabayashi *et al.*, 2005; Howell *et al.*,

2009). Así mismo, en maíz se ha visto que hay una traducción activa de mRNAs almacenados, de los cuales algunos traducen proteínas ribosomales (Beltrán *et al.*, 1995).

A diferencia de *A. thaliana*, las semillas de cereales como el arroz, la cebada y el maíz contienen endospermos grandes para la acumulación de nutrientes y embriones pequeños para el establecimiento de la plántula. Durante el inicio de la germinación, el endospermo del arroz absorbe agua de forma rápida e incrementa su peso sin cambio obvio en su tamaño, mientras que el tamaño del embrión se expande a lo largo con incremento en peso (Han y Yang, 2015).

La germinación involucra algunos cambios metabólicos y estructurales como la reparación del ácido desoxirribonucleico (DNA), la activación para la movilización de reservas, la división celular, el reinicio de la transcripción y traducción, entre otros. Estos cambios están regulados por una red compleja de señalizaciones metabólicas que son altamente sensibles a alteraciones endógenas y exógenas (Han y Yang, 2015; Oracz y Stawska, 2016).

1.4 LA RUTA TOR EN MAÍZ

Los mecanismos que coordinan el crecimiento y la división celular no se conocen del todo, pero se sabe que la vía de señalización mediada por la proteína reguladora TOR regula ambos procesos, el crecimiento celular y la progresión del ciclo celular (Fingar *et al.*, 2004).

En la mayoría de los eucariontes no fotosintéticos, desde las levaduras hasta los mamíferos, la ruta conservada de transducción de señales TOR coordina el crecimiento y la progresión del ciclo celular, estimulando la transición entre las fases G1 – S (Kozma y Thomas, 2002; Ekim *et al.*, 2011), así como procesos metabólicos relacionados con el nivel de energía o la apoptosis (Liao *et al.*, 2008). También se ha visto que este proceso de señalización transduccional induce la

biogénesis ribosomal y aumenta selectivamente la síntesis de proteínas ribosomales (Shahbazian *et al.*, 2006; Wang y Proud, 2006; Villa *et al.*, 2013).

Los mitógenos, hormonas y factores de crecimiento son producidos por los eucariontes para coordinar su desarrollo y crecimiento. La ruta TOR puede ser activada por señales del medio ambiente, nutrientes, factores de estrés, hormonas entre ellas la insulina o por factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs).

En plantas, hay evidencias de que la cinasa TOR se ha conservado a lo largo de la evolución y que está involucrada en el control del crecimiento y la proliferación celular. En maíz, se ha encontrado que los ortólogos de las proteínas TOR y S6K son fundamentales para el desarrollo de nuevas plantas (Reyes *et al.*, 2004; Agredano *et al.*, 2007).

Los IGFs son pequeños péptidos de señalización que se encuentran ampliamente presentes en células animales. Presentan diversificación de acuerdo con el tejido o la etapa de desarrollo conservando su papel en el control del crecimiento y desarrollo celular (Cohick y Clemmons, 1993). Así mismo, se ha demostrado la existencia de algunos péptidos reconocidos por anticuerpos contra la insulina, presentes en plantas mono y dicotiledóneas, sugiriendo la presencia de los IGFs en diferentes especies vegetales (Watanabe *et al.*, 1994; García *et al.*, 2001; Ribeiro *et al.*, 2009).

En maíz, se purificó un péptido de 5.7 kDa a partir de los ejes embrionarios, que se reconoció con el anticuerpo para insulina humana y se demostró que su estructura terciaria es similar a la de la insulina por lo que se le nombró factor de crecimiento similar a la insulina de *Zea mays* (ZmIGF) (Rodríguez *et al.*, 2011). El ZmIGF presenta características bioquímicas que sugieren su participación en la ruta TOR, debido a que induce el crecimiento de las plántulas de maíz, la síntesis de proteínas ribosomales, así como la biogénesis ribosomal de forma similar a como ocurre con la insulina en animales (García *et al.*, 2001; Dinkova *et al.*, 2007; Jiménez *et al.*, 2011; Villa *et al.*, 2013). Además, se ha reportado que el ZmIGF regula el crecimiento celular mediante la proliferación celular en tejidos de maíz,

sugiriendo que las propiedades bioquímicas y funcionales de los factores de crecimiento entre plantas y animales son bastante similares (Sotelo *et al.*, 2010; Ávila *et al.*, 2013).

Es importante mencionar que tanto la insulina como el ZmIGF promueven la fosforilación de la proteína ribosomal S6 en la subunidad ribosomal 40 S a través de la activación de la vía de transducción de señales TOR, de forma similar como se observa cuando se adiciona insulina bovina en células de mamíferos (Sánchez de Jiménez, *et al.*, 1999; Dinkova, *et al.*, 2007).

El presente trabajo de investigación está basado en la siguiente

2. HIPÓTESIS

El ZmlGF modifica en forma específica el estado de fosforilación de las proteínas ribosomales durante la germinación de semillas de maíz.

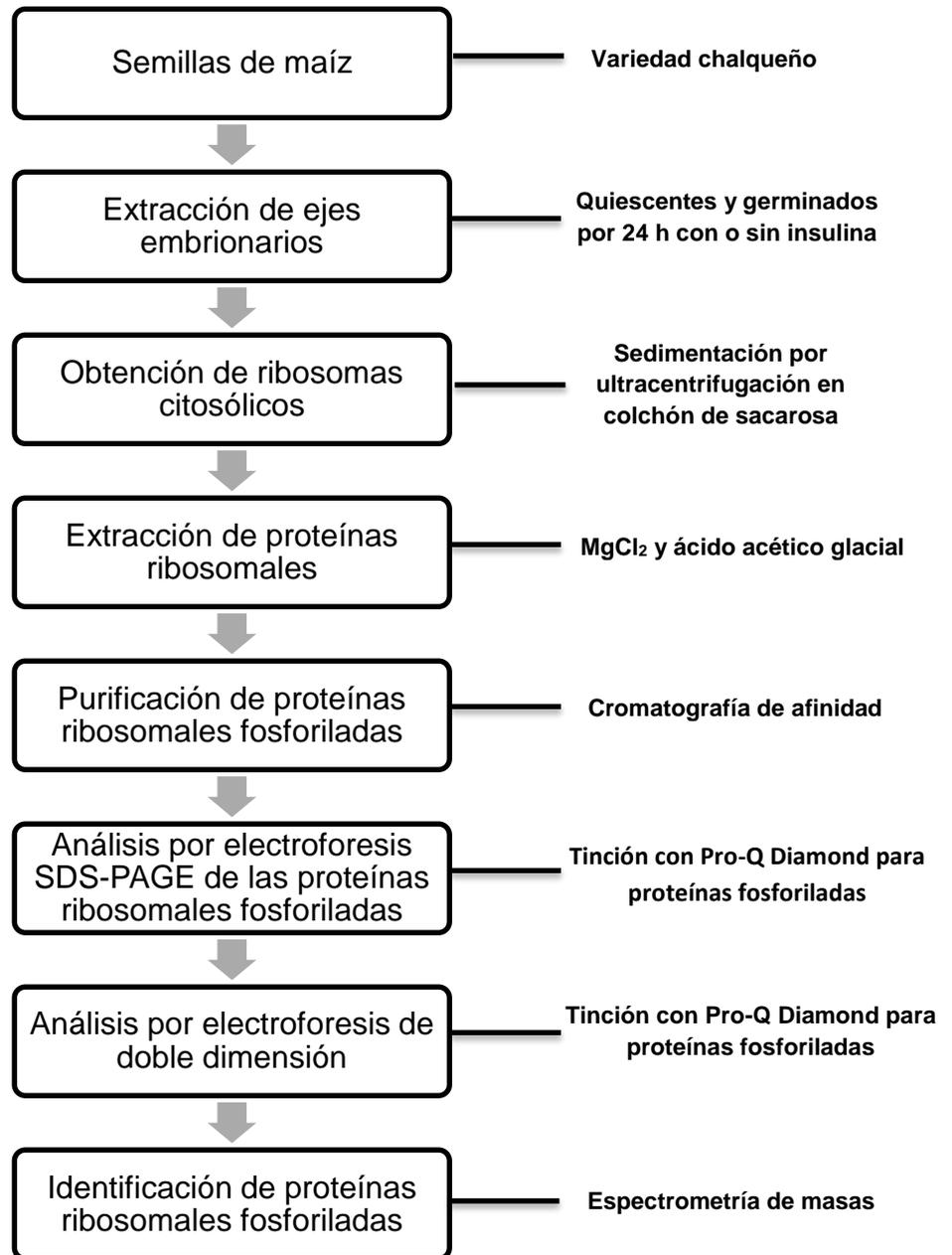
3. OBJETIVO GENERAL

Estudiar los cambios que ocurren en la fosforilación de las proteínas ribosomales en los ejes embrionarios de las semillas quiescentes de maíz y durante la germinación de las mismas, en presencia o ausencia del factor de crecimiento tipo insulina.

4. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Conocer el patrón de fosforilación de las proteínas ribosomales en los ejes de maíz sin germinar.
2. Conocer el patrón de fosforilación de las proteínas ribosomales en los ejes de maíz germinados por 24 horas con o sin la adición del factor de crecimiento tipo insulina.
3. Identificar qué proteínas ribosomales están fosforiladas en los ejes embrionarios quiescentes y cuáles proteínas ribosomales se fosforilan después de la germinación con o sin la adición del factor de crecimiento tipo insulina.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Equipos y reactivos

Tabla 2. Lista de equipos y reactivos utilizados.

Equipo o reactivo	Compañía
ChemiDoc XRS. Protean IEF Cell. Ready Gel IEF 3-15%. Tiras IPG pH 3-10.	Bio-Rad (Berkeley, California, EUA)
Epoch.	BioTek (Winooski, Vermont, EUA)
Anticuerpo contra fosfoserina Q5. Kit de purificación de fosfoproteínas.	Qiagen (Venlo, Hilden, Alemania)
Sustrato para la peroxidasa Luminata Crescendo.	Merck Millipore (Billerica, Massachusetts, EUA)
Tabletas inhibidoras de proteasas Complete.	Roche (Basilea, Suiza)
Anticuerpos contra S2, S6, L13 y L29.	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, EUA)
Anfolitos Pharmalyte pH 3-10. Coctel 3 inhibidor de fosfatasas.	Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA)
Colorante de fosfoproteínas Pro-Q Diamond. Estándares de peso molecular PeppermintStick. NanoDrop 2000.	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EUA)

6.2 Material biológico

Se trabajó con semillas de maíz (*Zea mays* L.) de la variedad Chalqueño, las semillas se lavaron con etanol al 70% y posteriormente con hipoclorito de sodio al 1%. Las semillas se germinaron en algodón y agua, conteniendo o no insulina en solución (200 μ U/mL). Las semillas se incubaron a 28°C por 24 h. Los ejes quiescentes y germinados por 24 h se extrajeron manualmente con un bisturí e inmediatamente se congelaron con nitrógeno líquido para su almacenamiento a -70°C hasta su uso.

6.3 Extracción de ribosomas citosólicos

Se siguió la metodología descrita por Davies y Abe, (1995) con algunas modificaciones. A partir de los ejes embrionarios de semillas quiescentes y germinadas con o sin insulina, se aislaron los ribosomas citosólicos. Los ejes embrionarios se homogeneizaron con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino el cual se resuspendió en 5 mL (por cada gramo de ejes) de solución amortiguadora de extracción (Tris-HCl 200 mM pH 7.6, KCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, EGTA 2 mM, β-mercaptoetanol al 0.5%, heparina al 1%, polioxi etileno 10-tridecil éter al 2%, desoxicolato de sodio al 1%, una tableta inhibidora de proteasas, inhibidores de fosfatasa al 0.5%). La mezcla resultante se incubó en hielo por 20 minutos y se homogeneizó 2 veces por 2 minutos con el politrón Ultra Turrax. El material se centrifugó a 27000 x g por 30 minutos a 4°C y el sobrenadante se adicionó sobre 6 mL de una solución de sacarosa (sacarosa 1 M, Tris-HCl 50 mM pH 7.6, KCl 25 mM, MgCl₂ 10 mM, β-mercaptoetanol al 0.5%). Los ribosomas citoplásmicos se sedimentaron en la solución de sacarosa mediante ultracentrifugación a 100,000 x g por 4 horas a 4°C. El sedimento ribosomal se enjuagó con agua estéril y se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.4 Cuantificación de ribosomas citosólicos

El sedimento de ribosomas citosólicos se resuspendió en agua estéril y se midió su absorbancia a una longitud de onda de 260 nm en el espectrofotómetro NanoDrop utilizando agua desionizada estéril como blanco. El valor de la absorbancia a 260 nm dividido entre 11.1 equivale a la concentración de ribosomas en mg/mL (Turkina *et al.*, 2011).

