



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**“VÍA PI3K-TOR Y FORMACIÓN DE COMPLEJOS MIRNA-MRNA:
MECANISMOS DE REGULACIÓN SELECTIVA A NIVEL TRADUCCIONAL
DE MRNAS DE PROTEÍNAS RIBOSOMALES EN MAÍZ (ZEA MAYS L.)”**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

PRESENTA

EDER ALBERTO MANCERA MARTÍNEZ



MÉXICO, D.F.

AÑO 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DRA. ESTELA SÁNCHEZ QUINTANAR DE JIMÉNEZ

VOCAL: DR. JAVIER PLASCENCIA DE LA PARRA

SECRETARIO: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI

1er. SUPLENTE: DRA. MARICARMEN QUIRASCO BARUCH

2° SUPLENTE: DRA. PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Departamento de Bioquímica, Facultad de Química. UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. ESTELA SÁNCHEZ QUINTANAR DE JIMÉNEZ
(nombre y firma)

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. EN C. RAÚL AGUILAR CABALLERO
(nombre y firma)

SUSTENTANTE:

EDER ALBERTO MANCERA MARTÍNEZ
(nombre (s) y firma (s))

I. ÍNDICE

I. ÍNDICE	3
II. DEFINICIONES	5
III. RESUMEN	6
IV. ANTECEDENTES	7
1. Mecanismo de síntesis de proteínas en eucariotes.....	7
2. Control traduccional	8
2.1 Conjunto de mecanismos que regulan la traducción de los mRNAs.....	9
3. Ruta de señalización selectiva inducida por insulina e IGFs que incide en el control traduccional de mRNAs con motivos 5'-TOP	13
4. Germinación de semillas	17
4.1 Estructura de las semillas de maíz.....	18
4.2 Germinación de maíz	18
5. Eventos moleculares durante la germinación.....	19
6. Proteínas ribosomales bajo estudio	21
6.1 Proteínas ribosomales que son estrictamente estructurales para que el aparato traduccional sea funcional (PREEs).....	22
6.2 Proteínas ribosomales duales (PRDs)	23
V. JUSTIFICACIÓN	28
VI. HIPÓTESIS	29
VII. OBJETIVOS	30
1. Objetivo general.....	30
2. Objetivos particulares	30
VIII. METODOLOGÍA.....	31
1. Preparación del material biológico.....	31
2. Extracción de RNA total	31
2.1. Fundamento	31
2.2. Reactivos y soluciones	32
2.3. Desarrollo de la técnica	32
3. Amplificación del mensaje por RT-PCR.....	34
3.1. Fundamento	34
3.2. Reactivos y soluciones	35
3.3. Desarrollo de la técnica	35
4. Cuantificación del nivel de expresión de mensaje por medio de electroforesis en gel de agarosa	36
4.1. Fundamento	36
4.2. Reactivos y soluciones	37
4.3. Desarrollo de la técnica	37
IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
1. Extracción de RNA total de ejes embrionarios de maíz.....	39
1.1. RNA total de ejes embrionarios sin germinar (0 horas).	39
1.2. RNA total de ejes embrionarios germinados por 6 horas.	40
1.3. RNA total de ejes embrionarios germinados por 12 horas.	41
1.4. RNA total de ejes embrionarios germinados por 24 horas.	41
2. Diseño de las secuencias de oligonucleótidos (primers)	42

3.	Estandarización de los ensayos por RT-PCR.....	44
4.	Análisis por RT-PCR del nivel de transcritos durante la germinación.....	48
4.1.	Nivel de transcrito de la proteína ribosomal S6.....	48
4.2.	Nivel de transcrito de la proteína ribosomal S12.....	49
4.3.	Nivel de transcrito de la proteína ribosomal P0.....	52
4.4.	Nivel de transcrito de la proteína ribosomal L13a.....	55
4.5.	Nivel de transcrito de la proteína ribosomal RACK1.....	57
5.	Análisis de las secuencias de las regiones 5' UTR de los mensajes bajo estudio. Presencia o ausencia de motivos 5' TOP y afinidad con el miRNA-10a.....	59
X.	CONCLUSIONES.....	66
XI.	BIBLIOGRAFÍA.....	68

II. DEFINICIONES

PRs. Proteínas ribosomales

5'UTR. 5' Untranslated region

5' TOP. 5' Tract of oligopyrimidine

miRNAs. MicroRNAs

mRNA. RNA mensajero

PI3K-TOR. Fosfatidil-inositol 3-kinase – Target of rapamycin

PREEs. Proteínas ribosomales estrictamente estructurales

PRDs. Proteínas ribosomales duales

III. RESUMEN

Los mRNAs que codifican para la mayoría de las proteínas ribosomales (**PRs**), exhiben en su región **5'UTR** motivos **5'-TOP** que les confiere selectividad traduccional mediante la inducción por estímulos mitogénicos, y zonas afines a **miRNAs** que permiten la formación de complejos **miRNA-mRNA** y promueven su traducción. La ruta **PI3K-TOR** es una vía de transducción de señales que juega un papel primordial en los efectos metabólicos y/o mitogénicos inducidos por la insulina y se relaciona con la selectividad traduccional de los mRNAs con motivos 5-TOP. Con respecto a las PRs, existe un conjunto que son estrictamente estructurales para que el aparato traduccional sea funcional (**PREEs**) y otro grupo que tienen alguna otra función de regulación extrarribosomal que no se relaciona con la actividad del ribosoma (**PRDs**). Considerando lo anterior, basados en la hipótesis de que la regulación de la expresión de ambos grupos de mRNAs es diferencial, se desarrolló un análisis del nivel de expresión para dos transcritos de PREEs (**S12 y S6**) y tres de PRDs (**P0, L13a y RACK1**) a lo largo de la germinación, en ejes embrionarios de maíz de 0, 6, 12 y 24 h de germinación mediante RT-PCR, con el fin de identificar patrones diferenciales de expresión a nivel transcripcional. Así mismo, con el fin de identificar diferencias entre los motivos 5'-TOP de ambos grupos de mensajeros (PREEs y PRDs) y/o regiones afines al **miRNA-10a**, que pudieran estar controlando de forma selectiva la traducción de estos mRNAs mediante la vía PI3K-TOR y/o la formación de complejos miRNA-mRNA, se analizaron las secuencias 5'UTRs de los mRNAs seleccionados. Se encontró que durante la germinación, existen patrones diferentes de expresión para ambos grupos de mRNAs y las características de los motivos 5'TOP (tamaño y composición nucleotídica) y las regiones afines a miRNA-10 (de acuerdo a la energía libre de alineamiento) presentan diferencias notables entre cada uno de los grupos de mRNAs estudiados.

IV. ANTECEDENTES

1. Mecanismo de síntesis de proteínas en eucariotes

La síntesis de proteínas es uno de los procesos celulares de mayor consumo de energía, por lo que su regulación debe estar finamente acoplada al estado metabólico de las células (Warner, 1999; Pestota y Hellen, 2000; Rutter et al., 2002). La proliferación celular normalmente requiere que la célula en crecimiento ajuste su capacidad de biosíntesis de proteínas en respuesta a la biodisponibilidad de nutrientes, así como a la presencia de factores de crecimiento y otras señales químicas. Esta respuesta involucra cambios coordinados, ya sea en la velocidad de traducción, así como en la abundancia de la maquinaria de síntesis en sí, específicamente de los ribosomas.

La síntesis de proteínas ribosomales depende tanto de la maquinaria de traducción como de la cantidad y la estructura del mRNA, ya que la cantidad de ribosomas es un indicio de la capacidad de la célula para sintetizar proteínas (Pain, 1996). Por tanto, la regulación de la síntesis del aparato traduccional en sí, es fundamental para controlar los procesos de diferenciación, crecimiento y proliferación celular.

Una de las tareas más importantes de cualquier célula es la formación de ribosomas. En células eucarióticas involucra la síntesis coordinada de cuatro especies de rRNA, transcritas por la RNA polimerasa I (18S, 28S, 5.8S) y la RNA polimerasa III (5S), y aproximadamente 80 proteínas ribosomales traducidas a partir de mRNAs sintetizados por la RNA polimerasa II (Larson et al., 1991).

En eucariotes el proceso de biogénesis de ribosomas ocurre secuencialmente en el nucleolo, el nucleoplasma y el citoplasma. Dicho proceso involucra la transcripción y el procesamiento de RNAs pre-ribosomales, su correcto plegamiento y acoplamiento con las proteínas ribosomales y el transporte de las partículas pre-ribosomales resultantes hacia el citoplasma donde ocurren los eventos finales de maduración. Además de las proteínas ribosomales y de los componentes ribonucleicos que constituyen a los ribosomas citoplasmáticos maduros, este intrincado proceso requiere la intervención de numerosas proteínas y pequeños factores de transporte e intercambio de RNA, los cuales interactúan de manera trascendente con las partículas pre-ribosomales en distintas etapas de la maduración. Más aun, en la actualidad, se están estudiando los mecanismos que controlan la fidelidad y monitorean la biogénesis de ribosomas. Uno de estos mecanismos es la degradación de RNA de las partículas pre-ribosomales defectuosas (Henras et al., 2008)

2.Control traduccional

En los eucariotes, la expresión de la mayoría de los genes es regulada temporal y espacialmente. Esta regulación ocurre en múltiples pasos y a diferentes niveles: en la síntesis y degradación de los mRNAs, incluyendo la transcripción, el procesamiento, transporte y estabilidad; en la traducción, la estabilidad de la proteína y las modificaciones post traduccionales de la misma (Clemens and Bommer, 1999; Gingras et al., 2004).

2.1 Conjunto de mecanismos que regulan la traducción de los mRNAs.

La iniciación de la traducción del mRNA es un paso clave en el control de la expresión de genes (Pierrat et al., 2007).

En los últimos años se han logrado grandes avances en la comprensión de los mecanismos de control de la traducción, ya sea a través de la regulación de las proteínas que se unen a mRNAs específicos y regulan su traducción; o a través del control de las actividades de los componentes de la maquinaria traduccional (Rhoads, 1999; Prendergast, 2003).

El control de la expresión genética a nivel traduccional presenta las grandes ventajas de ser un control de respuesta rápida, reversible, de ajuste fino en la cantidad de proteína producida (Mathews et al., 2000; Gingras et al., 2004). Además, la regulación de la síntesis de proteínas en eucariotes juega papeles críticos en el desarrollo, diferenciación, progresión del ciclo celular y la apoptosis (Mathews et al., 2000).

2.1.1.1 Mecanismos de regulación por estado de fosforilación y afinidad de los factores de inicio de la traducción

Después de la transcripción, procesamiento y exportación del núcleo al citoplasma, el mRNA está listo para su traducción. Sin embargo, dos transcritos presentes en cantidades idénticas pueden ser traducidos a velocidades muy diferentes. Este fenómeno se debe, en parte, por el hecho de que el ribosoma no se une directamente al mRNA, sino que el ribosoma es reclutado hacia el mRNA a través de la acción

concertada de un gran número de factores eucarióticos del inicio de la traducción (**eIFs**) (Kozak, 1999; Shah et al., 2000).

Los análisis por microarreglos indican que los niveles de mRNA no siempre reflejan los niveles de proteína (Pierrat et al., 2007). En relación a esto, la asociación del mRNA con los poliribosomas es necesaria para la síntesis de proteína. La fosforilación de los factores de inicio de la traducción ofrece un proceso efectivo y rápido para adaptarse a los cambios fisiológicos y ambientales, y hay evidencia de que muchos de estos factores son sujetos a múltiples eventos de regulación por fosforilación. En plantas, los mecanismos que más se han estudiado a este nivel, son la fosforilación reversible de los eIFs y la función del complejo a unión a la región 5'-CAP (Pierrat et al., 2007).

2.1.1.2 Mecanismos de regulación por formación de complejos mRNA-proteína (mRNPs)

La calidad y fidelidad de la expresión de genes opera post-transcripcionalmente a varios niveles en eucariotes. Una vez transcritos, los mRNAs se asocian con un conjunto de proteínas durante todo su tiempo de vida (Moore, 2005). Estos complejos mRNA-proteína (**mRNPs**) se someten a una serie de eventos de remodelación que tienen influencia en la sublocalización celular, traducción o degradación del mRNA. La degradación mediada por mRNA antisentido (**NMD**) o por micro RNA (**miRNA**) son ejemplos de mecanismos de silenciamiento. El NMD es un mecanismo que detecta y elimina mRNAs defectuosos que resultarían en proteínas truncadas que dañarían al organismo. El silenciamiento de mRNA por miRNA es un mecanismo que se asegura de que la proteína es expresada a un nivel apropiado que permita la función celular

normal. Ambos mecanismos de silenciamiento emplean procesos selectivos diferentes para determinar los mRNA blancos, sin embargo ambos están estrechamente relacionados con la dinámica que existe entre los mRNP y los cuerpos de procesamiento o P-bodies, cuya función es definir el destino de los mRNAs. Posiblemente la selectividad envuelva tanto la estructura de las regiones 3'UTR y su asociación con diversos factores (Shyu et al., 2008).

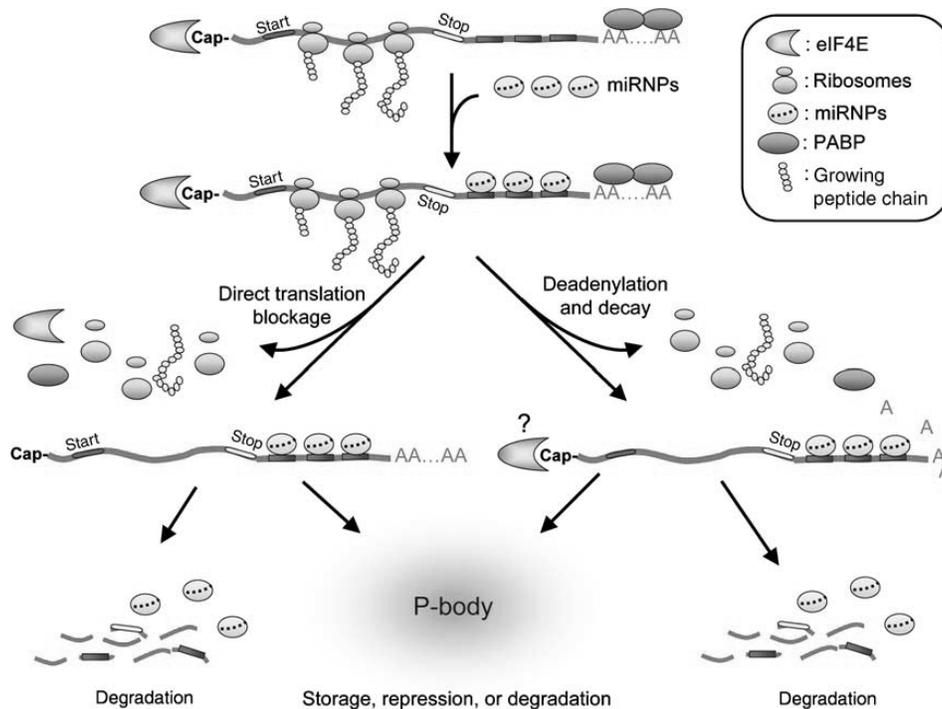


Figura 1. Mecanismos de silenciamiento de mRNA mediado por miRNA, modelo genérico tomado de Shyu et al., 2008

Sin embargo, en estudios recientes se ha mostrado que existen miRNAs que funcionan como reguladores postranscripcionales que incrementan la expresión de ciertos genes. Particularmente, se ha observado en eucariotes superiores (humano y ratón) que el miR-10a interactúa con la región 5'-UTR de mRNAs que codifican para algunas

proteínas ribosomales e incrementan su traducción (Orom et al., 2008). Se sabe también que el miR-10a disminuye la represión traduccional de los mRNAs de proteínas ribosomales en condiciones de inanición (Orom et al., 2008). El miR-10a se une en la región río abajo inmediata a los motivos 5'-TOP de los mRNAs de proteínas ribosomales y estos complejos estimulan su traducción, así como la síntesis de proteínas y la biogénesis de ribosomas (Orom et al., 2008).

2.1.1.3 Mecanismos de regulación por elementos estructurales propios en las regiones 5' y 3' no traducibles de los mRNAs

La eficiencia de traducción de un mRNA depende de los elementos estructurales propios de sus regiones 5' y 3' no traducibles (5'UTR y 3'UTR), así como de la disponibilidad y actividad de los factores que reconocen estas estructuras (Mamane et al., 2007). En la región 5'UTR, los elementos importantes son la estructura ⁷mGpppG (CAP) (Gingras et al., 2004), la presencia de estructuras secundarias y la longitud de la región (Kozak, 1991), la presencia de codones de iniciación "río arriba" de la región codificante (Morris y Geballe, 2000; Hernandez-Sánchez et al., 2003), así como la presencia de sitios de entrada interna al ribosoma (IRES) que son capaces de promover una traducción independiente de CAP (Gosert et al., 2000; Hellen y Sarnow, 2001; Henis-Korenblit et al., 2002; Kobayashi et al., 2003). En la región 3'UTR se han encontrado elementos que participan en la estabilidad y localización citoplásmica de los mRNAs (Mazumder et al., 2003). La poliadenilación de este extremo tiene un papel importante en la estabilización de mensajes, así como en su movilización a polisomas para su traducción (Stutz et al., 1998).

La síntesis de las proteínas de la maquinaria traduccional propiamente, parece estar sujeta a un modo de regulación característico. Los mRNAs que codifican para la gran mayoría de las proteínas ribosomales y para algunos factores de traducción, exhiben una característica estructural definida: un tracto rico en pirimidinas, ubicado en seguida de la estructura 5'CAP y se define como un elemento de regulación cis que comienza por una citosina la cual es seguida por 4 a 15 bases de pirimidina. Este motivo de nucleótidos, designado TOP (del inglés, tract of oligopyrimidine) (Meyuhas, 2000), confiere selectividad traduccional a los mensajes, la cual es inducida por un rango de estímulos metabólicos y/o nutricionales (Meyuhas, 2000; Proud, 2002).

