



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO

EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

CONTROL TRADUCCIONAL DE mRNAs DE  
PROTEÍNAS RIBOSOMALES DURANTE LA  
GERMINACIÓN DE MAÍZ (*Zea mays* L.)

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :  
**MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**

**P R E S E N T A :**

**EDER ALBERTO MANCERA MARTÍNEZ**

Tutor: DRA. Estela Sánchez Quintanar de Jiménez



MÉXICO, D. F.

Abril 2011



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.

# CONTROL TRADUCCIONAL DE mRNAs DE PROTEÍNAS RIBOSOMALES DURANTE LA GERMINACIÓN DE MAÍZ (*Zea mays* L.)

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Estela Sánchez Quintanar de Jiménez en el laboratorio de Control Traduccional de Plantas, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutoral que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Estela Sánchez Quintanar De Jiménez	Facultad de Química
Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles	Instituto de Biotecnología
Dra. Ma. Imelda López Villaseñor	Instituto de Investigaciones Biomédicas

Se reconoce la colaboración del Dr. Gerardo Jiménez Sánchez, la M. en C. Laura Uribe y la Dra. Claudia Rangel, del Instituto Nacional de Medicina Genómica, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los análisis de microarreglos. También se reconoce la colaboración del M. en C. Raúl Aguilar Caballero y el Dr. Alberto Donayre, en la realización de los análisis de dot blot y bioinformáticos respectivamente.

Se reconoce la asesoría de los Drs. Fulgencio Espejel Carrasco y Carolina Peña-Montes en los análisis por qRT-PCR, así como a los Drs. León Martínez-Castilla y Alberto Donayre en los análisis bioinformáticos.

El proyecto fue apoyado por la Dirección General de Apoyo Académico (DGAPA, UNAM), con el registro del proyecto IN212910. Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT (265055) para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día..... ( POR DEFINIR )

El Jurado de Examen de Grado estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Alejandra Covarrubias Robles	Instituto de Biotecnología
Vocal	Dra. Gladys Ileana Cassab López	Instituto de Biotecnología
Secretario	Dr. José Luis Reyes Taboada	Instituto de Biotecnología
Suplente	Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova	Facultad de Química
Suplente	Dra. Herminia Loza Tavera	Facultad de Química

**DEDICADO:**

*A mis padres Martha Laura y Rosendo (mimo y chif, los chefsitos); un infinito gracias por todo su amor, por todo su cariño y por todo su esfuerzo, los amo. A mi hermano Fernando Evair (beibi), te quiero mucho, gracias a ti también por todos esos juegos que hemos compartido.*

*También a mis abuelitas Conchita y Martha (se que desde aquella estrella nos bendices).*

*A Marie Andrée, gracias por tu amor y tu compañía durante estos 38 mesecitos (sí, chiquititos!). Eres el amor de mi vida*

**ESTO ES UN PRESENTE PARA Y POR USTEDES, SON LO MEJOR DE MI VIDA, JAMÁS OLVIDARÉ  
TODO SU AMOR Y TODA SU ENSEÑANZA.**

**AGRADECIMIENTO:**

*A la Dra. Estela Sánchez y al M. en C. Raúl Aguilar, por abrirme las puertas de su laboratorio y por echar a andar mi carrera en esto tan apasionante que es la ciencia. También a mi amiga de laboratorio Norma, en verdad muchas gracias por todo tu apoyo.*

## I. ÍNDICE

RECONOCIMIENTOS.....	2
I. ÍNDICE.....	4
II. DEFINICIONES.....	6
III. RESUMEN.....	7
IV. ANTECEDENTES.....	8
Biogénesis de ribosomas.....	8
Importancia de la regulación de la síntesis de proteínas-(r) durante la germinación de maíz.....	9
Regulación traduccional selectiva de mRNAs con motivos 5'-TOP.....	10
Ruta de señalización selectiva inducida por insulina e IGFS que incide en el control traduccional de mRNAs con motivos 5'-TOP.....	11
La ruta PI3K-TOR esta conservada en plantas.....	16
V. HIPÓTESIS.....	22
VI. OBJETIVOS.....	23
Objetivo general.....	23
Objetivos particulares.....	23
VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	24
VIII. METODOLOGÍA.....	26
Preparación del material biológico (Sánchez de Jiménez & Aguilar, 1984).....	26
Marcaje <i>in vivo</i> de proteínas ribosomales y citoplásmicas.....	26
Inmunodetección del ZmIGF (Dot blot).....	27
Extracción de RNA total (Chomczynski y Sacchi, 1987).....	27
Extracción de RNA polisomal (Arava, 2003).....	28
Análisis por microarreglos (Lockhart y Winzeler, 2000).....	30
Tratamiento y análisis de datos de microarreglos (Smyth, 2005).....	31
Análisis por RT-PCR cuantitativo de los niveles de transcrito de proteínas-(r).....	32