6.5 Extracción de proteínas ribosomales

Las proteínas ribosomales se obtuvieron de los ribosomas citosólicos aislados previamente (Siegmann y Thomas, 1987; Pérez *et al.*, 1993; Williams *et al.*, 2003). El sedimento de ribosomas citosólicos se resuspendió en agua estéril y se le adicionaron 0.1 volúmenes de MgCl₂ 1M y dos volúmenes de ácido acético glacial en rápida sucesión. El material se agitó suavemente por una hora a 4°C. Se

centrifugó a 14,000 x *g* por 10 min a 4°C para remover el rRNA. A partir del sobrenadante se obtuvieron las proteínas ribosomales mediante precipitación con cuatro volúmenes de acetona a -20°C por 12 h. Posteriormente se centrifugó a 14,000 x *g* por 10 min a 4°C. El precipitado de proteínas ribosomales se lavó una vez con acetona al 80%, 4°C y otra con etanol absoluto a 4°C, se centrifugó en cada lavado a 14,000 x *g* por 10 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y el sedimento de proteínas ribosomales se secó a temperatura ambiente por 5 minutos y después se liofilizó. El pellet de proteínas ribosomales se almacenó a -20 °C hasta su uso.

6.6 Cuantificación de proteínas mediante la técnica de Bradford

Las muestras de proteínas ribosomales se cuantificaron siguiendo la técnica de Bradford (Bradford, 1976) y se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) como proteína estándar. Los pellets de proteínas ribosomales se resuspendieron en 500 µL de agua estéril. Se tomó una muestra de la solución resultante y se hizo reaccionar con el reactivo de Bradford, después de un minuto en agitación se midió la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 595 nm en el lector de placas Epoch. Para realizar la curva patrón se utilizó una solución de 0.5 mg/ml de BSA para cubrir un rango de proteína de 0 µg a 7.5 µg de BSA. Se graficaron los resultados y se realizó la regresión lineal de los mismos, la ecuación resultante de la curva patrón se utilizó para obtener la concentración de las muestras de proteínas ribosomales en unidades de mg/mL.

6.7 Cuantificación de proteínas mediante UV

Las muestras de proteínas ribosomales utilizadas para las electroforesis en una y dos dimensiones se cuantificaron mediante espectrofotometría en la región ultravioleta a 280 nm. Esta técnica se basa en la absorción de la radiación en el ultravioleta cercano (280 nm) por las proteínas, dependiendo del contenido de aminoácidos aromáticos en la muestra, como tirosina y triptófano (y en menor grado del contenido de fenilalanina) (Aitken y Learmonth, 2002).

Los sedimentos de proteínas ribosomales se resuspendieron en 500 μL de agua estéril y se midió la absorbancia a 280 nm en el NanoDrop. Se utilizó agua desionizada estéril como blanco y la concentración de las muestras se obtuvo en unidades de mg/mL.

6.8 Purificación de proteínas fosforiladas mediante cromatografía de afinidad

Las proteínas ribosomales fosforiladas se purificaron a partir de las muestras de proteínas ribosomales totales, extraídas de los ejes embrionarios de maíz. Se utilizó el kit de purificación de fosfoproteínas siguiendo el protocolo del fabricante (QIAGEN, 2011). Esta técnica se basa en la purificación de las proteínas fosforiladas mediante cromatografía de afinidad. Las columnas de purificación contienen en su fase estacionaria ligandos (iones metálicos) afines a los grupos fosfato, por lo que al introducir la muestra, las proteínas con fosforilaciones se unen a los ligandos y se quedan retenidas en la columna hasta su elución con el amortiguador que contiene sales de fosfato.

La columna de purificación se equilibró con 4 mL de la solución A [Amortiguador de lisis y 0.25 % (w/v) de solución 3-(3-Colamidopropil-dimetilamonio)-propanosulfonato (CHAPS)]. Se ajustó la concentración de proteínas ribosomales a 0.1 mg/mL (mediante la técnica de Bradford) en una solución final (10 μL de Benzonase Nuclease, una tableta de inhibidores de proteasas y solución A) de 25 mL. La solución resultante con 2.5 mg de proteína ribosomal, se pasó a través de la columna para la unión de las proteínas ribosomales fosforiladas con los ligandos de la columna. Se lavó la columna con 6 mL de solución A para eluir todas las proteínas no fosforiladas de la resina, ésta fracción se colectó para su posterior análisis. Se eluyeron las proteínas ribosomales fosforiladas con 2 mL de solución B [Amortiguador de elución y 0.25 % (w/v) de solución CHAPS]. Se llevó a cabo la precipitación de las proteínas ribosomales, tanto fosforiladas como no fosforiladas, utilizando acetona hasta un 80% por 12 h a 4°C. Las proteínas ribosomales fosforiladas y no fosforiladas se sedimentaron mediante centrifugación a 12,000 $\times g$ por 10 min a 4°C. El pellet resultante de proteínas se secó por 5 min a temperatura ambiente y posteriormente se liofilizó. Se analizó el perfil de las

proteínas fosforiladas y no fosforiladas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE).

6.9 Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis SDS-PAGE es un método analítico que permite separar a las proteínas en relación a su masa molecular. La adición del detergente iónico dodecilsulfato sódico (SDS) a las proteínas genera la formación de complejos SDS-proteína causando la desnaturalización de las proteínas y confiriéndoles cargas negativas. De esta forma las proteínas cargadas negativamente migrarán desde el cátodo hasta el ánodo durante la electroforesis y se separarán en el gel de poliacrilamida en función de sus tamaños moleculares.

Se realizaron distintos ensayos de electroforesis SDS-PAGE para el análisis de las muestras de proteínas ribosomales fosforiladas y proteínas ribosomales totales.

Se utilizaron 30 µg de proteínas ribosomales para cada estado evaluado. Se adicionó solución de carga (Tris 0.12 M, SDS 4%, β-mercaptoetanol al 10%, glicerol al 20%, azul de bromofenol al 2 mg/mL) a las muestras de proteínas ribosomales y a los estándares de peso molecular con fosfoproteínas PeppermintStick. Posteriormente, las muestras se incubaron a 85°C por 5 min para la desnaturalización de las proteínas y se cargaron en los geles MiniProtean TGX de 4-15% de poliacrilamida. La electroforesis se realizó a 100 V por 2 horas o hasta que el frente de corrida alcanzara el borde del gel.

6.10 Western blot

Se realizaron ensayos de western blot para identificar la presencia de las proteínas ribosomales S2, S6, L13 y L29, así como la identificación de las proteínas con fosforilaciones en residuos de serina. Para ello, se utilizaron anticuerpos específicos para S2, S6, L13, L29 y anti-fosfoserina.

La técnica de western blot se basa en una previa separación de las proteínas mediante SDS-PAGE y posteriormente la transferencia de estas proteínas a una

membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) para su identificación con anticuerpos específicos.

La electroforesis SDS-PAGE se realizó al 15% de acrilamida y se corrió 3 h a 100 V. Al finalizar, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF con un tamaño de poro de 0.2 μm , durante 1 hora y 15 minutos a 100 V, utilizando una solución de transferencia con pH 8.3 (Tris-HCl 12.5 mM, glicina 96 mM, metanol al 20 %, SDS al 20%).

6.10.a Titulación de anticuerpos primarios anti-S2, anti-S6, anti-L13 y anti-L29

Antes de realizar la técnica de inmunodetección se evaluaron diferentes diluciones de los anticuerpos primarios para determinar la dilución adecuada a utilizar. Se usaron anticuerpos primarios, específicos para las proteínas ribosomales S2, S6, L13 y L29 de Santa Cruz Biotechnology. Se evaluaron las diluciones que se mencionan en la Tabla 3 mediante ensayos de western blot utilizando muestras de proteína ribosomal de ejes de maíz germinados por 24 horas.

Tabla 3. Diluciones utilizadas para la titulación de los anticuerpos primarios

Anticuerpo primario	No. de catálogo	Diluciones
Anti-S2	Sc-135389	1:200; 1:1000; 1:2000; 1:10000
Anti-S6	Sc-20085	1:200; 1:1000; 1:2000; 1:10000
Anti-L13	Sc-133960	1:200; 1:1000; 1:2000; 1:10000
Anti-L29	Sc-103166	1:200; 1:1000; 1:2000; 1:10000

6.10.b Western blot anti-S2, anti-S6, anti-L13 y anti-L29

Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios:

- Anti-S2 IgG policlonal de conejo. Sc-135389
- Anti-S6 IgG policlonal de conejo. Sc-20085
- Anti-L13 IgG policlonal de conejo. Sc-133960
- Anti-L29 IgG policlonal de cabra. Sc-103166

Se llevó a cabo la electroforesis SDS-PAGE con muestras de proteínas ribosomales fosforiladas y proteínas ribosomales no fosforiladas (purificadas por cromatografía de afinidad). Posteriormente estas proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF. Después de la transferencia, la membrana se incubó por una hora a temperatura ambiente con una solución de leche descremada al 5% (w/v) en el amortiguador salino tris con tween 20 (TBS-T) (Tris-HCl 10 mM, pH 7.6; NaCl 0.14 M; tween 20 al 0.25%). Se lavó la membrana dos veces por 10 minutos cada vez en solución de TBS-T (Solución TBS, tween 20 al 0.1%) y una vez por 10 minutos en solución TBS (Tris-HCl 10 mM, pH 7.6, NaCl 0.14 M). Se incubó la membrana con cada anticuerpo primario (anti-S2, anti-S6 y anti-L13) durante toda la noche a 4°C en una solución TBS-T al 0.25%. La membrana se lavó dos veces por 10 minutos cada vez en solución TBS-T al 0.25% y una vez por 10 minutos con solución TBS-T al 0.1%. Se procedió a incubar la membrana con el anticuerpo secundario (Tabla 4) en la solución TBS-T al 0.1% durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente la membrana se lavó dos veces por 10 minutos cada vez en TBS-T al 0.1% y un tercer lavado con la solución TBS por 10 minutos.

Tabla 4. Características de los anticuerpos secundarios utilizados en el western blot para la detección de las proteínas ribosomales S2, S6, L13 y L29.

Proteína ribosomal	Anticuerpo secundario	Dilución del anticuerpo
S2 S6 L13	IgG anti-conejo acoplado a fosfatasa alcalina, SIGMA.	1:1000
L29	IgG anti-cabra acoplado a peroxidasa, ZYMED	1:2000

Por último, se llevó a cabo la reacción de detección de las proteínas ribosomales, el tipo de reacción (colorimétrica o quimioluminiscente) fue determinado por la enzima acoplada al anticuerpo secundario que se utilizó (fosfatasa alcalina o peroxidasa).

La reacción de detección de las proteínas ribosomales S2, S6 y L13 se llevó a cabo mediante colorimetría con la enzima fosfatasa alcalina. Para esto se incubó la membrana por 5 minutos en una solución amortiguadora para fosfatasa (Tris

base 1 M, pH 9.5; NaCl 0.1 M; MgCl₂ 5 mM), se desechó la solución anterior y se adicionaron 10 mL de la solución para fosfatasa en la cual se agregaron los sustratos para la fosfatasa alcalina; 100 µL de azul nitro tetrazolio (33 mg/mL de dimetilsulfóxido (DMSO) al 70%) y 100 µL de 5-Br-4Cl-3-indol fosfato toluidina (7mg/mL DMSO al 100%). La membrana se incubó con la solución anterior hasta la aparición de bandas color café. Para detener la reacción, la membrana se lavó con agua (50 mL) y se adicionaron 50 µL de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.5 M para evitar la coloración café del fondo de la membrana.