3. Ruta de señalización selectiva inducida por insulina e IGFs que incide en el control traduccional de mRNAs con motivos 5'-TOP

Un mecanismo bien documentado de control traduccional en varios eucariotes superiores es la inducción de la síntesis de proteínas mediante la insulina y los factores de crecimiento similares a insulina (IGFs). La insulina y los IGFs son hasta ahora, unos de los efectores mejor caracterizados de la vía de transducción de señales que regula la síntesis de proteínas (Jefferies et al., 1997; Raught et al., 2000).

Los receptores para la insulina y los IGFs son miembros de una superfamilia de receptores para factores de crecimiento de tipo cinasa de residuos de tirosina (Ulrich y Schlessinger, 1990). Estos receptores, presentes en la membrana plasmática, se activan con la unión de insulina o IGFs respectivamente, provocando su actividad intrínseca de cinasa de tirosina que inicia una cascada de reacciones que involucra múltiples rutas de señalización, tales como las rutas de la fosfatidil-inositol 3-cinasa

(PI3K) y la de las proteínas cinasas activadas por mitógenos MAPKs (del inglés, Mitogen Activated Protein Kinases), responsables de los diversos efectos de estos factores de crecimiento, tales como los incrementos en la división celular, en el tamaño celular, en la síntesis de proteínas, en la migración celular y en la inhibición de la apoptosis (Butler et al., 1998; Peruzzi et al., 1999; Imai y Clemmons, 1999).

Dos rutas de transducción de señales han emergido como sistemas críticos de la respuesta al crecimiento: la ruta de Ras/MAPK, que principalmente actúa a través de controlar la expresión de myc; y la ruta de PI3K-mTOR, que actúa regulando la actividad de PI3K, PKB/Akt (protein kinase B), PKC (protein kinase C), PKG (protein kinase G), PKA (protein kinase A), mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) y la p70^{S6K} (Kozma y Thomas, 2002).

La ruta PI3K-mTOR juega un papel primordial en los efectos metabólicos y/o mitogénicos de la insulina y los IGFs (Ueki et al., 2002).

En la figura 2 se presenta un modelo genérico donde se describe la ruta de transducción de señales inducida por insulina/IGFs: La unión de la insulina o de los IGFs a sus respectivos receptores ocasiona el reclutamiento y fosforilación de las proteínas acopladoras denominadas IRSs (del inglés "insulin receptor substrate") para reclutar y acoplar a PI3K a la membrana celular (Stocker y Hafen, 2000). Una vez acoplada a los IRSs, la PI3K fosforila al lípido fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2), produciendo fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3) que a su vez funciona como segundo mensajero modulando la activación de las cinasas PKB y PDK1 (Balendran et al., 2000). PDK1 media la fosforilación de PKB y S6K (Balendran et al., 2000; Reyes de

la Cruz, 2004). Una vez activada por PIP3 y PDK1, PKB medía directamente la fosforilación y activación de GSK3 (Cross et al., 1995) y se ha argumentado que paralelamente PKB interviene en la activación de mTOR. Una vez activada, mTOR regula el incremento en la fosforilación de 4EBP (eIF4E binding protein) (Gingras et al., 2001; Wang et al., 2003) y de S6K (Reyes de la Cruz, 2004). Esta última regula a su vez el estado de fosforilación de la PR S6 ubicada en la subunidad 40S. Algunos efectores negativos pueden actuar en esta cascada de transducción de señales como son: la fosfatas de fosfolípidos (PTEN), el inhibidor del factor de iniciación 4E (4EBPI-3) y la rapamicina (Kozma y Thomas, 2002; Gingras et al., 2004; Carrera, 2004).

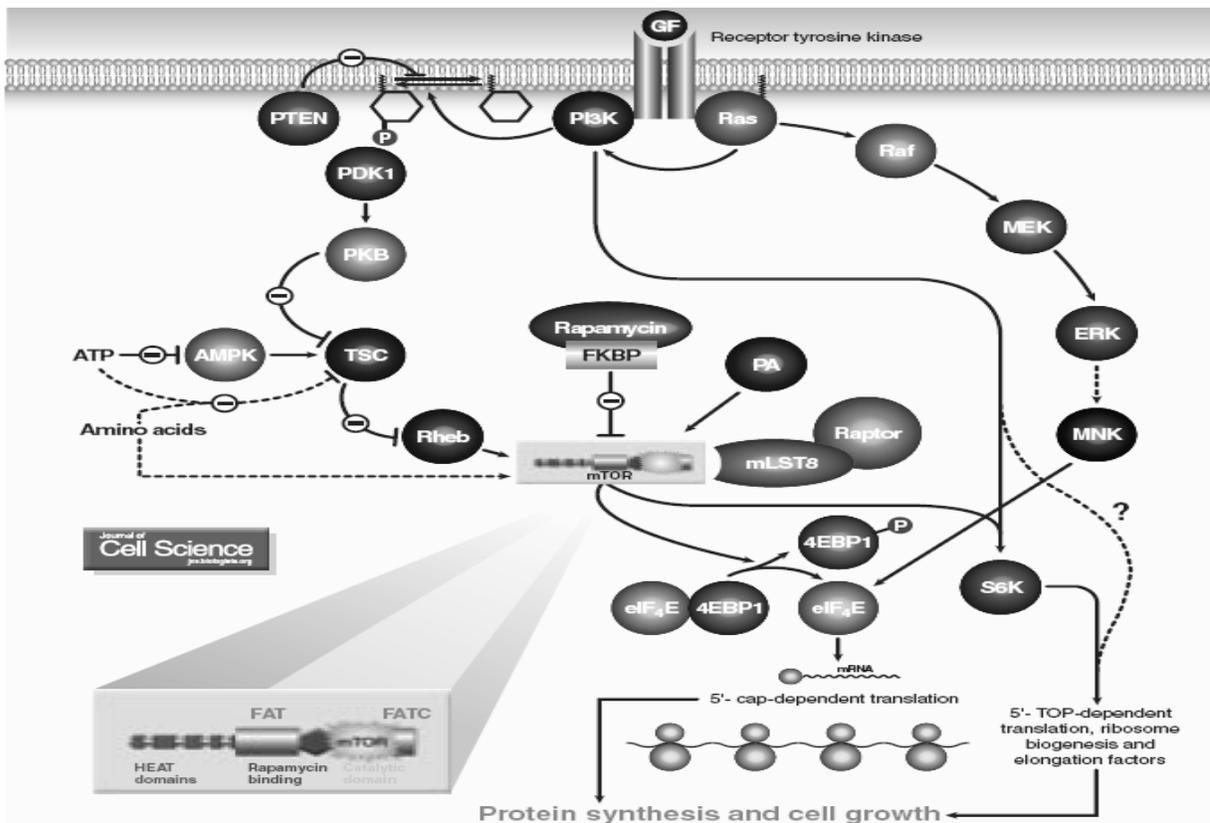


Figura 2. Ruta de señalización de TOR en mamíferos, modelo genérico tomado de Carrera, 2004.

La traducción eficiente de los mRNAs con regiones 5'-TOP está estrechamente relacionada a ciertas condiciones fisiológicas, a los niveles de fosforilación de S6K y consecuentemente con la fosforilación de la rpS6 (Meyuhas, 2000). Los datos de las investigaciones que se habían hecho sobre este tema hacían pensar en la hipótesis de que la fosforilación de rpS6 incrementaba la afinidad de los ribosomas por los mRNAs TOP y que facilitaba la iniciación de la traducción de esta clase de mRNAs (Meyuhas, 2000).

Este modelo ha sido ampliamente aceptado y es frecuentemente citado como el mecanismo mediante el cual S6K manifiesta su función biológica; sin embargo, estudios bioquímicos y genéticos con cultivos celulares han refutado la relación entre la fosforilación de rpS6 y la traducción eficiente de mRNAs TOP (Ruvinsky y Meyuhas, 2006). En relación con esto, se ha demostrado que la traducción de mRNAs TOP es regulada de manera normal en cultivos celulares de hepatocitos de ratón dobles mutantes de S6K1/S6K2. Así pues, estas observaciones indican que los mRNAs TOP están regulados a nivel traduccional mediante una vía independiente de S6K y de la fosforilación de rpS6 (Ruvinsky y Meyuhas, 2006)

En contraste, en estudios previos a los de Ruvinsky y Meyuhas, 2006, se ha demostrado que la regulación traduccional de estos mRNAs está completamente asociada a la vía de PI3K y PKB, la cual involucra a mTOR (Stolovich et al., 2002; Tang et al., 2001) (Figura 3). El efecto de la inhibición de mTOR por rapamicina sobre la traducción eficiente de los mRNAs TOP varía, ya que se ha observado que puede ir desde su ausencia o un mínimo efecto, hasta la pronunciada represión de su traducción (Ruvinsky y Meyuhas, 2006).

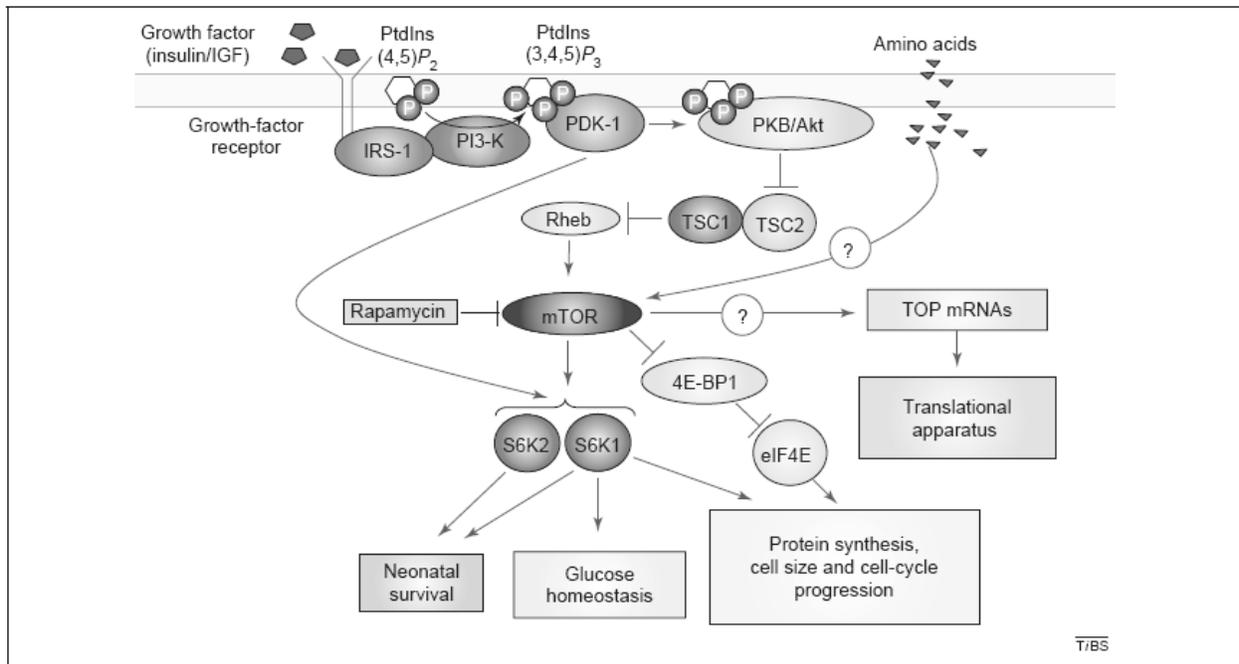


Figura 3. Ruta de señalización PI3K-mTOR, modelo genérico tomado de Ruvinsky y Meyuhas (2006).

Para el caso del maíz, se ha identificado un IGF denominado ZmIGF, que a nivel molecular incrementa la fosforilación de rpS6 en la subunidad 40S mediante una vía similar a la utilizada por insulina bovina en metazoarios, lo cual hace pensar que la vía de transducción PI3K-mTOR podría estar conservada en maíz (García et al., 2001)

4. Germinación de semillas

Las semillas han jugado una posición crítica en la evolución de las plantas superiores puesto que son la forma de dispersión de estos organismos. El éxito con el cual una planta superior se establece depende en gran parte de las propiedades fisiológicas y bioquímicas de sus semillas, debido a que en las etapas más tempranas del desarrollo, el establecimiento de la plántula depende de la calidad de los nutrientes almacenados

en ellas (Bewley y Black, 1994). Por otro lado, la nutrición de las poblaciones humanas depende también, en gran parte, de las semillas por sus reservas alimenticias. Por ejemplo, las semillas de cereales y leguminosas son la mayor fuente alimenticia para estas poblaciones, cuya importancia recae en sus reservas constituidas de proteínas, azúcares y aceites almacenadas en ellas durante su desarrollo y maduración.

4.1 Estructura de las semillas de maíz

El maíz (*Zea mays* L.) es una planta monocotiledónea que pertenece a la familia de las gramíneas.

En la semilla de maíz existe un único embrión rodeado por un tejido de reserva llamado endospermo. El embrión está formado por el eje embrionario y el escutelo que lo rodea. El eje embrionario se divide en coleoptilo, mesocotilo (unido al escutelo) y radícula (Figura 4). El término mesocotilo se refiere al primer internodo, localizado debajo de la plúmula, entre el nudo del coleoptilo y el nudo escutelar, característica única de las gramíneas (Reyes de la Cruz, 2004).

4.2 Germinación de maíz

En la literatura, el término germinación es utilizado libremente y algunas veces en forma no ortodoxa, por lo que es indispensable aclarar su significado. La germinación es un proceso que inicia con la captura de agua por la semilla (imbibición) y termina con la protrusión de la radícula que usualmente coincide con la elongación del eje embrionario. Esto incluye numerosos eventos entre los que destacan la síntesis de las proteínas, cambios e hidratación de las estructuras subcelulares, incremento en la

respiración, síntesis de macromoléculas y elongación celular, la mayoría de los cuales no son únicos de este proceso.

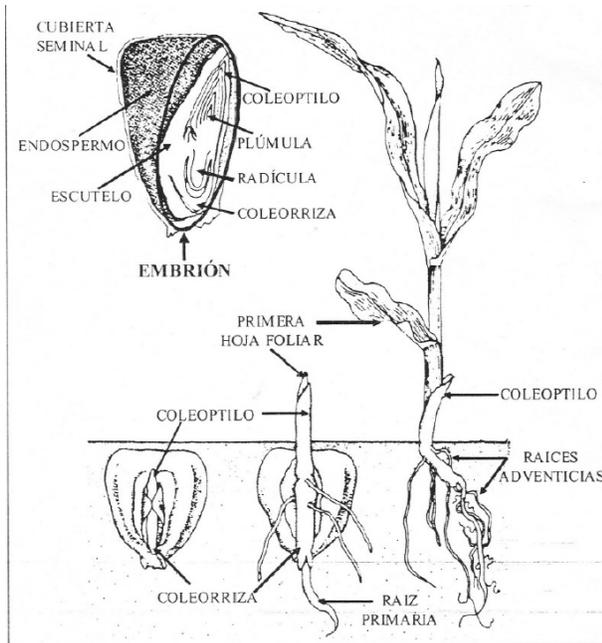


Figura 4. Representación de una semilla de maíz

5.Eventos moleculares durante la germinación

Las semillas maduras, deshidratadas, poseen un mínimo de agua y se encuentran en un estado metabólico quiescente. Cuando ocurre la imbibición, la semilla se rehidrata rápidamente y se activa el metabolismo celular que permitirá llevar a cabo la elongación del eje embrionario, la protrusión de la radícula y el posterior establecimiento de la planta. En una etapa temprana de la germinación, inmediata a la imbibición, se producen cambios estructurales como reparación de membranas celulares, abastecimiento energético, respiración mitocondrial, actividad enzimática de organelos, así como la síntesis de proteínas y posteriormente de RNA y DNA (Bewley y Black, 1994). Durante la germinación, los ejes embrionarios de maíz gradualmente reinician la

síntesis de proteínas, basada principalmente en la traducción de mRNAs almacenados (Bewley y Black, 1994)

Todos estos eventos celulares son fundamentales para completar el evento de germinación y la preparación para el subsiguiente crecimiento de la plántula. Por esta razón es que la mayoría de las investigaciones en la bioquímica de la germinación y del crecimiento se enfocan al estudio de dichos procesos, con el fin de determinar cuáles son los eventos claves indispensables para la germinación de una semilla (Bewley y Black, 1994), como lo son las rutas metabólicas respiratorias: glucólisis, ruta de las pentosas y ciclo de Krebs.

Se ha visto que a partir de la imbibición los polisomas activos comienzan a formarse rápidamente (Dommes y Van de Walle, 1990). En esta etapa temprana la traducción tiene lugar a partir de un conjunto de mRNAs muy específicos producidos durante la maduración de la semilla y que son almacenados en el eje embrionario en estado quiescente. Se ha considerado por numerosos autores que la traducción de estos mensajes ocurre de manera diferencial ya que algunos de ellos son traducidos en etapas muy tempranas de la germinación, otros se traducen de manera más tardía, mientras que algunos no se traducen y son degradados (Sánchez de Jiménez y Aguilar, 1984; Sánchez-Martínez et al., 1986).

La síntesis de proteínas es casi inmediata durante las primeras horas de germinación y se basa en la existencia de mensajes sintetizados y almacenados durante la maduración de las semillas, que codifican para proteínas que serán requeridas durante

la germinación. Se ha visto que no hay una correlación entre la cantidad del mRNA y la velocidad de traducción, o entre la cantidad de proteína y el nivel del mensaje.