Análisis de motivos en las 5'-UTRs de los mRNAs de proteínas-(r).....	33
IX. RESULTADOS .....	34
Extracción de RNA total de EEMs .....	34
Extracción de RNA polisomal de EEMS .....	35
Recopilación de las secuencias de mRNAs de proteínas-(r) y asignación en la base de datos de Affymetrix™.....	36
Control traduccional de la expresión de proteínas-[r] en la germinación de maíz .....	38
Control traduccional de la expresión de genes asociados al control del ciclo celular en la germinación de maíz.....	46
Validación de datos de microarreglos por qRT-PCR .....	47
Análisis bioinformático de las secuencias 5'UTR de proteínas-(r) .....	49
X. DISCUSIÓN .....	52
XI. CONCLUSIONES GENERALES .....	57
XII. TABLAS Y FIGURAS SUPLEMENTARIAS .....	58
XIII. AGRADECIMIENTOS.....	61
XIV. BIBLIOGRAFÍA.....	61

## II. DEFINICIONES

**24 h-EEMs.** Ejes embrionarios de maíz germinados por 24 h

**5'-TOP.** 5' Tract of oligopyrimidine

**5'UTR.** 5' Untranslated region

**EEMs.** Ejes embrionarios de maíz

**IGFs.** Factores de crecimiento similares a insulina

**mRNA.** RNA mensajero (transcrito)

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

**proteínas-(r).** Proteínas ribosomales

### III. RESUMEN

La germinación es un período de desarrollo crítico para la propagación de la planta. Estudios previos han indicado que, durante la germinación, las proteínas-ribosomales (r) son producidas *de novo*, debido a que la biogénesis de ribosomas es vital para satisfacer la síntesis de proteínas durante esta etapa de crecimiento acelerado. En consecuencia, teniendo en cuenta que la expresión de los genes de proteínas-(r) constituye una plataforma principal para el crecimiento y el desarrollo, la presente investigación se llevó a cabo para obtener una visión global de la regulación de la expresión de estos genes durante la germinación, un período relevante para el desarrollo de maíz. En este contexto, los ejes embrionarios de maíz (EEMs) de semillas quiescentes contienen una gran cantidad de mRNAs almacenados, dentro de los cuales los mRNAs que codifican proteínas-(r) son los más abundantes. De manera interesante, la gran mayoría de los mRNAs de proteínas-(r) requeridos para la formación de nuevos ribosomas, en este período de crecimiento rápido, mantienen sus niveles estables a lo largo de la germinación, lo que sugiere que la expresión de sus genes no está regulada principalmente a nivel transcripcional durante este período de desarrollo. En consecuencia, para confirmar esta propuesta, se desarrollaron análisis de microarreglos comparativos a partir de muestras de RNA total y polisomal de EEMs de 24 h de germinación. Para algunos experimentos, el proceso de germinación fue acelerado mediante la adición de insulina (equivalente al factor de crecimiento endógeno). Los resultados revelaron que los mRNAs de proteínas-(r) se acumulan en gran medida en los polisomas de tejidos estimulados con insulina, indicando la presencia de un mecanismo de control traduccional asociado al incremento de la síntesis de proteínas-(r) observado en este período. Estos resultados fueron validados por la determinación de los niveles de transcrito de algunos genes candidatos por qRT-PCR. Además, análisis bioinformáticos realizados con las secuencias de los mRNAs para proteínas-(r) de maíz y arroz, mostraron secuencias similares a las 5'TOP comúnmente presentes en los 5'UTRs de mRNAs sobre-regulados. Estos datos proporcionan un mayor apoyo a la propuesta de que en maíz existe un mecanismo de control traduccional que podría regular de forma específica la expresión de mRNAs de proteínas-(r) mediante la movilización selectiva de estos mRNAs a polisomas para su traducción.