En cambio, la reacción de detección para la proteína ribosomal L29 se realizó mediante quimioluminiscencia con la enzima peroxidasa. Para esto la membrana se hizo reaccionar directamente con el sustrato para la peroxidasa Luminata Crescendo.

6.10.c Western blot anti-fosfoserina

Se realizó la electroforesis SDS-PAGE utilizando 30 µg de proteína ribosomal para cada estado evaluado y se utilizaron estándares de peso molecular con dos fosfoproteínas y cuatro proteínas sin fosforilar PeppermintStick como controles positivos y negativos respectivamente. Al finalizar se llevó a cabo la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF. Posteriormente y siguiendo la metodología de QIAGEN (2011), la membrana se lavó dos veces por 10 minutos cada vez a temperatura ambiente (15 - 25°C) con una solución de TBS. La solución anterior se desechó y la membrana se incubó por una hora a temperatura ambiente con una solución de BSA al 5% (w/v) en TBS-T al 0.1%. La membrana se lavó dos veces por 10 minutos cada vez en solución de TBS-T al 0.1% y una vez por 10 minutos en solución TBS. La membrana se incubó con el anticuerpo primario anti-fosfoserina de ratón Q5 (# de cat. 37430) en una dilución 1:350 durante toda la noche a 4°C utilizando una solución TBS-T al 0.1%. La membrana se lavó dos veces por 10 minutos cada vez en solución TBS-T al 0.1% y una vez por 10 minutos con solución TBS. Se incubó la membrana con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a fosfatasa alcalina en una dilución 1:2000 en la

solución TBS-T al 0.1% durante una hora a temperatura ambiente. La membrana se lavó cuatro veces por 10 minutos cada vez en TBS-T al 0.1%.

La reacción de detección por colorimetría se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento que en el punto 6.10.b.

6.11 Electroforesis de doble dimensión (2 DE)

La electroforesis de doble dimensión permite separar a las proteínas en la primera dimensión de acuerdo con su punto isoeléctrico y en la segunda dimensión de acuerdo con su peso molecular. Las proteínas son separadas en la primera dimensión en función de su carga eléctrica a través de un proceso llamado isoelectroenfoque (IEF). Un gradiente de pH es crítico para el proceso de IEF, así como los cambios en la carga neta de las proteínas a diferentes puntos en el gradiente de pH. Cuando el gradiente de pH del medio es igual al punto isoeléctrico (pI) de la proteína, ésta alcanza una posición de equilibrio en el campo eléctrico y se focaliza. De esta manera todas las proteínas en una muestra pueden migrar hasta alcanzar sus puntos isoeléctricos y focalizarse en el gel. La segunda dimensión se realiza por electroforesis SDS-PAGE en donde las proteínas se separan en función de su peso molecular.

La técnica de IEF (Agrawal y Thelen, 2009) se realizó utilizando tiras de gradientes de pH inmovilizados (IPG) de 7 cm en un rango de pH de 3 a 10, en el equipo PROTEAN IEF Cell. Para rehidratar la tira IPG se utilizaron 250 μ g de proteínas ribosomales resuspendidas en 150 μ L de solución de extracción de isoelectroenfoque (urea 8 M, tiourea 2 M, CHAPS al 2%, Triton X-100 al 2%, ditiotreitól (DTT) 50 mM) y con anfólitos Pharmalyte pH 3-10 al 0.5%. Se mezcló con pipeta y se centrifugó a 20,000 \times g por 15 minutos a 20°C para separar cualquier sedimento. Se pipeteó el sobrenadante sobre el pocillo de la placa de focalización de un extremo a otro de los electrodos, se colocó la tira IPG con el lado del gel hacia abajo en contacto con los dos extremos de los electrodos, se adicionó 1 mL de aceite mineral sobre la tira IPG para evitar la deshidratación durante la focalización. Se procedió a la rehidratación activa a 250 V por 12 h y se

continuó con tres etapas de focalización (S1: 250 V por 15 min, S2: 4000 V por 2 h, S3: 4000 V por 12 min) utilizando una corriente de 50 μ A por gel. Posterior a la focalización, la tira IPG se equilibró con la solución amortiguadora de reducción (Tris-HCl 50 mM pH 8.8, urea 6 M, glicerol al 30%, SDS al 4%, DTT al 2%) por 10 minutos en agitación suave a temperatura ambiente. Esta incubación fue requerida para saturar las tiras IPG con SDS y DTT como agente reductor. Se llevó a cabo un segundo paso de equilibrio de las tiras IPG con el amortiguador de alquilación (Tris-HCl 50 mM pH 8.8, urea 6 M, glicerol al 30%, SDS 4%, iodoacetamida al 2.5%) por 10 min en agitación suave a temperatura ambiente. Esta segunda incubación fue requerida para prevenir la re-oxidación de las proteínas durante la electroforesis y para alquilar el DTT residual, lo cual minimizaría las rayas verticales que pudieran aparecer en el gel.

Se procedió a la segunda dimensión mediante una electroforesis SDS-PAGE. Para esto, se colocó la tira IPG sobre el gel apilador de poliacrilamida y sellando con una solución de agarosa para asegurar el contacto de la tira IPG y el gel de poliacrilamida. La electroforesis se llevó a cabo por 2 horas a 100 V y 0.3 mA. Se utilizaron geles prefabricados Ready Gel IEF de 3-15% de poliacrilamida. El gel de electroforesis se enjuagó por 10 minutos con agua desionizada para retirar el exceso de SDS y permitir una tinción adecuada con el reactivo Pro-Q Diamond.

6.12 Tinción con Pro-Q Diamond

Los geles de electroforesis de una y dos dimensiones se tiñeron con el colorante Pro-Q Diamond. Este reactivo tiñe de forma específica a las proteínas fosforiladas en residuos de serina, treonina o tirosina mediante la detección por fluorescencia. El fundamento de esta técnica se basa en la formación de un complejo fluorescente con los grupos fosfatos de las proteínas y su posterior detección por luminiscencia. La formación del complejo fluorescente comienza por el enlace de los grupos fosfatos de las proteínas a un catión metálico trivalente. Posteriormente este último se une con un grupo quelante enlazado al fluoróforo. De esta forma al aplicar cierta longitud de onda para excitar, el fluoróforo emitirá luz en señal de la presencia de los complejos fluorescentes unidos a los grupos fosfatos (Agnew *et*

al., 2006; Steinberg, 2009). La señal de detección de la fosforilación de las proteínas con Pro-Q Diamond está relacionada linealmente con el número de residuos de aminoácidos fosforilados presentes en los péptidos o proteínas presentes (Invitrogen, 2010).

Al finalizar la electroforesis, se llevó a cabo la fijación de las proteínas, la tinción y los lavados del gel de poliacrilamida utilizando agitación suave a temperatura ambiente en cada paso. A partir de la tinción del gel y en los pasos subsecuentes se trabajó en un cuarto oscuro para excluir al gel de la luz debido a que el reactivo Pro-Q Diamond es fotosensible.

Para comenzar con la técnica el gel de electroforesis se fijó con 100 mL de una solución de metanol al 50% y ácido acético al 10%, dos veces por 30 minutos cada vez. Posteriormente se lavó con 10 mL de agua desionizada, tres veces por 10 minutos cada vez y se llevó a cabo la tinción del gel con 60 mL del reactivo Pro-Q Diamond por 90 minutos en un cuarto oscuro. Pasado el tiempo el gel se destiñó con 100 mL de una solución de acetonitrilo al 20% y acetato de sodio 50 mM pH 4, tres veces por 30 minutos cada vez. Se lavó el gel con 100 mL de agua desionizada, dos veces por 5 minutos cada vez y se realizó la detección mediante fluorescencia a una excitación máxima de 555 nm y una emisión máxima de 580 nm utilizando el equipo ChemiDoc XRS.

Después de la tinción con Pro-Q Diamond, el mismo gel se tiñó con azul de coomassie por 12 horas (Dyballa y Metzger, 2009).

6.13 Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas

Las manchas seleccionadas a partir de los geles de electroforesis de doble dimensión se identificaron por espectrometría de masas en la Unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

7. RESULTADOS

7.1 Germinación de semillas y extracción de proteínas ribosomales

En la Figura 3 se observan las semillas germinadas en ausencia o en presencia de insulina, así como los ejes embrionarios que se extrajeron de las semillas secas y de las germinadas. Como se puede observar en la Figura 3.II los ejes embrionarios extraídos de las semillas germinadas con insulina tienen una mayor longitud respecto a los ejes germinados sin insulina y a los ejes secos. Esto puede relacionarse con que la presencia de insulina estimula la actividad de la ruta TOR acelerando el proceso de germinación (Garrocho *et al.*, 2013; Villa *et al.*, 2013).

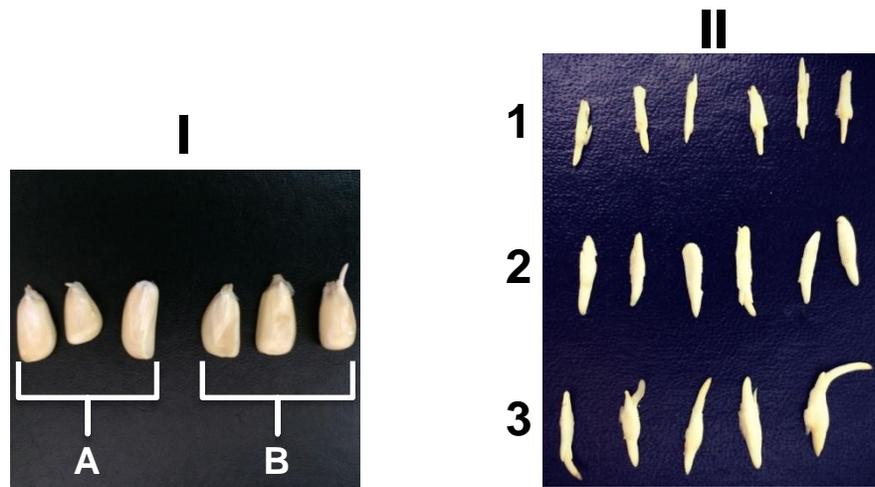


Figura 3. I. Semillas germinadas de maíz Var. Chalqueño: A) 24 horas a 28°C B) 24 horas a 28°C adicionando 200 μ U/mL de insulina. II. Ejes embrionarios de maíz diseccionados de las semillas: 1) Sin germinar 2) Germinadas por 24 h a 28°C 3) Germinadas por 24 h a 28°C adicionando 200 μ U/mL de insulina.

Se procedió a la extracción de las proteínas ribosomales a partir de los ejes embrionarios. En la Tabla 5 se presentan los rendimientos obtenidos de la extracción de ribosomas y en la Tabla 6 los rendimientos de la extracción de proteínas ribosomales, ambos rendimientos se expresan en valores de peso seco para la cantidad de ejes embrionarios, ya que de esta forma no se considera el contenido de agua presente, que en el caso de los ejes embrionarios germinados es mayor al de ejes sin germinar.

Tabla 5. Rendimiento de ribosomas citosólicos por gramo de ejes embrionarios de semillas sin germinar (0 h), germinadas por 24 horas (24 h) y germinadas por 24 h con insulina (24 h+I).

