

00562

5
2ej

Fosforilación de proteínas ribosomales durante la germinación de maíz

Tesis de Maestría en Ciencias Químicas (Bioquímica)

**División de Estudios de Posgrado, Departamento de Bioquímica,
Facultad de Química, UNAM**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Bióloga Alma Topiltzin Pérez Méndez

Octubre de 1991



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

Índice

| | |
|---|----|
| Abreviaturas | v |
| Presentación | 1 |
| Introducción | |
| I.-Formación de la semilla y germinación | 2 |
| II.-Síntesis de proteínas en la germinación | 4 |
| III.-Algunos datos sobre ribosomas | 8 |
| IV.-Fosforilación de proteínas ribosomales y control traduccional | 15 |
| Antecedentes experimentales | 19 |
| Hipótesis | 20 |
| Objetivos | 20 |
| Artículo | 21 |
| Resultados complementarios | |
| Fosforilación de proteínas ribosomales en la germinación | 47 |
| Síntesis de proteínas durante la germinación | 55 |
| Discusión | |
| Fosforilación <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de proteínas ribosomales durante la germinación | 64 |

| | |
|--|-----------|
| Control traduccional en la germinación | 66 |
| Estimuladores externos en la fosforilación de proteínas ribosomales | 71 |
| Estrés y fosforilación de proteínas ribosomales | 72 |
| Conclusiones | 74 |
| Apéndice | 76 |
| Bibliografía | 79 |

Abreviaturas

| | |
|---------------|---|
| AIA | Acido indolacético. |
| MCPP | Acido 2-(2-metil-4-cloro-fenoxi) propiónico. |
| BAP | Bencilaminopurina. |
| SFB | Suero fetal de bovino. |
| HSP | Proteínas de estrés de calor ("Heat-shock protein") |
| NEpHGE | Electroforesis en gel de no equilibrio de pH. |
| PMSF | Fluoruro de fenil,metil,sulfonilo. |
| TCA | Acido tricloroacético. |
| PPO | 2,5-difeniloxazol |
| POPOP | [2,2'-p-fenilen bis(5-feniloxazol)] |
| DMSO | Dimetilsulfóxido. |

Una parte importante de los datos obtenidos durante la realización de esta tesis de maestría se utilizó para escribir el artículo titulado: "DEVELOPMENTAL REGULATION OF RIBOSOMAL PROTEIN PHOSPHORYLATION IN MAIZE", el cuál está sometido a revisión para su publicación en la revista "Plant Physiology".

Es por lo anterior que se anexa el manuscrito del mismo. La metodología no mencionada en él se agrupa en el apéndice, se hacen más breves las secciones de introducción y antecedentes , y en la sección de resultados únicamente se presentan aquellos no descritos en el artículo. Por último se presenta una discusión general del trabajo.

Introducción

I.-Formación de la semilla y germinación

La semilla es el medio por el cual las plantas angiospermas aseguran la dispersión de su descendencia. El éxito en el establecimiento de la nueva planta depende fuertemente de las características fisiológicas y bioquímicas de la semilla (Bewley y Black, 1985).

Cuando un grano de polen alcanza un gineceo adecuado, tiene lugar la formación de un tubo polínico, que atravesando el estilo se dirige a un óvulo maduro. Una vez que los gametos masculinos se encuentran en el interior del saco embrionario, se lleva a cabo la fecundación.

A partir de la fecundación los eventos metabólicos que suceden en la semilla se agrupan de la siguiente manera (Kernode 1990):

HISTODIFERENCIACIÓN: durante la cual el cigoto sufre numerosas divisiones mitóticas y las células resultantes se diferencian para formar el plan estructural básico de la planta.

El óvulo doblemente fecundado dará origen al embrión y al endospermo, mientras que su tegumento formará la testa de la semilla (Cortés 1986).

MADURACIÓN: Esta ocurre casi totalmente en ausencia de divisiones celulares. Se caracteriza por expansión celular y deposición de reservas en los tejidos de almacenamiento.

DESECACIÓN: que resulta en una reducción gradual del metabolismo conforme los tejidos van perdiendo agua. La semilla pasa a un estado metabólicamente inactivo o quiescente que le permitirá sobrevivir separada de la planta materna hasta encontrar las condiciones ambientales adecuadas para germinar.

En los cereales cada semilla es un fruto completo llamado cariopsis, este fruto contiene un único embrión rodeado de endospermo. El embrión está formado por el eje embrionario y un cotiledón modificado llamado escutelo (Strasburger *et al*, 1974).

Si experimentalmente se remueve el embrión de la semilla en desarrollo antes de completar la maduración, éste germina precozmente y por lo general no es capaz de establecerse como plántula. Se piensa que el ambiente que proporciona la semilla hace que el embrión termine su programa de desarrollo, acumulando suficientes reservas para que la germinación sea exitosa.

Existe controversia en la definición del término germinación: para algunos autores se define como el periodo metabólico que se inicia con la entrada de agua a la semilla y termina con la emergencia de la radícula (Bewley y Black, 1985). Para otros autores este proceso incluye además el subsecuente establecimiento y crecimiento de la plántula (Salisbury y Ross, 1978).

De manera general la imbibición trae como consecuencia la reestructuración de las macromoléculas que constituyen a la semilla, reactivación metabólica general, elongación, y finalmente división celular. En el caso del maíz (*Zea mays* v. Chalqueño) la primera división celular se da alrededor de las 24 horas de imbibición de la semilla completa. Cuando el embrión se extrae de la semilla y se imbebe aisladamente en un medio de cultivo, esta primera división se adelanta aproximadamente tres horas (Baíza *et al*, 1986).

Respiración, actividad enzimática y síntesis de proteínas y de RNA, son eventos celulares fundamentales en la germinación, íntimamente involucrados en la preparación para el posterior crecimiento de la plántula (Bewley y Black 1985, Mayer 1989).

La síntesis de DNA es un fenómeno tardío en la germinación; en el maíz se ha demostrado que no existe síntesis replicativa durante las primeras horas de la germinación (Baíza *et al*, 1989) y que precede a

ésta una síntesis de tipo reparativo. En embriones de centeno se observó el mismo fenómeno (Vázquez-Ramos y Osborne, 1986).

II.- Síntesis de proteínas en la germinación

Al empezar la imbibición de la semilla, la síntesis de proteínas en el embrión se reestablece tan rápidamente que pareciera que todos los elementos necesarios para esta actividad ya se encuentran presentes en la semilla seca (Simon 1984).

Vaughan y colaboradores desde 1967 observaron que el intervalo entre la hidratación y la iniciación de la síntesis de proteínas es usualmente menor que el tiempo requerido para sintetizar ribosomas en núcleos y transferirlos a citoplasma, por lo que sugirieron que la síntesis de proteínas en semillas recién imbibidas se lleva a cabo con ribosomas preexistentes. Esta idea se refuerza con los trabajos de diversos autores que demuestran la presencia de monosomas en semillas secas de trigo (Marcus 1966), Nabo silvestre (Payne *et al*, 1978), y maíz (Sánchez de Jiménez, 1981).

Se ha reportado que RNAs de transferencia y aminoacil-tRNA sintetetas están presentes en semillas secas (Bewley y Black, 1985; Mayer, 1989), además hoy en día se utilizan extractos de germen de trigo para llevar a cabo síntesis *in vitro* de proteínas, por lo que es claro que todos los elementos de la maquinaria de síntesis se encuentran presentes en el embrión de las semillas antes de germinar.

La cantidad de polisomas presentes en las semillas secas es por lo general muy baja o nula. Durante la germinación de trigo (Marcus *et al*, 1966) y de maíz (Sánchez de Jiménez *et al*, 1981) los polisomas aparecen rápidamente en el embrión. Este fenómeno se ha observado en gran variedad de semillas por lo que parece ser que el ensamblaje de polisomas es un factor crítico en la emergencia de la quiescencia (Leshem, 1973).

En 1975 Spiegel y Marcus utilizando amanitina y cordicepina, demuestran que la formación de poli-ribosomas en la germinación temprana de embriones de trigo es independiente de la transcripción y poliadenilación de RNAs mensajeros pues los polisomas se forman con la misma velocidad en los controles que en las semillas tratadas con los inhibidores.

Con lo anterior quedó demostrado que la síntesis temprana de proteínas en semillas en imbibición no depende de la síntesis de mRNAs. Este hecho se ha confirmado y además se ha demostrado que no solo no es necesaria la síntesis sino tampoco el procesamiento secundario (desmetilación, poliadenilación o formación del CAP) de los mRNAs ya presentes en la semilla seca (Lane y Tumaitis-Kennedy, 1981).

Además de lo anterior, durante los años '70s otras evidencias de la existencia de RNAs mensajeros almacenados en la semilla seca se fueron acumulando (Wareing 1981). Los más sobresalientes pueden resumirse en la siguiente forma:

- Fue posible extraer RNA de embriones secos de trigo que dirigiera la síntesis *in vitro* de proteínas.
- Una fracción de este RNA almacenado está formada por moléculas poliadeniladas.
- Por incorporación de marca radiactiva y análisis de los productos por electroforesis en geles de poli-acrilamida fue posible identificar proteínas sintetizadas en las primeras horas de la germinación cuya síntesis no dependía de transcripción.
- Los patrones de proteínas sintetizadas *in vivo* durante las primeras horas de germinación son similares a los de las que se sintetizan *in vitro* con mensajes extraídos de las semillas secas.
- Se demostró la síntesis *de novo* de enzimas específicas aún cuando se inhibió la síntesis de RNA.

Debido a que durante el periodo quiescente de la semilla la actividad sintética está totalmente inhibida, se llegó a la conclusión de que los mRNAs presentes en la semilla seca se forman desde la embriogénesis y persisten hasta la germinación.

Los mensajes responsables de la síntesis temprana de proteínas durante la germinación se han clasificado en dos categorías generales (Bewley y Black 1985, Kermode 1990):

- mRNAs RESIDUALES. Son sintetizados y expresados durante el desarrollo de la semilla y no se alcanzan a destruir durante la desecación. No se expresan durante la germinación y al comenzar este proceso inmediatamente se degradan.
- mRNAs ALMACENADOS o de VIDA LARGA que se sintetizan durante la embriogénesis pero no se expresan en este periodo. Se encuentran listos para ser traducidos inmediatamente después de la rehidratación de la semilla. Se presume que estos mRNAs además de codificar para proteínas de mantenimiento, dirigen la síntesis de proteínas fundamentales para la germinación.

Dure y colaboradores en 1969 trabajando con semillas de algodón en germinación demuestran que la síntesis *de novo* de una proteasa es dependiente de un mRNA almacenado. Tres años más tarde (Ihle y Dure 1972) prueban que este mensajero se sintetiza durante la embriogénesis y sin embargo su traducción está bloqueada en esta etapa del desarrollo. Después de la demostración de la existencia de mensajes almacenados parece necesario explicar cómo es que la semilla en desarrollo discrimina entre los mensajes que hay que destruir y aquellos que hay que conservar para la germinación. Hasta la fecha no es claro este mecanismo, sin embargo parte de la explicación a esto puede ser diferencias en su localización subcelular o su asociación con proteínas específicas.

En algodón los trabajos de Hammett y Katterman (1975) mostraron que al menos parte de los mRNAs de las semillas secas se encuentran en el núcleo y poseen una cola de 75-100 adeninas, igual a los men-

sajeros encontrados en el citoplasma. Es posible que al germinar la semilla, estos mRNAs se movilicen hacia el citoplasma para ser traducidos.

Por otro lado algunos reportes proporcionaron evidencia de que los mensajeros almacenados se encuentran asociados a proteínas formando partículas ribonucleoproteicas (mRNPs) libres en el citoplasma, llamadas informosomas (Peumans *et al*, 1979), y que estos se sintetizan durante la embriogénesis (Ajt Khozhin *et al*, 1976).

Aunque la síntesis de proteínas en la germinación temprana puede proceder en ausencia de síntesis de RNA (Spiegel y Marcus, 1975), poco a poco se va haciendo estrictamente dependiente de los mensajes que se sintetizan *de novo*. Actualmente se sabe que los RNAs almacenados se destruyen durante las primeras horas de germinación y se presenta un incremento de mensajes nuevos (Mayer, 1989).

Por la temporalidad de estos eventos es evidente que durante la germinación temprana coexisten mensajeros almacenados y recién sintetizados. En semillas de trigo, a las seis horas de germinación el 54% de los mensajes se encuentran enganchados a polisomas, y no parece ser que los mRNAs almacenados o los recién sintetizados participen preferencialmente en este proceso (Caers *et al*, 1979). ¿Qué determina entonces cuáles son los mensajes que se traducen en cada momento?

Durante las primeras horas de la germinación se da un cambio radical en el patrón de síntesis de proteínas, y este cambio puede ser casi totalmente bloqueado si se utiliza amanitina, por lo que se piensa que el cambio en el patrón proteico es consecuencia de regulación transcripcional. (Thompson y Lane, 1980).

El mismo autor discute que a pesar de que su trabajo y el de otros autores ponen en evidencia el papel fundamental que juega la síntesis de mensajes nuevos en horas tempranas de la germinación, estudios complementarios con sistemas de traducción *in vitro* sugieren fuertemente la existencia simultánea de control traduccional además del control transcripcional.

III.-Algunos datos sobre ribosomas

La gran mayoría de los estudios sobre estructura ribosomal se ha hecho en células procariotes. A pesar de que existen diferencias importantes respecto a eucariotes, el ribosoma de todos los organismos posee una semejanza estructural importante, que refleja quizás la universalidad de sus funciones básicas.

Estructuralmente el ribosoma consta de dos subunidades, cada una formada por proteínas y RNA (figura 1).

La subunidad pequeña puede dividirse en dos partes desiguales: la "cabeza", que representa aproximadamente la tercera parte del total, y la "base", que constituye las otras dos terceras partes. Una región protuberante llamada plataforma se extiende desde la base hasta la cabeza, formando una hendidura entre esta protuberancia y la cabeza. También la estructura de la subunidad grande es asimétrica y consiste en una protuberancia central con dos protrusiones (una de cada lado) inclinadas aproximadamente 50° (Oakes, 1987. Figura 2)

El ribosoma eucariote posee básicamente esta misma estructura, sólo hay que agregar algunos lóbulos extras, (ver figura 3. Lake, 1985).

Mientras que la masa molecular del ribosoma procariote es de aproximadamente 2.8×10^6 daltones (Alberts *et al.* 1983), la masa molecular del ribosoma eucariote completo varía desde 3.9 (para plantas) hasta 4.55×10^6 daltones (mamíferos). Esta variación es el resultado de un incremento en el tamaño de la subunidad grande de 2.4 a 3.05×10^6 daltones (Wool, 1979), y no se sabe nada acerca de su significado funcional.

Tal como el ribosoma procariote, el ribosoma eucariote está constituido únicamente por dos tipos de biopolímeros: RNA y proteínas (ver figura 1), sin embargo el contenido de proteínas es marcadamente superior: en el caso de procariotes la relación RNA:proteína es 2:1, y en los eucariotes es 1:1 (Spirin 1986).

Se ha especulado sobre la función de estas proteínas ribosomales "extras". Algunas pueden estar especializadas para interactuar con receptores en el retículo endoplásmico (riboforinas), otras en el ensamblaje y transporte de las subunidades recién sintetizadas y otras más pueden estar involucradas en la regulación de la lectura del mRNA (Wool, 1979). Un ejemplo que ilustra la importancia de la regulación traduccional en eucariotes es el hecho de que en el caso de células bacterianas el ribosoma puede "leer" el RNA mensajero a una velocidad de 40 a 50 nucleótidos por segundo; el ribosoma eucariote es capaz de leer hasta 30 nucleótidos en ese mismo tiempo pero los efectos regulatorios pueden reducir esto hasta 5-10 nucleótidos por segundo (Spirin, 1986).

Casi todas las proteínas ribosomales son pequeñas (11,000 a 40,000 D), extremadamente básicas (muchas tienen punto isoeléctrico superior a 11) y muy insolubles en amortiguadores ordinarios (Wool, 1979). También existen en el ribosoma algunas proteínas ácidas (cargadas negativamente a pH 8.6) pero su número es muy inferior a las básicas: en ribosomas de hígado de rata parece haber únicamente 8 (Gressner y Wool, 1974)

Además de su localización en la estructura tridimensional del ribosoma (ver figura 5), de algunas proteínas se sabe algo más sobre su función:

- Dos de las proteínas ácidas conocidas en procariotes como L7 y L12 (en eucariotes como eL7 y eL12 o P1 y P2) poseen características especiales: cada una de ellas se encuentra por duplicado constituyendo el tallo de la subunidad grande (Wool, 1979), L12 es idéntica a L7 excepto que el amino terminal de L7 está acetilado (Lake, 1985), se ha demostrado además que en *E. coli* (Vilella *et al*, 1991) y en levadura (Zinker, 1990) la cantidad de copias presentes en el ribosoma no es constante sino que depende del estado metabólico de la célula. Parece ser que estas proteínas participan en la unión de varios factores de elongación y la hidrólisis de GTP dependiente del IF2 (Lake, 1985).