## IV. ANTECEDENTES

### Biogénesis de ribosomas

Una de las tareas más importantes de cualquier célula es la biogénesis de ribosomas. En células eucarióticas, este proceso 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-(r) traducidas a partir de mRNAs sintetizados por la RNA polimerasa II (Larson *et al.*, 1991; Henras, 2008).

En eucariontes, el proceso de biogénesis de ribosomas ocurre secuencialmente en el nucléolo, el nucleoplasma y el citoplasma. Dicho proceso involucra la síntesis de proteínas-(r), la transcripción y el procesamiento de RNAs pre-ribosomales, su correcto plegamiento y acoplamiento con las proteínas-(r) y el transporte de las partículas pre-ribosomales resultantes hacia el citoplasma donde ocurren los eventos finales de maduración. Además de las proteínas-(r) y de los componentes ribonucleicos que constituyen a los ribosomas citoplasmáticos maduros, este intrincado proceso requiere la intervención de RNPs, las cuales interactúan de manera trascendente con las partículas pre-ribosomales en distintas etapas de la maduración (Henras *et al.*, 2008).

## **Importancia de la regulación de la síntesis de proteínas-(r) durante la germinación de maíz**

Particularmente, la síntesis de proteínas-(r) 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.

La biogénesis de ribosomas 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; Henras, 2008). 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. En el caso de plantas, la síntesis de proteínas y por lo tanto de ribosomas es vital durante la germinación, un período de crecimiento rápido

Debido al alto costo que involucra la biogénesis de ribosomas, la síntesis de RNAs ribosomales y de proteínas-(r) está altamente regulada (Schmidt, 1999; Warner, 1999). Por lo tanto, la célula debe responder de manera rápida a los estímulos de crecimiento extra e intracelulares, y en consecuencia estas señales deben ser transmitidas a fin de regular la producción de ribosomas.

En células de eucariontes, la tasa de traducción de mRNAs es controlada por señales de

crecimiento y, últimamente, la atención se ha centrado en determinar cuáles son las vías de transducción de señales que están implicadas en este proceso (Hamilton, 2006). En este caso, la síntesis de proteínas-(r) en particular, depende principalmente de los mecanismos de control traduccional que regulan de manera coordinada la biosíntesis de ribosomas (Hamilton, 2006).

### **Regulación traduccional selectiva de mRNAs con motivos 5'-TOP**

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-(r) y para algunos factores de traducción exhiben una característica estructural definida: un motivo rico en pirimidinas ubicado en seguida de la estructura 5'CAP que se ha definido como un elemento de regulación en *cis* que comienza con una citosina seguida por 4 a 15 bases de pirimidinas y un motivo rico en GC. Este motivo de nucleótidos, designado TOP (del inglés, tract of oligopyrimidine) (Meyuhas, 2000), confiere cierta selectividad traduccional a los mensajes que es inducida por un rango de estímulos metabólicos y/o nutricionales (Meyuhas, 2000; Proud, 2002; Hamilton, 2006). La síntesis de estas proteínas es delicadamente sensible a la tasa de crecimiento de la célula (Hamilton, 2006), de tal manera que una disminución en los niveles de crecimiento celular y/o de nutrimentos resulta en la inhibición de la traducción de mRNAs 5'-TOP., Este efecto puede ser observado experimentalmente por la movilización de los mRNAs desde la fracción polisomal (traducción activa) en células en condiciones de crecimiento, hacia las fracciones sub-polisomales (población sin traducirse) en células en condiciones con inhibición del crecimiento (Hamilton, 2006). Los mRNAs 5'-TOP aparentemente existen en dos

estados: el estado reprimido y el estado activo. En células en crecimiento, la porción de mRNAs 5'-TOP presentan un incremento en el estado activo y estos mRNAs son traducidos con una eficiencia máxima (Hamilton, 2006). Así pues, el motivo 5'-TOP confiere un mecanismo de control traduccional dependiente de las condiciones nutrimentales y de crecimiento el cual se relaciona directamente con la expresión coordinada de las proteínas que se requieren para la biogénesis de ribosomas (Hamilton, 2006).