Estado	Ejes embrionarios (g) peso seco	Ribosomas citosólicos (mg)	Rendimiento (mg ribosomas/g de ejes peso seco)
0 h	3.5	25.6	7.3
24 h	1.1	13.7	12.4
24 h + I	1.2	14.5	12.1

Tabla 6. Rendimiento de proteína ribosomal por gramo de ejes embrionarios de semillas sin germinar (0 h), germinadas por 24 horas (24 h) y germinadas por 24 horas con insulina (24 h+I)

Estado	Ejes embrionarios (g) peso seco	Proteína ribosomal (mg)	Rendimiento (mg proteína/g de ejes peso seco)
0 h	3.5	7.2	2.0
24 h	1.1	5.2	4.7
24 h + I	1.2	6.4	5.3

La presencia de ZmIGF durante la germinación de semillas de maíz aumentó el número de proteínas ribosomales respecto a las semillas que se germinaron en agua (Tabla 6). Esto coincidió con lo ya reportado de la estimulación de la síntesis de algunas proteínas ribosomales cuando se activa la vía TOR estimulada por IGFs. Esta vía estimula el transporte de mRNAs específicos hacia los polisomas para su traducción (Levy *et al.*, 1991; Dinkova *et al.*, 2007).

7.2 Purificación de proteínas fosforiladas mediante cromatografía de afinidad

Las proteínas ribosomales fosforiladas se purificaron mediante ensayos de cromatografía de afinidad. Estas proteínas se analizaron mediante electroforesis SDS-PAGE para observar el patrón de fosforilación (Figura 4).

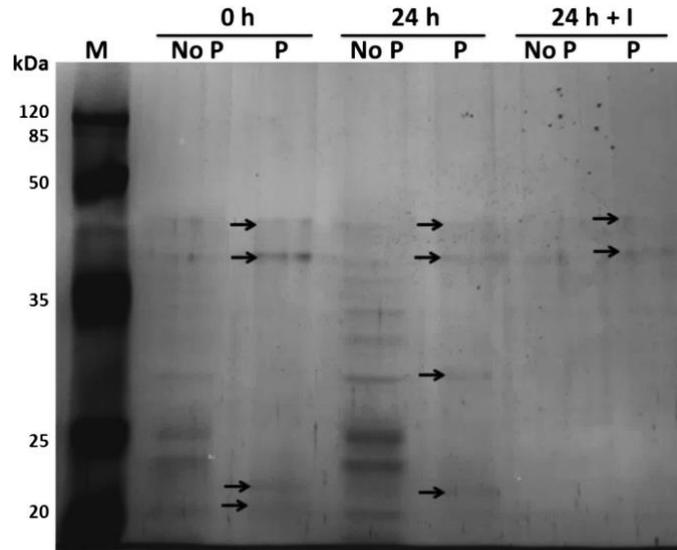


Figura 4. Gel de electroforesis SDS-PAGE con proteínas ribosomales fosforiladas (P) y proteínas ribosomales no fosforiladas (No P) de ejes de semillas de maíz sin germinar (0 h); germinadas por 24 horas (24 h); y germinadas por 24 h en presencia de insulina (24 h+I). Se presenta el gel teñido con azul de coomassie. M: marcadores de peso molecular.

Con este análisis se pudo observar la presencia de al menos cuatro proteínas ribosomales fosforiladas de 20, 30, 37 y 38 kDa aproximadamente. Sin embargo, la purificación por cromatografía de afinidad tuvo un rendimiento bajo en la obtención de proteínas ribosomales fosforiladas lo cual limitó la cuantificación de las proteínas y no se pudo cargar la misma cantidad de muestra en los carriles de la electroforesis SDS-PAGE (Figura 4). Para saber la identidad de las proteínas ribosomales fosforiladas que se encontraron en esta electroforesis SDS-PAGE se realizaron ensayos de western blot.

7.3 Detección de las proteínas ribosomales S2, S6, L13 y L29 mediante western blot

Las proteínas ribosomales S2, S6, L13 y L29 se han reportado como susceptibles a la fosforilación en tejidos de *A. thaliana* (Turkina *et al.*, 2011; Boex-Fontvieille *et al.*, 2013), por lo que se eligieron como candidatos que podrían modificar su estado de fosforilación en las semillas germinadas con o sin insulina.

Antes de realizar los ensayos de western blot se establecieron los títulos adecuados para cada anticuerpo primario contra las proteínas ribosomales S2, S6, L13 y L29, con este propósito se probaron las diluciones 1:200, 1:1000, 1:2000 y 1:10000 para cada anticuerpo (Figura 5).

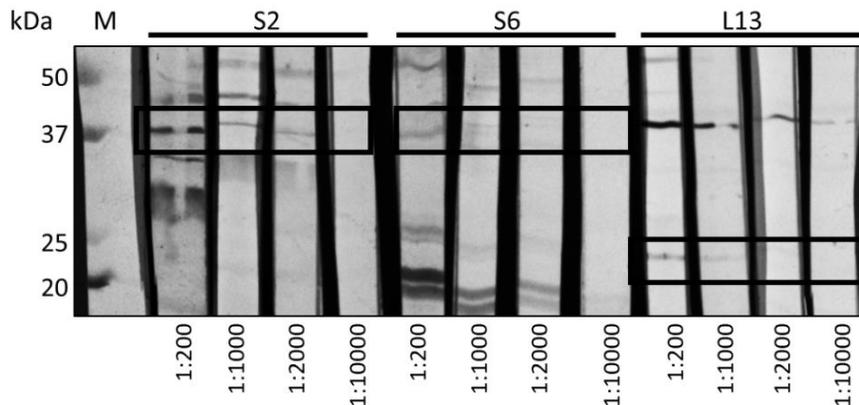


Figura 5. Titulación de anticuerpos primarios contra las proteínas ribosomales S2, S6 y L13. Se evaluaron las diluciones 1:200, 1:1000, 1:2000 y 1:10000 de cada anticuerpo. Los rectángulos muestran la proteína ribosomal que correspondería con S2, S6 y L13 de acuerdo con su peso molecular. M: marcadores de peso molecular. Membrana revelada con fosfatasa alcalina.

Para el anticuerpo anti-S2 se eligió la dilución 1:1000; para anti-S6 la dilución 1:200 y para anti-L13 la dilución 1:200. La titulación del anticuerpo contra la proteína ribosomal L29 se realizó siguiendo la misma metodología excepto la detección que se hizo mediante quimioluminiscencia. Sin embargo, no se detectó señal, lo cual se podría atribuir a que la proteína L29, al tener un bajo peso molecular de aproximadamente 7 kDa, no se retuvo en el gel de poliacrilamida durante la electroforesis o a que el anticuerpo anti-L29 no fue específico (Imagen no mostrada).

Para la detección de las proteínas ribosomales S2, S6 y L13 (Figura 6) se partió de muestras de proteínas ribosomales fosforiladas y no fosforiladas obtenidas por cromatografía de afinidad.

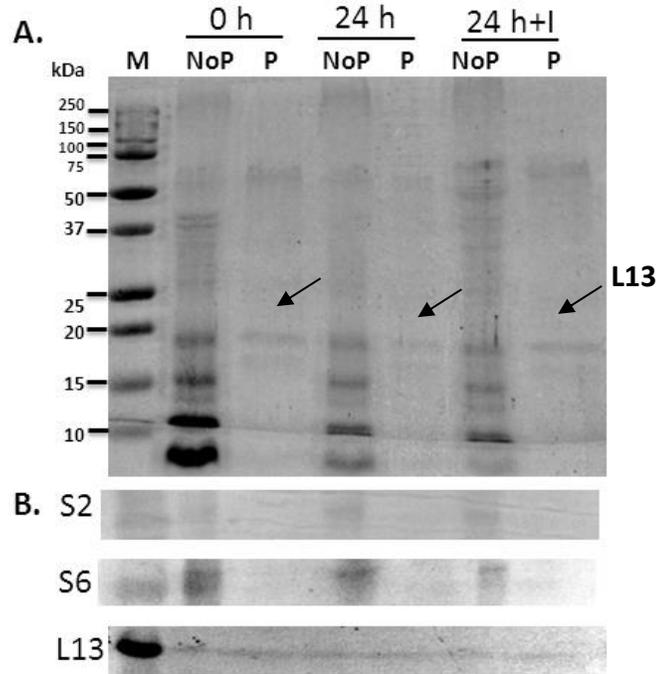


Figura 6. **A.** Gel de electroforesis SDS-PAGE teñido con azul de coomassie. Se utilizaron muestras de proteínas purificadas mediante cromatografía de afinidad. Proteínas ribosomales de ejes sin germinar (0 h); Proteínas ribosomales de ejes germinados 24 h a 28°C (24 h); Proteínas ribosomales de ejes germinados 24 h a 28°C en presencia de insulina (24 h+I); Proteínas ribosomales no fosforiladas (NoP); Proteínas ribosomales fosforiladas (P); Marcadores de peso molecular (M). **B.** Western blot contra las proteínas ribosomales S2, S6 y L13, revelado con fosfatasa alcalina.

Se observó la presencia de la proteína ribosomal fosforilada L13 de 20 kDa en los ejes embrionarios de maíz sin germinar y se encontró que su estado de fosforilación no cambió por la germinación o por la adición de insulina (Figura 6B).

No fue posible detectar las proteínas ribosomales fosforiladas S2 y S6, lo cual se atribuyó a la baja cantidad de proteínas ribosomales fosforiladas presentes en la electroforesis ya que en el gel teñido con azul de coomassie no se observó alguna proteína fosforilada en el tamaño correspondiente a 28-30 kDa, que sería el peso

molecular de S2 o S6, mostrando que la purificación de proteínas fosforiladas por cromatografía de afinidad tuvo un rendimiento muy bajo.

7.4 Detección de las fosforilaciones en residuos de serina mediante western blot

Con el propósito de tener otras evidencias de los cambios en fosforilación de las proteínas ribosomales y como la mayoría de las fosforilaciones de las proteínas ribosomales reportadas en eucariontes han sido en residuos de serinas (Turkina *et al.*, 2011; Boex-Fontvieille *et al.*, 2013), se decidió realizar la inmunodetección de las fosforilaciones de proteínas ribosomales en los residuos de serina (anti-fosfoserina) por western blot (Figura 7).

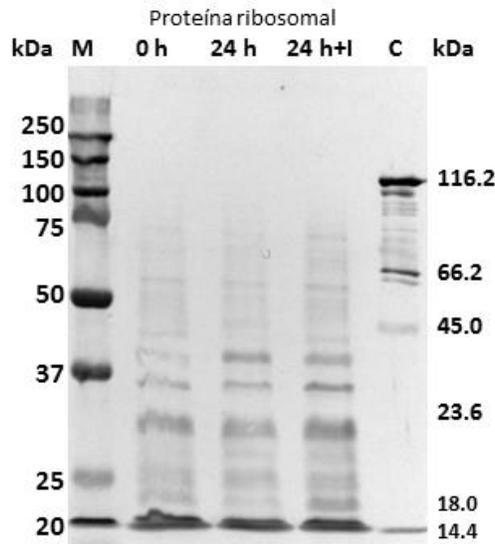


Figura 7. Western blot anti fosfo serina, utilizando 30 μ g de proteína ribosomal en cada estado. (0 h) proteínas ribosomales de ejes sin germinar; (24 h) proteínas ribosomales de ejes germinados 24 h a 28 °C; (24 h+I) proteínas ribosomales de ejes germinados 24 h a 28 °C en presencia de insulina. (M) Marcadores de peso molecular; (C) Marcadores de peso molecular con fosfoproteínas, controles positivos (45.0 y 23.6 kDa) y negativos de fosforilación (116.2, 66.2, 18.0 y 14.4 kDa).

Como puede observarse en la Figura 7 el anticuerpo anti-fosfoserina fue inespecífico ya que los controles negativos que se incluyeron (116.2, 66.2, 18 y

14.4 kDa) también dieron señal en el western blot. Por lo que esta técnica no se utilizó para analizar el patrón de fosforilación.

7.5 Identificación de la fosforilación de las proteínas ribosomales con Pro-Q Diamond mediante electroforesis SDS-PAGE

El reactivo Pro-Q Diamond tiene la capacidad de teñir proteínas fosforiladas con una alta sensibilidad (16 ng de fosfoproteína por banda), por lo que se utilizó para identificar a las proteínas ribosomales fosforiladas (Figura 8).