- La proteína ribosomal L5 forma una partícula ribonucleoproteica con el RNA ribosomal 5S (Steitz *et al*,1988) y ahora se sabe que esta RNP es un precursor del ensamblaje ribosomal en células de mamíferos (Wormington, 1989).
- La proteína S6 se encuentra localizada en la plataforma de la subunidad pequeña; junto con las proteínas S11, S15 y S18 parece estar relacionada con la unión del RNA mensajero al ribosoma (Lake, 1985). Como se mencionará más adelante, S6 parece ser la proteína ribosomal que con más frecuencia se encuentra fosforilada.

RIBOSOMA 80S



SUBUNIDAD 60S



SUBUNIDAD 40S



| | | |
|--------------------------|--------------------|--------------------|
| No. DE PROTEINAS | 45-50 | 30 |
| MASA DE PROTEINAS | 1,000,000 | 700,000 |
| RNA | 25-28S | 18S |
| | 4,700 bases | 1,900 bases |
| | 5.8S | |
| | 160 bases | |
| | 5S | |
| | 120 bases | |

FIGURA 1: Componentes del ribosoma citoplásmico de hígado de rata. (Tomado de Lewin, 1985).

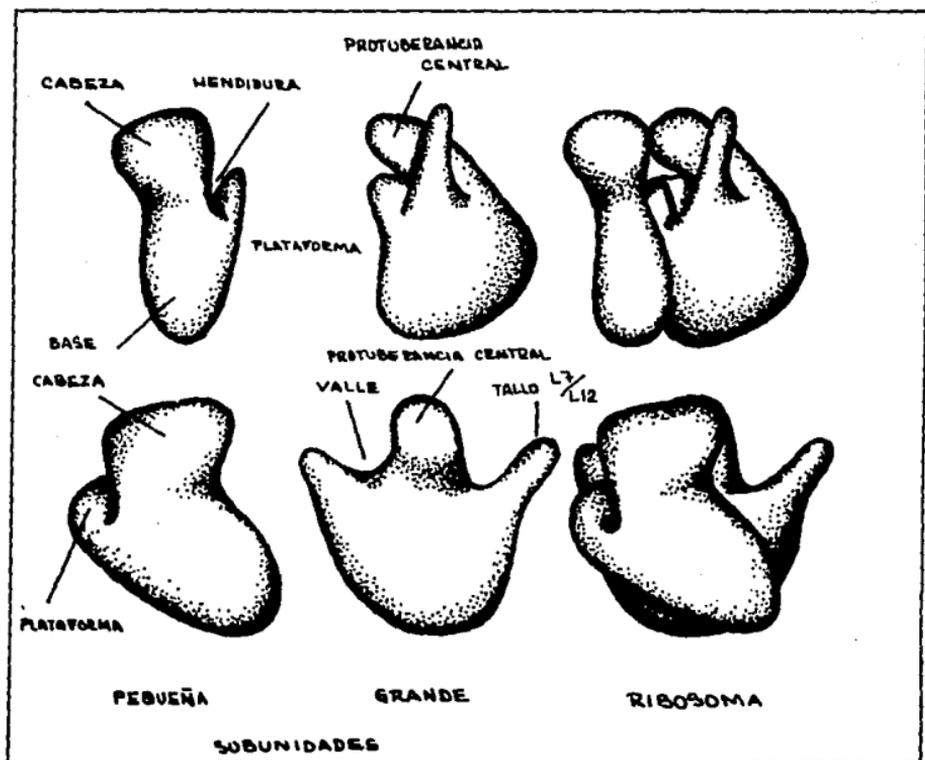


FIGURA 2: Modelo tridimensional consenso del ribosoma de *E. coli*. En la figura se muestran dos orientaciones. La longitud de un ribosoma es aproximadamente 250 Å. (Lake, 1985)

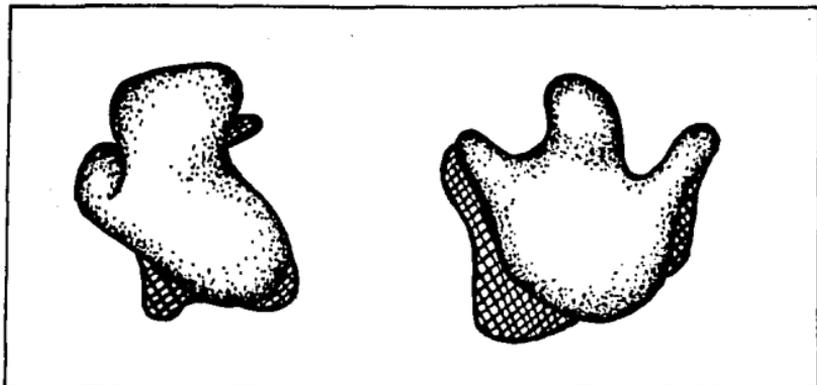


FIGURA 3: Lóbulos característicos del ribosoma eucariote (sombreados) sobre la estructura básica al ribosoma procaríote.

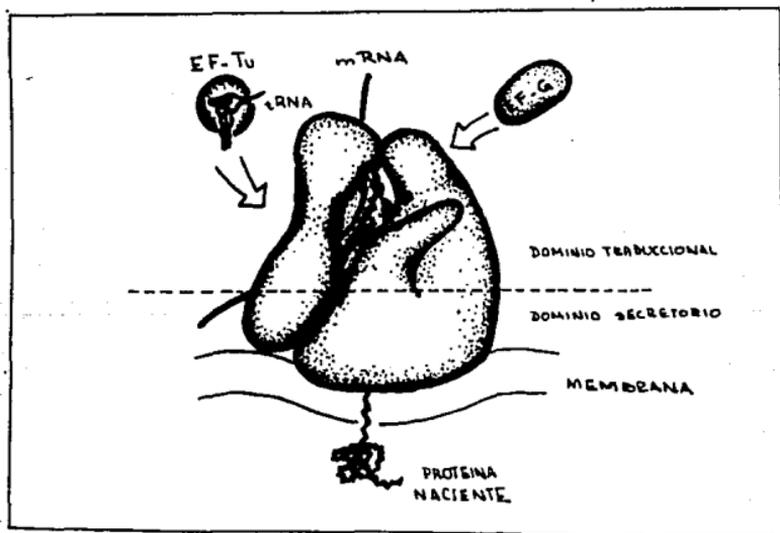


FIGURA 4: Representación de los dominios traduccional y secretorio del ribosoma. (figuras 3 y 4 tomadas de Oakes, 1987).

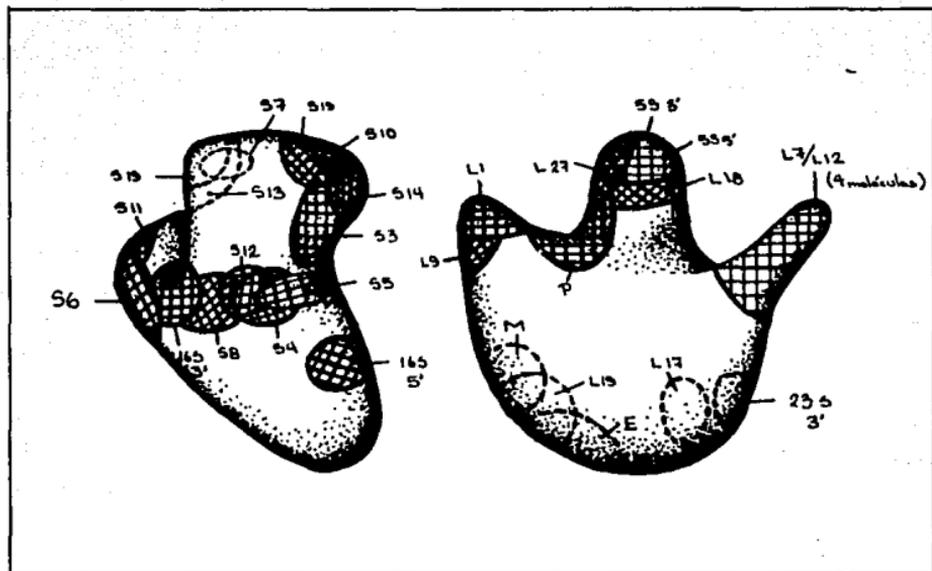


FIGURA 5: Diagrama que muestra la localización de las proteínas, rRNAs y sitios funcionales en el ribosoma. Las líneas punteadas indican sitios localizados en la cara "posterior" de la figura. P, M, y E representan los sitios de Peptidil transferasa, Unión a membrana y salida de la proteína naciente, respectivamente. (Oakes, 1987).

IV.-Fosforilación de proteínas ribosomales y control traduccional

Las proteínas ribosomales de organismos procaríotes sólo se fosforilan bajo circunstancias poco usuales como infección viral (Wool, 1979), mientras que la fosforilación-desfosforilación de proteínas ribosomales en diversos tejidos animales y vegetales es un fenómeno que responde a múltiples estímulos como hormonas, suero y factores de crecimiento (Thomas *et al*, 1982), regeneración hepática (Wool, 1979), shock de calor (Maller *et al*, 1986), anaerobiosis (Bailey, 1990) y fitorreguladores (Yakovleva y Kulaeva, 1982 ; Pérez *et al*, 1990).

Los tejidos en animales donde se ha reportado este fenómeno incluyen: corteza adrenal, testículo, reticulocito, fibroblastos, hígado, glándula mamaria, tiroides, adenohipófisis, diversos tejidos tumorales (revisión por Trewavas, 1976) y oocitos de *Xenopus laevis* en maduración (Nielsen, 1982) entre otros.

En tejidos vegetales se ha descrito fosforilación de proteínas ribosomales en tomate (Sharf y Nover, 1982), cotiledones de calabaza (Yakovleva, 1987), trigo (Fehling y Weidner, 1988), maíz (Pérez 1990), chícharo y *Lemna* (Trewavas, 1976).

Inicialmente se creyó que S6 era la única proteína fosforilada (Gresner y Wool, 1974). Durante principios de la década pasada diversas fosfoproteínas ribosomales adicionales fueron reportadas (Belanger *et al*, 1981; Scharf y Nover, 1982). Aunque el número exacto no ha sido establecido se acepta que el ribosoma eucariote puede contener más de una fosfoproteína y que el contenido de fosfatos de éstas no se altera por las mismas condiciones que se sabe modifican el grado de fosforilación de S6. Las evidencias sugieren que la fosforilación de proteínas ribosomales no está controlada por un solo mecanismo, y puede tener diferentes funciones en la actividad ribosomal (Belanger, 1981).

Sin duda el mecanismo de fosforilación de S6 en células de mamífero en cultivo ha sido uno de los más estudiados:

En 1983 Burkhard y Traugh observaron que S6 puede ser fosforilada *in vitro* por dos diferentes cinasas: una dependiente de cAMP y otra independiente de éste pero activada por proteasas (Burkhard y Traugh, 1983). Cada cinasa cataliza la unión a la proteína de diferentes cantidades de fosfato y aparentemente en posiciones distintas. Por caracterización de los fragmentos tripticos fosforilados y comparación con lo encontrado *in vivo* concluyen que la fosforilación por la cinasa activada por proteasas es idéntica a la que se da naturalmente (Persic y Traugh, 1983).

En 1988 el grupo de Thomas identifica y caracteriza una cinasa de S6 estimulada por mitógenos (Jeno *et al*, 1988) y concluye que su actividad es regulada por un proceso de fosforilación-desfosforilación (Ballou, 1988).

Parece ser que puede existir una familia de diferentes cinasas de S6 relacionadas con sistemas de agonistas distintos (Witters, 1990)

Ante la amplia distribución del fenómeno y la diversidad de estímulos a los que responde, se han venido haciendo esfuerzos para determinar el efecto que la fosforilación de proteínas ribosomales pudiera tener en la síntesis de proteínas. Muchos resultados fueron negativos (Ochoa, 1979) o al menos controversiales (Trewavas, 1976).

El sistema que se ha usado no es sencillo: con bastante más de 100 componentes macromoleculares, la síntesis de proteínas en eucariotes es probablemente el sistema multienzimático más complejo estudiado a nivel molecular (Hershey *et al*, 1986).

Sin embargo, poco a poco empezaron a aparecer resultados más sólidos, algunos de los cuáles se presentan a continuación:

- En células en cultivo de mamífero, los ribosomas que tienen S6 fuertemente fosforilada son preferencialmente incorporados a polisomas (Duncan, 1982; Thomas, 1982).

- Los ribosomas defosforilados por "shock" de calor en *Drosophila* presentan menor habilidad para traducir ciertos mensajes (Kru-ger, 1981).
- Palen y Traugh en 1987 publican un trabajo que ofrece el soporte más sólido para considerar que efectivamente la fosforilación de al menos una proteína ribosomal (S6) altera la capacidad ribosomal de síntesis. En este trabajo se muestra que la fosforilación de S6 por una cinasa estimulada por mitógenos no afecta la unión del mensajero a la subunidad 40S, sin embargo sí estimula la síntesis de globina tres y media veces respecto al control. Además parece hacerlo de manera selectiva pues incrementa la síntesis de β globina 3.9 veces, mientras que la de α globina sólo aumenta 1.8 veces.

Por otra parte se sabe que las proteínas ácidas P1 y P2 de ribosomas eucarióticos se fosforilan (Reyes *et al*, 1977; Sánchez-Madrid *et al*, 1979), y que en el citoplasma de levaduras se encuentra una poza de éstas proteínas sin fosforilar (Zinker, 1990). De acuerdo a Vidales *et al* (1984) la fosforilación de estas proteínas es lo que regula su afinidad por el ribosoma, de tal manera que esta modificación covalente podría ser la responsable de los cambios en el contenido de proteínas ácidas que presentan los ribosomas de *Saccaromyces* en ciertas etapas de su desarrollo.

Mc Conell y Kaplan (1982) muestran que ribosomas de hígado de rata sin P1 y P2 no son capaces de polimerizar aminoácidos *in vitro* ni de hidrolizar GTP de manera dependiente del factor de elongación 2. Sólo recuperan estas actividades si al agregar las proteínas faltantes éstas están previamente fosforiladas *in vitro* por una cinasa dependiente de cAMP.

Para sistemas vegetales también se tienen algunos indicios de que la fosforilación de proteínas ribosomales repercute en las funciones del ribosoma:

- En tomate la síntesis preferencial de proteínas de "shock" de calor coincide con la defosforilación de S6 y el aumento en la fosforilación de dos proteínas ácidas de 15 y 16 kD (Sharf y Nover, 1982).
- En cotiledones de calabaza la formación de polisomas y el aumento en la síntesis de proteínas generado por citocininas correlaciona con la fosforilación de S6 (Yakovleva, 1987).
- Ribosomas de trigo altamente fosforilados por adaptación a altas temperaturas presentan actividad de síntesis de proteínas probada en un sistema *in vitro* (dependiente de poly-U) tres veces mayor que los ribosomas de plantas controles. Por intercambio de subunidades se determinó que la actividad incrementada de la síntesis está dada exclusivamente por la subunidad grande (Fehling y Weidner, 1987).

Aunque aún faltan demostraciones más contundentes para probar la influencia de la fosforilación de proteínas ribosomales en la actividad ribosomal (Hershey, 1989), hasta ahora la posibilidad de que este sea un mecanismo de control traduccional es muy atractiva y los resultados en diversos sistemas parecen ser muy prometedores.

Antecedentes experimentales.

Además de lo mencionado en la introducción, existen antecedentes de nuestro propio laboratorio que justifican más ampliamente el planteamiento del presente trabajo experimental.

En uno de ellos se da información sobre la relevancia de los mensajeros almacenados en la semilla durante la germinación temprana de maíz:

Haciendo el análisis por electroforesis bidimensional de las proteínas sintetizadas a 6 y 24 horas de germinación, y habiendo bloqueado la síntesis de mRNAs con α -amanitina, se observó que a pesar de que los ejes embrionarios contaban únicamente con los mensajeros almacenados aparecían nuevas proteínas a las 24 horas que no se sintetizaban a las 6 horas. Esto se interpretó como resultado de un control traduccional durante la germinación (Sánchez de Jiménez y Aguilar, 1984).

Por otra parte, trabajando con auxinas en la germinación de maíz, se observó que éstas alteran la fosforilación de las proteínas ribosomales (Pérez *et al*, 1990). Con el fin de determinar si esta alteración influye en la actividad ribosomal, los ribosomas se probaron en un sistema de síntesis de proteínas *in vitro* dependiente de poli-U. Midiendo la velocidad de traducción a diferentes concentraciones de ribosomas se obtuvieron valores de Km aparente significativamente mayores para tejidos tratados con auxinas que para los controles.

En un esfuerzo por averiguar si también existía efecto de la fosforilación en la lectura de otro tipo de mensajes (no sintético), se probaron estos ribosomas de tejidos estimulados por auxinas en un sistema de síntesis *in vitro* pero ahora usando RNA de virus de Bromomosaico como mensajero (Ibarra, 1990). Se encontró que los ribosomas de tejidos estimulados con MCPP (una auxina sintética) traducían con menor eficiencia uno de los cuatro mensajes virales, mientras que los tratados con ácido indolacético (la auxina natural, cuya influencia en la fosforilación

ribosomal es diferente que la del MCPP) presentaban mayor eficiencia en la traducción de otro de los mensajes.