### **Ruta de señalización selectiva inducida por insulina e IGFS que incide en el control traduccional de mRNAs con motivos 5'-TOP**

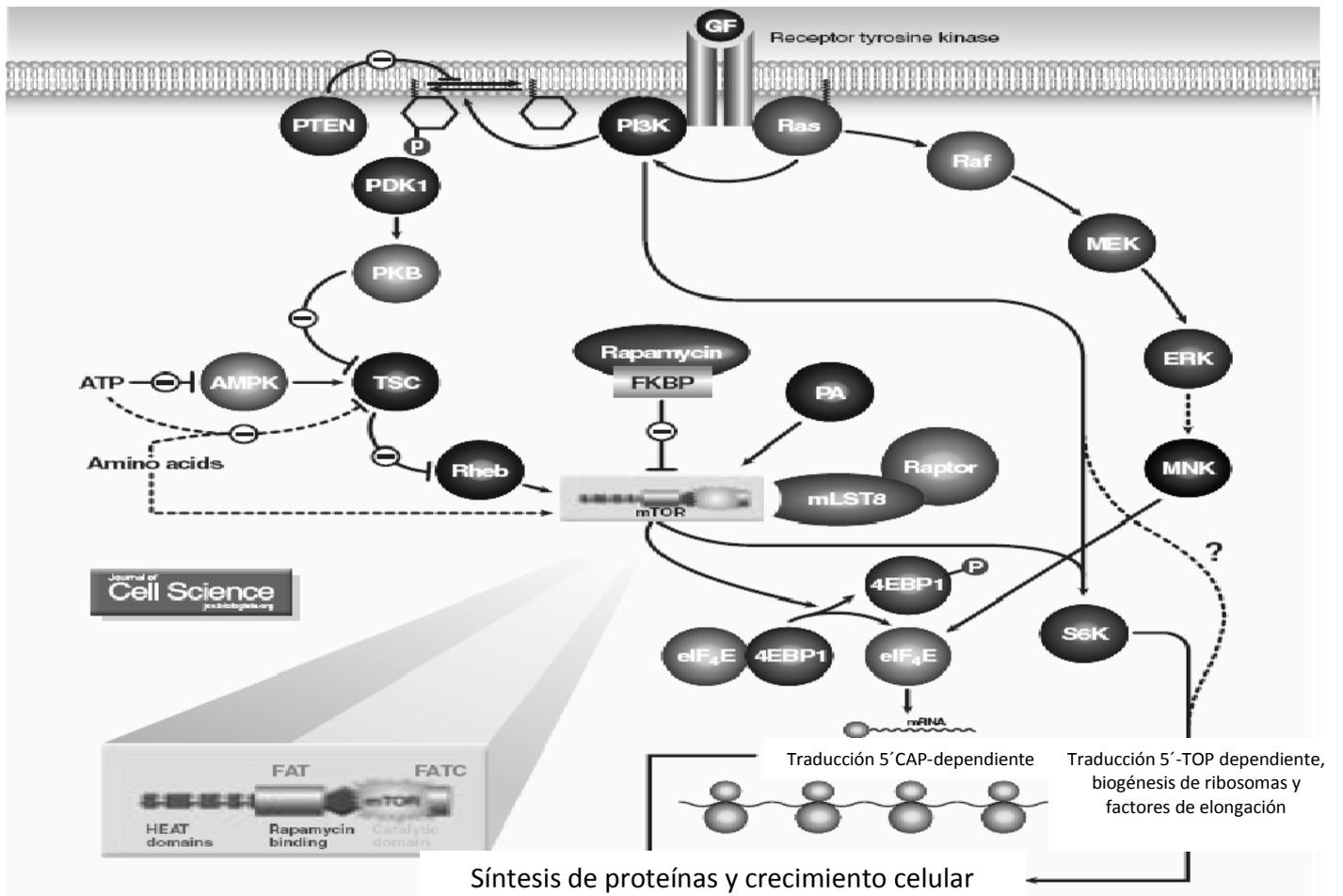
El mecanismo más estudiado de regulación traduccional dependiente de las condiciones nutrimentales y de crecimiento, está relacionado particularmente con la vía de señalización PI3K-TOR a la cual se asocian los efectos metabólicos de la insulina y de los IGFS. Estos efectores controlan procesos como el crecimiento celular, el incremento en la síntesis de proteínas y la traducción selectiva de mRNAs que codifican proteínas del aparato traduccional (Proteínas-(r), eIFs y eEFs) (Leever *et al.*, 2004; Fingar *et al.*, 2004; Hay y Sonenberg, 2008). En mamíferos, se ha reportado que esta selectividad traduccional de los mRNAs de proteínas-(r) ocurre a nivel de la región 5'UTR, ya que la mayoría de éstos exhiben en esta región motivos 5'-TOP. Si bien podrían existir otras vías de señalización que pudieran interconectar las condiciones metabólicas y fisiológicas nutrimentales o de crecimiento con el control traduccional de este tipo de mRNAs, actualmente se ha sugerido que solo la vía PI3K-TOR es la responsable de regular y dirigir este mecanismo al menos en eucariotas no-fotosintéticos.