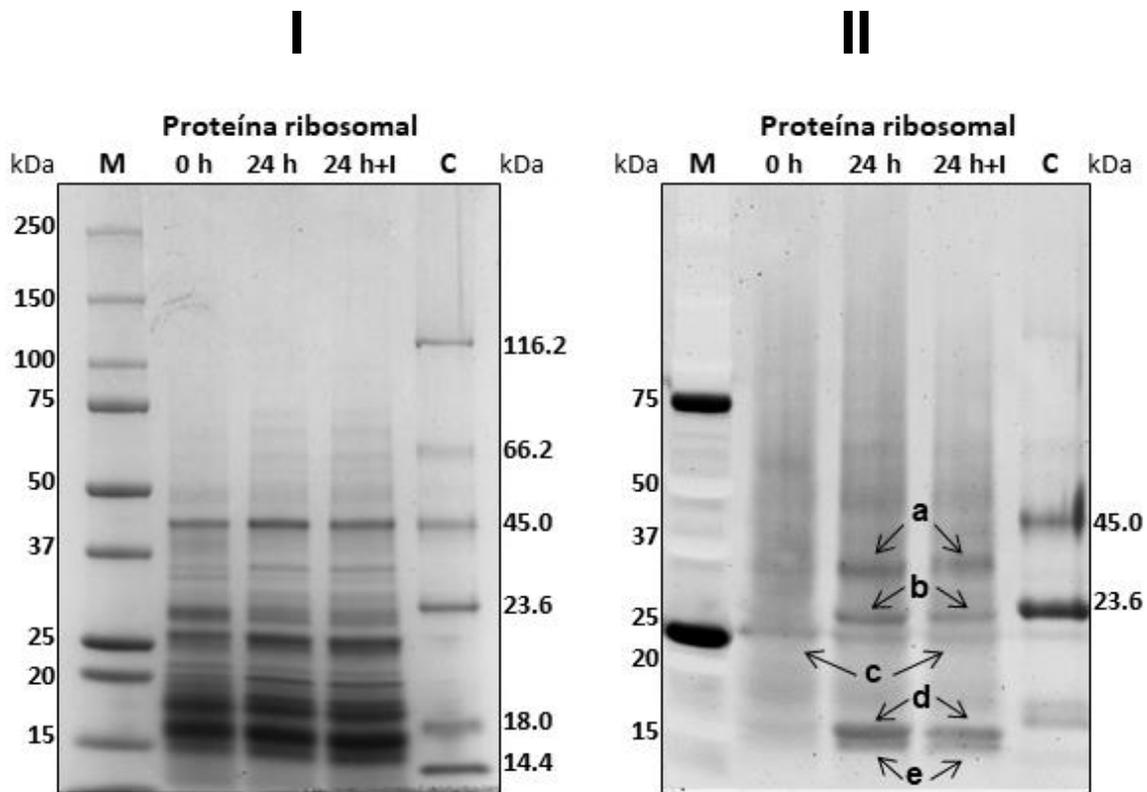


Figura 8. Electroforesis SDS-PAGE con 30 μ g de proteína ribosomal. **(I)** Gel teñido con azul de coomassie. **(II)** Gel teñido con Pro-Q Diamond. **0 h**: Proteína ribosomal de semillas sin germinar; **24 h**: Proteína ribosomal de semillas germinadas por 24 horas; **24 h+I**: Proteína ribosomal de semillas germinadas por 24 horas con insulina; **M**: Marcadores de peso molecular; **C**: Marcadores de peso molecular con fosfoproteínas, controles positivos (45.0 y 23.6 kDa) y negativos de fosforilación (116.2, 66.2, 18.0 y 14.4 kDa).

Los resultados muestran que en los ejes de semillas sin germinar se encuentra una proteína fosforilada de 24 kDa (marcada con la letra “c”), y su grado de fosforilación no se afectó por la germinación o por la adición de insulina (Figura 8.II). Por su peso molecular esta proteína podría corresponder con la proteína ribosomal L13, respaldando los resultados de la inmunodetección de L13 en donde se observó el mismo comportamiento (Figura 6B).

En general se observó que en los ejes embrionarios de semillas germinadas por 24 horas con o sin insulina la fosforilación de las proteínas ribosomales aumentó, respecto a los ejes sin germinar. Se observaron cuatro proteínas ribosomales fosforiladas con pesos moleculares de 36, 25, 14 y 13 kDa (“a”, “b”, “d” y “e” respectivamente), las cuales mantuvieron su grado de fosforilación durante la germinación en presencia de insulina (Figura 8.II).

La proteína de aproximadamente 36 kDa podría corresponder a la proteína ribosomal P0 por su peso molecular, la cual se ha encontrado frecuentemente fosforilada en eucariontes (Arpin *et al.*, 1978; Bailey *et al.*, 1997; Tchórzewski *et al.*, 2000).

La proteína que tiene un peso molecular de 25 kDa aproximadamente podría corresponder con las proteínas ribosomales S2 y/o S6. Ambas proteínas ribosomales han sido reportadas en organismos eucarióticos como susceptibles a la fosforilación (Boex-Fontvieille *et al.*, 2013; Rosner *et al.*, 2013).

Las proteínas que tienen un peso molecular de 13-14 kDa podrían corresponder con las proteínas ribosomales ácidas P1, P2 o P3 que se han reportado como blancos importantes para la fosforilación en el control del crecimiento celular (Tchórzewski *et al.*, 2000; Wahl y Möller, 2002; Liljas, 2004).

Con estos resultados se observó que hubo un aumento en el número de proteínas ribosomales fosforiladas durante la germinación por 24 horas, independientemente de la adición de insulina al medio, por lo que con el objetivo de tener una mayor resolución de los patrones de fosforilación de las proteínas ribosomales se realizaron electroforesis de doble dimensión.

7.6 Análisis de la fosforilación de proteínas ribosomales mediante electroforesis de doble dimensión

Para obtener una mejor resolución de las proteínas ribosomales fosforiladas se empleó la técnica de electroforesis en dos dimensiones (Isoelectroenfoco y SDS-PAGE).

Las proteínas ribosomales fosforiladas se tiñeron con Pro-Q Diamond en los geles de doble dimensión (Figura 9). A partir de estos geles se seleccionaron algunas proteínas y se identificaron mediante espectrometría de masas (Tabla 7).

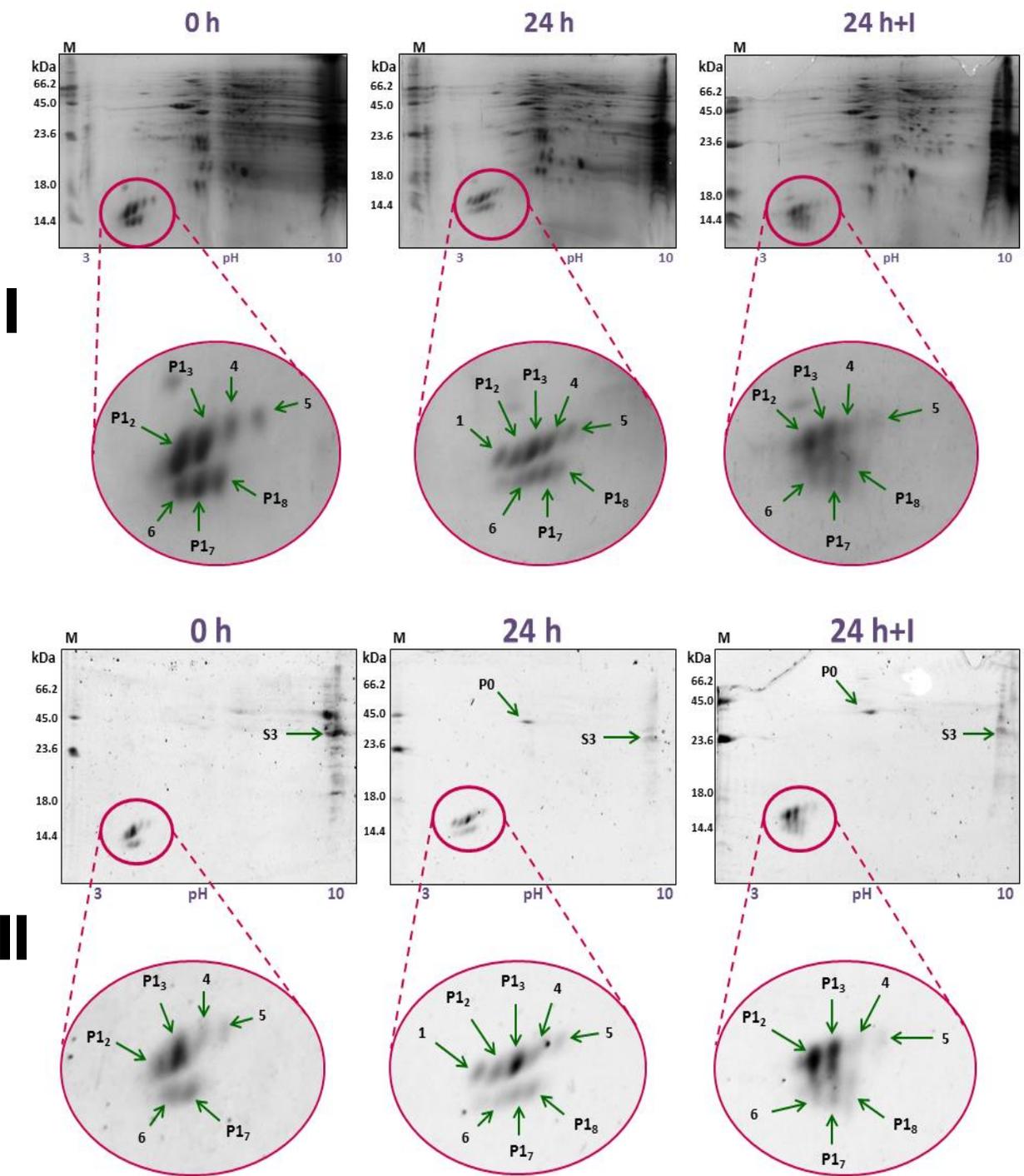


Figura 9. Electroforesis de doble dimensión con 250 μ g de proteína ribosomal. (I) Geles teñidos con azul de coomassie. (II) Geles teñidos con Pro-Q Diamond. 0 h: Proteína ribosomal de semillas sin germinar, 24 h: Proteína ribosomal de semillas germinadas por 24 horas, 24 h+I: Proteína ribosomal de semillas germinadas por 24 horas con insulina. M: Marcadores de peso molecular con fosfoproteínas (45.0 y 23.6 kDa).

Tabla 7. Resultados de la identificación de proteínas ribosomales fosforiladas mediante espectrometría de masas a partir de las proteínas seleccionadas en los geles de doble dimensión.

Proteína seleccionada en el gel de doble dimensión	Identificación por espectrometría de masas
S3	Proteína ribosomal S3
P0	Proteína ribosomal P0
P1₂	Proteína ribosomal ácida P1
P1₃	Proteína ribosomal ácida P1
P1₇	Proteína ribosomal ácida P1
P1₈	Proteína ribosomal ácida P1

La electroforesis de doble dimensión mostró ocho proteínas ribosomales ácidas de pesos moleculares parecidos, con cambios en el grado de fosforilación en los estados evaluados (Figura 9.II). Estas ocho proteínas ribosomales ácidas se enumeraron del 1 al 8, de las cuales se identificó por espectrometría de masas a la proteína ribosomal ácida P1 en cuatro copias (P1₂, P1₃, P1₇ y P1₈) que presentaron diferentes estados de fosforilación debido al proceso de germinación y por la adición de insulina como factor de crecimiento.

La proteína ribosomal ácida P1₂ se encontró fosforilada en los ejes embrionarios sin germinar aumentando su grado de fosforilación al adicionar insulina durante la germinación. En contraste, la proteína número 1, que podría corresponder con alguna isoforma de P1, P2 o P3, redujo drásticamente su fosforilación al adicionar insulina durante la germinación.

Las proteínas P1₃ y P1₇ se encontraron fosforiladas en los ejes embrionarios sin germinar y mantuvieron el nivel de fosforilación durante la germinación en ausencia o presencia de insulina.