Hipótesis

Con base en todos los antecedentes aquí presentados, se planteó la siguiente hipótesis de trabajo:

Durante la germinación ocurren cambios en la fosforilación-desfosforilación de ciertas proteínas ribosomales y esto forma parte del mecanismo de control traduccional de los mRNAs almacenados y sintetizados *de novo*.

Objetivos

- Caracterizar la fosforilación de proteínas ribosomales durante la germinación de maíz.
- Observar si este fenómeno es alterado por auxinas y/o algún otro estimulador.
- Determinar si la fosforilación observada tiene algún efecto en la funcionalidad del ribosoma.

A continuación y como parte de los resultados, se presenta una copia del artículo sometido a revisión para su publicación en la revista "Plant Physiology".

RUNNING HEAD:

Ribosomal Protein Phosphorylation

AUTHOR TO WHOM ALL CORRESPONDENCE SHOULD BE SENT:

Estela Sánchez de Jiménez

Departamento de Bioquímica

Facultad de Química

Universidad Nacional Autónoma de México

México, D.F. 04510

Phone: (905)550-9196

Telex: 1774523 UNAMME

Fax: 548-3227

TITLE

**DEVELOPMENTAL REGULATION OF RIBOSOMAL PROTEIN PHOSPHORYLATION IN
MAIZE.**

MANUSCRIPT RECEIVED _____

REVISED MANUSCRIPT RECEIVED _____

AUTHORS:

Alma Pérez-Méndez¹ and Estela Sánchez de Jiménez.

INSTITUTION ADDRESS:

Departamento de Bioquímica

Facultad de Química

Universidad Nacional Autónoma de México

México, D.F. 04510

Phone: (905)550-9196

Telex: 1774523 UNAMME

Fax: 548-3227

FOOTNOTES:

¹APM is a recipient of a fellowship from CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología)

ACKNOWLEDGMENTS:

This work was supported by Grant: Dr. Humberto Estrada Ocampo. Facultad de Química. UNAM. The authors are grateful to Irene Artigas for correcting the manuscript.

ABSTRACT.

In vitro and *in vivo* ribosomal proteins phosphorylation were studied in maize embryonic axes at different stages of germination. After ^{32}P -protein labeling, the ribosomal proteins were isolated and analyzed by gel electrophoresis and autoradiography. Specific ^{32}P -ribosomal protein patterns were found for 3, 8, 16 or 24 h of germination for the *in vivo* but not for the *in vitro* system. Main features on the *in vivo* pattern were a 30.9 kD labeled band appearing from 8h incubation up and a strong decline of ^{32}P incorporation on 15.8 and 14.8 kD proteins along germination. Phosphorylation of the 30.9 kD protein was induced at 3 h by stress (heat or anoxia shock) but not by phytohormones or other protein-kinase effectors. Analysis of the ribosomal subunit proteins obtained by sucrose gradient centrifugation indicated that 14.8, 15.8 and 38 kD ^{32}P -proteins are part of the large subunit.

It is concluded that ribosomal protein phosphorylation in maize axes is developmentally regulated, and it seems to have a role in translational control.

INTRODUCTION.

The phosphorylation of ribosomal proteins is known to be a generalized phenomenon in animal as well as in plant cells, and seems to be precisely regulated by several internal and external stimuli (14,19,24) The relevance of this phenomenon is based on

the fact that it has been proved that protein phosphorylation of initiation factors and ribosomal proteins participates in controlling mRNA translation in different eukaryotic cell types (1,12,18).

In seed germination, protein synthesis is one of the earliest and more important events required for seedling growth and establishment. Initial protein synthesis in cereal embryos is mostly supported by stored mRNA (15,25), although newly synthesis of mRNA has also been proved (6). Some of the stored mRNA are, however, not translated until late in germination (23). Similarly, delay on mRNA translation onset has been demonstrated within the embryogenesis-germination process of cotton seeds (11). The above data suggest that some kind of translational control is functioning in embryos during seed germination.

Previous work in our laboratory has revealed fast phosphorylation-dephosphorylation of ribosomal proteins in germinating maize embryonic axes (19). Based on these antecedents, it can be considered that phosphorylation of ribosomal proteins could be part of an overall mechanism controlling the stored mRNA translation at early stages of germination. The present research was undertaken to characterize the regulation of ribosomal protein phosphorylation on maize axes during seed germination.

MATERIALS AND METHODS.

Reagents: All chemicals were purchased from Sigma Co. [32 P]-orthophosphate (sp. act. 3.7 MBq mmole $^{-1}$) and 32 P- γ ATP (sp.

act. 259 TBq mmole⁻¹) from England Nuclear.

Phytoregulators: IAA (Indole acetic acid) and BAP (bencyl amine purine) were also purchased from Sigma Co. The MCPPE [2(2-methyl, 4-chloro) phenoxypropionic acid]] was synthesized by Dr. Martha Albores, Chemistry Department, Facultad de Quimica, UNAM.

Biological Material.

Maize embryonic axes (*Zea mays* L. var. Chalqueño) were manually dissected and disinfected as follows: axes from dry seeds (0.2 g) were rinsed with 70% ethanol for 15 sec followed by 10 min in 5% calcium hypochloride and finally rinsed three times with sterile water. Disinfected axes were incubated under sterile conditions on Murashige and Skoog medium in the dark at 25 °C, as previously reported (3).

Ribosome and ribosomal protein isolation.

Ribosomes were isolated after Sharf and Nover (24). Some modifications were introduced as follows: frozen axes were homogenized in liquid N₂. The frozen powder was mixed with 7 ml of buffer A-2 (20 mM Tris-HCl, pH 7.8, 5 mM MgCl₂, 20 mM KCl, 1 mM PMSF, 1 mM NaF, 0.5% β-mercaptoethanol, 1% triton X-100, 0.25 M sucrose) plus 80 mM β-glycerophosphate as phosphatase inhibitor. After successive steps of centrifugation at 5000 x g and 27000 x g for 5 and 20 min each, the supernatant was layered onto 3 ml of sucrose cushion (0.5 M sucrose and 0.5 M KCl in buffer A-2).

Ribosomes were sedimented at 250 000 x g for 4 h. The ribosomal pellet was resuspended on resuspension buffer (20 mM Hepes-KOH pH 7.6, 5 mM Mg acetate, 125 mM K acetate, 6 mM β -mercaptoethanol and 80 mM β -glycerophosphate). Ribosomal proteins were extracted with acetic acid and magnesium acetate and precipitated with acetone as described by Ranjove and Gordon (21).

Preparation of ribosomal subunits.

Functional ribosomes were isolated after Fehling and Weidner (8) adding 80 mM β -glycerophosphate in all the buffers. Ribosomal pellet was resuspended in 0.25 M sucrose, 50 mM Tris HCl (pH 7.6) and 80 mM β -glycerophosphate; incubated 10 min at 37 °C with 0.5 mM puromycin and 0.5 mM GTP. Then incubation mixture was made 1 M KCl, 10 mM MgCl₂ and 20 mM β -mercaptoethanol. The suspension containing 30 OD_{260nm} of ribosomes was layered onto 15-30% linear sucrose gradient containing 0.85 M KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM β -mercaptoethanol and 50 mM Tris HCl (pH 7.6), and centrifuged at 270 000 xg for 5 hours at 10 °C (9). Gradients were withdrawn with a density gradient removing apparatus (Auto Densi Flow IIC Haake-Buchler, Saddle Brook, NJ, monitored with an LKB 2138 Uvicord S at 278 nm). Aliquots containing the ribosomal subunits were pooled and centrifuged 4 h at 250 000 xg . The pellets were used for protein isolation as indicated above.

Electrophoresis of ribosomal proteins.

The ribosomal proteins were resuspended in sample buffer:

75 mM Tris-HCl (pH 6.8), 8 M urea, 2.4% SDS, 12% glycerol, 6% β -mercaptoethanol and electrophoresed in SDS acrylamide gels in a discontinuous buffer system according to Laemmli (13). The resolving gel (11 cm length) contained 16% acrylamide-bisacrylamide mixture (30:0.8). Electrophoresis was performed at 80 V for 12 h. The gels were stained with 0.2% (w/v) Coomassie blue R, 50% (v/v) methanol and 7.5% (v/v) acetic acid. Autoradiographs of the dried gels were obtained using Kodak X-0 mat film and kept at -70°C .

In vitro Ribosome phosphorylation.

Isolated ribosomes were resuspended in resuspension buffer (see above) and *in vitro* autophosphorylated as reported: (7,20). The assay mixture contained 50 mM Tris-HCl pH 7.9, 10 mM Mg acetate, 25 mM CaCl_2 , 0.5 mM β -mercaptoethanol, 14 O.D._{260nm} of ribosomes as source of enzyme and substrate, 200 μM ATP, 0.25 μCi of ^{32}P - γ -ATP in a final volume of 50 μl . After 5 min at 27°C the reaction was stopped with acetic acid and magnesium acetate to get RNA precipitation (see above). The ribosomal proteins were electrophoresed and the autoradiographs were obtained from these gels as described above.

In vivo Phosphorylation of Ribosomal Proteins.

Two hundred mg of embryonic axes were incubated for different periods on the nutrient medium. Two hundred and fifty μCi of ^{32}P -orthophosphate was added to the medium at the last hour of

incubation. After that, the axes were removed from the medium, washed three times with sterile water and frozen in liquid N₂ until used. For some experiments either 50 μM BAP or 23.3 μM of native IAA or synthetic auxin, MCPP were added. In others heat shock (42 °C for 20 min) or anoxia (vacuum for 20') were applied. Ribosomes and ribosomal proteins were isolated from these axes and analyzed as indicated above.

RESULTS

The system used here is considered to represent a suitable model to study the biochemical events occurring in axes during seed germination. This statement is based on the following data: The germination period of the maize variety used in this research last approximately 24 h (4). At the end of this period, the meristematic cells of the embryonic axes reiniciate cell division following a pre-established timing pattern. The axes incubated under the *in vitro* conditions stated in Materials and Methods, showed similar cell division timing pattern, except that the process started two hours earlier (3).

It has previously been reported that isolated ribosomes from this (2) and other species (5) are capable of autophosphorylation. Therefore, the first experiments were endowed to confirm this finding in maize ribosomes and to define their pattern of autophosphorylation during germination. To this end, ribosomes were isolated from axes, incubated for different periods of time, and exposed to γ -³²P-ATP for 5 min. Their proteins were isolated

and electrophoresed as indicated in Materials and Methods. The correspondant autoradiographs showed several labeled bands, a pattern that was repeated in all the samples tested: 0, 3, 8 and 16 h of incubation (Fig. 1). The most prominent bands correspond to 51.3, 38.9, 33.8, 28.8, 25.1, 18.6 (Fig 1).

The *in vivo* phosphorylation of the ribosomal proteins (Rb-P) was also analyzed. Maize axes from quiescent seeds were incubated for different periods of time and one-hour pulse of ^{32}P -orthophosphate was applied prior to the end of the incubation period. The isolated Rb-P were analyzed by gel electrophoresis and autoradiography. The coomassie blue stained gels showed identical patterns for axes at all the periods tested (similar as in the *in vitro* experiments; as the one shown in Fig 5). The autoradiographs however, showed specific labeled bands for different periods of incubation (Fig 2). Most relevant differences were: 1) a 30.9 kD protein heavily labeled at 8 h and later, but do not labeled at 3 h period, and 2) differential intensities in two bands of low molecular weight (15.8 and 14.8 kD approx.). These bands were heavily labeled at 3 h incubation period and slowly decreased in intensity until 24 h (Fig 2). At 30 h of germination these proteins did not show any more ^{32}P incorporation (data not shown). The effect of exogenously applied growth regulators to the axes was tested to see if phosphorylation of the 30.9 kD protein could be induced earlier than the developmentally pre-established period observed in the *in vivo* experiments. Quiescent seed axes were *in vivo* incubated with ^{32}P -orthophosphate. Either benzylamine purine,

(BAP) or native (IAA) or synthetic (MCP) auxins were also added. The isolated ribosomal proteins from these axes were analyzed by electrophoresis and autoradiography (Fig 3). It is observed that the phytohormones did not modify the normal phosphorylated pattern, nor the 30.9 kD protein was phosphorylated in advance (see 3h-control, Fig 2). Other possible protein-kinase effectors such as spermine, spermidine, calcium and calmodulin applied in a similar manner to the axes also failed to induce early phosphorylation of the 30.9 kD protein (Fig 3). On the other hand, when the 3 h incubated axes received a heat or anoxia shock treatments: 20 min at 45 °C; or vacuum to force water penetration into the axes, the 30.9 kD band appeared labeled in the electrophoretic pattern (Fig 3).

Experiments were design to test if phosphorylation of 30.9 kD protein required *de novo* protein synthesis and if so, whether it was based on stored or newly synthesized mRNA. Specific inhibitors of either transcription (α -amanitin) or translation (cycloheximide) were applied to the quiescent axes using vacuum to force the entrance of the inhibitors and to induce phosphorylation of 30.9 kD protein at 3 h incubation. One hour ³²P-pulse was given to these axes right before ending the incubation period. Controls were carried out to test the effectiveness of the inhibitors: block of ¹⁴C-Uridine incorporation into poly A⁺ RNA, and of ³⁵S-methionine into soluble proteins (data not shown). The autoradiographic analysis of the Rb-P from these experiments

showed the expected phosphorylated 30.9 kD protein on the 3 h incubated vacuum control. The α -amanitin and the cycloheximide treated-axes also showed this band labeled (Fig 4). It is interesting to note that a 29 kD band also appeared in the pattern of cycloheximide treated axes (Fig 4). In a similar experiment it was possible to see that the 8 h phosphorylation pattern was not modified by these inhibitors (data not shown).

To determine the ribosomal location of the small molecular weight ribosomal phosphoprotein, isolation of the two ribosomal subunits from *in vivo* labeled ribosomes was performed. The method provided a clear separation of the subunits in the sucrose gradient and Rb-P were isolated from each subunit fraction. The stained pattern of each of the electrophoresed subunit Rb-P showed specific bands for both, the large and the small subunits (Fig 5). At the end of the process, however, low levels of ^{32}P -incorporation were found in both subunits, probably due to endogenous protein-phosphatase(s) action (Gabriela Sepúlveda, personal communication). Due to this limitation, the bands of these proteins in the autoradiographs were weak. However 38, 15.8 and 14.8 kD bands were clearly observed in the large subunit pattern (Fig 6).

DISCUSSION

Phosphorylation-dephosphorylation of Rb-P has been recognized as a relevant phenomenon in eukaryotic cells (10). In plants, however, the information available in regard to the characteristics of this

phenomenon is very limited. The data presented here, show for the first time developmental controlled phosphorylation of Rb-P in tissues of the maize embryonic axes during germination (Figs 1 and 2). One of the main features of the maize Rb-P phosphorylation is the tight timing control observed on the 30.9 kD protein. This protein seems to correspond to the S-6 protein reported in other eukaryotic organisms, this based on its close molecular weight and phosphorylation response to heat shock and other type of stresses (2,14) (Fig 3).

The protein-kinase(s) responsible for ribosomal protein phosphorylation early in germination do not seem to depend on newly synthesized mRNAs nor on protein synthesis (Fig 4), but it is already present in the tissues, although at 3 h the 30.9 kD protein is still not phosphorylated. A mechanism involving pos-translation modification of the enzyme(s) responsible for this phosphorylation might be plausible explanation for this phenomenon. Since stress (heat shock or vacuum shock) is able to induce in advance this phosphorylation, mobilization of related cofactors, activators or inhibitors of the phosphorylation process shall also be considered.

Another interesting observation on the developmental control of the axes Rb-P phosphorylation is the fast decrease of ³²P-phosphorylation of proteins 15.8 and 14.8 kD as germination progresses. These proteins seem to correspond to the acidic proteins P1 and P2 both for their molecular weights and their capacity to be phosphorylated (16). The location of these two

proteins in the large subunit (Fig 5) further supports this identification (16,22)

Several reports have indicated that phosphorylation of S-6 protein stimulates protein synthesis initiation (10,17) and/or differential speed of mRNA translation (18). On the other hand, phosphorylation of the acidic proteins P₁ and P₂ is known to be relevant in the binding of these proteins to the elongation factors during translation (16,22). Thus, the specific developmental control on the phosphorylation of the putative proteins S-6, P₁ and P₂ in maize axes, strongly suggests that the expression of genetic information during seed germination is regulated at translational level. Further work in our laboratory is undertaken in order to deeper understand this step of developmental regulation in maize seed germination.