Sorprendentemente, reportes previos han demostrado que la insulina y los IGFs también son capaces de estimular el crecimiento germinativo en diversas especies de plantas, incluyendo maíz, sorgo, melón, girasol, pepino, frijol y soya (Goodman y Davis, 1993; García-Flores *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2004). Adicionalmente, se ha observado un incremento en la síntesis de proteínas-(r) en semillas de maíz al germinar en presencia de insulina o del IGF endógeno de maíz (ZmIGF) (García-Flores *et al.*, 2001; Rodríguez-López *et al.*, 2011), a través de un mecanismo altamente conservado (Reyes de la Cruz *et al.*, 2004; Agredano *et al.*, 2007), similar al reportado para la mayoría de eucariontes no-fotosintéticos (Kozma *et al.*, 2002; Ruvinsky and Meyuhas, 2006; Markou *et al.*, 2010).

Los receptores para la insulina y los IGFs, inductores de esta vía, 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, lo que induce 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).

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 1 se presenta un modelo genérico que 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 al modular 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 media 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 proteína-(r) S6 ubicada en la subunidad 40S. Algunos efectores negativos pueden actuar en esta cascada de transducción de señales como son: la fosfatasa 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).

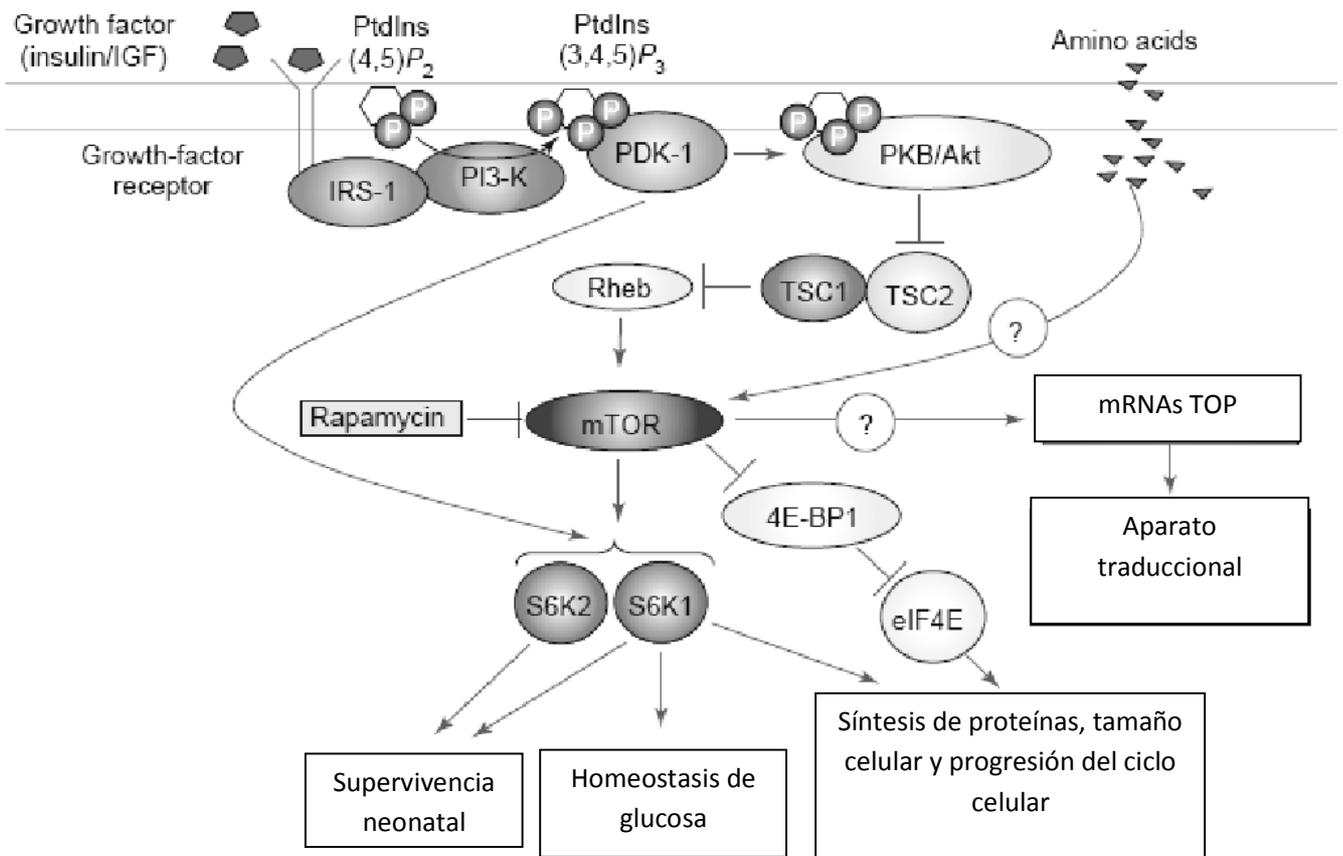


**Figura 1.** Ruta de señalización de TOR en mamíferos, modelo genérico tomado y adaptado de Carrera, 2004.

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 había sido ampliamente aceptado y es frecuentemente citado como el mecanismo mediante el cual S6K manifiesta su función biológica; sin embargo, estudios bioquímicos y genéticos posteriores 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; o