6. Proteínas ribosomales bajo estudio

Los mRNAs que codifican para proteínas ribosomales se encuentran en su mayor parte almacenados en los ejes embrionarios de las semillas (Beltrán-Peña et al., 1995).

De las proteínas ribosomales que forman parte de la maquinaria traduccional, se sabe que existe un conjunto de proteínas que son estrictamente estructurales necesarios para que el aparato traduccional sea funcional (**PREEs**). Sin embargo, en estudios recientes, se ha demostrado que existen algunas **PR** que tienen alguna otra función de regulación extrarribosomal que no se relaciona con la actividad de síntesis de proteínas del ribosoma (proteínas duales, **PRDs**), incluso algunos eucariotes superiores, depletados de dichas proteínas, prescinden de ellas para completar la función del aparato de traducción (Kapasi et al., 2007).

Algunos componentes ribosomales han sido implicados en varias funciones durante la elongación. Estos componentes se centran principalmente en los factores de elongación, el rRNA y algunas proteínas ribosomales como S6, S12, L10 (análogo de P0), L11 y L12 (Hill et al., 1990).

Actualmente, se ha observado que existen proteínas ribosomales que resultan indispensables en la estructura del ribosoma para que el aparato traduccional sea funcional, ya que las mutantes nulas de dichas proteínas no son viables. Sin embargo,

el hecho de que estas proteínas sean indispensables en la función del aparato traduccional no elimina la posibilidad de que cumplan otras funciones extrarribosomales, como por ejemplo la proteína P0 (Ruvinsky y Meyuhas, 2006).

6.1 Proteínas ribosomales que son estrictamente estructurales para que el aparato traduccional sea funcional (PREEs)

6.1.1.1 Proteína ribosomal S6

La proteína ribosomal S6 es el mayor sustrato de las protein-cinasas en ribosomas eucarióticos y juega un papel importante en el control del crecimiento y proliferación celular (Williams et al., 2003).

Esta proteína ribosomal está localizada en el sitio de unión al mRNA de la subunidad 40S de ribosomas citoplasmáticos. En *Zea mays* se han identificado dos genes que codifican para un polipéptido (30kD, 11.4 pl) con secuencia de aminoácidos y estructura secundaria conservados en otros eucariotes (Williams et al., 2003).

La rpS6 se ha detectado unida por cross-linking a mRNA, tRNA y factores de iniciación de la traducción, confirmando su localización en una región que está relacionada con el inicio de la traducción (Williams et al., 2003).

6.1.1.2 Proteína ribosomal S12

Algunas proteínas son de gran interés en la etapa de elongación. Una de ellas es la proteína S12 la cual participa en la exactitud y fidelidad de la elongación. Se han observado mutantes resistentes a estreptomicina cuando son modificadas en S12. También se ha observado que su función se relaciona con la unión de los factores EF-G (Sharma et al., 2007).

Por medio de estudios estructurales y bioquímicos se ha identificado a la proteína ribosomal S12 (de alta especificidad de unión al rRNA 16S alrededor de la posición 900 y 530) como un contribuyente molecular crítico en la selección específica entre las diversas especies de tRNA, promoviendo reordenamientos en la subunidad pequeña denominados “cierre” (Sharma et al., 2007).

6.2 Proteínas ribosomales duales (PRDs)

6.2.1.1 Proteína ribosomal P0

En procariontes las proteínas L11 y L10 (en eucariotes análogo de P0) están localizadas en la base del tallo de la subunidad 50S, el cual se compone de la proteínas L7/L12. La proteína L10 y el dímero L7/L12 forman un complejo proteico pentamérico. Estas proteínas están unidas a la misma región del RNA 23S donde también se unen antibióticos como tioestrepton y micrococina. La proteína L10 es la responsable de la unión con el RNA 23S. Aparentemente esta región del RNA tiene una concentración de

elementos que afectan la hidrólisis de GTP y otros que se relacionan con la interacción de factores de iniciación. Las proteínas L10, L11 y L12 parecen ser universales en el ribosoma. Su presencia se ha reportado en especies de todos los reinos con algunas diferencias en la longitud de la secuencia de aminoácidos y en general se ha reportado que la conservación de aminoácidos a nivel proteína y de nucleótidos a nivel de mensaje es alta, principalmente en *Archaeobacteria*. En *S. solfataricus* L10 es una proteína con un pI de 9.56 y un peso molecular de 36,531 Da; en *E. coli* L10 se compone de 165 aminoácidos mientras que en eucariotes de 317 aminoácidos (Hihara et al., 1994).

En eucariotes, la proteína ribosomal ácida P0 forma parte de un grupo especial de proteínas ribosomales denominadas PRs ácidas (P0, P1 y P2), las cuales se fosforilan durante la traducción, proceso que no ocurre en procariotes (Muñoz, 2002).

Con un peso molecular de 38 kDa, P0 está localizada en el tallo de la subunidad ribosomal 60S, formando un complejo pentamérico con los dímeros de las proteínas ribosomales ácidas P1 y P2, con un peso molecular de 13 kDa. P1, P2 y P0 son análogos de las proteínas ribosomales de *Escherichia coli* L7/L12 y L10, respectivamente, y al parecer cumplen las mismas funciones que su contraparte en procariontes; por ejemplo, la unión al rRNA 28S, la interacción con factores de traducción, promoción de la interacción aminoacil-tRNA y la asociación con la actividad hidrolítica del GTP (Muñoz, 2002). En la siguiente tabla se reporta las características principales de P0 tanto a nivel proteína como a nivel de su cDNA en arroz, la cual presenta alta similitud en maíz.

Table 1. Characteristics of the acidic ribosomal phosphoprotein P0 cDNA from rice

Organism:	Rice (<i>Oryza sativa</i> L. cv Hayayuki).
Source:	λ ZAP cDNA library constructed from poly(A) ⁺ RNA of rice anthers at the uninucleate microspore stage.
Techniques:	Double-strand plasmid sequencing of cDNA library; dideoxy sequencing of restriction fragment subclones.
Method of Identification:	Deduced amino acid sequence shows 70% identity with that of <i>C. rubrum</i> .
Feature of the cDNA:	1220 nucleotides in length, consisting of a 111-nucleotide 5' untranslated region, a 960-nucleotide open reading frame, and a 149-nucleotide 3' untranslated region.
Feature of the Protein:	319 amino acid residues with a calculated <i>M_r</i> of 34,377.
(G + C) Content:	Coding region 55%.

Tabla 1. Características del cDNA de la proteína ribosomal ácida P0 (L10) de Arroz, tomado de Hihara et. al (1994).

6.2.1.2 Proteína ribosomal RACK1

El receptor de la cinasa C activada (**RACK1**) es una proteína de plegamiento capaz de interactuar con varias macromoléculas, como lo son proteínas solubles de señalización y receptores unidos a membrana. Fue originalmente caracterizada por su homología con la subunidad β de la proteína unida a nucleótidos de guanina. Después se demostró que RACK1 interactúa con la proteína cinasa C (**PKC**) beta, incrementando su actividad de cinasa y promoviendo su localización subcelular correcta. Se ha observado que la interacción de PKC con su receptor RACK1 influye en la señalización de otras moléculas (Nilsson et al., 2004) y regula la traducción de manera independiente a la ruta PI3K-TOR (Grosso et al., 2008) .

La unión de RACK1 a protein-cinasas y a receptores de membrana es de forma regulatoria. De manera interesante, RACK1 es también un constituyente del ribosoma

de eucariotes, y recientemente un estudio de microscopía electrónica ha revelado que se encuentra en la subunidad 40S, en la vecindad del canal de salida del mRNA (Nilsson et al., 2004).

RACK1 recluta a PKC activada hacia el ribosoma, lo cual estimula la traducción a través de la fosforilación del factor de iniciación 6 y, potencialmente, de proteínas asociadas a mRNA. En adición a esto, el hecho de que RACK1 se asocia con receptores de membrana indica que promueve el embarque de ribosomas hacia sitios donde la traducción local es requerida, mediante adhesiones específicas (Nilsson et al., 2004).

De acuerdo a los experimentos de Loreni et al., 2005, éstos demuestran que la síntesis de RACK1 es coordinada cualitativamente y cuantitativamente con la producción de proteínas ribosomales. Así pues, esta observación apoya la idea, antes ya propuesta por otros investigadores, que RACK1 es una proteína ribosomal típica. Sin embargo, es importante mencionar que estas investigaciones no son suficientes para abundar sobre las funciones extrarribosomales de RACK1 en otros tipos celulares y organismos y sobre su función celular en diversos estados de desarrollo o diversas condiciones de estrés (Loreni et al., 2005).

6.2.1.3 Proteína ribosomal L13a

Se ha reportado que la proteína L13a participa en el control traduccional transcrito-específico que restringe la expresión de un gen que causa la inflamación de los tejidos (Kapasi et al., 2007). El interferón proinflamatorio γ induce la fosforilación de la proteína ribosomal L13a y su translocación desde la subunidad ribosomal 60S hacia el complejo

del interferón- γ -activado inhibidor de la traducción (**GAIT**). Este complejo se une con la región 3'UTR del mRNA de ceruloplasmina (**Cp**) y bloquea su traducción (Kapasi et al., 2007). En la siguiente figura se esquematiza el mecanismo de inhibición traduccional mediada por el complejo GAIT con L13a.

Así como el silenciamiento transcrito-específico de Cp es dependiente de la proteína ribosomal L13a, ahora se sabe que células monocíticas de humano con ribosomas deficientes en L13a son competentes para realizar la actividad traduccional global. La disminución de la PR L13a causa reducción significativa de la metilación del rRNA y de la traducción cap-independiente de los mRNAs de p27, p53 y SNAT2 mediada por elementos de Sitio Interno de Entrada al Ribosoma (**IRES**). Sin embargo, no existen diferencias significativas en el procesamiento en el RNA ribosomal, en la formación de polisomas, en la actividad traduccional global, en la fidelidad traduccional ni en la proliferación celular entre células monocíticas de humano deficientes de L13a y células wild-type (Chaudhuri et al., 2007).

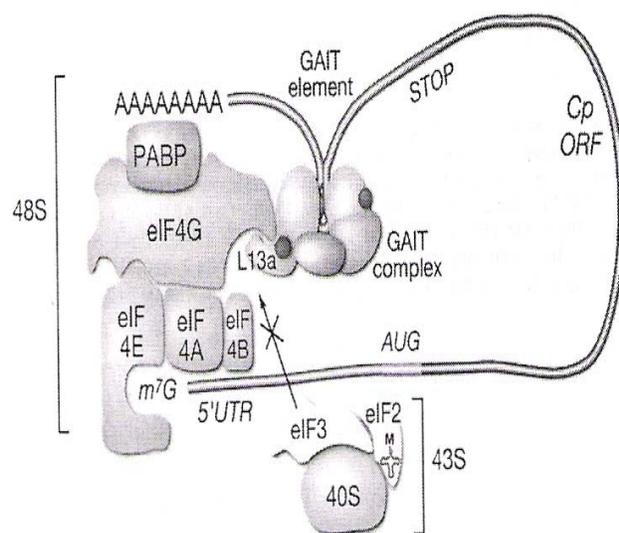


Figura 3. Inhibición transcrito-específica donde la formación de GAIT impide el acoplamiento de los factores de iniciación de la traducción. La unión de L13a sobre el sitio de reconocimiento de eIF3 con eIF4G bloquea la interacción de la subunidad 43S e impide la iniciación de la traducción. Tomado de Kapasi et al., 2007

V. JUSTIFICACIÓN

Las semillas tienen una posición crítica en la evolución de las plantas superiores puesto que son la forma de dispersión de estos organismos. El éxito con el cual una planta superior se establece depende en gran parte de las propiedades fisiológicas y bioquímicas de sus semillas, debido a que en las etapas más tempranas del desarrollo, el establecimiento de la nueva plántula depende de la calidad de los nutrientes almacenados en ellas y de la fidelidad y la regulación de los procesos fisiológicos y bioquímicos que ocurren durante la germinación.

Por esta razón, considerando que la síntesis de proteínas es un proceso bioquímico clave en el inicio de la germinación, el enfoque de esta investigación es la de generar conocimiento sobre la regulación selectiva de la expresión genética de los mRNAs que codifican para proteínas ribosomales específicas en ejes embrionarios de maíz, planta que representa en México y en muchos países de América Latina un pilar en la nutrición de la población.

VI. HIPÓTESIS

Basada en los antecedentes expuestos se construye la siguiente hipótesis de trabajo:

Durante la germinación existe regulación diferencial tanto a nivel transcripcional como a nivel traduccional, en la expresión de los **mRNAs** de **PREEs** y **PRDs**. Dado que la regulación a nivel transcripcional es diferencial, se esperan encontrar patrones diferentes en los niveles de expresión durante la germinación, para cada grupo de mRNAs. Así mismo, dado que la regulación selectiva a nivel traduccional ocurre por la vía de señalización **PI3K-TOR** y/o por la formación de complejos **miRNA-10a-mRNA**, se espera entonces encontrar diferencias en las señales **5'TOP** y/o en las características de acoplamiento miRNA-10a-mRNA.

VII. OBJETIVOS

1. Objetivo general

- Identificar el patrón de regulación en la expresión de los mensajes de las **PREEs** (S6, S12) y las **PRDs** (P0, L13a y RACK1), tanto a nivel transcripcional durante la germinación, como a nivel traduccional en ejes embrionarios de maíz, y analizar la participación de la vía PI3K-TOR en este proceso.

2. Objetivos particulares

- Analizar el nivel de expresión del mRNA de cada una de las PR bajo estudio en ejes de maíz durante la germinación (0, 6, 12 y 24 horas) con el fin de identificar regulación diferencial a nivel transcripcional.
- Llevar a cabo un análisis de secuencia de las regiones 5' UTR de los mensajes bajo estudio, a fin de identificar elementos importantes que pudieran dar selectividad traduccional, principalmente regiones 5'-TOP mediante la vía PI3K-TOR, y/o regiones afines a miRNAs que favorezcan su traducción mediante la formación de complejos miRNA-mRNA.

VIII. METODOLOGÍA

1. Preparación del material biológico (Sánchez de Jiménez & Aguilar, 1984)

Ejes de maíz: Se utilizaron semillas de maíz (*Zea mays L*) variedad Chalqueño, desinfectadas con hipoclorito de sodio al 5%, las cuales se germinaron en charolas de plástico entre dos capas de algodón humedecido con agua desionizada suficiente durante 6, 12 y 24 h a 28°C en la oscuridad. Se tomó la precaución de seleccionar únicamente semillas enteras que no muestren daño físico o aparente contaminación microbiana. Transcurrido el tiempo de germinación, se disectaron los ejes de las semillas, se congelaron envueltos en papel aluminio con nitrógeno líquido, y se almacenaron a -70°C para su posterior uso. Los ejes embrionarios de semillas quiescentes (0 h de germinación) fueron tratados de la misma forma.

2. Extracción de RNA total (Chomczynski y Sacchi, 1987)

2.1. Fundamento

Para el desarrollo de esta técnica se empleó el reactivo Trizol de la marca Invitrogen®. Este reactivo es un agente listo para usar en la extracción de RNA total de células y tejidos. El reactivo es una solución homogénea de fenol e isotiocianato de guanidina de fácil uso basado en el desarrollo de la técnica planteado en Chomczynski and Sacchi, (1987). Durante la homogenización el agente de Trizol mantiene la integridad del RNA mientras se rompe el tejido celular y se solubilizan los componentes de las células. Al adicionar cloroformo y centrifugar se separa la solución en dos fases de manera que el

RNA queda disuelto en la fase acuosa, mientras que en la fase orgánica quedan los demás componentes. Posteriormente el alcohol isopropílico que se adiciona favorece la precipitación del RNA y éste finalmente se lava con etanol al 75%.

Como precaución, durante toda la técnica es necesario evitar la presencia de RNAsas que degraden al RNA, de manera que antes de iniciar la metodología se esteriliza todo el material que se empleará, a fin de inhibir la actividad de estas enzimas.

2.2. Reactivos y soluciones

Para el desarrollo de la técnica se requieren los siguientes reactivos:

- Cloroformo
- Isopropanol
- Etanol 75% en agua DEPC (Dietil pirocarbonato).
- Agua libre de RNAsas o solución de SDS al 0.5% (El agua DEPC se prepara al 0.01% v/v y se esteriliza en autoclave).

2.3. Desarrollo de la técnica

El tejido en estudio se homogenizó en un mortero estéril con nitrógeno líquido y se transfirió el tejido a tubos Eppendorf adicionando el reactivo de Trizol en una proporción de 1 mL por cada 50-100 mg de tejido. El volumen de la muestra no debe exceder el 10% del volumen de Trizol usado para la homogenización. Para remover el material insoluble se centrifugó a 12,000g por 10 minutos a 4°C. El precipitado resultante

contiene membranas, polisacáridos y DNA de alto peso molecular, mientras que el sobrenadante contiene RNA.

Posteriormente se incubaron las muestras por 5 minutos a 15-30°C para permitir la disociación de complejos ribonucleoproteicos. Se adicionó 0.2 mL de cloroformo por cada mL de Trizol empleado. Los tubos se agitaron vigorosamente con la mano por 15 segundos, se incubaron a 15-30°C por 2 o 3 minutos y se centrifugaron a no más de 12,000g por 15 minutos a 4°C. Únicamente el sobrenadante incoloro se transfirió a un tubo nuevo. La precipitación de RNA se llevó a cabo con 0.5 mL de isopropanol por cada mL de Trizol usado en la homogenización inicial. Las muestras se incubaron a 15-30°C por 10 minutos para precipitar al RNA. Se removió el sobrenadante y el precipitado se lavó tres veces por centrifugación con etanol al 75% mezclado con vortex, a no más de 7,500g por 5 minutos a 4°C, adicionando 1 mL de etanol por cada mL de Trizol empleado. Fue importante no dejar el RNA completamente seco para evitar que no se pudiera redissolver en agua para su cuantificación. Se agregó agua libre de RNAsas c.b.p. redissolver el precipitado.