REFERENCES

- 1) Aquino LA, Tao M (1987) Evidence for the regulation of protein synthesis by a wheat germ phosphoprotein factor. *Biochemistry* 26: 7979-7986
- 2) Bailey-Serres J, Freeling M (1990) Hypoxic stress-induced changes in ribosomes of maize seedling roots. *Plant Physiol* 94:1237-1243
- 3) Baiza A, Sánchez de Jiménez E (1989) Effect of the auxin 2(2-methyl, 4-chloro) phenoxypropionic acid on the cell cycle

- regulation in maize embryonic tissues. *Physiol Plant* 75: 261-266
- 4) Baiza A, Aguilar R, Sánchez de Jiménez E (1986) Histones and the first cell cycle in maize germination. *Physiol Plantarum* 68: 259-264
 - 5) Browning KS, Van TFJ, Lauer SJ, Aquino LA, Tao M, Ravel JM (1985). Phosphorylation of wheat germ initiation factors and ribosomal proteins. *Plant Physiol* 77:370-373
 - 6) Datta K, Marsch L, Marcus A (1983) Early growth of wheat embryonic axes and the synthesis of RNA and DNA. *Plant Physiol* 72:394-397.
 - 7) Dobrowolska G, Meggio F, Pinna LA (1987) Characterization of multiple forms of maize seedling protein kinases reminiscent of animal casein kinases S (type 1) and TS (type 2). *Biochem et Biophys Acta* 931: 188-195
 - 8) Fehling C, Weidner M (1986) Temperature characteristics and adaptative potential of wheat germ ribosomes. *Plant Physiol* 80:181-186
 - 9) Fehling E, Weidner M (1988) Adaptative potential of wheat ribosomes toward heat depends on the large ribosomal subunit and ribosomal protein phosphorylation. *Plant Physiol* 87: 562-565
 - 10) Hershey JWB, Duncan R, Mathews MB (1986) Mechanism of translational control. *In: Translational control.* Ed MB Mathews. Corrent Communications, CSH, NY
 - 11) Ihle JN, Dure L, (1972) The developmental biochemistry of

- cotton seed embryogenesis and germination. III Regulation of biosynthesis of enzymes utilized in germination. *J Biol Chem* 247:5058-5055
- 12) Jagus R, Crouch D, Kanlcezny A, Safer B (1982) The role of phosphorylation in the regulation of eukaryotic initiation factor 2 activity. *Current Topics Cell Reg* 21:35-42
 - 13) Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
 - 14) Maller JL, Stefanovic D, Erikson E, Smith BJ (1986) Regulation of ribosomal protein S6 phosphorylation by protein-tyrosine kinases. In: *Translational Control*. Ed MB Mathews. *Current Communications, CSH*. pp.173-177.
 - 15) Mayer AM, Marbach J (1980) Biochemistry of the translation from resting to germinating state in seeds. In: *Progress in Phytochemistry*. L Reinhold JB, Harbrone and T Swain eds. Pergamon Press Oxford.
 - 16) Mc Conell WP, Kaplan NO (1982) The activity of the acidic phosphoproteins from 80 S rat liver ribosome. *J Biol Chem* 257: 5359-5366
 - 17) Nielsen PJ, Thomas G, Maller JL (1982) Increased phosphorylation of ribosomal protein S6 during meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 2937-2941
 - 18) Palen E, Traugh JA (1987) Phosphorylation of ribosomal protein S6 by cAMP dependent protein kinase and mitogen-stimulated S-6 kinase differentially alters translation of globin mRNA. *J*

Biol Chem 262: 3518-3523

- 19) Pérez L, Aguilar R, Pérez-Méndez A, Sánchez de Jiménez E(1990) Phosphorylation of ribosomal proteins induced by auxins in maize embryonic tissues. Plant Physiol 94:1270-1275
- 20) Polya GM, Davies JR (1982) Resolution of Ca^{+2} -calmodulin-activated protein kinase from wheat germ. FEBS Letters 150(1):167-171.
- 21) Ranjove HP, Gordon J (1977) Evolutionary microdivergence of chicken and rat liver ribosomal proteins. J Biol Chem 252:9065-9070
- 22) Sáenz-Robles MT, Remacha M, Vilella MD, Zinker S, Ballesta JPG (1990) The acidic ribosomal proteins as regulators of the eukaryotic ribosomal activity. Biochem Biophys Acta 1050:51-55
- 23) Sánchez de Jiménez E, Aguilar R (1984) Protein synthesis patterns: relevance of old and new messenger RNA in germinating maize embryos. Plant Physiol 75:231-234
- 24) Sharf KD, Nover L (1982) Heat shock-induced alterations of ribosomal protein phosphorylation in plant cell cultures. Cell 30:427-437
- 25) Spiegel S, Obendorf L, Marcus A (1975) Transcription of ribosomal and messenger RNAs in early wheat embryo germination. Plant Physiol 56:502-507
- 26) Vilella MD, Remacha M, Ortiz BL, Méndez E, Ballesta JPG(1991) Characterization of the yeast acidic ribosomes phosphoproteins using monoclonal antibodies. Eur J Biochem 196:407-414

LEGENDS TO THE FIGURES

Figure 1

Autoradiography of *in vitro* phosphorylated ribosomal proteins.

Maize axes ribosomes (14 O.D._{260NM}) after incubated for different periods of time (0, 3, 8 and 16 hours) were treated with 0.25 μ Cl of ^{32}P γ -ATP at 27 $^{\circ}\text{C}$ for 5 minutes to get *in vitro* autophosphorylation. The ribosomal proteins of each assay system were precipitated and electrophoresed as described in Materials and Methods. The autoradiography was obtained using Kodak X-0 mat film and keep in dark at -70°C for 2 days. Heavy arrows indicate 30.9, 15.8 and 14.8 kD location. Empty arrow points to 29 kD protein.

Figure 2

Autoradiography of *in vivo* phosphorylated ribosomal proteins.

Maize embryonic axes (200 mg) incubated 3, 8, 16 and 24 hours were pulse labeled during the last hour with 250 μ Cl of ^{32}P orthophosphate. Ribosomal proteins were isolated and electrophoresed as indicated in Materials and Methods. The film was exposed to the dry gel for five days.

Figure 3

Effect of phytohormones and some effectors on the *in vivo* ribosomal protein phosphorylation pattern.

Embryonic axes were incubated for three hours in absence (C) or presence (*) of either :a) 200 μ l of 20 mM AIA or MCPFP; or 200 μ l of 0.05 mM BAP, during the last hour of incubation. b) Ca^{++} -CAM (10 μ M $CaCl_2$ and 104 units of CaM (bovine calmodulin from Sigma. Co) during the whole period. c) 100 μ l 0.5 mM of both spermine and spermidine during the whole period.

H).- Heat shock 42 $^{\circ}C$ applied during the last 20 minutes of incubation.

A).- Anoxia shock.- vacuum applied for 20 min to the axes.

All samples were one hour-pulse with ^{32}P -orthophosphate . Control at the right end corresponds to 8 h incubation.

Figure 4

Effect of inhibitors of transcription and translation on ribosomal protein phosphorylation.

Embryonic axes were incubated for 3 hours in presence of either: α -aman.- α -amanitine (300 μ l of a 20 μ g/ml solution) or CH.-cycloheximide (300 μ l of a 100 μ g/ml solution). These inhibitors were forced to penetrate into the axes by applying the inhibitor with 20 min of vacuum. "Stress control": vacuum applied to the axes for 20 min with sterile water instead of inhibitor solution.

Figure 5

Sucrose gradient of ribosomal subunits.

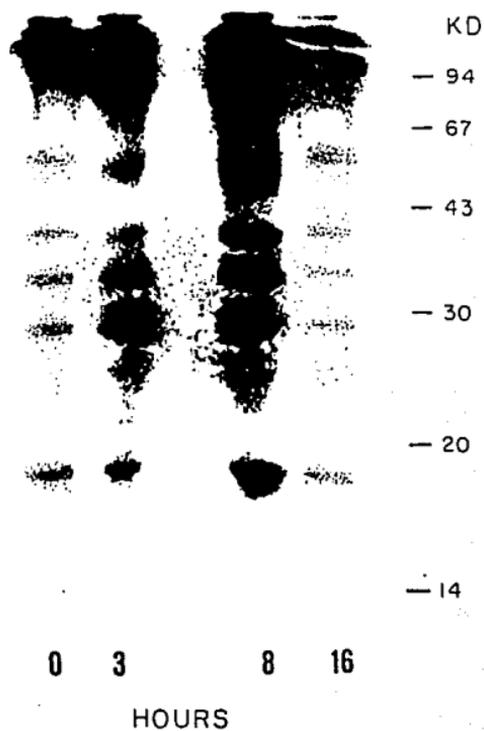
Ribosomal subunits were obtained by puromycin treatment from

maize axes ^{32}P -pulse labeled as indicated in Materials and Methods and analysed by sucrose gradient centrifugation.

A).- UV profile of the 15-30% sucrose gradient.

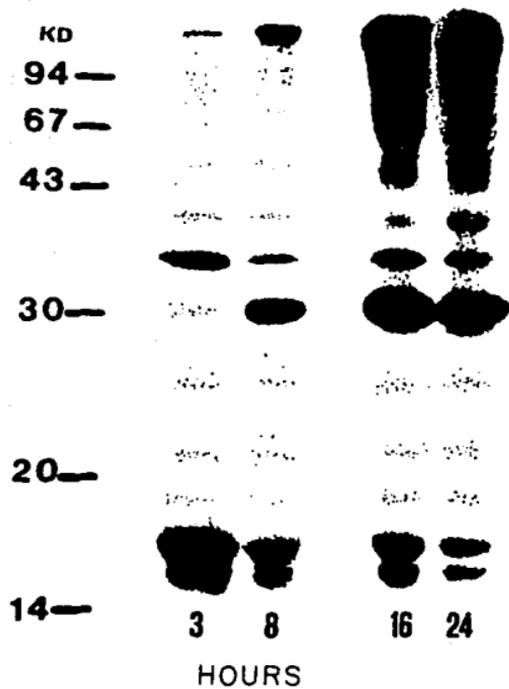
B).- Coomassie blue stained gel of ribosomal proteins electrophoresed for 12 h at 80 V: T-total ribosomal proteins; L:Large subunit ribosomal proteins; S:small subunit ribosomal proteins.

C).- Autoradiography of the large subunit ribosomal proteins.

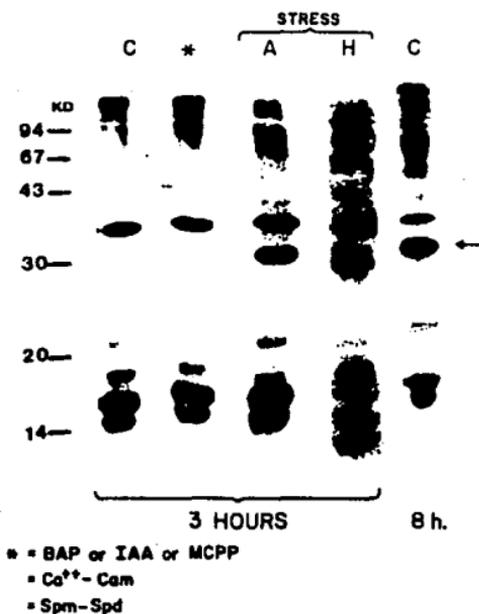


42

↑ Figure 1
Ferrer-Mendez and Sánchez de Jiménez.



↑ *Figure 2*
Pérez Méndez and Sánchez de Turmeque



↑ Figure 3
 Pérez-Morales and Sánchez de Jiménez

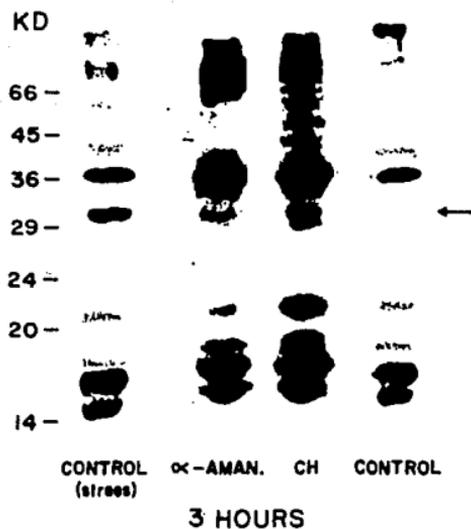


Figure 4
 ↑ Pérez-Méndez and Saiz-Casas de Jiménez

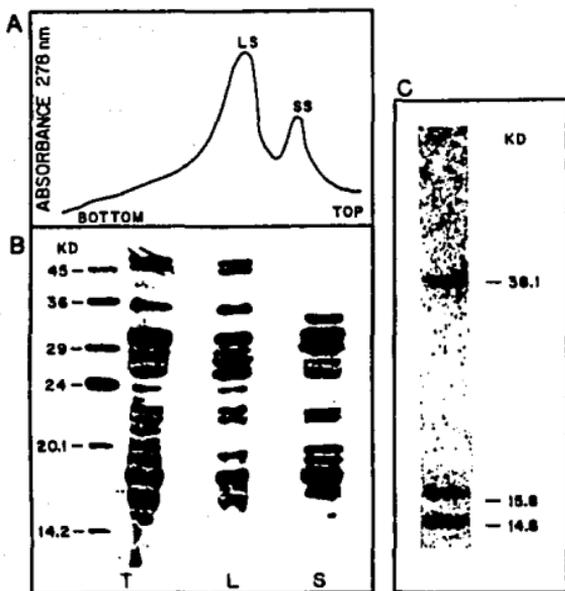


Figure 5
 ↑ Pérez-Méndez and Sánchez de Turanzo

Resultados complementarios

Fosforilación de proteínas ribosomales durante la germinación

Además de lo presentado en el artículo anexo, se realizaron otros experimentos que complementan la caracterización que se hizo acerca del fenómeno en cuestión. Estos resultados se describen a continuación:

En la figura 6 se presenta la fosforilación de proteínas ribosomales de ejes embrionarios de maíz imbibidos 5 (a) y 30 horas (b). De igual manera que en el experimento presentado en la figura 1 del artículo, el pulso de ^{32}P se dio únicamente durante la última hora de imbibición. Es posible observar que la proteína de 30.9 kD aún no incorpora fósforo radiactivo entre las 4 y 5 horas de germinación (momento en que se dio al pulso) y que a las 30 horas sigue incorporando este radioisótopo. En cambio las proteínas de 14.8 y 15.8 kD dejan totalmente de incorporar fósforo radiactivo a las 30 horas de germinación.

En un esfuerzo por identificar las proteínas ribosomales fosforiladas, se decidió tratar de determinar a que subunidad ribosomal pertenecían las especies fosforiladas. En el panel A de la figura 5 del artículo se muestra el perfil densitométrico del gradiente de sacarosa utilizado para separar las subunidades de una muestra de ribosomas tratados con puromicina (ver metodología descrita en el artículo). En el panel B se muestra la tinción con azul de Coomassie de las electroforesis realizadas con la proteína recuperada de cada pico del gradiente. Para fines comparativos se muestra un gel donde se separaron las proteínas totales del ribosoma completo (T). Tal y como se esperaba este patrón es la suma de los patrones electroforéticos de las subunidades (L+S). Al someter ribosomas fosforilados (10 horas de germinación) al tratamiento de separación de subunidades sólo fue posible obtener la autorradiografía de la proteína presente en la subunidad ribosomal grande (por las razones que se mencionarán en la sección de discusión), y parece ser que per-

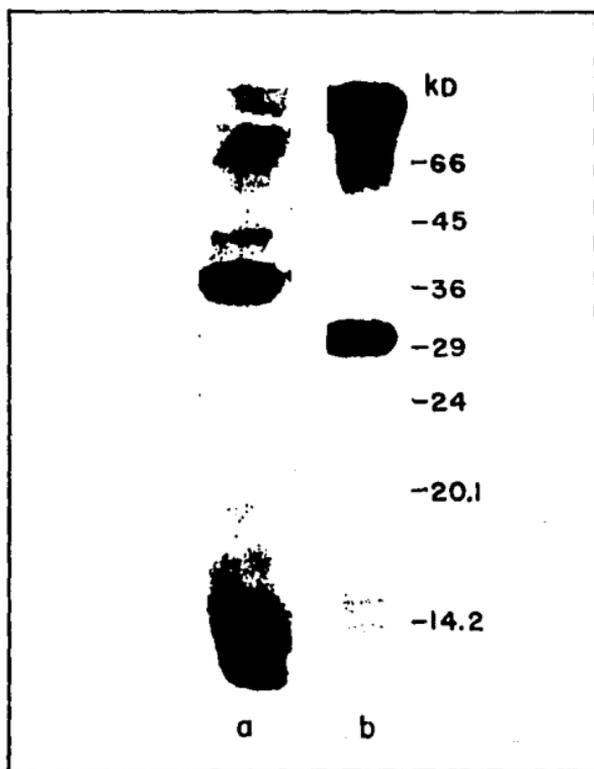


FIGURA 6: FOSFORILACIÓN in vivo DE PROTEÍNAS RIBOSOMALES DE EJES EMBRIONARIOS IMBIBIDOS 5(a) Y 30 (b) HORAS. EN AMBOS CASOS EL PULSO DE FOSFATO RADIOACTIVO SE DIO DURANTE LA ÚLTIMA HORA DE IMBIBICIÓN. ESTA FIGURA COMPLEMENTA LO MOSTRADO EN LA FIGURA 2 DEL ARTÍCULO.

tenecen a ésta subunidad las fosfoproteínas de 38, 14.8 y 15.8 kD (figura 5C del artículo).