bien, existe una cinasa de S6 aún no descrita (Ruvinsky y Meyuhas, 2006). Un mecanismo alternativo, podría asociarse a la presencia de múltiples parálogos de la proteína S6 en varios eucariontes, los cuales presentan sitios no redundantes de fosforilación alternativa. En plantas, la fosforilación de la proteína S6 es programada de acuerdo al desarrollo y está regulada por temperatura, concentración de oxígeno y otras condiciones de crecimiento (Scharf and Nover, 1982; Perez *et al.*, 1990; Turck *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 2003). Sin embargo, esta asociación queda por elucidarse. En conjunto, estos estudios no afirman ni descartan la hipótesis de que la forma fosforilada de rpS6 y/o las S6Ks son elementos necesarios para la regulación de la traducción de los mRNAs TOP, dejando abierta la posibilidad de que otros sustratos de la cinasa mTORC1 podrían ser responsables de esta actividad. Lo extensamente demostrado hasta el momento es que la regulación traduccional de los mRNAs TOP está asociada a la vía de PI3K y PKB, la cual involucra a mTOR (Stolovich *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2001) (Figura 2).



**Figura 2.** Ruta de señalización PI3K-mTOR, modelo genérico tomado de Ruvinsky y Meyuhas (2006).

### La ruta PI3K-TOR esta conservada en plantas.

Es sabido que la mayoría de eucariontes regulan su crecimiento a través de la vía de señalización PI3K-TOR, movilizandose selectivamente los mRNAs de proteínas-(r) hacia polisomas para ser traducidos y llevar a cabo la síntesis de proteínas-(r) (Grolleau et al., 2002; Hamilton et al., 2006; Markou et al., 2010). Esta vía de señalización es activada por insulina o por los miembros de la familia de los factores similares a insulina (IGFs) en todos los eucariontes, desde

levaduras hasta mamíferos (Leevers et al., 2004; Fingar et al., 2004), incluyendo plantas (Robaglia et al., 2004; Reyes de la Cruz et al., 2004).