Para la cuantificación el RNA se diluyó 1:50 mezclando 2 µL de RNA y 98 µL de agua en una celda de cuarzo y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro UV a 260nm. Para obtener la concentración de RNA en la muestra se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración RNA } (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = \frac{40 * \text{factor de dilución} * \text{Abs } 260\text{nm}}{1000}$$

1000

3. Amplificación del mensaje por RT-PCR (Wang et al., 1989)

3.1. Fundamento

En general, la técnica de RT-PCR convencional se basa en la reacción en cadena de la polimerasa, la cual ocurre después de un ciclo de transcripción reversa en el cual se sintetiza cDNA a partir del RNA molde. La reacción en cadena de la polimerasa amplifica fragmentos específicos de DNA mediante cebadores o primers, los cuales se aparean con el cDNA y amplifican de manera exponencial una cierta región de interés. Los productos de RT-PCR pueden cuantificarse por medio de densitometrías en geles de agarosa.

El desarrollo de esta técnica se llevó a cabo mediante el kit Super Script™ One-Step RT-PCR con Platinum® Taq system, el cual es un sistema diseñado para una detección conveniente, sensible y reproducible y para un análisis de moléculas de RNA mediante RT-PCR. Los componentes tanto para la síntesis de cDNA como para el PCR convencional están combinados en un único tubo, usando primers gen-específicos y un blanco molde de RNA. Así pues, la transcripción reversa es automáticamente seguida del ciclo de PCR sin pasos adicionales.

3.2. Reactivos y soluciones

Los componentes de este kit son los siguientes:

- RT/Platinum Taq Mix, que contienen una mezcla de SuperScript™ II Transcriptasa Reversa y Platinum® Taq DNA Polimerasa para una síntesis óptima de cDNA.
- 2x Reaction Mix, el cual consiste de un buffer optimizado para la transcripción reversa y posterior amplificación por PCR, Mg²⁺ optimizado, desoxirribonucleótidos de trifosfato y estabilizantes.
- Sulfato de magnesio 5 mM
- Sulfato de magnesio 50 mM

3.3. Desarrollo de la técnica

Para desarrollar la técnica fue necesario considerar los resultados obtenidos del diseño de los “primers” (ver resultados, apartado de diseño de primers), de manera que el programa del termociclador se ajustará a estas condiciones para lograr la síntesis de cDNA y la amplificación. Automáticamente después de la síntesis de cDNA se lleva a cabo la amplificación por PCR convencional dentro del mismo ciclo programado en el termociclador.

Una síntesis eficiente de cDNA se logra normalmente con una fase de incubación previa de 30 minutos a 50°C, siendo éstas las condiciones del punto inicial del ciclo. La temperatura óptima para la transcripción reversa dependerá de las secuencias del primer y el blanco de amplificación.

Para llevar a cabo esta técnica se adicionaron en un microtubo en hielo los siguientes componentes de acuerdo a la siguiente tabla:

Componente	Volumen/10 μL	Concentración final
2x Reaction Mix	5 μ L	1X
RNA (total o polisomal)	X μ L	10 pg-1 μ g
Primer Fw (10 μ M)	0.4 μ L	0.4 μ M
Primer Rew (10 μ M)	0.4 μ L	0.4 μ M
Stock MgSO ₄ (5mM)	1.2 μ L	1.8 mM
RT/Platinum Taq Mix	0.2 μ L	----
Agua destilada estéril	c.b.p 10 μ L	----

Se mezclaron los componentes en vortex asegurándose que la mezcla quedara en la base del tubo. Posterior a la reacción, se analizó el producto de la amplificación en gel de agarosa.

4. Cuantificación del nivel de expresión de mensaje por medio de electroforesis en gel de agarosa (Wang et al., 1989)

4.1. Fundamento

Para detectar el fragmento de cDNA amplificado por RT-PCR se somete el producto de esta reacción a una electroforesis en gel de agarosa o de poliacrilamida, para separar los posibles fragmentos de DNA de distinto tamaño. A continuación se tiñe el gel en una solución con bromuro de etidio y mediante una lámpara de luz UV se visualizan las bandas de DNA.

4.2. Reactivos y soluciones

Los componentes de este kit son los siguientes:

- Agua libre de RNAsas o solución de SDS al 0.5% (El agua DEPC se prepara al 0.01% v/v y se esteriliza en autoclave).
- Solución de TBE 5X pH 8 (5.4% Tris, 2.75% ácido bórico, 0.01 M EDTA)
- Agarosa marca SIGMA®
- Solución de bromuro de etidio al 1%
- Buffer de carga (solución alcohólica libre de RNAsas de azul de bromofenol al 1%)

4.3. Desarrollo de la técnica

La cámara de electroforesis y sus aditamentos (peine y portagel) previamente se lavaron con agua DEPC libre de RNAsas. Para preparar el gel, se midieron 25 mL en un tubo Falcon estéril de una solución de TBE 5X pH 8 (5.4% Tris, 2.75% ácido bórico, 0.01 M EDTA) y se aforaron a 250 mL con agua DEPC en un matraz aforado estéril. Se pesaron 0.3 g de agarosa en un matraz Erlenmeyer estéril y se agregaron 30 mL del buffer de TBE preparado para obtener un gel al 1 % de agarosa. Una vez disuelta la agarosa (se puede calentar ligeramente sin llegar a ebullición), se agregó cuidadosamente 1 μ L de bromuro de etidio y a temperatura ambiente se vierte esta solución en el portagel, se coloca inmediatamente el peine y se deja gelificar colocando papel transparente encima para evitar contaminación.

En cada microtubo con la mezcla de reacción se agregó 1 μL de buffer de carga, se cargó en el gel de agarosa y se corrió el gel a 85 V durante 40 minutos.

El análisis semicuantitativo del nivel de expresión de cada mensaje bajo estudio se llevó a cabo en un equipo Fluor-S Bio Rad™ mediante el software Quantity One™.

IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Extracción de RNA total de ejes embrionarios de maíz

Después de preparar el material biológico como se describió en la metodología, se extrajo RNA total de ejes embrionarios de 0, 6, 12 y 24 h de germinación.

1.1. RNA total de ejes embrionarios sin germinar (0 horas).

A partir de 0.6 g de ejes embrionarios sin germinar se obtuvo la muestra B de RNA total íntegra (0hT1B y 0hT2B). En la figura 1.1 se muestra una electroforesis en gel de agarosa al 1% libre de RNAsas de dicha muestra a fin de observar integridad y la relación de la intensidad de las bandas con respecto a la cantidad de RNA cargado en el gel.

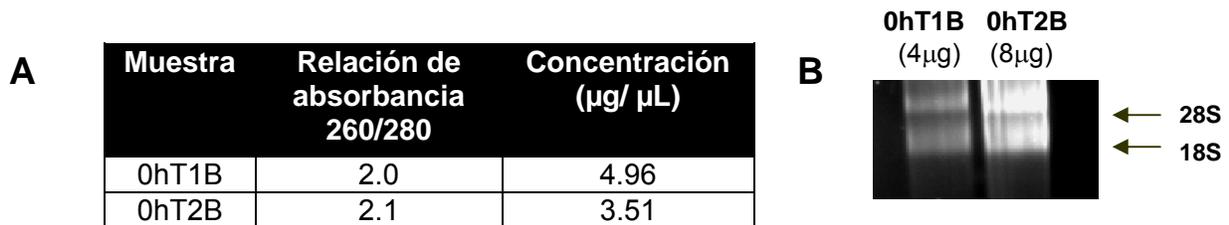


Figura 1.1. Las muestras de RNA 0hT1B y 0hT2B muestran integridad para los ensayos del análisis del nivel de transcritos durante la germinación. Panel A. Cuantificación de las concentraciones correspondientes a las muestras de RNA total 0hT1B y 0hT2B. Las relaciones de absorbancia 260/280 de cada muestra se relacionan con la integridad del RNA y su pureza; para validar la integridad y pureza de las muestras se espera que este valor sea lo más cercano a 2. Ambos valores correlacionan con la integridad que se muestra en el gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (panel B). **Panel B.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras de RNA total 0hT1B y 0hT2B. En el gel se cargaron 4 y 8 μg de RNA respectivamente de las muestras 0hT1B y 0hT2B. La muestra de RNA total 0hT1B fue la que se utilizó como

RNA molde de 0 horas en el análisis por RT-PCR del nivel de los transcritos de interés durante la germinación.

1.2. RNA total de ejes embrionarios germinados por 6 horas.

A partir de 0.8 g de ejes embrionarios sin germinar se obtuvo la muestra de RNA total 6hT. En la figura 1.2 se muestra una electroforesis en gel de agarosa al 1% libre de RNAsas de dicha muestra a fin de observar integridad.

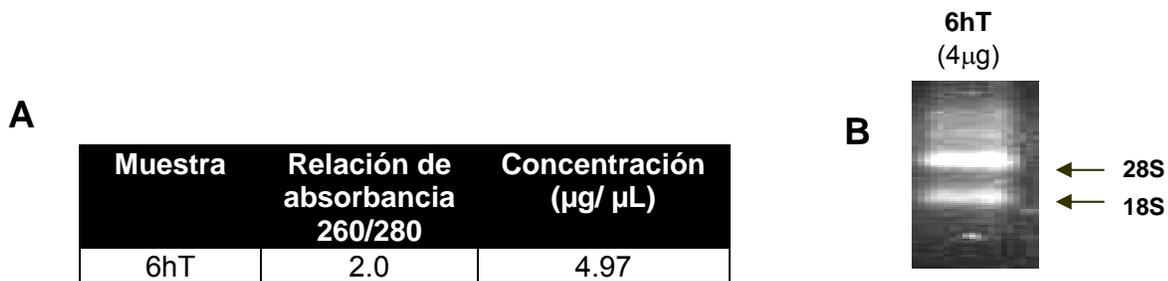


Figura 1.2. La muestra de RNA 6hT muestra integridad para los ensayos del análisis del nivel de transcritos durante la germinación. Panel A. Cuantificación de la concentración correspondiente a la muestra de RNA total 6hT. La relación de absorbancia 260/280 de la muestra se relaciona con la integridad del RNA y su pureza; para validar la integridad y pureza de las muestras se espera que este valor sea lo más cercano a 2. Este valor correlaciona con la integridad que se muestra en el gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (panel B). **Panel B.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la muestra de RNA total 6hT. En el gel se cargó 4 μg de RNA de la muestra 6hT, la cual se utilizó como RNA molde de 6 horas de germinación en el análisis por RT-PCR del nivel de expresión de los mRNAs de interés durante la germinación.

1.3. RNA total de ejes embrionarios germinados por 12 horas.

A partir de 0.5 g de ejes embrionarios sin germinar se obtuvo una muestra de RNA total. En la figura 1.3 se muestra una electroforesis en gel de agarosa al 1% libre de RNAsas de dicha muestra a fin de observar integridad.

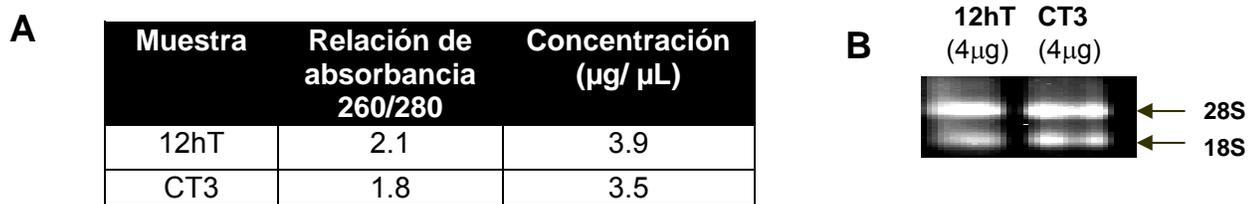


Figura 1.3. La muestra de RNA 12hT muestra integridad para los ensayos del análisis del nivel de transcritos durante la germinación. Panel A. Cuantificación de la concentración correspondiente a la muestra de RNA total 12hT. La relación de absorbancia 260/280 de la muestra se relaciona con la integridad del RNA y su pureza; para validar la integridad y pureza de las muestras se espera que este valor sea lo más cercano a 2. Este valor correlaciona con la integridad que se muestra en el gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (panel B). **Panel B.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la muestra de RNA total 12hT. En el gel se cargó 4 μg de RNA de la muestra 12hT y 4 μg de RNA de la muestra CT3 (RNA total de ejes embrionarios germinados por 24 h) como un control tanto de carga como de integridad. La muestra 12hT se utilizó como RNA molde de 12 horas de germinación en el análisis por RT-PCR del nivel de expresión de los mRNAs de interés durante la germinación.

1.4. RNA total de ejes embrionarios germinados por 24 horas.

Se obtuvieron cuatro muestras de RNA total del lote de ejes embrionarios germinados por 24 h a partir de 1g de tejido. A continuación, en la figura 1.4, se presentan los datos de concentración de estas muestras así como la electroforesis en gel de agarosa a fin de validar la integridad de la muestras.

A

Muestra	Relación de absorbanza 260/280	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
CT1	1.9	3.2
CT2	1.3	3.8
CT3	1.8	3.5
CT4	1.8	4.1

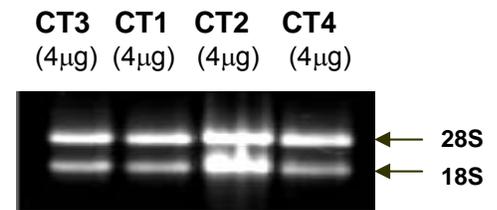
B

Figura 1.4. . Las muestras de RNA total CT1, CT3 y CT4 muestran integridad para los ensayos del análisis del nivel de transcritos durante la germinación. **Panel A.** Cuantificación de las concentraciones correspondientes a las muestras de RNA total CT1, CT2, CT3 y CT4. Las relaciones de absorbanza 260/280 de cada muestra se relacionan con la integridad del RNA y su pureza; para validar la integridad y pureza de las muestras se espera que este valor sea lo más cercano a 2. Los valores de CT1, CT3 y CT4 correlacionan con la integridad que se muestra en el gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (panel B)). La muestra CT2 tiene un valor de relación de absorbanza 260/280 bajo y correlaciona con el grado de degradación que presentaba ya esta muestra. **Panel B.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras de RNA total CT1, CT2, CT3 y CT4. En el gel se cargaron 4 μg de RNA de cada una de las muestras y la intensidad homogénea de las bandas valida su concentración. La muestra CT3 se utilizó tanto como RNA molde de 24 horas de germinación en la estandarización de las condiciones de RT-PCR de cada uno de los mensajeros y en el análisis de RT-PCR del nivel de expresión de los mRNAs de interés durante la germinación.

2. Diseño de las secuencias de oligonucleótidos (primers)

Antes de desarrollar una reacción de RT-PCR, es fundamental contar con primers adecuados que permitan una buena amplificación de las secuencias de interés, en este caso secuencias de fragmentos de los mRNAs que codifican para las proteínas ribosomales bajo estudio. Para lograr lo anterior ha sido necesario localizar dichas secuencias de mRNAs, en las bases de datos del genoma de *Zea mays*, ya sea

directamente con el nombre de la proteína para la cual codifica el mensajero, o bien mediante alineamientos de dichas secuencias de otras especies sobre el genoma de *Zea mays*.

Posteriormente, ya con la secuencia identificada del mRNA de interés, se escogió un par de secuencias (sentido y antisentido) que disten entre ellas de acuerdo al tamaño del producto amplificado que se desee. Ambas secuencias fueron sometidas a un análisis mediante el software Oligo Analyzer 3.0 de manera que se obtengan parámetros como la temperatura de alineamiento, % guaninas-citosinas (%GC) así como su peso molecular, además se analizan las energías de apareamiento entre sí mismo o con el otro oligonucleótido. Se recomienda que la temperatura de alineamiento de cada primer sea cercana a 60°C y similares entre sí, que el % GC se ubique entre 55 y 62% y finalmente que la secuencia comience con una guanina del lado 5' para facilitar la cinética de la reacción. Las energías de los homoalineamientos y heteroalineamientos no deberán ser menores a -11 kcal/mol y las temperaturas de dichos entrecruzamientos no deberán ser superiores ni cercanas a la temperatura de alineamiento de cada oligonucleótido, al menos en un rango de 15°C. Fue necesario considerar que la secuencia en antisentido debe ser la inversa reversa en relación a la secuencia del mRNA de interés. Por último, en base a la secuencia de cada uno de los oligonucleótidos, se colocaron las secuencias de los mRNA que codifican para cada proteína ribosomal bajo estudio mediante un BLAST, que por medio de una secuencia de algoritmos, permitió identificar sobre la base de datos del genoma de *Zea mays* los mensajeros de interés con el fin de comprobar que las secuencias de los "primers" diseñados alineaban únicamente con el mRNA que nos interesa.

Las secuencias seleccionadas se sintetizaron en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM ubicado en la zona de institutos de Ciudad Universitaria.

En la tabla 1.2 se presentan las secuencias de los oligonucleótidos seleccionados, los parámetros obtenidos del análisis y su concentración indicada por el proveedor.