Con base en lo descrito en los antecedentes se probó si en este sistema las auxinas alteran de alguna manera la fosforilación de las proteínas ribosomales. Además de lo presentado en el artículo, se probó si un pulso de AIA (auxina natural) a las 3 o a las 24 horas de germinación alteraba el patrón de fosforilación previamente descrito. La única alteración detectada fue la aparición de otra fosfoproteína justo bajo la especie de 30.9 kD (aproximadamente 28.2 kD) en el tratamiento de auxina a las 24 horas (figura 7, carril C).

Se probaron otros posibles estimuladores de la fosforilación, como el suero fetal de bovino y la insulina, cuyo efecto sobre la fosforilación de S6 está bien descrito para sistemas animales. Como es posible observar en la figura 8 (carriles B y C) ninguno de ellos (a estas concentraciones y en esta etapa de la germinación) altera la fosforilación de las proteínas ribosomales de ejes embrionarios de maíz.

Debido a que ninguno de los estimuladores probados fue capaz de inducir la fosforilación "temprana" de la proteína de 30.9 kD se decidió averiguar si la cinasa responsable de esta fosforilación ya se encontraba presente a las 3 horas, o si era necesaria su síntesis durante la germinación. Con este fin se analizaron las proteínas ribosomales de ejes imbibidos en presencia de un inhibidor de la síntesis de proteínas (cicloheximida) o de un inhibidor de la transcripción (amanitina). El análisis se hizo tanto a las 3 horas, (figura 4 del artículo) como a las 10 horas de germinación (figura 9 de Resultados).

Para asegurar la entrada de los inhibidores al eje embrionario se utilizó vacío: los ejes secos se imbibieron en un pequeño volumen de la solución del inhibidor y se expusieron en un matraz a 15' de vacío a 4C. Esta metodología se ha usado en el laboratorio para provocar la entrada de sustancias de alto peso molecular. De manera simultánea se hizo un "control" donde un pequeño lote de ejes embrionarios recibieron el mismo tratamiento de vacío pero la solución con la que se

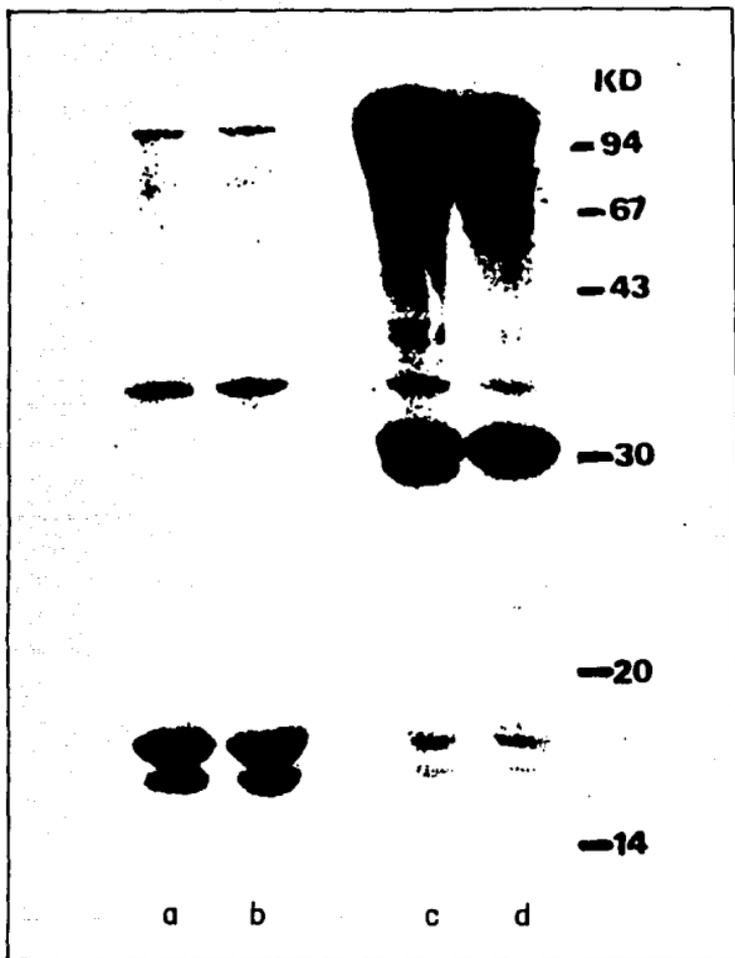


FIGURA 7: FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS RIBOSOMALES DE EJES IMBIBIDOS 3 (a y b) O 24 HORAS (c y d) APLICANDO UN PULSO DE AIA (20 ppm) DURANTE LA ÚLTIMA HORA DE IMBIBICIÓN (b y c), AL MISMO TIEMPO QUE EL PULSO DE ^{32}P .

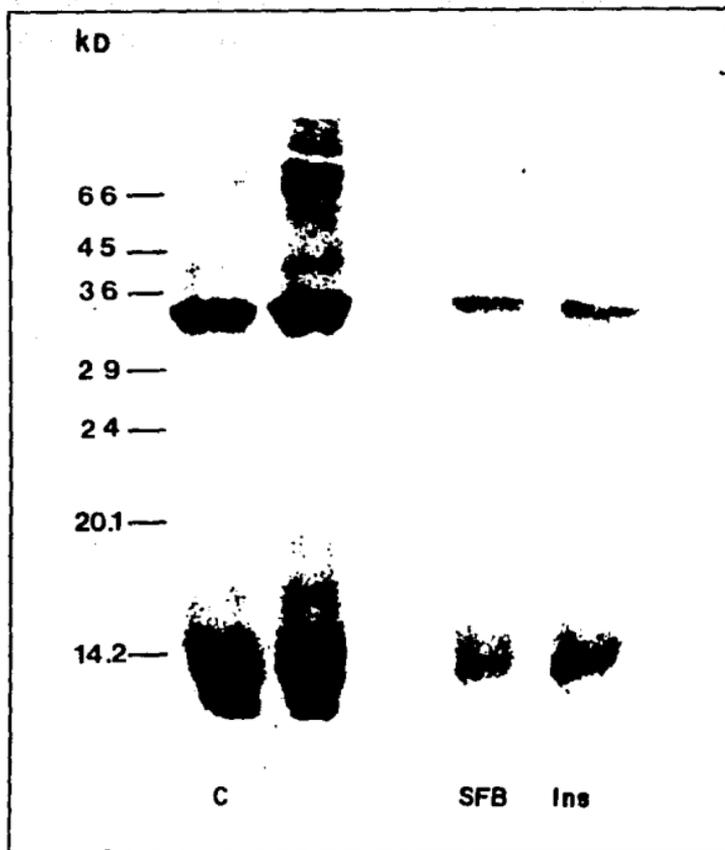


FIGURA 8: FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS RIBOSOMALES DE EJES EMBRIONARIOS IMBIBIDOS 5 HORAS. CONTROL (c), RIBOSOMAS DE EJES ESTIMULADOS CON 125 μ l DE SUERO FETAL DE BOVINO (SFB), O CON 200 μ U DE INSULINA (Ins). EN TODOS LOS CASOS EL ESTIMULADOR SE APLICÓ AL MISMO TIEMPO QUE EL PULSO RADIATIVO (DURANTE LA ÚLTIMA HORA DE IMBIBICIÓN).

bañaron fue únicamente agua estéril. Como se observa en el control de la figura 4 del artículo el vacío provocó la fosforilación temprana de S6. Este fenómeno lo atribuimos a estrés que el vacío debe provocar al tejido embrionario, y será discutido posteriormente.

Volviendo a las figuras 4 del artículo y 9 de resultados parece claro que la inhibición de la traducción o de la transcripción no alteran o evitan la fosforilación de las proteínas ribosomales. En el caso de S6 los inhibidores no evitan la fosforilación inducida por el vacío (figura 4 , artículo) ni la inducida por el desarrollo que ocurre naturalmente después de las ocho horas de imbibición (figura 9). Por lo anterior parece ser que tanto las(s) cinasa(s) responsables de la fosforilación de las proteínas ribosomales como sus sustratos ya están presentes en la semilla seca.

El único cambio observado fue la fosforilación producida por el tratamiento con cicloheximida en la proteína que en el gel se presenta justo abajo de la fosfoproteína de 30.9 kD. Es posible que la fosforilación haya sido inducida por el estrés que la presencia del inhibidor provoca en el tejido o por el bloqueo de la síntesis de alguna fosfatasa.

Ante el hecho de que una situación de estrés como es el vacío provoca la fosforilación temprana de la proteína de 30.9 kD, se decidió probar si otra situación de estrés induce la misma respuesta. Además se sabe que en otros sistemas el estrés de calor (heat shock) produce alteraciones en la fosforilación de la proteína ribosomal S6, de 31 kD, así que se decidió probar esta situación en nuestro sistema.

Además del patrón alterado de fosforilación que se muestra en el artículo debido a estrés de calor, cuando se utilizó otra temperatura (45C) durante un periodo mayor (30') se obtuvo un patrón de fosforilación ligeramente diferente (figura 10). Ambos presentan en común la fosforilación temprana de la proteína de 30.9 kD, pero el tratamiento más drástico (b) presenta además mayor incorporación de P en la proteína de 28.2 kD, y menor fosforilación en la de 20.1 kD.

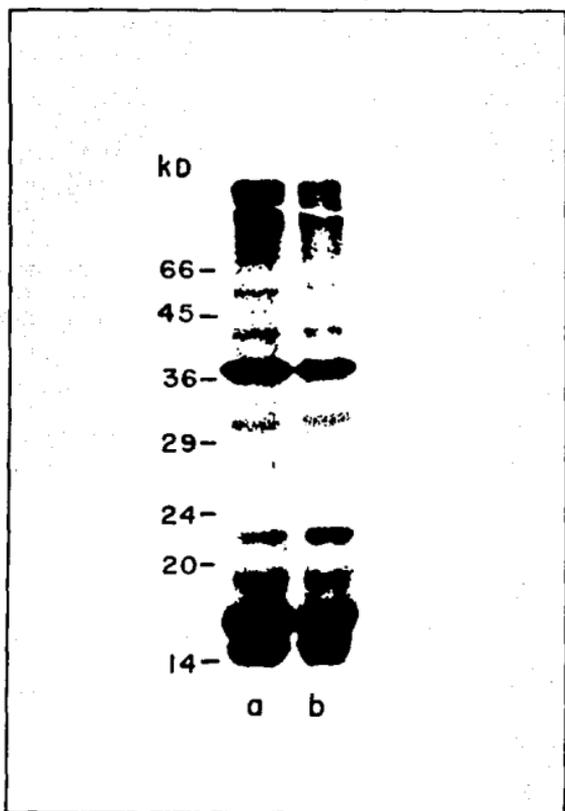


FIGURA 9: FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS RIBOSOMALES DE EJES EMBRIONARIOS IMBIBIDOS 10 HORAS EN PRESENCIA DE α -AMANITINA (a) O CICLOHEXIMIDA (b). LA FOSFORILACIÓN A LAS 3 HORAS Y EL CONTROL SIN INHIBIDORES SE PRESENTA EN LA FIGURA 4 DEL ARTÍCULO.

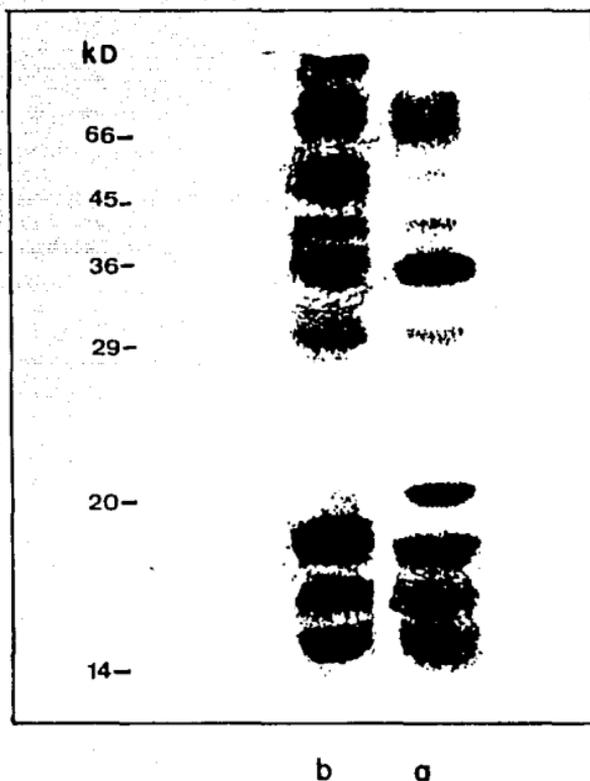


FIGURA 10: FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS RIBOSOMALES DE EJES EMBRIONARIOS DE MAÍZ A LOS QUE SE LES DIO UN "SHOCK" DE CALOR 20' A 42°C (a) O 30' A 45°C (b) AL FINAL DE LA IMBIBICIÓN, QUE EN TOTAL DURÓ 3 HORAS. EN AMBOS CASOS EL PULSO DE RADIATIVIDAD SE DIO DURANTE LA ÚLTIMA HORA.

Síntesis de proteínas durante la germinación

Para determinar si los cambios en la fosforilación de proteínas ribosomales que se observaron a lo largo de la germinación coinciden con un cambio notable en la velocidad de síntesis de proteínas, se imbibieron ejes embrionarios de maíz durante diferentes periodos de tiempo y se les dio un pulso de metionina radiactiva (35 S) durante la última hora de imbibición. Posteriormente se determinó cuánta radiactividad se incorporó a la fracción proteica en cada tratamiento y este valor se corrigió por la poza radiactiva determinada para cada caso (ver apéndice). Los valores obtenidos se presentan graficados en la figura 11. Como es posible notar, la velocidad de síntesis va aumentando de manera constante conforme avanza el tiempo de germinación. No parece haber un cambio brusco en este parámetro que coincida con el dramático cambio que previamente se describió para la fosforilación de ribosomas entre las 5 y 8 horas de germinación.

Este experimento se repitió al menos tres veces y en ningún caso fue posible observar algún cambio importante en la pendiente de la gráfica.

Con el fin de determinar si existe algún cambio cualitativo en la síntesis de proteínas en este periodo (entre las tres y ocho horas de germinación) no atribuible a la presencia de nuevos mRNAs resultantes de la transcripción, se realizó el experimento cuyos resultados se esquematizan en la figura 13 (La esquematización de las fluorografías fue necesaria debido a que la baja exposición de las fluorografías hizo difícil obtener fotografías con la calidad necesaria para su análisis y posterior impresión). La estrategia fue la siguiente:

Ejes embrionarios de maíz se trataron con α -amanitina desde el principio de la imbibición con el fin de bloquear la síntesis *de novo* de RNAs mensajeros, de tal manera que para la síntesis de proteínas sólo se utilizaran los mensajes almacenados.

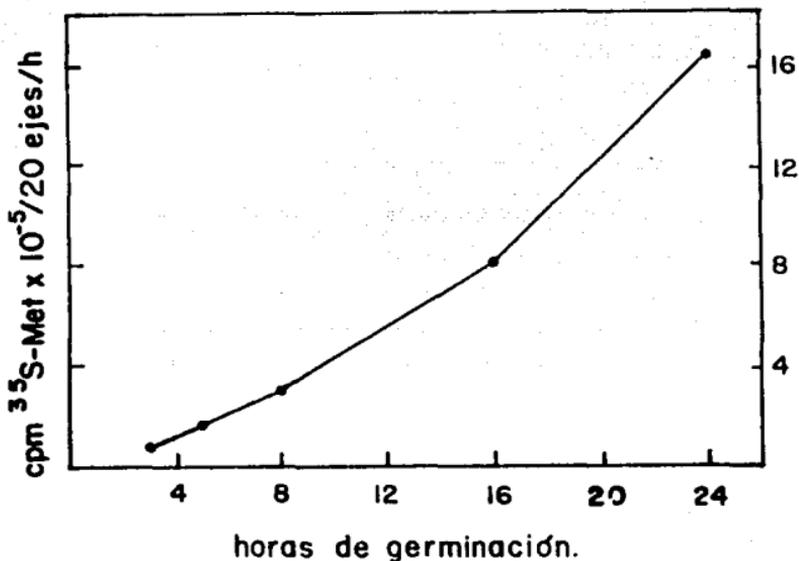


FIGURA 11: VELOCIDAD DE SÍNTESIS *in vivo* DE PROTEÍNAS A DIFERENTES HORAS DE GERMINACIÓN. EL PULSO DE ^{35}S -METIONINA SE DIO DURANTE LA ÚLTIMA HORA DE IMBIBICIÓN Y SE CUANTIFICÓ LA RADIOACTIVIDAD INCORPORADA A MATERIAL PRECIPITABLE CON 20% DE TCA.