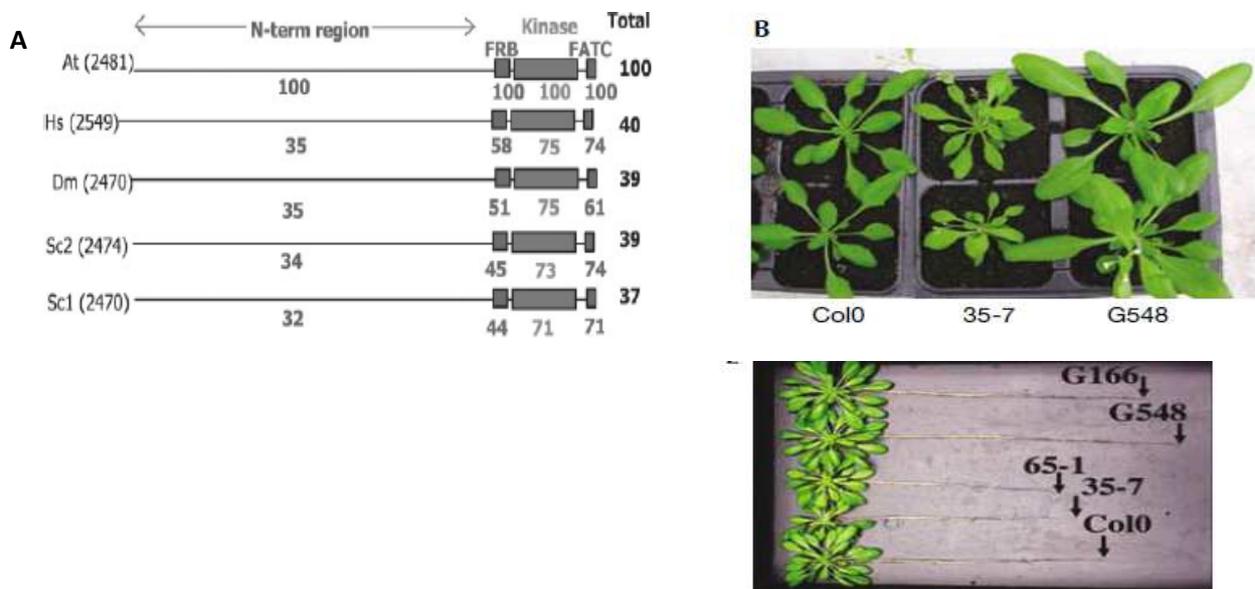
En los últimos años y de forma paulatina, han surgido un gran número de reportes en la literatura científica que ponen de manifiesto la existencia en plantas de proteínas con función, localización y secuencia altamente similares a proteínas asociadas a las vías de señalización de la insulina y de los IGFs de eucariontes no-fotosintéticos (Tabla 1; Oliveira *et al.*, 2004).

**Tabla 1.** Lista de proteínas que están asociadas a las vías de señalización de insulina o IGFs, que se encuentran tanto en vertebrados como plantas.

Proteínas	Animales	Plantas	Referencias
Insulina	+	+	Oliveira <i>et al.</i> , 1999
Substratos receptores de insulina, proteínas	+	+	Carpi <i>et al.</i> , 2002
IRS-1 e IRS-2	+	+	Dietrich <i>et al.</i> , 1997
Transportador de glucosa	+	+	Chiou <i>et al.</i> , 1996
PI3K	+	+	Hong <i>et al.</i> , 1994 Bovet <i>et al.</i> , 2001
Hexocinasa	+	+	Moore <i>et al.</i> , 2003
Vía de MAPK	+	+	Agrawal <i>et al.</i> , 2003
TOR (Target of rapamycin)	+	+	Menand <i>et al.</i> , 2002
Cinasa de la proteína ribosomal S6	+	+	García-Flores <i>et al.</i> , 2001