Tabla 1.2. Secuencia y parámetros de los primers diseñados

Primer (mRNA)	Secuencia (5'-3')	P.M. (g/mol)	Tm (°C)	Concentración (µg/µL)	Tamaño del producto (pb)
S6 (Fw)*	TGA TGC TCT GGG TGA GGA GTT AAA	7487.9	57.3	Stock 10 µM	525
S6 (Rev)*	TTC CTT CAG CCT CTG GGC AAG AAG	7328.8	57.4	Stock 10 µM	
S12 (Fw)	GAT CTC CCT TCG CAG CCG	5411.5	58.5	3.3	546
S12 (Rev)	GATCTCCTAGCA AGCCCAAGA CG	7002.6	59.4	4.2	
P0 (Fw)	GCA GCG ATG GCG ATC AAG	5573.7	57	3.7	933
P0 (Rev)	GTCCGACTCCTCTTCAGGC	5715.7	57.4	3.2	
L13a (Fw)	GGTAAGAGGCGAGATGGTGTC	6591.3	57.2	5.1	496
L13a (Rev)	GAGACCTTGGCCTTCTCCTTTC	6628.3	57.5	3.8	
RACK1 (Fw)	GAC ACC ATC GTC CCA GCT TC	5997.9	58.1	2.5	685
RACK1 (Rev)	GCT CGG TCG CAG CAC AAA G	5822.8	59.6	3.1	

*Diseñados por Dinkova T. en 2004

3. Estandarización de los ensayos por RT-PCR

Previo a la cuantificación del mensaje de cada uno de los mRNAs bajo estudio, fue necesario dentro de una fase de estandarización, identificar las condiciones ideales para la cuantificación de cada mensaje por RT-PCR, ya que en este tipo de ensayos es importante considerar variables de temperatura, concentración de RNA, concentración de oligonucleótidos (primers), concentración de Mg²⁺ y número de ciclos en el

termociclador, esto con el fin de evitar la saturación de la amplificación del RNA templado y subestimar el nivel de mensaje inicial en la muestra. A continuación en la figura 3.1 se presenta la electroforesis en gel de agarosa al 1% de los subproductos del ensayo más representativo de RT-PCR, las condiciones y concentraciones de cada uno, así como la discusión de lo que se observa.

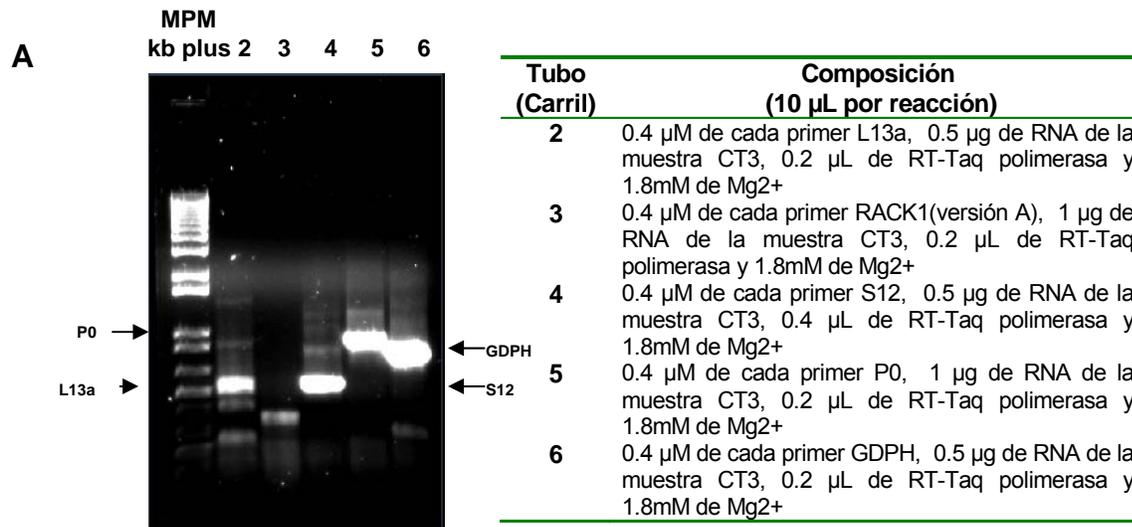


Figura 3.1 Los “primers” diseñados para la amplificación por RT-PCR de los mRNAs L13a, RACK1, S12 y P0 son viables para el análisis del nivel de transcritos durante la germinación. Panel A. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación obtenidos por RT-PCR correspondientes a los mRNAs L13a, RACK1, S12 y P0. Partiendo de ensayos previos, las concentraciones de “primers” y Mg²⁺ se modificaron con el fin de volver más astringente el sistema de reacción y favorecer el alineamiento de los primers con la secuencia de interés, en especial para los mensajeros de L13a y RACK1 en los cuales no se había logrado la amplificación del mensaje; además se incrementó el número de ciclos a 35. Se programó en el termociclador las siguientes condiciones de temperatura: 1 ciclo a 55°C-30 min y 94°C-4 min, 35 ciclos de 94°C-30 s, 52°-1min, 72°C -1:30min y un ciclo final de 72°C-10 min.

En el carril 2 del gel de agarosa presentado en la figura 3.1, se observa una banda de ligera intensidad a la altura de las 500 pb aproximadamente que corresponde al

fragmento del mensaje de L13a (496 pb); las condiciones establecidas favorecieron la amplificación de dicho mensaje, sin embargo la presencia de otras bandas refleja poca especificidad y por lo tanto, en ensayos posteriores, se incrementó la concentración de Mg^{2+} con el fin de ajustar la especificidad. En el carril 3 se observa una banda de ligera intensidad a la altura de 350pb que corresponde a un fragmento inespecífico que se ha reconocido con los oligonucleótidos empleados en la reacción, concluyendo de esta manera que los primers empleados para la amplificación del mensaje de RACK1 no fueron adecuados. En relación a lo anterior, se diseñó un segundo par de oligonucleótidos para RACK1 (ver tabla 1.2) que resultó adecuado para la amplificación del mensaje por RT-PCR. En los siguientes tres carriles (4, 5 y 6) se observa una adecuada amplificación de los mensajes de S12, P0 y GDPH.

Considerando todos los ensayos previos se establecieron condiciones ideales para la amplificación de los mRNAs de cada una de las proteínas de interés en función a la concentración de los reactivos (RNA molde y primers), a las concentraciones de los componentes astringentes (Mg^{2+}) y a la temperatura de alineamiento de cada uno de los primers. Así pues, en cada uno de los siguientes ensayos por RT-PCR se emplearon concentraciones 0.4 μ M de primer, 1.8 mM de Mg^{2+} y 0.5 μ g de RNA molde. En la siguiente tabla se presentan los parámetros y condiciones ideales que se usaron en los ensayos por RT-PCR correspondientes al análisis del nivel de los transcritos durante la germinación. Para los casos particulares en los que se emplearon condiciones diferentes se hace notar al pie de figura correspondiente.

Tabla 1.3. Condiciones ideales de amplificación por RT-PCR empleadas en el análisis del nivel de transcritos durante la germinación.

mRNA	Condiciones ideales de amplificación por RT-PCR	[Co] de reactivos	Tamaño del producto (pb)
S6	1 ciclo (55°C por 30 min y 94°C por 4 min) 29 ciclos (94°C por 30 s, 55° por 1min y 72°C por 1:30 min) 1 ciclo final (72°C por 10 min)	0.4 µM de primer 1.8 mM de Mg ²⁺ 0.5 µg de RNA	525
S12	1 ciclo (55°C por 30 min y 94°C por 4 min) 28 ciclos (94°C por 30 s, 55°C por 1min y 72°C por 1:30min) 1 ciclo final (72°C por 10 min)	0.4 µM de primer 1.8 mM de Mg ²⁺ 0.5 µg de RNA	546
P0	1 ciclo (52°C por 30 min y 94°C por 4 min) 28 ciclos (94°C por 30 s, 52°C por 1min y 72°C por 1:30min) 1 ciclo final (72°C por 10 min)	0.4 µM de primer 1.8 mM de Mg ²⁺ 0.5 µg de RNA	933
L13a	1 ciclo (52°C por 30 min y 94°C por 4 min) 35 ciclos (94°C por 30 s, 52°C por 1min y 72°C por 1:30min) 1 ciclo final (72°C por 10 min)	0.4 µM de primer 1.8 mM de Mg ²⁺ 0.5 µg de RNA	496
RACK1	1 ciclo (60°C por 30 min y 94°C por 4 min) 35 ciclos (94°C por 30 s, 60°C por 1min y 72°C por 1:30min) 1 ciclo final (72°C por 10 min)	0.4 µM de primer 1.9 mM de Mg ²⁺ 0.5 µg de RNA	685

Nota: En los ensayos por RT-PCR correspondientes al análisis del nivel de transcritos durante la germinación se programaron estas mismas condiciones de temperatura y únicamente se varió el número de ciclos de amplificación, esto con el fin de resolver la saturación del sistema y validar la capacidad semicuantitativa de los ensayos.

4. Análisis por RT-PCR del nivel de transcritos durante la germinación

4.1. Nivel de transcrito de la proteína ribosomal S6

En la figura 4.1 se muestra un análisis densitométrico ya estandarizado con controles de carga del rRNA 18S y marcador de pesos moleculares. En este caso se programó en el termociclador las condiciones reportadas en la tabla 1.3 a 29 ciclos de amplificación.

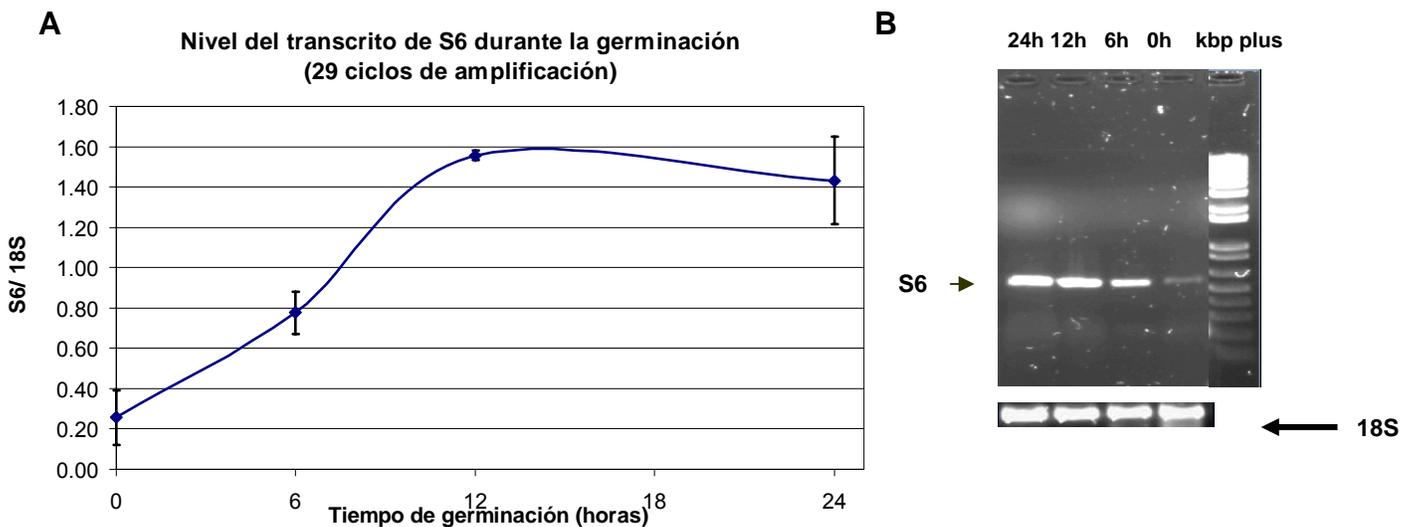


Figura 4.1. El mRNA de la rpS6 se encuentra almacenado a las 0 h, incrementa de forma logarítmica hasta las 12 h, para luego estabilizarse hacia las 24 h. **Panel A.** Análisis densitométrico del nivel de transcrito de la proteína S6 (525 pb) durante la germinación a 29 ciclos de amplificación (3 réplicas técnicas). **Panel B.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación obtenidos en el ensayo de RT-PCR para las muestras de RNA total seleccionadas de 0, 6, 12 y 24 h de germinación (gel representativo de las 3 réplicas). En los carriles 1, 2, 3, y 4 del gel de agarosa se observa amplificación de fragmentos de 525 pb que corresponden al transcrito de S6 (24, 12, 6, y 0 h de germinación respectivamente). Se muestran los controles de carga correspondientes a cada muestra de RNA molde usando oligos del rRNA 18S, con los cuales se obtuvo amplificación uniforme para todas las muestras de RNA a lo largo de la germinación, partiendo de 0.5 µg de RNA a 27 ciclos (parte inferior del gel).

Podemos observar que el comportamiento del nivel de expresión a lo largo de la germinación es casi logarítmico, alcanzando un máximo a las 24 h de germinación.

Con los resultados presentados en la figura anterior, confirmamos con buena reproducibilidad, que hay mRNA de la rpS6 almacenado a las 0h, incrementa en etapas tempranas de germinación para alcanzar un máximo a las 12 h y estabilizarse hacia las 24 h.

4.2. Nivel de transcrito de la proteína ribosomal S12

En la figura 4.2 se muestra un análisis densitométrico ya estandarizado con controles de carga del mRNA de ubiquitina, del rRNA 18S y marcador de pesos moleculares. En este caso se programó en el termociclador las condiciones reportadas en la tabla 1.3 a 28 ciclos de amplificación.

Con respecto al gel de la figura 4.3, en este gel a 28 ciclos de amplificación, se logra detectar la señal de 0 y 6h sin llegar a la saturación cuantitativa del sistema en 12 y 24 h.

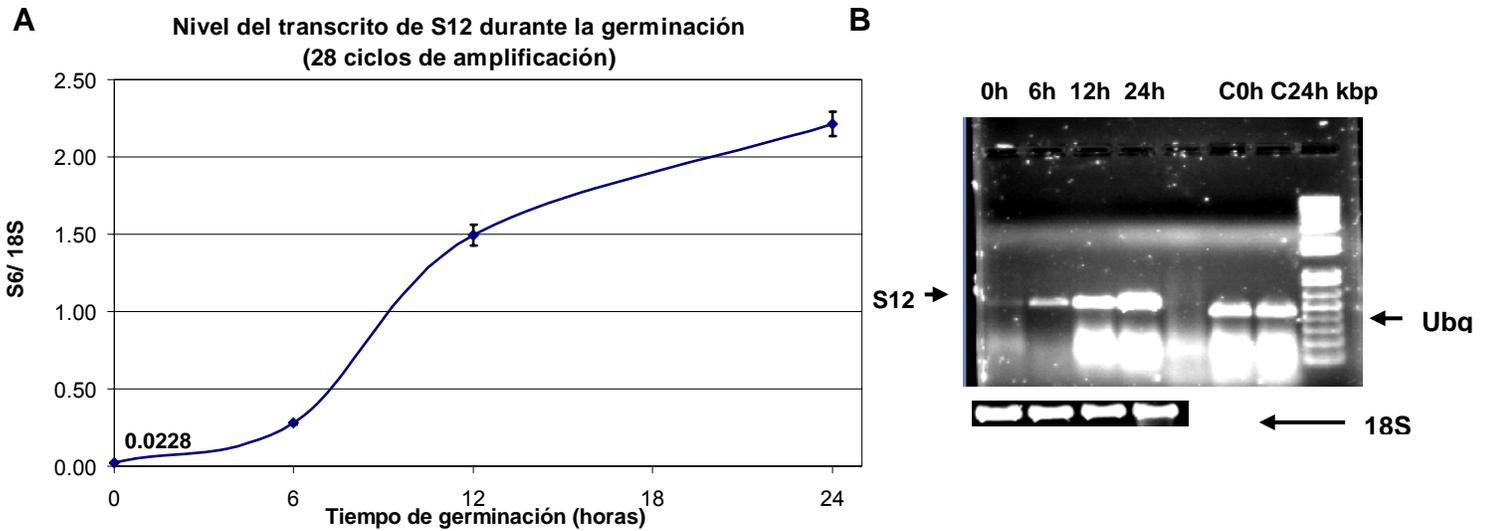


Figura 4.2. El mRNA de la rpS12 se encuentra almacenado a las 0 h, incrementa de forma **logarítmica** en etapas tempranas de la germinación, hasta alcanzar un máximo a las 24 h.

Panel A. Análisis densitométrico del nivel de transcrito de la proteína S12 durante la germinación a 28 ciclos de amplificación (3 réplicas técnicas). Observar que el nivel de transcrito a 0 h no es cero, es decir que el mRNA si se encuentra almacenado. **Panel B.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación obtenidos en el ensayo de RT-PCR para las muestras de RNA total seleccionadas de 0, 6, 12 y 24 h de germinación (gel representativo de las 3 réplicas). En los carriles 1, 2, 3, y 4 del gel de agarosa se observa amplificación de fragmentos de 546 pb, que corresponden al transcrito de S12 (0, 6, 12, y 24 h de germinación respectivamente). Los carriles C0h y C24h (450pb) corresponden a los controles de carga usando oligos del mRNA de ubiquitina (0 y 24 h respectivamente). En ensayos posteriores se logró reproducir controles de carga correspondientes a cada muestra de RNA molde usando oligos del rRNA 18S, con los cuales se obtuvo amplificación uniforme para todas las muestras de RNA a lo largo de la germinación partiendo de 0.5 µg de RNA a 27 ciclos (parte inferior del gel).

A continuación en la figura 4.3 se muestra un segundo análisis del nivel de transcrito de S12 durante la germinación a 25 ciclos de amplificación y con las condiciones reportadas en la tabla 1.3, con el fin de validar la capacidad cuantitativa del sistema.