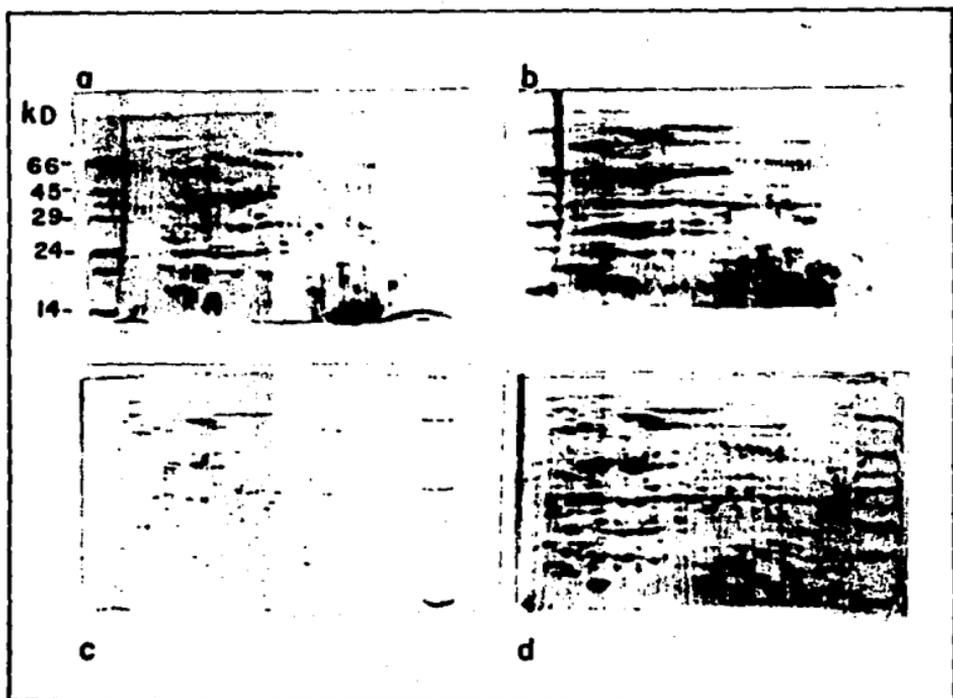


FIGURA 12: GELES BIDIMENSIONALES DE PROTEÍNAS DEL SOBRENADANTE POSRIBOSOMAL MARCADAS CON ^{35}S . LA DIFERENCIA EN EL CONTENIDO DE PROTEÍNA SE DEBE A QUE SE CARGARON IGUALANDO POR RADIATIVIDAD PARA FACILITAR LA INTERPRETACIÓN DE LAS FLUOROGRAFÍAS. 3 hrs. DE GERMINACIÓN (a); 3 hrs. con α -AMANITINA (b); 10 hrs. (c); 10 hrs. CON α -AMANITINA (d).

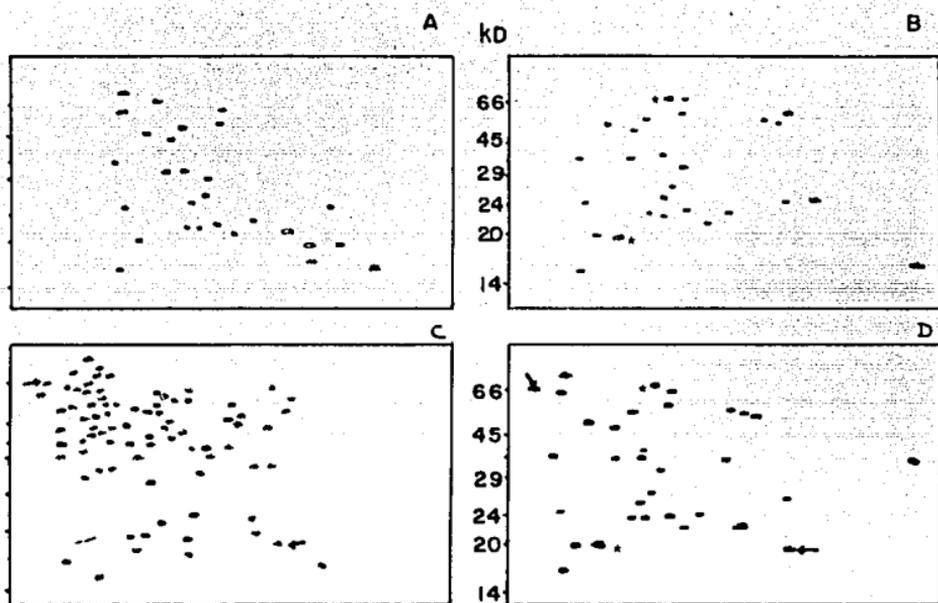


FIGURA 13: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS FLUOROGRAFÍAS CORRESPONDIENTES A LAS ELECTROFORESIS BIDIMENSIONALES DE PROTEÍNAS POSRIBOSOMALES MARCADAS CON METIONINA RADIATIVA. TRES HORAS (a y b) O DIEZ HORAS DE GERMINACIÓN (c y d) EN PRESENCIA (b y d) O AUSENCIA (a y c) DE α -AMANITINA. CON NEGRO ESTAN REPRESENTADAS LAS PROTEÍNAS COMUNES PARA LOS CUATRO TRATAMIENTOS. LAS FLECHAS SEÑALAN LAS PROTEÍNAS COMUNES PARA 10 CONTROL Y 10 α . LOS ASTERISCOS SEÑALAN AQUELLAS PROTEÍNAS QUE SÓLO APARECEN CUANDO SE INCUBA EN PRESENCIA DE α -AMANITINA.

Con este procedimiento y comparando las fluorografías de los geles bidimensionales de las proteínas sintetizadas (marcadas con ^{35}S) a diferentes horas de germinación se pretendía observar si existe control traduccional en ese momento de la germinación, el cuál se manifestaría con la aparición de proteínas diferentes en los geles de diferentes horas de imbibición, a pesar de que el juego de mensajes presente en los ejes embrionarios sería el mismo.

Si bien los patrones electroforéticos teñidos con azul de Coomassie son básicamente iguales (figura 12), es notable la diferencia que presenta el patrón de proteínas recién sintetizadas (esquemático en la figura 13 a partir de las fluorografías de cada tratamiento) entre las 3 y 10 horas de germinación: a pesar de que los geles se cargaron con igual cantidad de radiactividad (número de cuentas), a las tres horas sólo apreciamos alrededor de 28 proteínas (A) mientras que a las diez horas es posible distinguir cerca de 80 manchas (C). Por comparación con el esquema del tratamiento de 10 horas con α amanitina (D), parece ser que la mayoría de las proteínas que aparecen específicamente a las 10 horas (señaladas con azul en C) son sintetizadas a partir de mensajeros que se generan durante las fases tempranas de la germinación, pues desaparecen si se bloquea la transcripción (D).

Los tratamientos de 3hrs: A y B (control y con α amanitina) así como el de 10 horas con α amanitina (D) presentan alrededor de 20 proteínas comunes que en el esquema se representan con negro; de estas especies sólo fue posible localizar 12 con razonable seguridad en el tratamiento de 10 horas control (C).

Debido a que estas proteínas (señaladas con negro) se presentan tanto en los controles como en los tratamientos con α amanitina, es posible pensar que se trata de proteínas que se sintetizan a partir de mensajeros almacenados. Cabe indicar que por pruebas realizadas en el laboratorio, sabemos que la concentración de α amanitina usada bloquea en más de un 95% la síntesis de mRNA.

En el esquema se señala con verde las proteínas que sólo aparecen en el control de tres horas de germinación (A), con anaranjado las propias de 3 horas imbibidas en presencia de α -amanitina (B), con azul aquellas que aparecen sólo en el patrón de diez horas (C) y con rojo las que aparecen específicamente en el tratamiento de 10 horas con α -amanitina (D).

Al comparar los esquemas B y D resulta claro que las proteínas propias de cada tratamiento (anaranjadas en B y rojas en D) no son las mismas, a pesar que estos dos tratamientos poseen el mismo juego de RNAs mensajeros. Más adelante se discutirá este resultado como indicativo de la presencia de control traduccional.

En el esquema se señalan con flechas llenas aquellas proteínas cuya síntesis parece ser común en los tratamientos de 10 y 10. La mayoría de ellas no están presentes a las tres horas de imbibición (sólo una de ellas aparece también en A). Como estas proteínas se sintetizan aún en presencia de α -amanitina, debe tratarse de especies que se expresan únicamente a las 10 horas, aún cuando sus mensajeros estén presentes desde el principio de la imbibición.

Finalmente se encuentran marcadas con asterisco (*) las proteínas que sólo aparecen en los casos en que los ejes se imbibieron en presencia de α -amanitina (B y D).

En la figura 14 se muestra la fluorografía de las proteínas ribosomales extraídas de ejes embrionarios que recibieron los mismos tratamientos que en la figura 14. El gel fue cargado igualando cantidad de proteína.

A juzgar por que existe incorporación de radiactividad desde las tres horas de imbibición, parece ser que la síntesis de proteínas ribosomales empieza tempranamente en la germinación.

A este tiempo la incorporación de 3 S-metionina parece estar disminuída por la presencia de α -amanitina por lo que es posible que parte

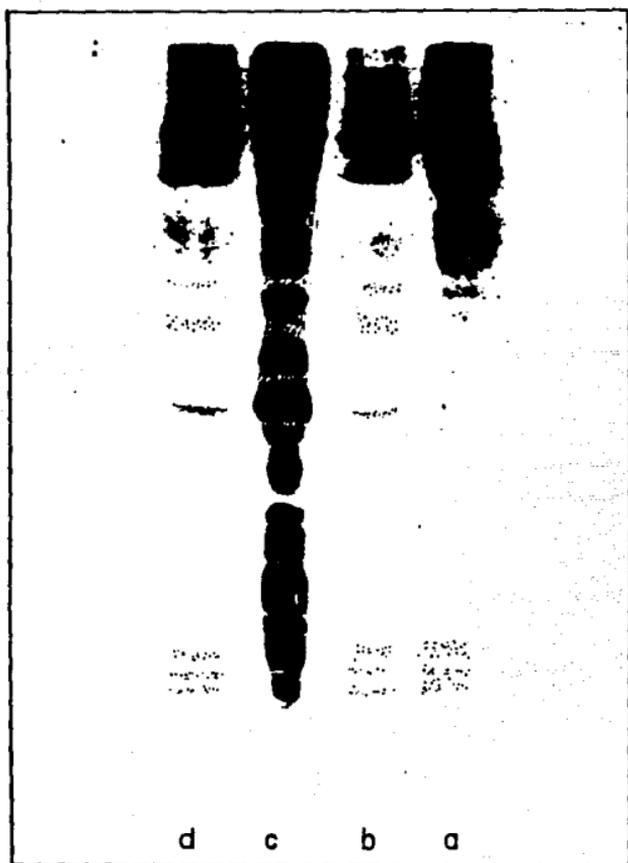


FIGURA 14: FLUOROGRAFÍA DE LAS PROTEINAS RIBOSOMALES MARCADAS CON ^{35}S -METIONINA DURANTE LA GERMINACIÓN. LOS TRATAMIENTOS SON LOS MISMOS QUE EN LA FIGURA 14.

de la síntesis de estas proteínas a las tres horas esté dirigida por mensajes recién sintetizados.

A las 10 horas de germinación la síntesis es muy abundante y el tratamiento con amanitina provoca una drástica disminución en la incorporación. Parece ser que la contribución de los mensajeros nuevos es mayor a las diez que a las tres horas de imbibición.

La tabla 1 presenta los datos cuantitativos de los experimentos mostrados en las figuras 13 y 14. Se presentan como valores relativos pues cada experimento mostró valores absolutos diferentes, dependiendo de la radiactividad utilizada y su incorporación en cada caso.

A las tres horas de germinación en presencia del inhibidor, la síntesis de proteínas del sobrenadante posribosomal disminuye alrededor de un 60% , y en el caso de las proteínas ribosomales la disminución es de alrededor de un 50%.

A las diez horas la incorporación de metionina radiactiva aumenta alrededor de un 75% respecto al control en el caso de las proteínas del sobrenadante posribosomal y aproximadamente un 100% para las ribosomales. En ambos casos la presencia del amanitina provoca la disminución de la incorporación a valores prácticamente iguales que los encontrados para las 3 horas en presencia del inhibidor. No parece haber diferencia estadísticamente significativa entre el comportamiento de las proteínas ribosomales y las proteínas del sobrenadante posribosomal.

| TRATAMIENTO | PROTEÍNAS POSRIBOSOMALES | PROTEÍNAS RIBOSOMALES |
|-----------------|--------------------------|-----------------------|
| 3 hrs. C | 1 | 1 |
| 3 hrs. α | 0.345 \pm 0.097 | 0.535 \pm 0.263 |
| 10hrs. C | 1.750 \pm 0.161 | 2.020 \pm 0.209 |
| 10hrs. α | 0.339 \pm 0.102 | 0.479 \pm 0.134 |

TABLA 1: INCORPORACIÓN RELATIVA DE 35 S A PROTEÍNAS DEL SOBRENADANTE POSRIBOSOMAL Y A PROTEÍNAS RIBOSOMALES DURANTE LA GERMINACIÓN, EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE α -AMANITINA.

LOS VALORES PRESENTADOS SON RELATIVOS AL CONTROL. n=3.

Discusión

Seguramente en algunos aspectos de esta discusión se repetirán ideas que ya se manejaron en el artículo, sin embargo para exponer un análisis general de esta tesis es necesario hacer una interpretación global de todos los resultados obtenidos.

A) Fosforilación *in vivo* e *in vitro* de proteínas ribosomales durante la germinación de maíz

En la figura 1 del artículo se muestra la "autofosforilación" que sufren los ribosomas extraídos de ejes embrionarios con diferentes horas de germinación. Decimos que se trata de autofosforilación pues en el ensayo no se agrega otra cinasa mas que la(s) presente(s) en la preparación ribosomal, y por la metodología empleada en su extracción (a través de un colchón de sacarosa con 0.5 M de KCl), estos ribosomas no parecen tener otras proteínas además de las estructurales (Browning *et al*, 1985; Scharf y Nover, 1982) así que la actividad de cinasa está a cargo de proteínas que constituyen al ribosoma. Hay que decir que el significado que tiene la autofosforilación en los ribosomas es desconocido.

Las proteínas que *in vivo* sufren esta modificación covalente son varias pero llaman la atención aquellas cuyo estado de fosforilación cambia a lo largo del tiempo, esto es: la de 30.9 kD, en la que la incorporación de fósforo radiactivo se inicia entre las 5 y 8 horas de germinación, y las de 14.8 y 15.8 kD, cuya incorporación de fósforo va decreciendo marcadamente hasta cesar por completo a las 30 horas de germinación (figura 2 del artículo).

Al comparar la fosforilación *in vivo* e *in vitro* pareciera que se trata de dos fenómenos diferentes: *in vivo* se presentan importantes cambios en la fosforilación a lo largo del tiempo de germinación, que a juzgar por el escaso éxito para alterarlos con estimuladores externos (figura 3 del artículo y figuras 7,8 y 9 de Resultados), parecen estar estrictamente

regulados por señales internas propias del desarrollo. Además debido a que las fosforilaciones en un caso y en otro no son en los mismos sitios ni con la misma intensidad es muy posible que se trate de diferentes enzimas.

Cabe mencionar aquí que este mismo experimento de la fosforilación *in vivo* se repitió tres veces anteriores, pero no se lograba tener suficiente incorporación de ^{32}P en proteínas ribosomales como para revelar la autorradiografía en un tiempo razonable. Fue hasta que se utilizó β -glicerilfosfato en todos los amortiguadores que obtuvimos resultados como el que aquí se presenta. Así pues estas fosforilaciones parecen estar muy expuestas a fosfatasas durante la extracción.

De alguna manera esta importante actividad de fosfatasa sobre el ribosoma ayudaría a explicar por qué no existe consenso acerca del número de proteínas ribosomales que se fosforilan, y por qué no siempre son exitosos los intentos para determinar si esta fosforilación tiene algún efecto en la traducción.

Se hicieron algunos esfuerzos para tratar de identificar las proteínas ribosomales fosforiladas y aunque no son suficientes resultan muy alentadores los pocos resultados que se obtuvieron en este sentido: Las fosfoproteínas de 14.8, 15.8 y 38 kD se encuentran en la subunidad grande ribosomal (figura 5C del artículo) y la de 30.9 kD no parece encontrarse en esta subunidad.

La razón por la que no se muestra la autorradiografía correspondiente a la fosforilación en la subunidad pequeña es metodológica: a pesar de que la resolución que se logró al separar las subunidades en el gradiente de sacarosa es bastante aceptable (fig 5A) y de que el rendimiento es suficiente para detectar las proteínas aún con azul de coomassie (fig. 5B), la radiactividad en la subunidad pequeña no fue suficiente como para observarse en la placa autorradiográfica. Este procedimiento se repitió varias veces poniendo los mismos inhibidores de fosfatasas que fueron efectivos durante la extracción de ribosomas (β -glicerilfosfato y fluoruro de sodio) y sin embargo el fósforo incorporado

a proteínas "desaparece", mostrando que los inhibidores no son eficientes durante la manipulación que requiere este proceso. Si bien este hecho nos causa intriga, resultados de otros estudiantes en el laboratorio demuestran la presencia de proteína-fosfatasa entre las proteínas estructurales del ribosomas, y esta actividad no es bloqueada con β -glicerilfosfato en los ensayos *in vitro* (Sepúlveda, comunicación personal). Es posible pensar que la cercanía física de la fosfatasa con su sustrato haga poco efectiva la presencia del β -glicerilfosfato, pues éste inhibe a las fosfatasa por competencia con su sustrato.