La proteína P1₈ se fosforiló hasta las 24 horas de germinación independientemente de si se agregó o no insulina.

Otra proteína que se identificó por espectrometría de masas fue la proteína ribosomal P0. Se observó que P0 no está fosforilada en los ejes de las semillas quiescentes, pero en los ejes de las semillas germinadas por 24 horas de

germinación en presencia o ausencia del factor de crecimiento su fosforilación es evidente.

La proteína ribosomal S3 también cambió su estado de fosforilación, en ejes secos de maíz se encuentra fosforilada y después de 24 horas de germinación con o sin insulina el grado de fosforilación de la proteína disminuyó (Figura 9.II).

8. DISCUSIÓN

La fosforilación de las proteínas ribosomales es una modificación post-traduccional que se ha relacionado principalmente con la regulación de la síntesis de proteínas (Soung *et al.*, 2009). En bacterias, mamíferos y levaduras se ha estudiado ampliamente la fosforilación de las proteínas ribosomales y se ha visto que hay una gran variabilidad en su fosforilación en relación al tipo de organismo, tejido o por algún factor de cambio en el medio (Mikulík *et al.*, 2011; Bautista y Zinker, 2014; Meyuhas, 2015). El crecimiento celular es un proceso donde ocurren cambios significativos a nivel molecular y fisiológico, y se caracteriza por estar altamente regulado a través de distintos mecanismos. Uno de estos mecanismos es la vía de transducción de señales TOR, ampliamente estudiada en mamíferos conocida como mammalian target of rapamycin (mTOR) y que se ha relacionado con la regulación de la síntesis de proteínas. En células de mamíferos y en plantas como *A. thaliana* y maíz se ha reportado que la ruta TOR promueve la fosforilación de la proteína ribosomal S6 a través de la cinasa S6K (cinasa de la proteína ribosomal S6) y este evento parece tener un papel determinante en la regulación del inicio de la traducción (Ruvinsky y Meyuhas, 2006; Dinkova *et al.*, 2007; Rosner *et al.*, 2013). Se ha visto recientemente, en células de mamíferos, que la ruta mTOR regula la fosforilación de 28 proteínas ribosomales, entre ellas las proteínas S2, S3, S6, S8, S27, L13, L18, L23, L34, P0 y P2 (Xu *et al.*, 2016). La ruta TOR puede ser activada por hormonas como la insulina o por IGFs. En maíz se aisló el péptido ZmIGF y se demostró que es capaz de activar la ruta TOR para regular el crecimiento y la proliferación celular incluyendo la estimulación de la germinación de semillas de maíz (Rodríguez *et al.*, 2011; Garrocho *et al.*, 2013; Villa *et al.*, 2013).

Debido a lo anterior la hipótesis de esta investigación fue que el factor de crecimiento ZmIGF podría participar en la modificación específica del estado de fosforilación de las proteínas ribosomales durante la germinación de semillas de maíz. Y para probar esta hipótesis el objetivo fue comparar los patrones de fosforilación de las proteínas ribosomales de ejes embrionarios de semillas de

maíz germinadas en ausencia o en presencia de insulina como factor de crecimiento.

En los tres estados evaluados de las semillas de maíz se observaron ocho proteínas ribosomales ácidas de pesos moleculares similares (Figura 9). Entre estas proteínas se identificó por espectrometría de masas la presencia de la proteína ribosomal ácida P1 en cuatro copias (P1₂, P1₃, P1₇ y P1₈) que difieren en el peso molecular y en el punto isoeléctrico posiblemente por sus distintos grados de fosforilación o por alguna otra modificación post-traducciona (Figura 9.II).

Así mismo se observó un aumento en la fosforilación de la proteína ribosomal ácida P1₂ en ejes de semillas germinadas con insulina (Figura 9.II), lo que podría sugerir que la vía TOR regula la fosforilación de esta proteína ya que se ha reportado que el factor de crecimiento ZmIGF al igual que la insulina es uno de los activadores de la vía TOR para acelerar la germinación (García *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2011), regulando positivamente la fosforilación de algunas proteínas ribosomales como por ejemplo las proteínas ribosomales ácidas P2 y P0 en células de mamíferos (Xu *et al.*, 2016), por lo que la fosforilación de la proteína ribosomal ácida P1 podría estar aumentando debido a la activación de la vía TOR durante la germinación con el factor ZmIGF.

La fosforilación de la proteína ribosomal P1 durante la germinación del maíz puede estar involucrada en la regulación de la traducción, así como se ha reportado en levaduras y en células de mamíferos, en donde esta proteína ribosomal forma parte del tallo ribosomal para la interacción con el mRNA, algunos factores de inicio y elongación de la traducción y con el dominio de la GTPasa durante la síntesis de proteínas (Ballesta *et al.*, 1999; Qiu *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2008; Ramachandran y Herman, 2011). Se ha visto que la fosforilación de las proteínas ribosomales P1, P2 y P0 es necesaria para su actividad. La fosforilación de las proteínas ribosomales P1 y P2 en levaduras, se produce cuando los ribosomas están formando la estructura 80S, o sea, cuando el ribosoma está activo catalizando la síntesis de proteínas (Bautista y Zinker, 2014).

El mecanismo por el cual la vía TOR promueve la fosforilación de las proteínas del tallo ribosomal (P1, P2 y P0) aún no se ha demostrado, sin embargo, se ha visto que cuando las proteínas ribosomales P1 y P2 se encuentran unidas a los ribosomas pueden ser fosforiladas por la cinasa PK60 (Ballesta *et al.*, 1999) que pertenece a la familia de las cinasas dependientes de adenosín monofosfato cíclico (cAMP). En levaduras se ha relacionado la vía TOR con la actividad de las cinasas dependientes de cAMP, sugiriendo que ambos mecanismos funcionan en paralelo para promover el crecimiento celular (Ramachandran y Herman, 2011), por lo que éste podría ser un posible mecanismo de la fosforilación de las proteínas del tallo ribosomal.

Las proteínas ácidas P1 y P2 están involucradas en un proceso de intercambio entre las proteínas que se encuentran en el citoplasma y las que se asocian al ribosoma en el nucleolo (Bautista y Zinker, 2014) lo que podría influir en su mecanismo de fosforilación. Una forma en la que se podría entender este mecanismo es mediante la caracterización molecular y bioquímica de las cinasas y fosfatasa que actúan sobre las proteínas ribosomales ácidas.

De forma general podemos ver que la germinación cambió el estado de fosforilación de las proteínas ribosomales, ya que hay un aumento en el número de proteínas ribosomales fosforiladas respecto a las proteínas que ya se encontraban fosforiladas en los ejes de semillas sin germinar (Figura 8.II). El proceso de germinación por 24 horas de las semillas de maíz provocó la fosforilación de la proteína ribosomal P0 y de las proteínas ribosomales ácidas P1₈ y 1, la cual por su masa molecular y pl podría corresponder con alguna isoforma de P1 o P2. En cambio, la proteína ribosomal S3 disminuyó su grado de fosforilación por el proceso de germinación.

La fosforilación de la proteína ribosomal P0 se ha relacionado con la interacción con el dominio de la GTPasa durante la elongación de la traducción, formando parte de la estructura del tallo ribosomal en la subunidad 60S (Velilla *et al.*, 2013; Krokowski *et al.*, 2006; Qiu *et al.*, 2006). Por lo que se propone que la fosforilación de P0 se promueve cuando se activa la síntesis de proteínas en la germinación de

semillas de maíz, formando la estructura del tallo ribosomal durante la traducción y ya que en las semillas sin germinar no hay una traducción activa, P0 se encontraría defosforilada.

Las proteínas ribosomales ácidas P1₈ y 1 se fosforilaron hasta las 24 horas de germinación sugiriendo su participación en la regulación de la síntesis de proteínas ribosomales durante este proceso. Estos resultados indican que cada proteína ribosomal ácida tiene un papel específico en la regulación del proceso de traducción, ya que como se vio anteriormente, P1₂ fue la única isoforma de P1 que presentó cambios por la adición de insulina durante la germinación, a diferencia de las proteínas ribosomales ácidas P1₃ y P1₇ que posiblemente su fosforilación cumple con funciones más conservadas ya que se encontraron fosforiladas desde los ribosomas de las semillas secas y sin cambios durante la germinación.

La proteína ribosomal S3 disminuyó su grado de fosforilación durante la germinación (Figura 9.II). Este cambio podría ser un mecanismo de respuesta al daño del DNA celular que sufren las semillas durante la desecación, ya que en células humanas se ha reportado que la fosforilación de la proteína ribosomal S3 promueve su transporte hacia el núcleo para su interacción con sitios de daño en el DNA (Yadavilli *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2010). De esta manera se puede explicar que en las semillas secas de maíz la proteína S3 tenga un mayor grado de fosforilación que en las semillas germinadas debido a que la disminución del contenido de agua durante la desecación provoca daños al DNA y a otras macromoléculas, mientras que durante la germinación estos daños se van reparando y hay una disminución en los mecanismos de respuesta al daño del DNA (Huang *et al.*, 2012; Barrett *et al.*, 2015).

La proteína ribosomal L13 fue una de las proteínas que no modificó su nivel de fosforilación durante la germinación, ya que mantuvo su grado de fosforilación desde los ejes embrionarios sin germinar hasta los ya germinados (Figura 6B), lo que podría indicarnos que su fosforilación se puede relacionar con funciones en el ribosoma necesarias tanto para las semillas secas como para las semillas germinadas como por ejemplo en la estructura y estabilidad de la subunidad

ribosomal 60S ya que se ha visto su interacción específica con el rRNA 28S (Das *et al.*, 2013).

9. CONCLUSIONES

1. La germinación de las semillas de maíz promueve la fosforilación específica de algunas proteínas ribosomales en los ejes embrionarios.
2. El factor ZmIGF aumentó el grado de fosforilación de la proteína ribosomal ácida P1 en los ejes embrionarios de semillas de maíz germinadas respecto a los ejes germinados en ausencia del factor y a los ejes sin germinar.
3. Se identificaron cuatro copias de la proteína ribosomal ácida P1 con diferentes niveles de fosforilación promovidos por la germinación y por la adición de insulina durante la germinación, sugiriendo que cada tipo de P1 fosforilada está involucrada en diferentes funciones para la regulación de la síntesis de proteínas.
4. La proteína ribosomal L13 se encuentra fosforilada en los ejes embrionarios de semillas secas de maíz y no modifica su estado de fosforilación con el proceso de germinación ni con la estimulación con insulina durante la germinación.
5. La proteína ribosomal S3 disminuye su nivel de fosforilación durante el proceso de germinación por 24 horas.
6. En este trabajo se identificaron algunas de las proteínas ribosomales fosforiladas involucradas en la regulación de la síntesis de proteínas durante la germinación en ausencia y en presencia de insulina.
7. Con los resultados obtenidos podemos concluir que el factor ZmIGF modificó de forma específica el estado de fosforilación de algunas proteínas ribosomales durante la germinación de semillas de maíz.