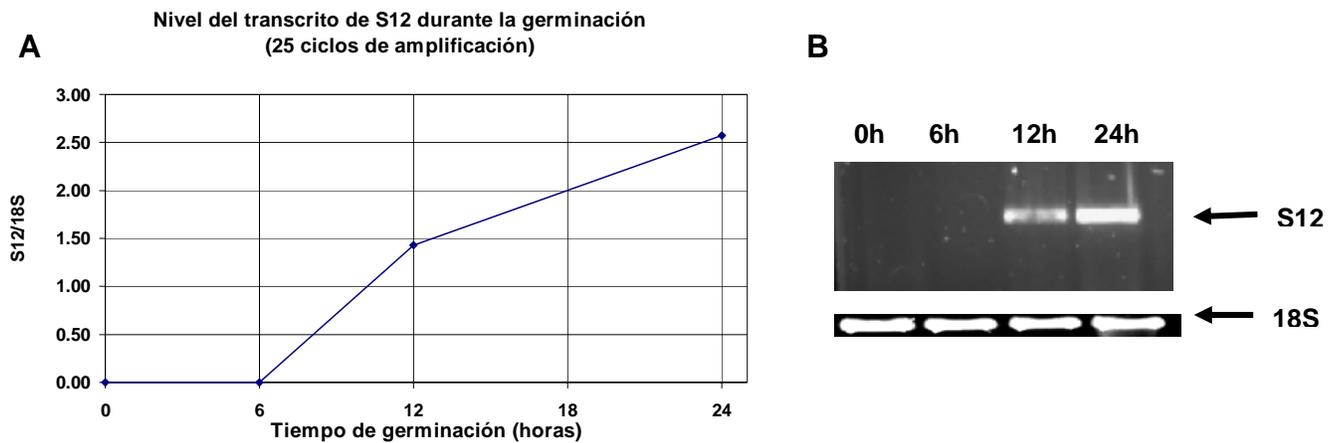


Figura 4.3. Resolución semicuantitativa del nivel de transcrito de la rpS12 durante la germinación. Panel A. Análisis densitométrico del nivel de transcrito de la proteína S12 durante la germinación a 25 ciclos de amplificación (correspondiente al gel mostrado en el panel B). **Panel B.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación obtenidos en el ensayo de RT-PCR para las muestras de RNA total seleccionadas de 0, 6, 12 y 24 h de germinación. En ensayos posteriores se logró reproducir controles de carga correspondientes a cada muestra de RNA molde usando oligos del rRNA 18S, con los cuales se obtuvo amplificación uniforme para todas las muestras de RNA a lo largo de la germinación partiendo de 0.5 μ g de RNA a 27 ciclos (parte inferior del gel).

Al observar el gel de esta serie de amplificación, comprobamos que a un número menor de ciclos de amplificación (25) ya no se detecta señal de respuesta para el nivel de transcrito de la rpS12 tanto a 0 como a 6 h de germinación. Con respecto a 12 y 24 h, tomando en cuenta el gel de la figura 4.2, en este gel a 25 ciclos de amplificación, se logra resolver una posible saturación cuantitativa del sistema, lo que confirma que las diferencias observadas en la figura 4.2 son válidas.

4.3. Nivel de transcrito de la proteína ribosomal P0

En el siguiente panel de la figura se muestran los resultados de un primer análisis densitométrico del nivel del mensajero de la rpP0 durante la germinación a 30 ciclos de amplificación. En este caso se programó en el termociclador las condiciones reportadas en la tabla 1.3 a 30 ciclos de amplificación.

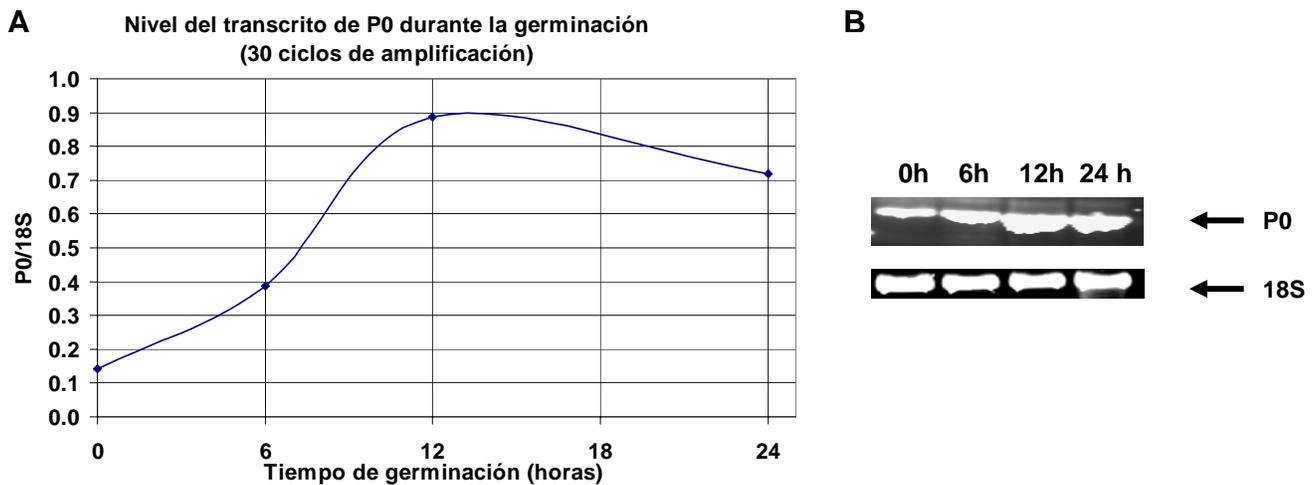


Figura 4.4. El mRNA de la rpP0 se encuentra almacenado a las 0 h, incrementa de forma logarítmica hasta las 12 h, para luego estabilizarse hacia las 24 h. **Panel A.** Análisis densitométrico del nivel de transcrito de la proteína P0 durante la germinación a 30 ciclos de amplificación. Observar que el transcrito a 0 h se encuentra almacenado en los ejes quiescentes. **Panel B.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación obtenidos en el ensayo de RT-PCR para las muestras de RNA total seleccionadas de 0, 6, 12 y 24 h de germinación. En los carriles 1, 2, 3, y 4 del gel de agarosa se observa amplificación de fragmentos de 933 pb, que corresponden al transcrito de P0 (0, 6, 12, y 24 h de germinación respectivamente, no se muestra el ladder en el gel). En ensayos posteriores se logró reproducir controles de carga correspondientes a cada muestra de RNA molde usando oligos del rRNA 18S, con los cuales se obtuvo amplificación uniforme para todas las muestras de RNA a lo largo de la germinación partiendo de 0.5 μ g de RNA a 27 ciclos (parte inferior del gel).

Al observar el gel que se muestra en la figura 4.4, fue necesario disminuir el número de ciclos en próximos ensayos a fin de no saturar el sistema de amplificación y por lo tanto sobreestimar la cantidad de mensajero en las muestras de RNA empleadas, en especial para aquellas correspondientes a tiempos más avanzados durante la germinación. De acuerdo a este ensayo, se observa que hay mRNA almacenado a las 0 h y sube al iniciar la germinación para luego estabilizarse de 12 a 24 h.

A continuación en la figura 4.5 se muestra un segundo análisis ya estandarizado del nivel de transcrito de la rpP0 durante la germinación a 25 ciclos de amplificación, con el fin de validar la capacidad semicuantitativa del sistema. Se utilizaron controles de carga del rRNA 18S y las condiciones programadas en el termociclador fueron igualmente las reportadas en la tabla 1.3.

Al observar el gel de esta serie de amplificación, comprobamos que a un número menor de ciclos de amplificación (25) ya no se detecta señal de respuesta para el nivel de expresión del mRNA de P0 a 0 h de germinación. De acuerdo a esto, se observa que el nivel de transcrito a las 12 h tiende a disminuir hacia horas avanzadas de la germinación (24 h).

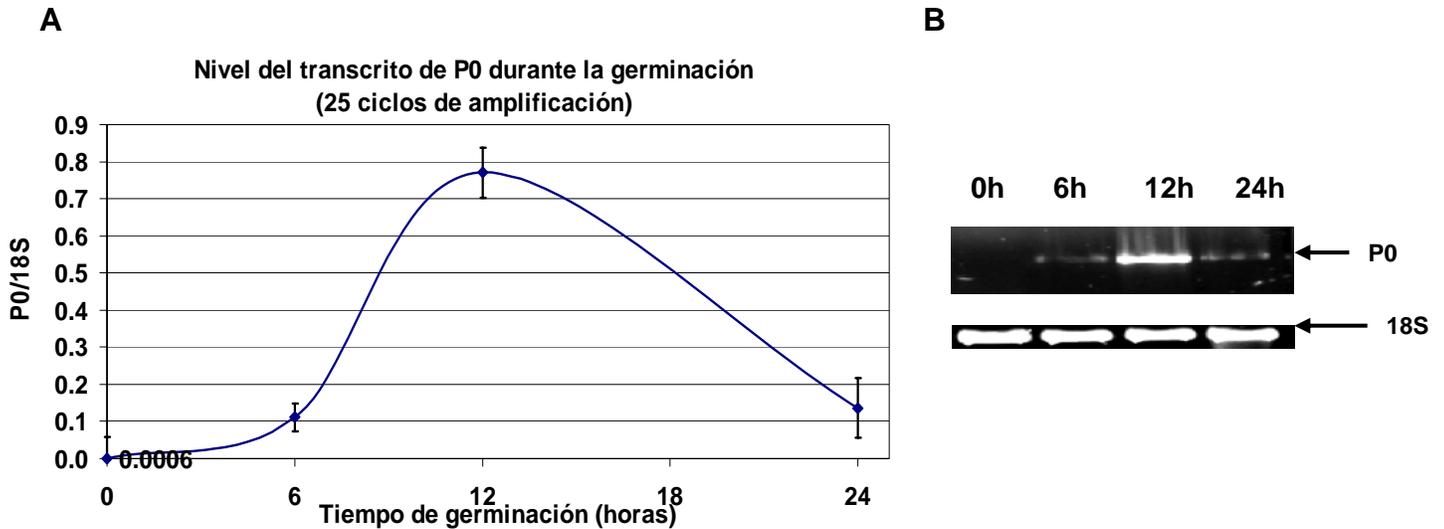


Figura 4.5. El nivel de transcrito de la rpP0 disminuye entre las 12 y 24 h de germinación (resolución cuantitativa del sistema de amplificación). Panel A. Análisis densitométrico del nivel de transcrito de la proteína P0 durante la germinación a 25 ciclos de amplificación (3 réplicas técnicas). Observar que el nivel de transcrito tiende a disminuir después de alcanzar un máximo a las 12 h de germinación. **Panel B.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación obtenidos en el ensayo de RT-PCR para las muestras de RNA total seleccionadas de 0, 6, 12 y 24 h de germinación (gel representativo de 3 réplicas técnicas). En los carriles 1, 2, 3, y 4 del gel de agarosa se observa amplificación de fragmentos de 933 pb, que corresponden al transcrito de P0 (0, 6, 12, y 24 h de germinación respectivamente, no se muestra el ladder en el gel). Cabe resaltar que la señal a 0 h no es observable pero, al modificar el contraste de la imagen en el software Quantity One, ésta es ligeramente mayor a 0 (ver gráfico del panel A). En ensayos posteriores se logró reproducir controles de carga correspondientes a cada muestra de RNA molde usando oligos del rRNA 18S, con los cuales se obtuvo amplificación uniforme para todas las muestras de RNA a lo largo de la germinación partiendo de 0.5 µg de RNA a 27 ciclos (parte inferior del gel).

Podemos adivinar que hay mRNA almacenado en ejes quiescentes, incrementa en las primeras horas de germinación, alcanzando un máximo a las 12 h y tiende a disminuir notablemente a las 24 h.

4.4. Nivel de transcrito de la proteína ribosomal L13a

A continuación, en la figura 4.6 se presenta un análisis del nivel de expresión del mensaje de la proteína ribosomal L13a a 33 ciclos de amplificación. Las condiciones de los ciclos de temperatura fueron las reportadas en la tabla 1.3.

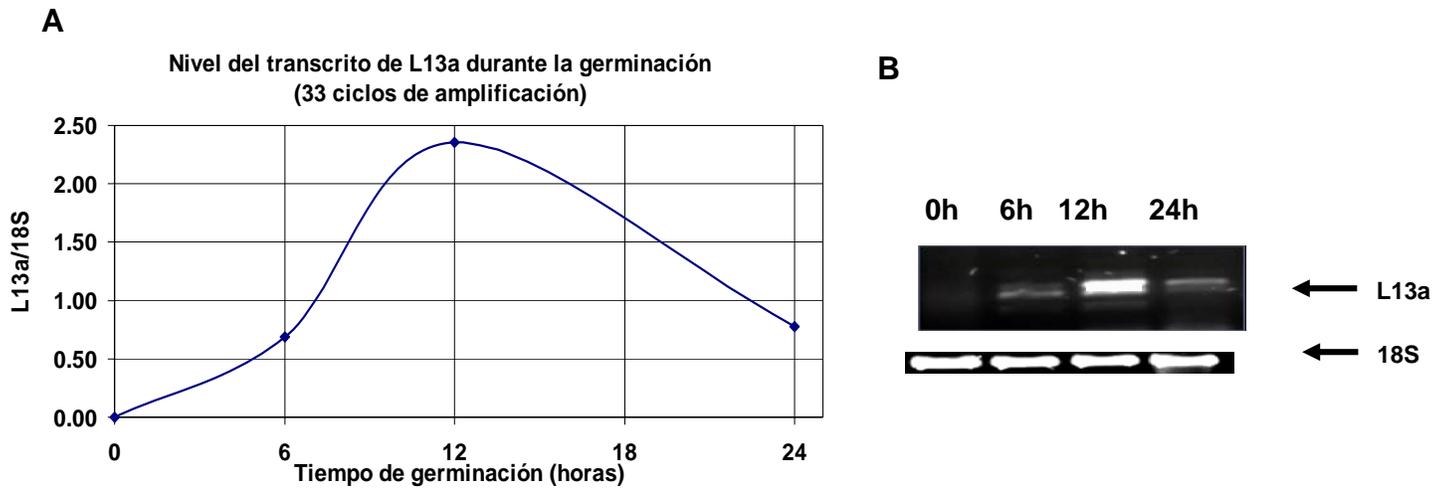


Figura 4.6. El mRNA de la rpL13a incrementa de forma logarítmica hasta alcanzar un máximo a las 12 h, para luego disminuir hacia las 24 h. **Panel A.** Análisis densitométrico del nivel de transcrito de la proteína L13a durante la germinación a 33 ciclos de amplificación. **Panel B.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación obtenidos en el ensayo de RT-PCR para las muestras de RNA total seleccionadas de 0, 6, 12 y 24 h de germinación. En los carriles 1, 2, 3, y 4 del gel de agarosa se observa amplificación de fragmentos de 496 pb, que corresponden al transcrito de L13a (0, 6, 12, y 24 h de germinación respectivamente, no se muestra el ladder en el gel). Se observa buena resolución cuantitativa en la intensidad de las bandas de 6 y 12 h. En ensayos posteriores se logró reproducir controles de carga correspondientes a cada muestra de RNA molde usando oligos del rRNA 18S, con los cuales se obtuvo amplificación uniforme para todas las muestras de RNA a lo largo de la germinación partiendo de 0.5 µg de RNA a 27 ciclos (parte inferior del gel).

En la figura 4.7 se muestra un nuevo análisis densitométrico a 35 ciclos con controles de carga del del rRNA 18S, con el fin de validar el nivel de transcrito a 0 h. Las condiciones programadas en el termociclador fueron las indicadas en la tabla 1.3.

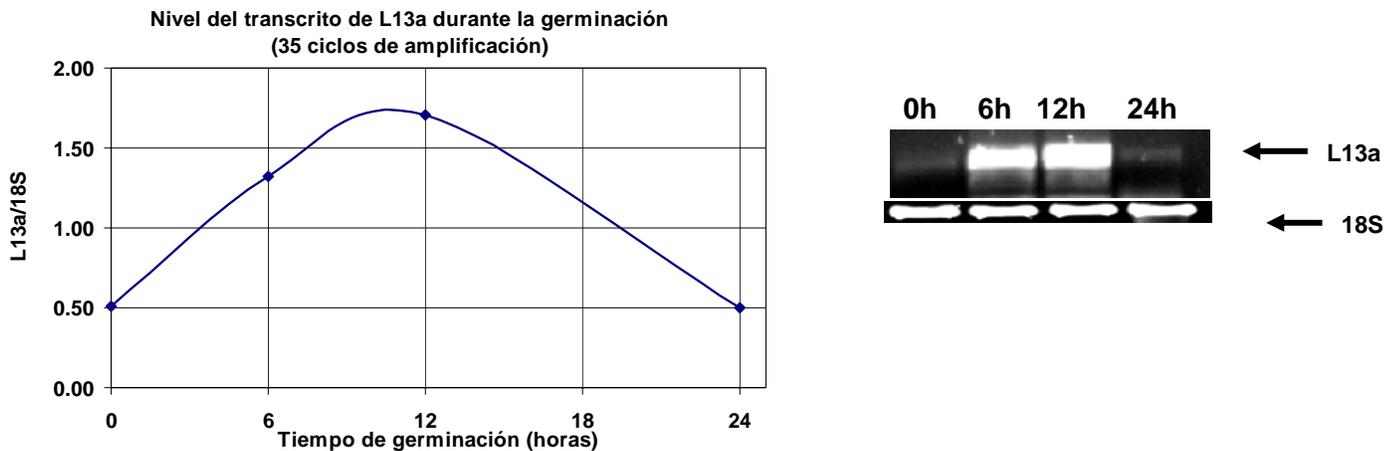


Figura 4.7. El mRNA de la rpL13a si se encuentra almacenado a las 0 h, incrementa de forma lineal hasta las 12 h, para luego disminuir notablemente hacia las 24 h. Panel A. Análisis densitométrico del nivel de transcrito de la proteína L13a durante la germinación a 35 ciclos de amplificación. Observar que el transcrito a 0 h se encuentra almacenado en los ejes quiescentes. **Panel B.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación obtenidos en el ensayo de RT-PCR para las muestras de RNA total seleccionadas de 0, 6, 12 y 24 h de germinación. En los carriles 1, 2, 3, y 4 del gel de agarosa se observa amplificación de fragmentos de 496 pb, que corresponden al transcrito de L13a (0, 6, 12, y 24 h de germinación respectivamente, no se muestra el ladder en el gel). El gel de electroforesis muestra buena resolución en la intensidad de las bandas de 6 y 12 h y se logró detectar mensajero a las 0 y 24 h de germinación. En ensayos posteriores se logró reproducir controles de carga correspondientes a cada muestra de RNA molde usando oligos del rRNA 18S, con los cuales se obtuvo amplificación uniforme para todas las muestras de RNA a lo largo de la germinación partiendo de 0.5 µg de RNA a 27 ciclos (parte inferior del gel).