Si bien de ninguna manera son concluyentes, los datos hasta ahora obtenidos (peso molecular y posible localización en subunidades) permiten pensar que la identidad de las proteínas en cuestión es la siguiente: L7 y L12 (o P1 y P2) para las bandas de 14.8 y 15.8 kD y S6 para la banda de 30.9 kD. Además el patrón de fosforilación obtenido se comparó con los pocos que para vegetales hay en la literatura, y tanto el peso molecular como la localización en subunidades de las fosfoproteínas coinciden (Scharf y Nover, 1982).

A reserva de identificar las fosfoproteínas por otros métodos, si efectivamente se trata de las proteínas L7, L12 y S6 el fenómeno es más interesante aún pues se trata precisamente de las proteínas ribosomales cuya fosforilación está descrita, y además se ha reportado su posible participación en fenómenos de control traduccional (Mc Connell y Kaplan, 1982; Vidales *et al*, 1984; Nielsen *et al*, 1981; Nielsen *et al*, 1982; Burkhard y Traugh, 1983; Palen y Traugh, 1987).

B) Control traduccional durante la germinación

El aumento en la velocidad de síntesis de proteínas en un tejido dado puede ser reflejo del aumento en la formación de polisomas. Si la fosforilación de S6 entre las 5 y 8 horas de germinación provocara aumento en la cantidad de ribosomas unidos a polisomas como está reportado para otros sistemas (Nielsen *et al*, 1981), o facilitara la iniciación de la síntesis de proteínas (Thomas *et al*, 1982) creemos que

esto se vería reflejado en un aumento significativo en la velocidad de síntesis de proteínas entre las 5 y 8 horas de germinación.

La gráfica de la figura 11 muestra que el aumento en la velocidad de incorporación de metionina radiactiva a lo largo de la germinación es constante, por lo que creemos que la fosforilación de S6 no es el factor causante de este aumento.

Sin embargo es curioso hacer notar que el aumento en la velocidad de síntesis parece paralelo a la disminución en la fosforilación de los proteínas ribosomales que podrían corresponder a las proteínas ácidas (14.8 y 15.8 kD). Desde luego sería necesario cuantificar la radiactividad incorporada a estas proteínas para ver si efectivamente existe una relación cuantitativa. Esta determinación tendría que considerar no sólo la densitometría de las autorradiografías sino también en forma crítica el tamaño de la poza de ATP radiactivo que se encuentre disponible en cada etapa de la germinación.

Si en un análisis cuantitativo más estricto sí se encontrara relación inversa entre la velocidad de síntesis y la de incorporación de fósforo en las proteínas ácidas podría especularse sobre el papel de la fosforilación de estas proteínas:

Actualmente se cree que la afinidad que tienen las proteínas ácidas por el ribosoma depende de su fosforilación (Vidales, 1984), de tal manera que aquellas proteínas fosforiladas son las que están integradas al ribosoma. Además se sabe que son las proteínas ácidas fosforiladas las que permiten mayor velocidad de elongación (Mc Conel y Kaplan, 1982). Si esto funcionara para el presente sistema de estudio podría ser que la incorporación de fósforo radiactivo en las proteínas ácidas del ribosoma fuera necesaria para la integración de los monosomas a polisomas, y conforme disminuye la cantidad de monosomas (al ir aumentando la de polisomas, Sánchez de Jiménez *et al*, 1981) la incorporación de fósforo radiactivo a proteínas ácidas disminuye también. El no encontrar las proteínas ácidas "fosforiladas" a las 30 horas con pulso de fósforo radiactivo puede ser resultado de que las proteínas ya incorporaron fósforo "frío" durante las

horas anteriores al pulso, y que ya no hay "monosomas que fosforilar" pues todos se encuentran enganchados a polisomas.

Desde luego es muy posible que existan otros factores que limiten la velocidad de síntesis de proteínas como son la energía disponible para la síntesis de proteínas, actividad de las aminoacil-tRNA sintetasas, poza disponible de aminoácidos, síntesis de ribosomas etc., y sean estos otros elementos los que determinen el aumento en la velocidad de síntesis.

La germinación de semillas es un proceso que trae consigo un fuerte cambio de expresión génica el cual es fundamental para el desarrollo de la plántula. Presenta características muy peculiares como el hecho de que coexisten RNAs mensajeros que se formaron durante una etapa de desarrollo diferente con RNAs mensajeros que son producto de una re-programación en la expresión génica.

Si bien el papel que juegan los mensajeros almacenados en esta nueva etapa del desarrollo es motivo aún de controversia, su presencia y su traducción durante la germinación temprana es un hecho ampliamente aceptado.

Es por esto que, sin negar la importancia fundamental que tiene el control transcripcional en la germinación, y con base en los hallazgos sobre fosforilación de las proteínas ribosomales en este momento del desarrollo, se decidió averiguar si una parte complementaria de la estrategia para modular la expresión genética en este sistema es también el control traduccional, el cual afectara el proceso a nivel cualitativo.

Además de lo encontrado en la literatura, los resultados del experimento de la figura 13 (Resultados) ofrecen apoyo a la existencia de control traduccional durante la germinación:

El hecho de que el patrón de proteínas sintetizadas cambie tan dramáticamente en los controles a las 3 y 10 horas de germinación (figura 13, A y C) sugiere que este es un momento en que está sucediendo un cambio importante en la expresión genética del sistema. El

hecho de que al utilizar α -amanitina el patrón de 10 horas (D) sea casi igual que los de 3 hrs. control (A) y 3 hrs. con α -amanitina (B) parece confirmar que el componente transcripcional tiene fuerte peso en el cambio de expresión.

Sin embargo, aunque existe un mismo juego de mensajes en 3 y 10 (B y D), porque está bloqueada la transcripción, en estos dos momentos distintos de germinación se sintetizan algunas proteínas diferentes (señaladas con color naranja en B y con color rojo en D) además de un "set" común (en negro). Lo anterior indica que algunos de los mensajes que están presentes desde el principio de la imbibición de la semilla sólo se expresan en momentos específicos de la germinación, seguramente como respuesta a alguna señal interna.

Es posible que este control traduccional sea un mecanismo complementario al de destrucción y síntesis de RNAs mensajeros, necesario para modular eficazmente la expresión genética en este momento del desarrollo.

Las manchas señaladas con flechas (C y D) parecen tratarse de proteínas que se sintetizan únicamente a las 10 horas de germinación. A juzgar por su presencia a pesar del α -amanitina (D), sus mensajes se encontraban presentes desde el principio de la germinación y sin embargo no se traducen a las tres horas de imbibición.

Lo anterior puede suceder si algunos de los mRNAs se encuentran compartimentalizados en algún sitio, por ejemplo núcleo, y están fuera del alcance de los ribosomas (Hammett y Katterman, 1975) o si se encuentran asociados a proteínas formando partículas ribonucleoproteicas llamadas informosomas (Peumans *et al*, 1979), por lo que su traducción está bloqueada.

Otra posibilidad (que no necesariamente excluye a las anteriores) es que la maquinaria de síntesis sufra algún cambio que haga que a diferentes horas de germinación se favorezca diferencialmente la lectura de algunos mensajeros (modulación a nivel traduccional). Este cambio bien puede ser debido a la fosforilación de S6.

Sin más bases que la coincidencia temporal y la relación reportada en la literatura entre control traduccional y fosforilación de proteínas ribosomales, creemos posible que en la germinación de maíz la diferencia en fosforilación de S6 entre las 5 y 8 horas de imbibición sea parte del mecanismo de selección de RNAs mensajeros que hace posible que algunos se traduzcan a las tres y otros a las diez horas de germinación.

Hay que mencionar también que ante el tratamiento con amanitina aparecen tanto a las tres como a las diez horas de germinación dos proteínas (señalada con asterisco en B y D). Es posible que la presencia de estas proteínas sea una "respuesta" al estrés provocado por la presencia del inhibidor.

Así pues por los resultados de los experimentos con metionina ³⁵S se concluye que existe un importante cambio cualitativo en la síntesis de proteínas durante las primeras horas de germinación, y que este cambio no es reflejo únicamente de la transcripción, así que se sugiere la presencia de control traduccional en esta etapa de la germinación.

A reserva de confirmar plenamente la existencia de control traduccional en este momento de la germinación, este fenómeno podría ser parte de la estrategia general por la cual el eje embrionario reprograma su expresión génica para ahora desarrollar una plántula.

Si el control traduccional sucede en parte a través de la fosforilación-defosforilación de las proteínas ribosomales, "descubrir" cuáles son los elementos que regulan la fosforilación sería muy importante para determinar las señales que provocan el fenómeno de la germinación.

Por otra parte los RNAs mensajeros sujetos a control traduccional deben tener características estructurales que harían posible su selección por ribosomas "fosforilados". El conocer estas características estructurales nos permitiría entender mejor el fenómeno de selección de mensajes, y sondeando otros sistemas reconocer su importancia en los otros casos donde está descrita la fosforilación de S6.

C) Estimuladores externos en la fosforilación de proteínas ribosomales

Haciendo uso de la información encontrada en la literatura decidimos aplicar diversos estimuladores para tratar de inducir la fosforilación temprana de la proteína "S6".

Además de los incluidos en el artículo, utilizamos suero fetal de bovino (SFB) e Insulina (Ins.) (figura 8, resultados). La razón para probarlos es que están descritos como estimuladores de la fosforilación de S6 en sistemas animales (Thomas, *et al*, 1982). Además aunque aún no ha sido descrito para plantas, se sabe que hormonas del tipo de la insulina ("insulin-like") están presentes en organismos muy alejados de los mamíferos, como esponjas (Robitzki *et al*, 1989), por lo que parecen estar muy conservados a lo largo de la evolución.

Sin embargo ninguno de los estimuladores probados produjo la fosforilación temprana de S6. Si bien es posible que las plantas no respondan a estos estimuladores, aún no podemos descartar que sea en otros tejidos o en otros momentos del desarrollo cuando la planta sea capaz de responder a ellos. Será hasta que se identifique la cinasa de S6 en plantas, cuando podamos determinar si sus activadores son comunes a los de los animales.

El AIA (auxina natural) se probó a dos diferentes tiempos de germinación: 3 hrs (resultado incluido en el artículo, Figura 3) y a 24 horas (fig 7, resultados). El único cambio visible fue la aparición de una banda fosforilada de 28.2 kD. La cercanía con la banda de 30.9 kD puede sugerir que se trata de una especie de la misma proteína pero con diferente estado de fosforilación pues está descrito que la presencia de grupos fosfato en una proteína puede alterar su movilidad electroforética en geles de SDS (Ericson y Maller, 1989). Desde luego esto no descarta que pueda tratarse de una proteína totalmente diferente pero de peso molecular semejante.

El hecho de que la fitohormona provoque algún cambio en la fosforilación a las 24 pero no a las 3 horas de imbibición podría explicarse si consideramos que el tejido puede no ser responsivo a auxinas en horas tempranas de germinación. En la literatura está descrito que un mismo tejido puede presentar diferentes proteínas de unión a auxinas (posibles receptores) a lo largo de su desarrollo (Shimomura *et al*, 1988).

Si ésto sucediera durante la germinación significaría que incluso la sensibilidad a estímulos externos es una "capacidad" que el embrión genera quizás como respuesta a su programa de desarrollo preestablecido.

D) Estrés y fosforilación de proteínas ribosomales

Se ha reportado que el estrés de calor ("Heat-Shock") estimula el recambio de fósforo en la proteína ribosomal S6 (Sharf y Nover, 1982; Glover, 1982).

En el sistema usado en este trabajo, el estrés de calor hizo que la proteína S6 incorporara fósforo radiactivo desde las tres horas de germinación (figura 3 del artículo). Además provocó desfosforilación de la proteína de 20.1 kD, y en algunos de los experimentos (fig 10 B), dependiendo del tiempo que duró la incubación y si se realizó a 45C o a 42C, se aumentó la fosforilación de una proteína de 22 kD y de la proteína de 28.2 kD. (ver figura 10).

Tanto el estrés de vacío como el estrés de calor provocaron la fosforilación "temprana" de la proteína ribosomal de 30.9 kD.

De momento no es posible asegurar que la fosforilación provocada por señales internas del desarrollo (a las ocho horas de germinación) sea igual que la provocada por los diferentes tipos de estrés. A pesar de que se trata de la misma proteína fosforilada es posible que esta modificación covalente se ubique en diferentes posiciones. Si esto fuera así, la fosforilación en ambos casos probablemente tendría diferente significado funcional, tal y como está descrito para la fosforilación de S6

por una cinasa dependiente de cAMP o por una cinasa activada por proteasas (Palen y Traugh, 1987).

Ahora bien, si la fosforilación de S6 provocada por el desarrollo y por el estrés estuviera a cargo de la misma cinasa podría tratarse de un efecto convergente de dos señales distintas que en algún punto comparten la vía de transducción.

Es interesante mencionar aquí que para otros sistemas se ha reportado una situación semejante, en el sentido de que respuestas que se creían exclusivas de "heat-shock" se presentan durante ciertas etapas de desarrollo:

En el caso de *Drosophila* los mRNAs que codifican para las proteínas de estrés de calor (HSP) de 26, 28 y 83 kD son inducidos a altos niveles en las células nodrizas del ovario. Los mensajeros para las HSPs de 22, 23, 26 y 28 kD se inducen también durante el último tercio de la transición larva-prepupa (Lindquist, 1986).

Cooper y colaboradores, al caracterizar la respuesta a estrés de calor de diferentes tejidos de maíz, encuentran que las HSPs de 70 y 72 kD se expresan constitutivamente en los granos de polen durante su germinación, mientras que en otros tejidos estas proteínas únicamente se sintetizan durante estrés de calor (Cooper *et al*, 1984).

Conclusiones

El presente trabajo muestra por primera vez que existe fosforilación de proteínas ribosomales en ejes embrionarios de maíz durante las primeras 30 horas de germinación.

El patrón de fosforilación cambia notablemente a lo largo de la germinación:

A las ocho horas de imbibición se inicia la incorporación de fósforo radiactivo en una proteína de 30.9 kD

Las proteínas de 38.1, 15.8 y 14.8 kD incorporan fuertemente fósforo radiactivo desde las tres horas de germinación; esta incorporación va disminuyendo conforme avanza la imbibición hasta cesar casi por completo a las 30 hrs. de germinación.

Esta fosforilación parece estar fuertemente regulada por el desarrollo pues ninguno de los estimuladores probados logró alterar el patrón de fosforilación internamente establecido.

De manera preliminar se identificaron algunas de las proteínas ribosomales fosforiladas: aquellas que en nuestro sistema presentan peso molecular de 14.8 y 15.8 kd creemos que se tratan de las proteínas L7 y L12 (o P1 y P2) por su coincidencia en el peso molecular reportado y su ubicación en la subunidad grande ribosomal.

La fosfoproteína que en nuestro sistema se presenta con 30.9kD de peso molecular parecería ser que se trata de la proteína S6. Esto es con base tanto en su peso molecular reportado como en la alteración de su fosforilación por situaciones de estrés (calor y vacío). Aunque no en forma definitiva se sugiere que pertenece a la subunidad pequeña ribosomal.

La fosforilación de las proteínas ribosomales en la germinación no depende de síntesis de proteínas por lo que se concluye que la(s) ci-

nasa(s) responsables de este fenómeno ya está(n) presente(s) en la semilla seca.

Durante las primeras horas de la germinación de maíz se observa un fuerte cambio en las proteínas sintetizadas por el eje embrionario. Este cambio es atribuible en su mayor parte a cambios en la transcripción, sin embargo experimentos con bloqueadores de la síntesis de mensajeros revelan lo que parece ser un componente de control traduccional en este mismo sistema.

La fosforilación de la proteína S6 coincide temporalmente con cambios cualitativos en la traducción que no son debidos únicamente a la aparición de nuevos mensajes.

Apéndice: Metodología no descrita en el artículo

Medida de la velocidad de síntesis de proteínas durante la germinación

Para cada tratamiento se sembraron 20 ejes embrionarios de maíz disectados manualmente en medio Murashige y Skoog (1962) y se mantuvieron a 25°C en oscuridad durante los tiempos indicados. Durante la última hora de siembra se aplicó un pulso de metionina ³⁵S (actividad específica 41.8 TBq/mmol; 100 uCi por tratamiento en un volúmen de 100 µl), se retiraron los ejes del medio de cultivo, se lavaron tres veces con agua estéril y se congelaron a -70°C hasta su uso.

La molienda se realizó en morteros estériles con nitrógeno líquido y arena de mar (Sigma) como abrasivo. El polvo se pasó a tubos Corex donde se mezcló vigorosamente con 6 ml de amortiguador (Tris-HCl 50 mM pH 7.6, KCl 50 mM, MgCl 10 mM, β-mercaptoetanol 5 mM, NaF 5 mM y PMSF 1 mM). Después de centrifugar a 27,000xg durante 10 minutos se tomó una alcuota del sobrenadante para cuantificar la toma de radiactividad de cada tratamiento (poza). Al resto del sobrenadante se le agregó NaOH hasta alcanzar una concentración de 1M y se calentó a 37°C durante 10 min para hidrolizar los tRNAs. Posteriormente la mezcla se neutralizó con TCA al 100% y se agregó además un exceso de éste hasta alcanzar una concentración del 10%. Las muestras permanecieron en hielo al menos tres horas, se centrifugaron a 10,000 xg durante 5 minutos y las pastillas se lavaron con éter varias veces hasta quitar el TCA. Las proteínas se resuspendieron en el mismo amortiguador utilizado para la molienda y se cuantificó la radiactividad incorporada a proteína mezclando una alcuota con 10 ml de líquido de Bray que contiene PPO 0.4 % , POPOP 0.02 % , Naftaleno 6 % , Etilenglicol 2 % y Metanol 10 % en Dioxano (Bray, 1972) en viales y contando en un aparato de centelleo líquido Minaxi-β Tri-carb.