10.PERSPECTIVAS

1. Llevar a cabo el análisis de los patrones de fosforilación de las proteínas ribosomales con puntos isoeléctricos mayores a 10 para poder analizar si las proteínas ribosomales básicas están involucradas en la regulación de la germinación en ausencia o presencia de insulina.
2. Estudiar la funcionalidad de la fosforilación de la proteína ribosomal ácida P1 durante la germinación cuando se adiciona insulina como factor de crecimiento, ya que esta proteína aumenta su grado de fosforilación cuando ocurre este proceso.
3. Definir los sitios de fosforilación de las proteínas ribosomales que se ven afectadas durante la germinación y por la adición de insulina al medio para ver si hay cambios entre los tipos de aminoácidos fosforilados ya que esto ayudaría a entender que tipo de cinasas estarían involucradas.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ◆ Agnew B., Beechem J., Gee K., Haugland R., Liu J., Martin V., Patton W., Steinberg T., (2006). Compositions and methods for detection and isolation of phosphorylated molecules. United States Patent 7102005.
- ◆ Agrawal G., Thelen J., (2009). A high-resolution two dimensional gel- and Pro-Q DPS-based proteomics workflow for phosphoprotein identification and quantitative profiling. *Phospho-Proteomics, Methods and Protocols*. Humana Press, New York, vol. 527.
- ◆ Agredano L., Reyes H., Martínez L., Sánchez E., (2007). Distinctive expression and functional regulation of the maize (*Zea mays* L.) TOR kinase ortholog. *Molecular BioSystems*, 3, 1-10.
- ◆ Aguilar R., Sánchez E., (1984). Amino acid pools and protein synthesis in germinating maize embryos. *Plant Cell Reports*, 3, 193-195.
- ◆ Aitken A., Learmonth M., (2002) Protein determination by UV absorption. *The protein protocols handbook*. Springer, 3-6.
- ◆ Arpin M., Madjar J., Reboud J., (1978). Occurrence of phosphorylated forms of an acidic protein in the large ribosomal subunit of rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta*, 519, 537-541.
- ◆ Ávila A., Espejel F., Paz E., Cortés B., Pérez L., (2013). Effect of insulin on the cell cycle of germinating maize seeds (*Zea mays* L.). *Seed Science Research*. 23, 3-14.
- ◆ Bailey J., Vangala S., Szick K., Kenneth C., (1997). Acidic phosphoprotein complex of the 60S ribosomal subunit of maize seedling roots. *Plant Physiology*, 114, 1293-1305.
- ◆ Ballesta J., Remacha M., (1996). The large ribosomal subunit stalk as a regulatory element of the eukaryotic translational machinery. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 55, 157-193.
- ◆ Ballesta J., Rodriguez M., Bou G., Briones E., Zambrano R., Remacha M., (1999). Phosphorylation of the yeast ribosomal stalk. Functional effects and

enzymes involved in the process. *FEMS Microbiology Reviews*, 23, 537-550.

- ◆ Ban N., Beckmann R., Cate J., Dinman J., Dragon F., Ellis S., Lafontaine D., (2014). A new system for naming ribosomal proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 24, 165-169.
- ◆ Barakat A., Szick-Miranda K., Chang I., Guyot R., Blanc G., Cooke R., Delseny M. y Bailey-Serres J., (2001). The organization of cytoplasmic ribosomal protein genes in the *Arabidopsis* genome. *Plant Physiology*, 127, 398-415.
- ◆ Bargis-Surgey P., Lavergne J., Gonzalo P., Vard C., Filhol-Cochet O., Rebound J., (1999). Interaction of elongation factor eEF-2 with ribosomal P proteins. *European Journal of Biochemistry*, 262, 606-611.
- ◆ Barret A., Waterworth W., West C., (2015). Roles of DNA repair pathways in maintenance of seed viability and vigour. *Aspects of Applied Biology*, 124, 15-19.
- ◆ Bautista A., Zinker S., (2014). The P1/P2 protein heterodimers assemble to the ribosomal stalk at the moment when the ribosome is committed to translation but not to the native 60S ribosomal subunit in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*, 53, 4105-4112.
- ◆ Beltrán E., Aguilar R., Ortíz A., Dinkova T., Sánchez E., (2002). Auxin stimulates S6 ribosomal protein phosphorylation in maize thereby affecting protein synthesis regulation. *Physiologia Plantarum*, 115, 291-297.
- ◆ Beltrán E., Ortíz A., Sánchez E., (1995). Synthesis of ribosomal proteins from stored mRNAs early in seed germination, *Plant Molecular Biology*, 28, 327-336.
- ◆ Boex-Fontvieille E., Daventure M., Jossier M., Zivy M., Hodges M., Tcherkez G., (2013). Photosynthetic control of *Arabidopsis* leaf cytoplasmic translation initiation by protein phosphorylation. *Plos one*, 8, e70692.
- ◆ Bou G., Remacha M., Ballesta J., (2000). Ribosomal stalk protein phosphorylating activities in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 375, 83-89.

- ◆ Bradford, M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- ◆ Byrgazov K., Vesper O., Moll I., (2013). Ribosome heterogeneity: another level of complexity in bacterial translation regulation. *Current Opinion in Microbiology*, 16, 133-139.
- ◆ Carroll A., (2013). The *Arabidopsis* cytosolic ribosomal proteome: from form to function. *Frontiers in Plant Science*, 4, 1-14.
- ◆ Cohick W., Clemmons D., (1993). The insulin-like growth factors. *Annual Review of Physiology*, 55, 131-153.
- ◆ Cramer G., Urano K., Delrot S., Pezzotti M., Shinozaki K., (2011). Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biology*, 11, 163.
- ◆ De la Cruz J., Karbstein K., Woolford J., (2015). Functions of ribosomal proteins in assembly of eukaryotic ribosomes in vivo. *Annual Reviews of Biochemistry*, 84, 93-129.
- ◆ Das P., Basu A., Biswas A., Poddar D., Andrews J., Barik S., Komar A., Mazumder B., (2013). Insights into the mechanism of ribosomal incorporation of mammalian L13a protein during ribosome biogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 33, 2829-2842.
- ◆ Davies E., Abe S., (1995). Methods for isolation and analysis of polyribosomes. *Methods in Plant Cell Biology*. 50, 209-222.
- ◆ Dinkova T., Reyes H., García C., Aguilar R., Jiménez L., Sánchez E., (2007). Dissecting the TOR-S6K signal transduction pathway in maize seedlings: relevance on cell growth regulation. *Physiologia Plantarum*, 130, 1-10.
- ◆ Dyballa N., Metzger S., (2009). Fast and sensitive colloidal coomassie G-250 staining of proteins in polyacrylamide gels. *Journal of Visualized Experiments*, 30, 1-4.
- ◆ Edwards J., Roberts T., Atwell B., (2012). Quantifying ATP turnover in anoxic coleoptiles of rice (*Oriza sativa*) demonstrates preferential allocation

of energy to protein synthesis. *Journal of Experimental Botany*, 63, 4389-4402.

- ◆ Ekim B., Magnuson B., Acosta H., Keller J., Feener E., Fingar D., (2011). mTOR kinase domain phosphorylation promotes mTOR signaling cell growth and cell cycle progression. *Molecular and Cellular Biology*, 31, 2787-2801.
- ◆ Fingar D., Richardson C., Tee A., Cheatham L., Tsou C., Blenis J., (2004). mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/Eukaryotic translation initiation factor 4E. *Molecular and Cellular Biology*, 24, 200-216.
- ◆ Fonseca B., Graber T., Hoang H., González A., Soukas A., Hernández G., Alain T., Swift S., Weisman R., Meyer C., Robaglia C., Avruch J., Hall M., (2016). Evolution of TOR and translation control. Evolution of the protein synthesis machinery and its regulation. Editorial Springer International Publishing Switzerland, Suiza.
- ◆ Fox J., (2016). The genetic analysis of the yeast ribosomal protein UL4'S phosphorylation sites and the molecular analysis of ribosomal protein assembly. Editorial ProQuest, Baltimore.
Disponibile en: http://gateway.proquest.com/openurl?url_ver=Z39.88-2004&res_dat=xri:pqdiss&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:dissertation&rft_dat=xri:pqdiss:10159989
- ◆ Galland M., Huguet R., Arc E., Cueff G., Job D., Rajjou L., (2014). Dynamic proteomics emphasizes the importance of selective mRNA translation and protein turnover during *Arabidopsis* seed germination. *Molecular & Cellular Proteomics*, 13, 252-268.
- ◆ García C., Aguilar R., Reyes H., Albores M., Sánchez E., (2001). A maize insulin-like growth factor signals to a transduction pathway that regulates protein synthesis in maize. *Biochemical Journal*, 358, 95-100.
- ◆ Garrocho V., Aguilar R., Sánchez E., (2013). Insights into the TOR-S6K signaling pathway in maize (*Zea mays* L.). Pathway activation by effector-receptor interaction. *Biochemistry*, 52, 9129-9140.

- ◆ Giavalisco P., Wilson D., Kreitler T., Lehrach H., Klose J., Gobom J. y Fucini P., (2005). High heterogeneity within the ribosomal proteins of the *Arabidopsis thaliana* 80S ribosome. *Plant Molecular Biology*, 57, 577-591.
- ◆ Gilbert W., (2011). Functional specialization of ribosomes?. *Trends in Biochemical Sciences*, 36, 127-132.
- ◆ Han C., Yang P., (2015). Studies on the molecular mechanisms of seed germination. *Proteomics*, 15, 1671-1679.
- ◆ He D., Han C., Yao J., Shen S., Yang P., (2011). Constructing the metabolic and regulatory pathways in germinating rice seeds through proteomic approach. *Proteomics*, 11, 2693-2713.
- ◆ Kang C., Lee Y., Park J., Nawkar G., Oh H., Kim M., Lee SI., Kim W., Yun D., Lee S., (2016). Ribosomal P3 protein AtP3B of *Arabidopsis* acts as both protein and RNA chaperone to increase tolerance of heat and cold stresses. *Plant, Cell and Environment*, 39, 1631-1642.
- ◆ Holdsworth M., Bentsink L., Soppe W., (2008). Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, after ripening, dormancy and germination. *New Phytologist*, 179, 33-54.
- ◆ Howell K., Narsai R., Carroll A., Ivanova A., Lohse M., Usadel B., Millar A., Whelan J., (2009). Mapping metabolic and transcript temporal switches during germination in rice highlights specific transcription factors and the role of RNA instability in the germination process. *Plant Physiology*, 149, 961–980.
- ◆ Huang H., Møller I., Song S., (2012). Proteomics of desiccation tolerance during development and germination of maize embryos. *Journal of Proteomics*, 75, 1247-1262.
- ◆ Hummel M., Cordewener J., Groot J., Smeekens S., America A., Hanson J., (2012). Dynamic protein composition of *Arabidopsis thaliana* cytosolic ribosomes in response to sucrose feeding as revealed by label free MSE proteomics. *Proteomics*, 12, 1024-1038.

- ◆ Invitrogen, (2010). Pro-Q Diamond phosphoprotein gel stain. Molecular Probes. Revisado el 18 de mayo del 2010. Disponible en línea: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp33300.pdf>
Último acceso: 6 de abril del 2017.
- ◆ Ito T., Kim G., Shinozaki K. (2000). Disruption of an *Arabidopsis* cytoplasmic ribosomal protein S13-homologous gene by transposon-mediated mutagenesis causes aberrant growth and development. *Plant Journal*, 22, 257–64.
- ◆ Jiménez S., Mancera E., Donayre A., Rangel C., Uribe L., March S., Jiménez G., Sánchez E., (2011). Expression profile of maize (*Zea mays* L.) embryonic axes during germination: translational regulation of ribosomal protein mRNAs. *Plant Cell Physiology*, 52, 1719-1733.
- ◆ Korostelev A. y Noller H., (2007). The ribosome in focus: new structures bring new insights. *Trends in Biochemical Science*, 32, 434-441.
- ◆ Kozma S., Thomas G., (2002). Regulation of cell size in growth, development and human disease PI3K, PKB and S6K. *BioEssays*, 24, 65-71.
- ◆ Krokowski D., Boguszewska A., Abramczyk D., Liljas A., Tchórzewski M., Grankowski N., (2006). Yeast ribosomal P0 protein has two separate binding sites for P1/P2 proteins. *Molecular Microbiology*, 60, 386-400.
- ◆ Kruiswijk T., de Hey J., Planta R., (1978). Modification of yeast ribosomal proteins. Phosphorylation. *Biochemical Journal*, 175, 213-219.
- ◆ Lee S., Kwon I., Park J., Lee K., Ahn Y., Lee C., Kim J., Choi S., Cho S., Ahn Y., (2010). Ribosomal protein S3, a new substrate of Akt, serves as a signal mediator between neuronal apoptosis and DNA repair. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 29457-29468.
- ◆ Levy S., Avni D., Hariharan N., Perry R., (1991). Olygopyrimidine tract of the 5' end of mammalian ribosomal protein mRNAs is required for their translational control. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88, 3319-3323.