Podemos aseverar con los resultados presentados en las dos figuras anteriores que hay mRNA almacenado en ejes quiescentes, incrementa en las primeras horas de germinación, alcanzando un máximo a las 12 h y tiende a disminuir notablemente a las 24 h. Al parecer hay una cierta similitud entre el comportamiento del nivel de expresión de los mensajeros de P0 y L13a durante la germinación.

4.5. Nivel de transcrito de la proteína ribosomal RACK1

A continuación, en la figura 4.8 se presenta el análisis del nivel de transcrito de la proteína ribosomal RACK1 a 35 ciclos de amplificación. Las condiciones de los ciclos de temperatura fueron las reportadas en la tabla 1.3. Específicamente para estos ensayos se emplearon concentraciones de 1.9 mM de Mg^{2+} , a fin de elevar la astringencia del medio de reacción.

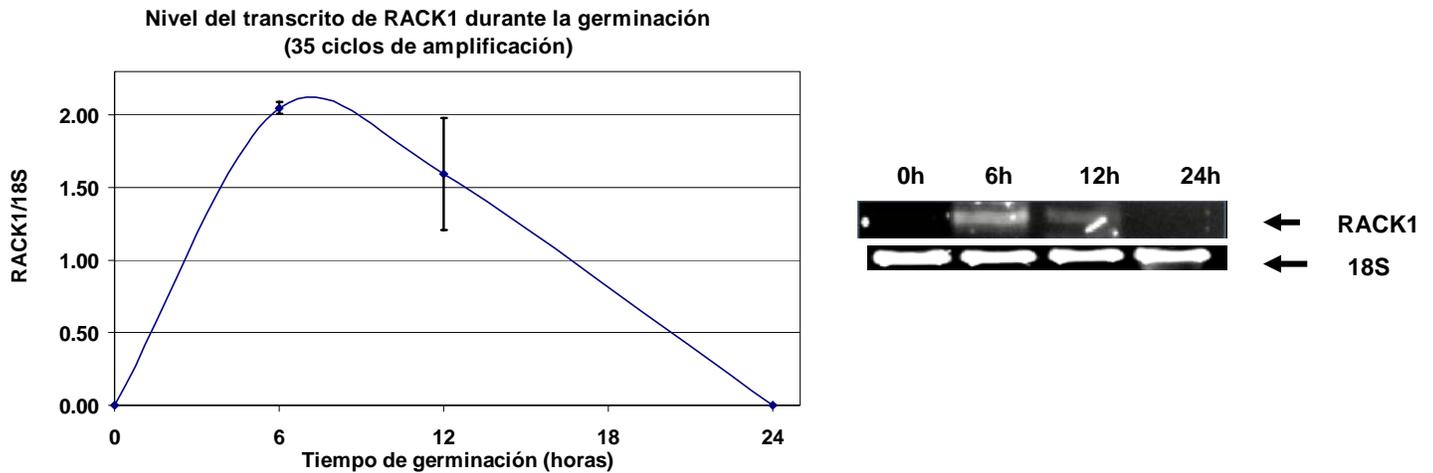


Figura 4.8. El transcrito de la proteína ribosomal RACK1 no se encuentra almacenado a las 0 h, incrementa alcanzando un máximo a las 6 h, para luego degradarse por completo hacia las 24 h. Panel A. Análisis densitométrico del nivel de transcrito de la proteína RACK1 durante la germinación a 35 ciclos de amplificación (3 réplicas técnicas). Observar que no hay mRNA almacenado a las 0 h y tiende a degradarse después de alcanzar un máximo a las 12 h de germinación. **Panel B.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación obtenidos en el ensayo de RT-PCR para las muestras de RNA total seleccionadas de 0, 6, 12 y 24 h de germinación (gel representativo de 3 réplicas técnicas). En los carriles 1, 2, 3, y 4 del gel de agarosa se observa amplificación de fragmentos de 685 pb, que corresponden al transcrito de RACK1 (0, 6, 12, y 24 h de germinación respectivamente, no se muestra el ladder en el gel). En ensayos posteriores se logró reproducir controles de carga correspondientes a cada muestra de RNA molde usando oligos del rRNA 18S, con los cuales se obtuvo amplificación uniforme para todas las muestras de RNA a lo largo de la germinación partiendo de 0.5 µg de RNA a 27 ciclos (parte inferior del gel).

De todo este análisis sobre los niveles de expresión de los mRNAs de las proteínas de interés, podemos decir que los mRNAs de las PREEs (S6 y S12) tienen un patrón de expresión similar a lo largo de la germinación y por lo tanto es probable que exista una regulación transcripcional similar para ambas PREEs.

Por el contrario, observamos un patrón de expresión durante la germinación, similar entre los mRNAs de P0 y L13a, el cual difiere al descrito para las PREEs. Así mismo, para el mRNA de RACK1 observamos que su patrón de expresión a lo largo difiere ligeramente al de P0 y L13a, en tanto a que no hay mRNA a las 0 h y 24 h de la germinación, lo cual nos hace pensar que la regulación de su expresión a nivel transcripcional no es la misma que el resto de los mRNAs estudiados.

5. Análisis de las secuencias de las regiones 5' UTR de los mensajes bajo estudio. Presencia o ausencia de motivos 5' TOP y afinidad con el miRNA-10a.

El siguiente análisis de las regiones 5' UTR se basó en las secuencias reportadas hasta el momento en el Gene Bank. Es importante mencionar que las secuencias de los mRNAs de las proteínas S12, L13a y RACK1 aun no están reportadas como tales tanto en las bases de datos del Gene Bank, como en bases de datos especializadas en maíz como GDBmaize. Así pues, dichas secuencias fueron obtenidas a partir de la homología con otras especies como Arabidopsis o Arroz, mediante alineamientos por BLAST en el genoma de maíz.

A continuación se presenta el análisis de búsqueda de motivos 5'TOP en las regiones 5' UTR de los mRNAs de interés. En la figura 5.1 se presentan las secuencias 5'UTR de los mRNAs así como los motivos 5'TOP remarcados en el caso de que estén presentes.

A

mRNA rp S6 5'GGCACGAGCUCCUUCGCCACCCAGCGCUCGAG**CUCCUCG**CUCCCUG
CGAGCGCGCGCCGCAACGCCACCA**AUG3'**

mRNA rp S12 5'GUUUGUUCUUA**CUCCUCCCG**UUUCCUCACUAGUCGUUACUGACUUC
UCGCUUGCCUGCUCCAGAUCUCCCUUCGCAGCCGGCCAGGGACCCCUU
CACAGCGCGGGAG**AUG3'**

B

mRNA rp P0 5'GAGGUUAAAGCGACGCCGCCGCCGCAAGCCGUCCGCCUUGCCCUUC
ACGAAGGCUUGGU**CCUCCUCCUUG**GUAUCUCCACUCCCCCUUCACAGA
UCCGUUCCUCCAGCUAGGGUUAGCGUUCUCUGCAGCG**AUG3'**

mRNA rp L13a 5'ACAUUCCGCCUCCA**CCCCCG**AACUCCAAACCCUAGCAGUAGCGCCGCC
GCCGCCAGGUAAGAGGCGAG**AUG3'**

mRNA rp RACK1 5'AACCUCUGGUCAGUG**CUCCUCUCCUCG**UGCUGCUCGUCCCGAAUUCGGCACG
AGGCCGCCAACGCAACCCUUGCAGCCCCAAUCCUCACAGCAACC**AUG3'**

Figura 5.1. Análisis de las secuencias 5'UTR de los mRNAs de interés. Presencia o ausencia de motivos 5'TOP y su relación con la vía de regulación de traducción PI3k-TOR

Los mRNAs que codifican para la gran mayoría de las proteínas ribosomales y algunos factores de traducción, exhiben una característica estructural definida: un tracto rico en pirimidinas, ubicado en seguida de la estructura 5'CAP y se define como un elemento de regulación cis que comienza por una citosina la cual es seguida por 4 a 15 bases de pirimidina y finaliza con un residuo de guanina (secuencia concenso C(Py)nG donde n=4-15 pirimidinas. Esta firma de nucleótidos, designada TOP, (del inglés, tract of oligopyrimidine) (Meyuhas, 2000), confiere

selectividad traduccional a los mensajes, la cual es inducida por un rango de estímulos metabólicos y/o nutricionales (Meyuhas 2000; Proud 2002). Al parecer el motivo 5'TOP del mRNA de L13a es de menor tamaño y menos enriquecido en timina en comparación a los 5'TOP de los mRNAs de las PRs S6, S12 y P0. **Panel A (PREEs)**. En la parte superior del panel A se presenta la región 5'UTR del mRNA de S6. Como se observa en la figura, esta secuencia contiene un motivo 5'TOP conformado por 6 pirimidinas. **Panel B (PRDs)**. Es probable que el efecto que tiene insulina sobre los niveles de traducción de los mRNAs esté relacionado con el tamaño del motivo 5'TOP presente en las regiones 5'UTRs. Considerando lo anterior, observamos en la parte superior del panel B, que el motivo 5'TOP de mayor tamaño corresponde al mRNA de la proteína ribosomal P0. Con respecto a L13a, el motivo 5'TOP aparente es de tamaño menor en relación a los otros 5'TOPs y no está enriquecido en timinas. Por el contrario RACK1 presenta un motivo 5'TOP de mayor tamaño.

A continuación en la figura 5.2, se presenta el análisis de acoplamiento entre las regiones 5'UTR y el miRNA-10a reportado en eucariotes superiores. Aquí se describe el modelo de regulación traduccional mediado por el miRNA-10a y se presentan los alineamientos entre las secuencias 5'UTRs de los mRNAs que presentaron homología con la secuencia complemento del miRNA-10a.

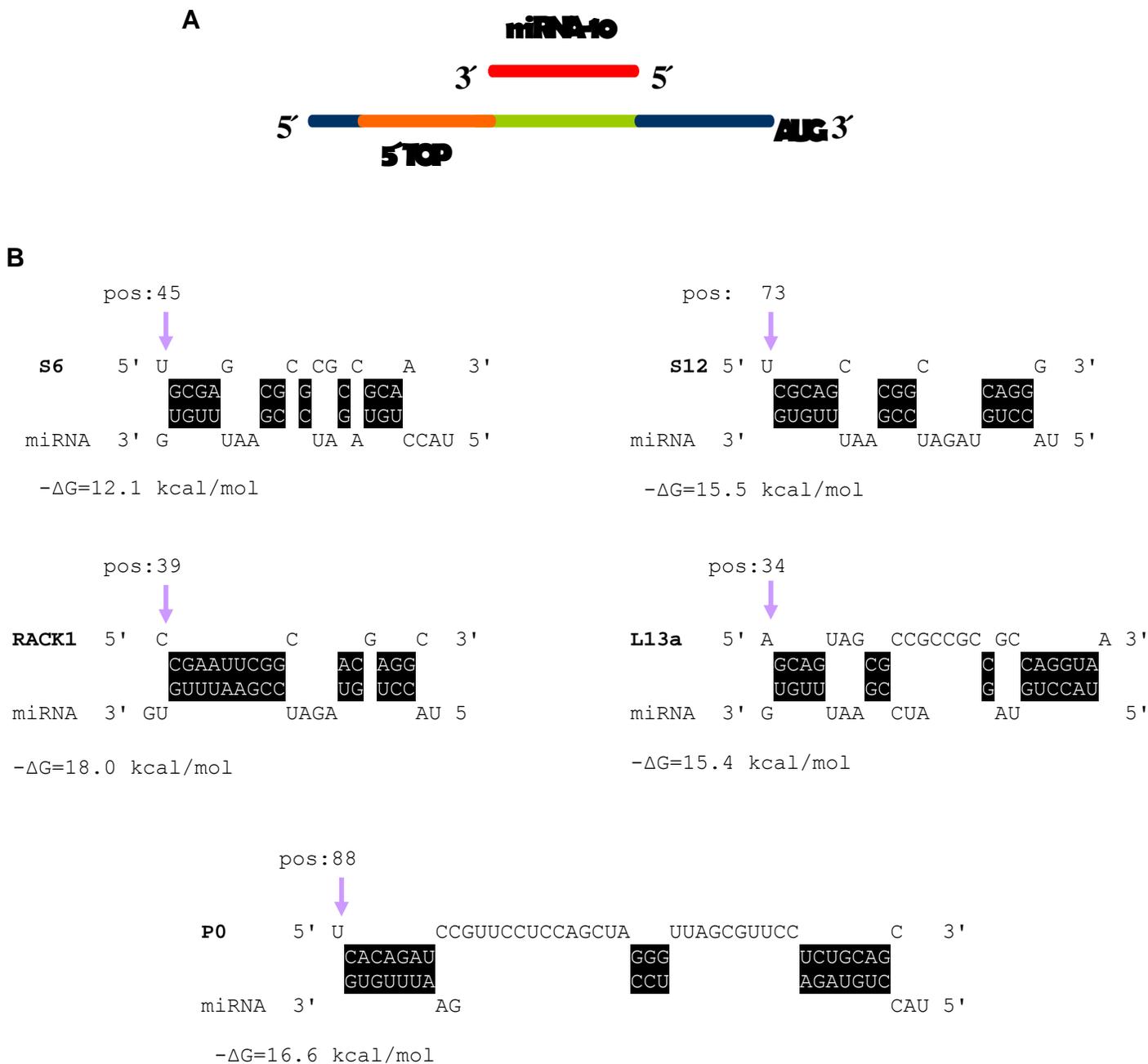


Figura 5.2. Mapeo de los sitios de unión a miRNA-10a. Cálculos termodinámicos para la unión de miRNA-10a a las regiones 5'UTRs de S6, S12, P0, L13a y RACK1. Los valores de ΔG fueron calculados mediante el software RNAhybrid 2.1. Todos los mRNAs presentan regiones afines a miRNA-10a, sin embargo al parecer las uniones entre los mRNAs de P0 y RACK1 con el miR-10a, presentan menor estabilidad energética, lo cual podría indicar que la regulación traduccional de estos mRNAs no está relacionada con la formación de complejos estables miR-10-mRNA.

Particularmente se ha observado en eucariotes superiores que el miR-10a interactúa con la región 5'-UTR de mRNAs que codifican para proteínas ribosomales e incrementan su traducción (Orom et al., 2008). Se sabe también que miR-10a disminuye la represión traduccional de los mRNAs de proteínas ribosomales en condiciones de inanición (Orom et al., 2008). El miR-10a se une en la región río abajo inmediata a los motivos 5'-TOP de los mRNAs de proteínas ribosomales y estos complejos estimulan su traducción así como la síntesis de proteínas y la biogénesis de ribosomas. Con los resultados observados en la figura 5.2, podemos sugerir que en maíz existen mecanismos similares de regulación traduccional mediado por un miRNA similar al miRNA-10a ya reportado en humano y ratón (Orom et al., 2008), y que este mecanismo probablemente no regula la traducción de los mRNAs de P0 y RACK1 dado que la estabilidad energética de la unión es poco probable.

A continuación en la figura 5.3, se plantea el modelo mediante el cual, con base en las características de las regiones 5'UTRs de los mRNAs estudiados, podría regularse diferencialmente su traducción mediante la vía transduccional PI3K-TOR y/o la formación de complejos miRNA-10a-mRNA (ver también figuras 5.1 y 5.2).