El valor de incorporación de radiactividad obtenido se corrigió por el valor de la poza de cada tratamiento.

Análisis electroforético de las proteínas sintetizadas durante la germinación

Los ejes embrionarios se sembraron como se mencionó anteriormente sólo que el pulso de metionina radiactiva se dio durante la última hora y media de imbibición.

Para los tratamientos en los que se bloqueó la síntesis de mRNAs los ejes secos se trataron con 15 μg (en 150 μl) de α -amanitina durante diez minutos, y posteriormente se sembraron. Se les dio un refuerzo 10 μg de α -amanitina al aplicar el pulso de radiactividad. Los controles se trataron de la misma manera pero con agua estéril en vez de la solución del inhibidor de la transcripción. Al terminar el periodo de imbibición se lavaron y congelaron tal como se describió previamente.

Se decidió utilizar las proteínas del sobrenadante posribosomal para así evitar la interferencia en la electroforesis del RNA ribosomal y de los péptidos nacientes. Es por esta razón que después de marcar los ejes con ^3S y lavarlos, se siguió la metodología de extracción de ribosomas mencionada en el artículo, y las proteínas se precipitaron a partir del sobrenadante posribosomal con 5 volúmenes de acetona, se resuspendió en agua y luego se reprecipitó llevando la muestra hasta un 20% de TCA. Después de lavar la pastilla se resuspendió en amortiguador de muestra (Urea 9.5M, anfolinas 4%, β -mercaptoetanol 5 % y NP-40 2%), se tomó una alícuota para cuantificar radiactividad y una muestra de cada tratamiento se sometió a electroforesis bidimensional de acuerdo a la técnica de no equilibrio (NEpHGE) modificada por O'Farrel (1977). La primera dimensión se realizó en geles de 7cm de longitud en presencia de anfolinas con rango de pH 3-10. El isoelectroenfoco se corrió por un total de 3.5 horas (30' a 100v, 45' a 200v, 75' a 300v y 60' a 500v) con polaridad invertida. Los geles se sacaron de los tubos y se almacenaron en amortiguador de diálisis (Tris HCl 0.06M pH 6.8, SDS 2% , β -mercaptoetanol 5 %, glicerol 10% y azul de bromofenol 0.002%) congelados hasta su uso.

La segunda dimensión se realizó en minigeles (Mighty small II, SE250, Hoefer Scientific Instruments) donde el gel separador contenía 15% de acrilamida-bisacrilamida (30:0.8). Se corrió a voltaje constante (120v) hasta poco después de la salida del frente.

Los geles se tiñeron con azul de coomassie, se destiñeron con solución de metanol (30%) y ácido acético (7%) , se lavaron con agua durante 30 min y luego se sumergieron en una solución de salicilato de sodio 1M (pH 5-7) durante 15' lo cual sustituye exitosamente el tratamiento para fluorografía con PPO y DMSO.

(Chamberlain, 1979). Inmediatamente después se secaron (secador de geles Bio-Rad, modelo 224) sobre papel Whatman 3MM , se expusieron a película autorradiográfica Kodak X-Omat, y permanecieron a -70°C hasta su revelado.

Bibliografía

- AJTKHOZHIN, M.A., Doshchanov, K.I. and U.A. Akhanov (1976). Informosomes as a stored form of mRNA in wheat embryos. *Febs Lett.* 66:124-126.
- BAIZA, A. and E. Sánchez de Jiménez (1986). Histones and the first cell cycle in maize germination. *Physiol.Plant.* 68:259-264.
- BAIZA, A., Vázquez-Ramos, J.M. and E. Sánchez de Jiménez (1989). DNA synthesis and cell division on embryonic maize tissues during germination. *J. Plant Physiol.* 135:416-421.
- BALLOU, L.M., Jenó, P. and G. Thomas (1988). Protein phosphatase 2A inactivates the mitogen-stimulated S6 kinase from Swiss mouse 3T3 cells. *J.Biol.Chem.* 263(3):1188-1194.
- BELANGER, G., Godin, C. and G. Lemieux (1981). Turnover rates of phosphoryl groups in ribosomal proteins of *Physarum polycephalum*: Evidence for two different mechanisms. *Eur.J.Biochem.* 120:143-148.
- BEWLEY, J.D. and M. Black (1985). *Seeds: Physiology of development and germination*. Plenum Press. New York. pp 1-2, 156-173.
- BRAY, G.A. (1972). A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. *Anal.Biochem.* 1:229-235.
- BROWNING, K.S., Yan, T.F., Lauer, S.J., Aquino, L.A. Tao, M and J.M. Ravel (1985). Phosphorylation of wheat germ initiation factors and ribosomal proteins. *Plant Physiol.* 77:370-373.
- BURKHARD, J.S. and J.A. Traugh (1983). Changes in ribosome function by cAMP-dependent and cAMP-independent phosphorylation of ribosomal protein S6. *J.Biol.Chem.* 258(22):14003-14008.

CAERS, L.I., Peumans, W.J. and A.R. Carlier (1979). Preformed and newly synthesized messenger RNA in germinating wheat embryos. *Planta* 144:491-496.

COOPER, P., David-Ho, T. and R.M. Hauptmann (1984). Tissue specificity of the Heat-Shock response in maize. *Plant Physiol.* 73:431-441.

CORTES, F. (1986). *Cuadernos de Histología Vegetal*. 2a ed. Marban. Madrid, Esp. pp 177-183.

CUMING, A.C. and B.G. Lane. (1979). Protein synthesis in imbibing wheat embryos. *Eur.J.Biochem.* 99:217-224.

ERIKSON, E. and L. Maller (1989). *In vivo* phosphorylation and activation of ribosomal protein S6 kinases during *Xenopus* oocyte maturation. *J.Biol.Chem.* 264(23):13711-13717.

FEHLING, E. and M. Weidner (1988). Adaptive potential of wheat ribosomes toward heat depends on the large ribosomal subunit and ribosomal protein phosphorylation. *Plant Physiol.* 87:562-565.

GLOVER, C.V.C. (1982). Heat-shock induces rapid dephosphorylation of a ribosomal protein in *Drosophyla*. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 79:1781-1785

GRESSNER, A.M. and I.G. Wool (1974). The phosphorylation of liver ribosomal proteins *in vivo*. Evidence that only a single small subunit protein (S6) is phosphorylated. *J.Biol.Chem.* 249:6917-6925.

HAMMET, J.R. and F.R. Katterman (1975). Storage and metabolism of (polyadenilic acid)mRNA in germinating cotton seeds. *Biochem.* 14(20):4375-4379.

HERSHEY, J.W.B., Duncan, R. and M.B. Mathews (1986). Mechanisms of translational control. En Mathews, M.D. (ed.). *Translational Control*. Current Communications in Molecular Biology. Cold Spring Harbor, N.Y. pp 1-8.

HERSHEY, J.W.B. (1989). Protein phosphorylation controls translation rates. *J.Biol.Chem.* 264(35):20823-20826.

IBARRA-CABALLERO, J.R. (1990) Efecto de las auxinas sobre el proceso de traducción en maíz. Modulación a nivel traduccional. Tesis de maestría en Ciencias Químicas (Bioquímica). Facultad de Química, U.N.A.M. pp 70-74.

IHLE, J.N. and L.Dure III. The developmental biochemistry of cotton seed embryogenesis and germination. III Regulation of biosynthesis of enzymes utilized in germination. *J.Biol.Chem.* 247:5048-5055.

JENO, P., Ballou, L.M., Novack-Hofer, I. and G. Thomas (1988). Identification and characterization of a mitogen-activated S6 kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 85:406-410.

KERMODE, A.R. (1990). Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. *Critical Reviews in Plant Sciences.* 9(2):155-195.

LAKE, J.A.(1985). Evolving ribosome structure: domains in archaebacteria, eubacteria, eocytes and eukaryotes. *Ann. Rev. Biochem.* 54:507-530.

LANE, B.G. and T.D. Tumas-Kennedy (1981). Comparative study of levels of secondary processing in bulk mRNA from dry and germinating wheat embryo. *Eur.J.Biochem* 114:457-463.

LESHEM, Y. (1973). *The molecular and hormonal basis of plant growth regulation.* Pergamon Press. New York. pp 44-59.

LINDQUIST, S.(1986). The heat-shock response. *Ann.Rev.Biochem.* 55:1151-1191.

MALLER, J.L., Stefanovic, D., Erikson, E. and B.J. Stith (1986). Regulation of ribosomal protein S6 phosphorylation by protein-tyrosine kina-

ses. En Mathews, M.D. (ed.). *Translational Control*. Current Communications in Molecular Biology. Cold Spring Harbor. N.Y. pp 173-177.

Mc CONELL, W.P. and N.O. Kaplan (1982). The activity of the acidic phosphoproteins from 80S rat liver ribosome. *J.Biol.Chem.* 257(10):5359-5366.

MAYER, A.M. and A. Poljakoff-Mayber (1989). *The germination of seeds*. 4a. ed. Pergamon Press. Oxford, U.K. pp 141-151.

MARCUS, A. Feeley, J. and A. Volcaný (1966). Protein synthesis in imbibed seeds. III Kinetics of aminoacid incorporation, ribosomal activation and polysome formation. *Plant. Physiol.* 41:1167-1171.

MURASHIGE, T. and F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plantarum* 15:473-479.

NIELSEN, P.J. Duncan, R. and E.H. McConkey (1981). Phosphorylation of ribosomal protein S6. Relationship to protein synthesis in HeLa cells. *Eur.J.Biochem.* 120:523-527.

NIELSEN, P.J., Thomas, G. and J.L. Maller (1982). Increased phosphorylation of ribosomal protein S6 during meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 79:2937-2941.

OAKES, M. Scheinman, A., Rivera, M., Soufer, D., Shankweiler, G. and J. Lake (1987). Evolving ribosome structure and function: rRNA and the translation mechanism. En Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, vol LII. pp 675-685.

OCHOA, S. and C. de Haro (1979). Regulation of protein synthesis in eukaryotes. *Ann.Rev.Biochem.* 48:549-580.

PALEN, E. and J.A. Traugh (1987). Phosphorylation of ribosomal protein S6 by cAMP-dependent protein kinase and mitogen-stimulated S6

kinase differentially alters translation of globin mRNA. *J.Biol.Chem.* 262(98):3518-3523.

PAYNE, P.I., Dobrazanska, M., Barlow, P.W. and M.E. Gordon (1978). The synthesis of RNA in imbibing seeds of rape (*Brassica napus*) prior to the onset of germination. A biochemical and cytological study. *J.Exp.Botany* 29(108):77-88.

PEREZ, L., Aguilar, R., Pérez-Méndez, A. and E. Sánchez de Jiménez (1990). Phosphorylation of ribosomal proteins induced by auxins in maize embryonic tissues. *Plant Physiol.* 94:1270-1275.

PERSIC, O. and J.A. Traugh (1983). Protease activated kinase II mediates multiple phosphorylation of ribosomal protein S6 in reticulocytes. *J.Biol.Chem.* 258(22):13998-14002.

PEUMANS, W.J., Caers, L.I. and A.R. Carlier (1979). Some aspects of the synthesis of long-lived messenger ribonucleoproteins in developing rye embryo. *Planta* 144:485-490.

REYES, R., Vázquez, D. and J.P.G. Ballesta (1977). Peptidyl transferase center of rat liver ribosome cores. *Eur.J.Biochem.* 73:25-31.

ROBITZKI, A., Schroder, H.C., Durdica, U., Pfeifer, K., Uhlenbruck, G. and W.E.G. Muller (1989). Demonstration of an endocrine signaling circuit for insulin in the sponge *Geodia cydonium*. *The EMBO J.* 8(10):2905-2909.

SAENZ-ROBLES, M.T., Remacha, M., Vilella, M.D., Zinker, S. and J.P.G. Ballesta (1990). The acidic ribosomal proteins as regulators of the eukaryotic ribosomal activity. *Biochem.Bioph.Acta.* 1050: 51-55.

SALISBURY, F.B. and C.W. Ross (1978). *Plant Physiology*. 2a ed. Wadsworth Publishing Co. Belmont, U.S.A. pp 211-246.

SANCHEZ DE JIMENEZ, E., Aguilar, R. and S. López (1981). Distinctive characteristics of protein synthesis in maize embryos during the early stages of germination. *Biochem. and Bioph. Res. Comm.* 99(2) 445-450.

SANCHEZ DE JIMENEZ, E. and R. Aguilar (1984). Protein synthesis patterns: relevance of old and new messenger RNA in germinating maize embryos. *Plant Physiol.* 75:231-234.

SANCHEZ-MADRID, F., Reyes, R. Conde, P. and J.P.G. Ballesta (1979). Acidic ribosomal proteins from eukaryotic cells. Effect on ribosomal functions. *Eur.J.Biochem.* 98:409-416.

SCHARF, K. and L. Nover (1982). Heat-Shock-induced alterations of ribosomal protein phosphorylation in plant cell cultures. *Cell* 30:427-437.

SHIMOMURA, S., Inohara, N., Fukui, T. and M. Futai (1988). Different properties of two types of auxin-binding sites in membranes from maize coleoptiles. *Planta* 175:558-566.

SIMON, E.W. 1984. Early events in germination. En *Seed Physiology* vol 2. Germination and reserve mobilization, editado por D.R. Murray. Academic Press. Australia. pp 4-19.

SPIEGEL, S. and A. Marcus (1975). Polyribosome formation in early wheat embryo germination is independent of either transcription or polyadenylation. *Nature* 256:228-230.

SPIRIN, A.S. (1986). *Ribosome Estructure and Protein Biosynthesis*. The Benjamin/Cummings Publishing Company. Menlo Park, California. pp 62-75.

STEITZ, J.A., Berg, C., Hendrick, J.P., La Branche-Chabot, H., Metspalu, A., Rinke, J. and T. Yario (1988.) A 5S rRna/L5 complex is a precursor to ribosome assembly in mammalian cells. *J.Cell Biol.* 106: 545-556.

STRASBURGER, E., Noll, H., Schenck, y A.F.W. Schimper (1974). *Tratado de Botánica*. 6a ed. Marín. Barcelona, Esp. pp 57.

THOMAS, G., Martin-Pérez, J. Siegmann, M. and A.M. Otto (1982). The effect of serum,EGF,PGF and insuline on S6 phosphorylation and the initiation of protein and DNA synthesis. *Cell* 30:235-242.

THOMPSON, E.W. and B.G. Lane (1980). Relation of protein synthesis in imbibing wheat embryos to the cell-free translational capacities of bulk mRNA from dry and imbibing embryos. *J.Biol.Chem* 225(12)5965:5970.

TREWAVAS, A. (1976). Post-translational modification of proteins by phosphorylation. *Ann.Rev.Plant Physiol.*27:349-374.

VAZQUEZ-RAMOS, J.M., and D.J. Osborne (1986). Analysis of DNA synthesised during early germination of rye embryos using BND-cellulose chromatography. *Mut.Res.* 166:39-47.

VIDALES, F.J., Sáenz-Robles,M.T. and J.P.G. Ballesta (1984). Acidic proteins of the large ribosomal subunit in *Saccaromyces cereviseae*. *Biochem.* 23:390-396.

VILELLA, M.D., Ramacha, M., Ortíz, B.L., Méndez, E. and J.P.G. Ballesta (1991). Charachterization of the yeast acidic ribosomes phospho-proteins using monoclonal antibodies. *Eur.J.Biol.Chem.* 196:407-414.

WAREING, P.F. and I.D.J. Phillips (1981). Growth and diferentiation in plants. 3a ed. Pergamon Press. Oxford, U.K. pp 67-93.

WITTERS, L.A. (1990). Protein Phosphorylation and dephosphorylation. *Curr.Op.Cell Biol.* 2:212-220.

WOOL, I.G. (1979). The estructure and function of eukaryotic ribosomes. *Ann.Rev. Biochem.*48:719-754.

WORMINGTON, W.M. (1989). Developmental expression and 5S rRNA-binding activity of *Xenopus laevis* ribosomal protein L5. *Mol.Cell Biol.* 9(12):5281-5288.

YAKOVLEVA, L.A. and O.N. Kulaeva (1987). The effect of phytohormones on phosphorylation of ribosomal proteins in detached pumpkin cotyledons. *Biochem.Physiol.Pflanzen.* 182:359-365.

ZINKER, S. and J.R. Wamers (1976). The Ribosomal Proteins of *saccharomyces cerevisiae*. Phosphorylated and exchangeable proteins. *J.Biol.Chem.*251(6):1799-1807.

ZINKER, S. (1990) P5/P5'the Acidic ribosomal phosphoproteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem.Bioph.Acta.* 606:76-82.