- ◆ Liao X., Majithia A., Huang X., Kimmel A., (2008). Growth control via TOR kinase signaling, an intracellular sensor of amino acid and energy availability, with crosstalk potential to proline metabolism. *Amino Acids*, 35, 761-770.
- ◆ Liljas A. (2004). Structural aspects of protein synthesis. Editorial World Scientific Publishing, Singapore, 38-46.
- ◆ Loreni F., Ricciardi S., (2014). Ribosomes. Translation and its regulation in cancer biology and medicine. A. Parsyan ed., Roma, Italia. 267-278.
- ◆ Lu H., Zhu Y., Xiong J., Wang R., Jia Z., (2015). Potential extra-ribosomal functions of ribosomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Research*, 177, 28-33.
- ◆ Martínez F., Remacha M., Ballesta J., (2008). Functional characterization of ribosomal P1/P2 proteins in human cells. *Biochemical Journal*, 413, 527-534.
- ◆ Mauro V., Edelman G., (2002). The ribosome filter hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 12031-12036.
- ◆ McIntosh K. y Warner J., (2007). Yeast Ribosomes: Variety is the spice of life. *Cell*, 131, 450-451.
- ◆ Melnikov S., Ben-Shem A., Garreau N., Jenner L., Yusupova G. y Yusupov M., (2012). One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19, 560-567.
- ◆ Meyuhas O., (2000). Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. *European Journal of Biochemistry*, 267, 6321-6330.
- ◆ Meyuhas O., (2015). Ribosomal protein S6 phosphorylation: Four decades of research. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 320, 41-73.
- ◆ Mikulík K., Bobek J., Ziková A., Smetáková M., Bezousková S., (2011). Phosphorylation of ribosomal proteins influences subunit association and translation of poly (U) in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular BioSystems*, 7, 817-823.
- ◆ Muench D., Zhang C., Dahodwala M., (2012). Control of cytoplasmic translation in plants. *RNA*, 3, 178-194.

- ◆ Nakabayashi K., Okamoto M., Koshiba T., Kamilya Y., Nambara E., (2005). Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. *Plant Journal*, 41, 697-709.
- ◆ Oracz K., Stawska M., (2016). Cellular recycling of proteins in seed dormancy alleviation and germination. *Frontiers in plant science*, 7, 1128.
- ◆ Pérez A., Aguilar R., Briones E., Sánchez E., (1993). Characterization of ribosomal protein phosphorylation in maize axes during germination. *Plant Science*, 94, 71-79.
- ◆ QIAGEN, (2011). PhosphoProtein Handbook. [En línea] (Actualizado en julio del 2011). Disponible en: <https://www.qiagen.com/mx/shop/sample-technologies/protein-sample-technologies/fractionation-and-depletion%20kits/phosphoprotein-purification-kit/> [Último acceso 24 de septiembre de 2016].
- ◆ Qiu D., Parada P., García A., Cárdenas D., Remacha M., Ballesta J., (2006). Different roles of P1 and P2 *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal stalk proteins revealed by cross-linking. *Molecular Microbiology*, 4, 1191-1202.
- ◆ Rajjou L., Duval M., Gallardo K., Catusse J., (2012). Seed germination and vigor. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 507-533.
- ◆ Rajjou L., Gallardo K., Debeaujon I., Vandekerckhove J., (2004). The effect of alpha-amanitin on the *Arabidopsis* seed proteome highlights the distinct roles of stored and neosynthesized mRNAs during germination. *Plant Physiology*, 134, 1598-1613.
- ◆ Ramachandran V., Heman P., (2011). Antagonistic interactions between the cAMP-dependent protein kinase and TOR signaling pathways modulate cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 187, 441-454.
- ◆ Reyes H., Aguilar R., Sánchez E., (2004). Functional characterization of maize ribosomal S6 protein kinase (ZmS6K), a plants ortholog of methazoan p70 (S6K). *Biochemistry*, 43, 533-539.

- ◆ Ribeiro E., Uchoa A., da Silva L., Beghini D., Ferreira A., Perales J., Jacinto T., Fernandez K., Xavier J., Oliveira A., (2009). Insulin-binding canavalia is present in *Canavalia ensiformis* seed coat. *Protein & Peptide Letters*, 16, 84-91.
- ◆ Rodríguez C., Rodríguez A., Aguilar C., Sánchez E., (2011). Biochemical characterization of a new maize (*Zea mays* L.) peptide growth factor. *Protein Peptide Letters*. 18, 84-91.
- ◆ Rosner M., Schipany K., Hengstschläger M., (2013). Phosphorylation of nuclear and cytoplasmic pools of ribosomal protein S6 during cell cycle progression. *Amino Acids*, 44, 1233-1240.
- ◆ Ruvinsky I., Meyuhas O., (2006). Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 31, 342-348.
- ◆ Sánchez de Jiménez E., Aguilar R., Dinkova T., (1997). S6 ribosomal protein phosphorylation and translation of stored mRNA in maize. *Biochimie*, 79, 187-194.
- ◆ Sánchez de Jiménez E., Beltrán-Peña E., Ortiz-López A. (1999). Insulin-stimulated ribosomal protein synthesis in maize embryonic axes during germination. *Plant Physiology*, 105, 148-154.
- ◆ Sauert M., Temmel H., Moll I., (2015). Heterogeneity of the translational machinery: Variations on a common theme. *Biochimie*, 114, 39-47.
- ◆ Savada R., Bonham S., (2014). Differential transcript accumulation and subcellular localization of *Arabidopsis* ribosomal proteins. *Plant Science*, 223, 134-145.
- ◆ Shahbazian D., Roux P., Mieulet V., Cohen M., Raught B., Taunton J., Hershey J, Blenis J., Pende M., Sonenberg N., (2006). The mTOR/P13K and MAPK pathway converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. *EMBO Journal*, 25, 2781-2791.
- ◆ Shu J., Heng H., Wei Q., Ni L., Wei P., Ian M., Song Q., (2015). A proteomic analysis of rice seed germination as affected by high temperature and ABA treatment. *Physiologia Plantarum*, 154, 142-161.

- ◆ Siegmann, M., Thomas, G. (1987). Separation of multiple phosphorylated forms of 40 S ribosomal protein S6 by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Methods Enzymol*, 146, 362-369.
- ◆ Sotelo R., Garrocho V., Aguilar C., Calderon M., Sánchez E., (2010). Coordination of cell growth and cell division in maize (*Zea mays* L.) relevance of the conserved TOR signal transduction pathway. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 46, 578-586.
- ◆ Soung G., Miller J., Koc H., Koc E., (2009). Comprehensive analysis of phosphorylated proteins of *Escherichia coli* ribosomes. *Journal of Proteome Research*, 8, 3390-3402.
- ◆ Spence J., Reddy R., Dittmar G., Sherman F., Karin M., Finley D., (2000). Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain. *Cell*, 102, 67-76.
- ◆ Stahl J., (2001). Ribosomal proteins in eukaryotes. *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, 1-11.
- ◆ Steinberg T., (2009). Protein gel staining methods: an introduction and overview. *Methods in Enzymology*, vol. 463, 541-564.
- ◆ Steitz T., (2008). A structural understanding of the dynamic ribosome machine. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9, 242-253.
- ◆ Sugihara Y., Honda H., Iida T., Morinaga T., Hino S., Okajima T., Matsuda T. y Nadano D., (2010). Proteomic analysis of rodent ribosomes revealed heterogeneity including ribosomal proteins L10-like, L22-like 1, and L39-like. *Journal of proteome research*, 9, 1351-1366.
- ◆ Szick K. y Bailey J., (2001). Regulated heterogeneity in 12-kDa P-protein phosphorylation and composition of ribosomes in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Biological Chemistry*, 276, 10921-10928.
- ◆ Tchorzewski M., Boguszevska A., Dukowsk P., Grankowski N., (2000). Oligomerization properties of the acidic ribosomal P-proteins from *Saccharomyces cerevisiae*: effect of P1A protein phosphorylation on the formation of the P1A-P2B hetero-complex. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1499, 63-73.

- ◆ Turkina M., Klang A., Vener A. (2011). Differential phosphorylation of ribosomal proteins in *Arabidopsis thaliana* plants during day and night. 2011, *PlosOne*, 6, e29307.
- ◆ Uchiumi T., Kominami R. (1992). Direct evidence for interaction of the conserved GTPse domain within 28 S RNA with mammalian ribosomal acidic phosphoproteins and L12. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 19179-19185.
- ◆ Van L., Vanderhaeghen R., De Block M., Bauw G., Villarroel R., Van Montagu M., (1994). An S18 ribosomal protein gene copy at the *Arabidopsis* PFL locus affects plant development by its specific expression in meristems. *EMBO Journal*, 13, 3378–3388.
- ◆ Velilla R., Remacha M., Ballesta J., (2013). Carboxy terminal modifications of the P0 protein reveal alternative mechanisms of nuclear ribosomal stalk assembly. *Nucleic Acids Research*, 41, 8628-8636.
- ◆ Venema J. y Tollervey D., (1999). Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Review of Genetics*, 33, 261-311.
- ◆ Villa J., Dinkova T., Aguilar R., Rivera F., Sánchez E., Pérez L., (2013). Regulation of ribosome biogenesis in maize embryonic axes during germination. *Biochimie*, 95, 1871-1879.
- ◆ Wahl M., Möller W., (2002). Structure and function of the acidic ribosomal stalk proteins. *Current Protein & Peptide Science*, 3, 93-106.
- ◆ Walsh C., (2006). Posttranslational Modification of proteins: Expanding nature's inventory. Editorial Roberts and Company Publishers, Colorado.
- ◆ Wang X., Proud C., (2006). The mTOR pathway in the control of protein synthesis. *Physiology*, 21, 362-369.
- ◆ Watanabe Y., Barbashov S., Komatsu S., Hemmings A., Miyagi M., Tsunasawa S., Hirano H., (1994). A peptide that stimulates phosphorylation of the plant insulin-binding protein. Isolation, primary structure and cDNA cloning. *European Journal of Biochemistry*, 224, 167-172.
- ◆ Weitbrecht K., Müller K., Keubner-Metzger G., (2011). First of the mark: early seed germination. *Journal of Experimental Botany*, 62, 3289-3309.

- ◆ Williams A., Werner J., Chang I., Bailey J., (2003). Regulated phosphorylation of 40S ribosomal protein S6 in root tips of maize. *Plant Physiology*, 132, 2086-2097.
- ◆ Xu J., Shan F., Yuling C., Yun F., Haiteng D., (2016). Proteomic analysis of mTOR inhibition-mediated phosphorylation changes in ribosomal proteins and eukaryotic translation initiation factors. *Protein Cell*, 7, 533-537.
- ◆ Xue S., Barna M., (2012). Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13, 355-369.
- ◆ Yadavilli S., Hegde V., Deutsch W., (2007). Translocation of human ribosomal protein S3 to sites of DNA damage is dependent on ERK-mediated phosphorylation following genotoxic stress. *DNA Repair*, 6, 1453-1462.
- ◆ Yerlikaya S., Meusburger M., Kumari R., Huber A., Anrather D., Costanzo M., Boone C., Ammerer G., Baranov P., Loewith R., (2016). TORC1 and TORC2 work together to regulate ribosomal protein S6 phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 27, 397-409.
- ◆ Yusupova G., Yusupov M., (2014). High-resolution structure of the eukaryotic 80S ribosome. *Annual Review of Biochemistry*, 83, 467-486.
- ◆ Yusupova G., Yusupov M., (2016). Crystal structure of eukaryotic ribosome and its complexes with inhibitors. *Philosophical Transactions B*, 372, 20160184.
- ◆ Zhao Y., Xu T., Zucchi P., Bogorad L., (1999). Subpopulations of chloroplast ribosomes change during photoregulated development of *Zea mays* leaves: Ribosomal proteins L2, L21 and L29. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96, 8997-9002.
- ◆ Zhou X., Liao W., Liao J., Liao P., Lu H., (2015). Ribosomal proteins: functions beyond the ribosome. *Journal of Molecular Cell Biology*, 7, 92-104