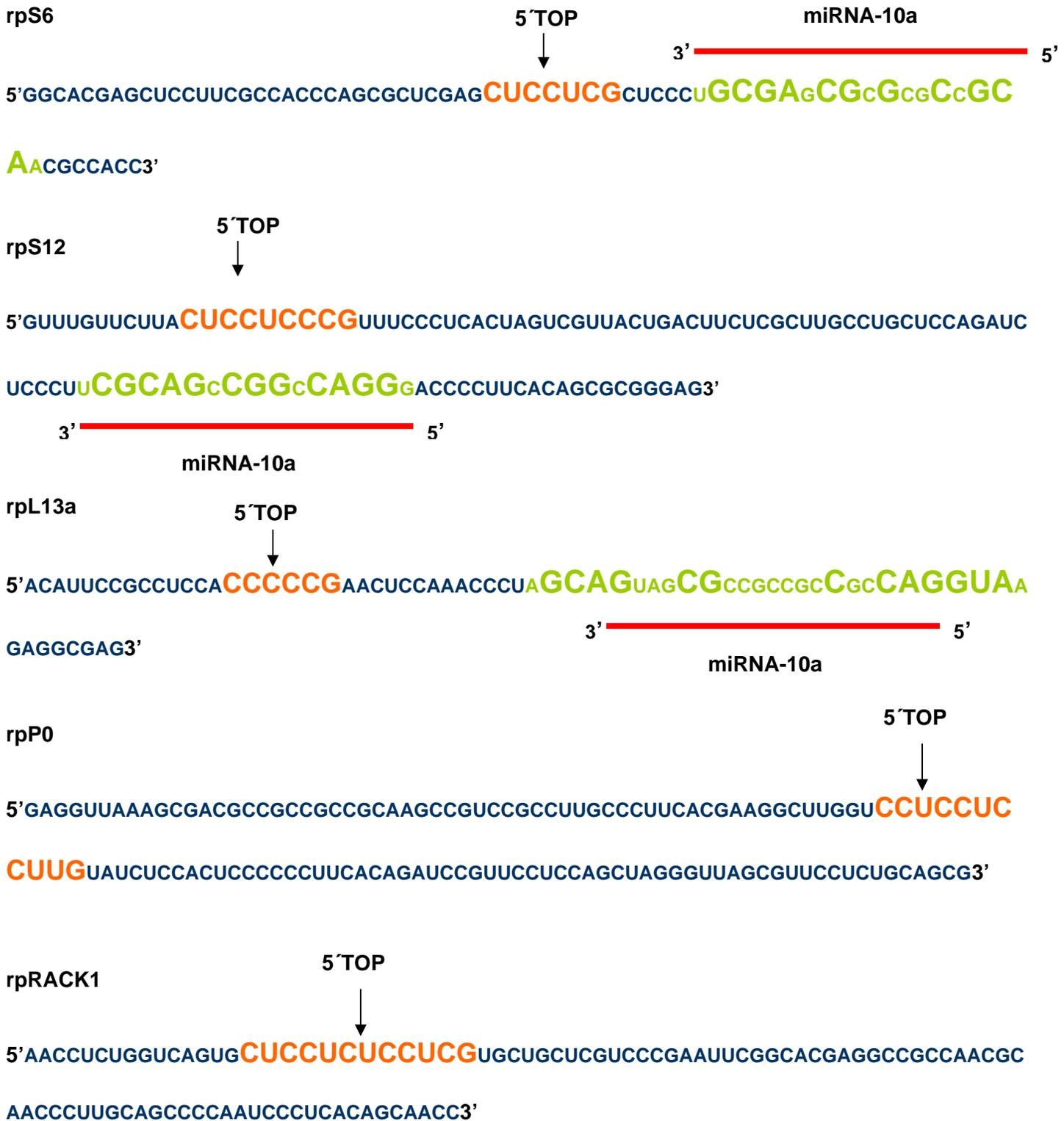


Figura 5.3. Modelo sugerido de regulación selectiva a nivel traduccional de los mRNAs estudiados mediante la vía PI3K-TOR y/o la formación de complejos miRNA-10a-mRNA.

De acuerdo al análisis de las secuencias de las regiones 5'UTRs, observamos primero que el tamaño y la composición nucleotídica de los motivos 5'TOP localizados en cada mensajero es variable. Por ejemplo, tenemos que los motivos 5'TOP de S6, S12 y L13a son de menor tamaño con respecto a los presentes en los mRNAs de P0 y RACK1. Al parecer la estabilidad de los complejos formados entre el miRNA-10a y los mRNAs de S6 y S12 es mayor en comparación a los otros mensajeros estudiados. Es probable que la formación de complejos miRNA-10-mRNA no regule a nivel traduccional la expresión de P0 y RACK1, debido a que la interacción es energéticamente poco probable.

X. CONCLUSIONES

De acuerdo al análisis del nivel de expresión durante la germinación, observamos que los mRNAs de las PREEs tienen un patrón de expresión similar a lo largo de la germinación y por lo tanto podemos afirmar que existe una regulación transcripcional similar para ambas PREEs (S6 Y S12).

Por el contrario, con respecto a las PRDs, observamos un patrón de expresión durante la germinación similar para los mRNAs de P0 y L13a, el cual difiere al descrito para las PREEs, por lo tanto concluimos que la regulación a nivel transcripcional, al menos durante la germinación, es diferencial en relación a las PREEs. Así mismo para el mRNA de RACK1, observamos que su patrón de expresión a lo largo de la germinación es parecido al mostrado por los mRNAs de las PRDs, pero no igual, lo cual nos hace pensar que la regulación de su expresión a nivel transcripcional podría no ser la misma que el resto de los mRNAs estudiados.

En relación a la regulación por la vía transduccional PI3K-TOR, concluimos que puede ser selectiva ya que las características de las señales 5'TOP presentan diferencias entre ambos grupos de mensajeros. El tamaño y la composición nucleotídica de los motivos 5'TOP localizados en cada mensajero es variable.

De acuerdo al mapeo de sitios de unión al miRNA-10a, podemos sugerir que en maíz existen mecanismos similares de regulación traduccional mediado por un miRNA como sucede en mamíferos.

En relación a una regulación modulada por ambas señales (TOP y afinidad al miRNA-10), tanto la vía PI3K-TOR como la formación de complejos miRNA-mRNA son mecanismos que al parecer actúan sinérgicamente en la regulación de la expresión de los mRNAs de S6, S12 y L13a. Sin embargo, es probable que la formación de complejos miRNA-10-mRNA no regule a nivel traduccional la expresión de los mRNAs de P0 y RACK1, debido a que la interacción es energéticamente poco probable, y sean solo las señales TOP la única vía que regule su expresión mediante la ruta PI3K-TOR.

XI. BIBLIOGRAFÍA

Balendran, A., R. M. Biondi, P. C. Cheung, A. Casamayor, M. Deak, and D. R. Alessi. 2000. A 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) docking site is required for the phosphorylation of protein kinase C ζ (PKC ζ) and PKC-related kinase 2 by PDK1. *J. Biol. Chem.* 275: 20806–20813.

Bewley, J. D. and Black, M. (1994) *Physiology of development and germination. In Seeds.* Bewley JD, Black M, eds. Second Edition, Plenum Press, New York and London, pp 147-148.

Beltrán-Peña E., Ortíz-López A., Sánchez de Jiménez E. (1995). Synthesis of ribosomal proteins from stored mRNAs early in seed germination. *Plant Mol. Biol.* 28:327-36

Butler, A.A., Blakesley, V.A., Poulakis, V., Tsokos, M., Wood, T.L., LeRoit, D., and Poulakis, V. (1998) Stimulation of tumor growth by recombinant human insulin growth factor 1 (IGF-I) is dependent on the dose and the level of IGF-I receptor expression, *Cancer Res.* 58,3021-3027.

Carrera, A. (2004) TOR signaling in mammals, *Journal of Cell Science* 117, 4615-4616

Chaudhuri, S., Vyas, K., Kapasi, P., Komar, A.A. Dinman, J. D., Barik, S., and Mazumder, B. (2007) Human ribosomal protein L13a is dispensable for canonical

ribosome function but indispensable for efficient rRNA methylation, *RNA Journal* 13: 2224-2237.

Clemens, M.J., and Bommer, V.-A. (1999) Translational control: the cancer connection, *Int. J Biochem. Cell Bio/.* 31, 1-23.

Dommes, J., and Van de Walle, C. (1990) Polysome formation and incorporation of new ribosomes into polysomes during germination of embryonic axes of maize, *Physiol. Plant.* 79, 289-296.

García, F., Aguilar, R., Reyes de la Cruz, H., Albores, M., and Sánchez de J., E. (2001) A maize insulin-like growth factor signals to a transduction pathway that regulates protein synthesis in maize. *Biochem. J.* 358, 95-100.

Gingras, A.C., Raught, B., Gygi, S.P., Niedzwiecka, A., Miron, M., Burley, S.K., Polakiewicz, R.D., Wyslouch-Cieszynska, A., Aebersold, R., and Sonenberg, N. (2001). Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes & Dev.* 15, 2852–2864.

Gingras, A. C., Raught, B. and Sonenberg, N. (2004). mTOR signaling to translation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 279, 169-197.

Gosert, R., Chang, K.H., Rijnbrand, R., Yi, M., Sangar, D.V., and Lemon, S.M. (2000) Transient expression of cellular polypyrimidine-tract binding protein stimulates cap-

independent translation directed by both picomaviral and flaviviral internal ribosome entry sites in vivo, *Mol. Cell. Biol.* 20, 1583-1595.

Grolleau, A., Browman, J., Pradet-Balades, B., Puravs, E., Hanash, S., García-Sanz, J. A. y Berretta, L., (2002) Global and specific translational control by rapamycin in T cells uncovered by microarrays and proteomics, *J. Biol. Chem.* 277, 22175-22184

Grosso, S., Volta, V., Sala, L.A., Vietri, M., Marchisio, P.C., Ron, D., Biffo, S., (2008) PKC β modulates translation independently from mTOR and through RACK1, *Biochem. J.* 415, 77-85

Hellen, C.V., and Samow, P. (2001) Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules, *Genes Dev.* 15, 1593-1612.

Henis-Korenblit, S., Shani, G., Sines, T., Marras, L., Shohat, G., Kimchi, A. (2002) The caspase-cleaved DAP5 protein supports internal ribosome entry site-mediated translation of death proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 5400-5405.

Henras, A.K., Soudet, J., G erus, M., Lebaron, S., Caizergues-Ferrer, M., Mouglin, A., Henry, Y. (2008) The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis, *Cell. Mol. Life Sci.* Publicado en red antes de su impresión.

Hernández-Sánchez, C., Mansilla, A., de la Rosa, E.J., Pollerberg, G.E., Martínez-Salas, E., and de Pablo, F. (2003) Upstream AVGs in embryonic proinsulin mRNA control its low translation level, *EMBO J.* 22, 5582-5592.

Hahara, Y., Umeda, M., Hara, C., Toriyama, K., y Uchimiya, H. (1994) Nucleotide Sequence of a Rice Acidic Ribosomal Phosphoprotein P0 cDNA', *Plant Physiol.* 105, 753-754.

Hill, W. W., Dahlberg A., Garret, B. P., Moore, D. Schlessinger y Warner, J. R. (1990) Ed. *The ribosome. Structure, Function and Evolution.* Am Soc. for Microbiol. Washington DC 678 p ISBN 1-55581-020-9

Imai, Y., and Clemmons, D.R. (1999) Role of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways in stimulation of vascular smooth muscle cell migration and desoxiribonucleic acid synthesis by insulin growth factor 1, *Endocrinology* 140, 4228-4235.

Jefferies, H., Fumagalli, S., Dennis, P., Reinhard, C., Pearson, R. and Thomas, G. (1997) Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70S6k. *EMBO J.* 16, 3693-3704

Kapasi, P., Chaudhuri, S., Vyas, K., Baus, D., Komar, A. A., Fox, P. L., Merrik, W. C. y Mazumder, B., (2007) L13a blocks 48 s assembly: Role of a general initiation factor in mRNA-specific translational control, *Mol. Cell* 25, 113-126

Kobayashi, N., Saeki, K., Yuo, A. (2003) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 induce cell cycle progression through the synthesis of c-Myc protein by internal ribosome entry site-mediated translation via phosphatidylinositol 3-kinase pathway in human factor-dependent leukemic cells. *Blood* 102, 3186-3195.

Kozak, M. (1999) Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes, *Gene* 234, 187-208.

Kozma, S.C., and Thomas, G. (2002) Regulation of cell size in growth, development and human disease: PI3K, PKB and S6K, *Bioessays* 24,65-71.

Lockhart, D. J., and Winzeler, E. A. (2000) Genomics, gene expression and DNA arrays, *Nature* 405, 827–836

Loreni, F., Iadevaia, V., Tino, E., Caldarola, S. y Amaldi, F., (2005) RACK1 mRNA translation is regulated via a rapamycin-sensitive pathway and coordinated with ribosomal proteins, *FEBS Letters*. 579, 5517-5520

Mamane, Y., Petroulakis, E., Martineau, Y., Sato, T-A., Larsson, O., Sonenberg, N., et al (2007) Epigenetic Activation of a Subset of mRNAs by eIF4E Explains Its Effects on Cell Proliferation. *PLoS ONE* 2(2): e242.

Mathews, M.B., Sonenberg, N., and Hershey, J.W.B. (2000) Origin and principles of translational control. In *Translational Control of Gene Expression.*, Hershey JWB, Mathews MB, eds. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 1-32.

Mazumder, B., Seshadri, V., Fox, P.L. (2003) Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means, *Trends Biochem. Sci.* 28, 91-8.

Meyuhas, O. (2000) Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level, *Eur. J. Biochem.* 267, 6321-6330.

Moore, M., J. (2005) From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs, *Science*, 309, 1514–1518

Muñoz, V. (2002) “Caracterización del grado de fosforilación de las proteínas ribosomales ácidas P1 y P2 de ejes embrionarios de maíz” Tesis de licenciatura (Química de Alimentos). Facultad de Química. UNAM

Nilsson, J., Sengupta, J., Frank, J., and Nissen, P. (2004) Regulation of eukaryotic translation by the RACK protein: a platform for signaling molecules on the ribosome, *Review, EMBO reports*, 12, 1137-1141

Ørom, U., Nielsen, F., Lund A. (2008) MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell.* 30, 460-71

Pain, V.M. (1996) Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells, *Eur. J. Biochem.* 236, 747-771.

Peruzzi, F., Prisco, M., Drews, M., Salmoni, P., Grassili, E., Romano, G., Calabretta, B., and Baserga, R. (1999) Multiple pathways on the insulin growth factor receptor in protection from apoptosis, *Mol. Cell. Biol.* 19, 7203-7215.

Pestova, T.V., and Rellen, C. (2000) The structure and function of initiation factors in eukaryotic protein synthesis, *Cell. Mol. Life Sci.* 57,651-6741

Pierrat, O.A., Mikitova, V., Bush, M.S., Browning, K.S., Doonan, J.H. (2007) Control of protein translation by phosphorylation of the mRNA 5'-cap-binding complex, *Biochem. Soc. Trans.* 35:1634-1637

Prendergast, C.G. (2003) Signal transduction: Putting translation before transcription, *Cancer Cell* 4, 244-245.

Proud, C.G. (2002) Regulation of mammalian translation factors by nutrients, *Eur. J. Biochem.* 269, 5338-5349.

Raught, B., Gingras, A. C. and Sonenberg, N. (2000) Regulation of ribosomal recruitment in eukaryotes. In *Translational Control of Gene Expression* (Hershey, J. W.

B., Mathews, M. B. and Sonenberg, N., eds.), pp. 245-293, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY

Reyes de la Cruz H, Aguilar R, Sánchez de Jiménez E. (2004) Functional characterization of a maize ribosomal S6 protein kinase (ZmS6K), a plant ortholog of metazoan p70(S6K), *Biochemistry J* 43(2):533-9.

Rhoads, R.E. (1999). Signal transduction pathways that regulates eukaryotic protein synthesis, *J. Biol. Chem.* 274,30337-30340.

Rutter, J., Probst, B.L., and McKnight, S.L. (2002) Coordinate regulation of sugar flux and translation by PAS kinase, *Cell* 111, 17-28.

Ruvinsky I., Meyuhas O. (2006) Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends Biochem Sci.* (6):342-8

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

Sánchez-Martínez, D., Puigdomenech, P., and Pagés, M. (1986) Regulation of gene expression in developing *Zea mays* embryos. Protein synthesis during embryogenesis and early germination in maize, *Plant Physiol.* 82,543-549.

Shah, O.J., Anthony, J.C., Kimball, S.R., and Jefferson, L.S. (2000) 4E-BP1 and S6K1: translational integration sites for nutritional and hormonal information in muscle, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 279:715-729.

Sharma D., Cukras A.,R., Rogers E.,J., Southworth D.,R., Green R. (2007) Mutational analysis of S12 protein and implications for the accuracy of decoding by the ribosome, *J. Mol. Biol.* 374(4):1065-76

Shyu, A., B., Wilkinson, M., F., van Hoof, A. (2008) Messenger RNA regulation: to translate or to degrade, *EMBO J.* 27(3):471-481.

Stocker, H., and Hafen, E. (2000) Genetic control of cell size. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 529-535.

Stolovich, M. et al. (2002) Transduction of growth or mitogenic signals into translational activation of TOP mRNAs is fully reliant on the PI3-kinase-mediated pathway, but requires neither S6K1 nor rpS6 phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 22, 8101–8113

Tang, H. et al. (2001) Amino acid-induced translation of TOP mRNAs is fully dependent on PI3-kinase-mediated signaling, is partially inhibited by rapamycin, and is independent of S6K1 and rpS6 phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 21, 8671–8683

Ueki, K., Yballe, C.M., Brachmann, S.M., Vicent, D., Watt, 1.M., Kahn, C.R., Cantley, L.E. (2002) Increased insulin sensitivity in mice lacking p85 beta subunit of phosphoinositide 3-kinase, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99,419-424.

Ullrich, A., and Schlessinger, J. (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity, Cell 61, 203-212.

Wang, A.M., Doyle, M.V. and Mark, D.F. (1989) Quantitation of mRNA by the Polymerase Chain Reaction, Proc Natl Acad Sci USA 86:9717-9721, 1989.

Wang, X., Li, W., Parra, J.L., Beugnet, A., and Proud, C.G. (2003). The C terminus of initiation factor 4E-binding protein 1 contains multiple regulatory features that influence its function and phosphorylation. Mol. Cell. Biol. 23: 1546–1557.

Warner, J. R. (1999) The economics of ribosomal biosynthesis in yeast, Trends Biochem. Sci. 24,437-440

Williams A. J., Werner-Fraczek J., Chang I., Bailey-Serres J. (2003) Regulated phosphorylation of 40S ribosomal protein S6 in root tips of maize. Plant Physiol. 132(4):2086-97