Reportes del grupo de Robaglia y colaboradores (2000-2010) han demostrado en *Arabidopsis* la existencia de un gen que codifica una proteína homóloga a la cinasa TOR de eucariontes superiores no-fotosintéticos (Figura 3A) que se expresa preferencialmente en tejidos sin diferenciar y con altas tasas de crecimiento (Menand *et al.*, 2001). Al caracterizar fenotípicamente plantas transformadas de *Arabidopsis* con iRNA (RNA de interferencia) dirigido a disminuir la expresión de la proteína homóloga TOR, o bien, mutantes de inserción que sobre-

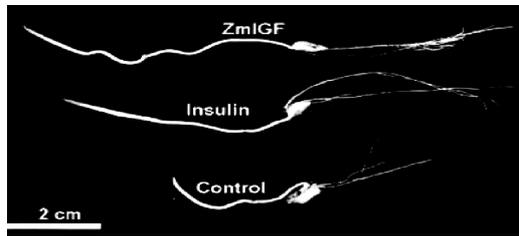
expresan dicha proteína, se observó que un incremento o una disminución en los niveles de expresión de la cinasa AtTOR induce un incremento o disminución, respectivamente, en el tamaño celular y tisular en la plántula (Deprost *et al.*, 2007; Figura 3). Por otro lado, la fuerte disminución de la expresión de la cinasa AtTOR detiene el crecimiento y desarrollo post-germinativo de semillas de Arabidopsis (Deprost *et al.*, 2007; Figura 3B).



**Figura 3. En Arabidopsis existe un gen que es homólogo al gen TOR, que regula el crecimiento y desarrollo post-germinativo. A)** Comparación de la secuencia de la proteína AtTOR con las secuencias de la proteína TOR de otros eucariontes no-fotosintéticos. **B)** Línea control (Col0 wild type), RNAi-silenciadas (35-7 y 65-1; plantas transgénicas que sobreexpresan un constructo de tallo-haza derivado de AtTOR bajo el control del promotor 35S que limita la expresión de AtTOR) y líneas sobreexpresantes que contienen inserciones de promotores fuertes de T-DNA en la región “río arriba” del inicio de la traducción de AtTOR, (Mutantes Gabi G166 y G548; mutantes Salk S7817 y S7846). Tomado de Deprost *et al.*, 2007

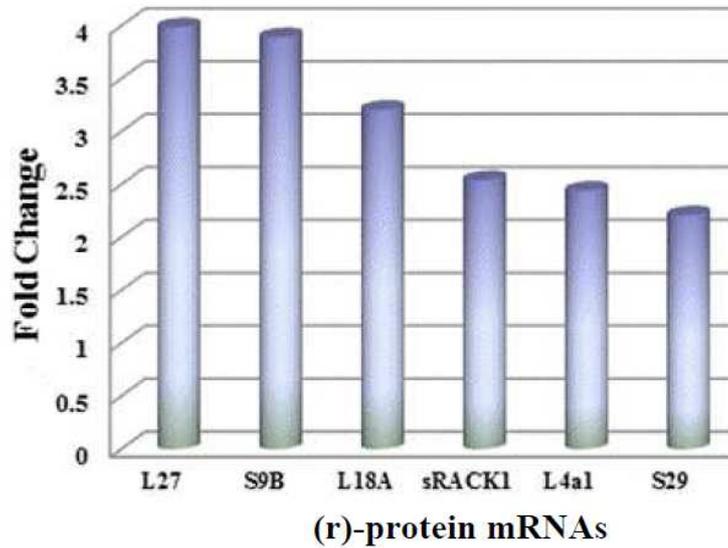
En relación a los efectores de la vía PI3K-TOR, reportes previos han demostrado que la insulina y los IGFs también son capaces de estimular el crecimiento germinativo en diversas especies de

plantas, incluyendo maíz, sorgo, melón, girasol, pepino, frijol y soya (Goodman y Davis, 1993; García-Flores *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2004). Recientemente, en maíz se identificó un IGF denominado ZmIGF que corresponde a un péptido de 5.7 kDa con actividad de IGF. Este péptido presenta una estructura bien definida de  $\alpha$ -hélice, determinada por dicroísmo circular, similar a la ya reportada para la insulina o el IGF-1 (Rodríguez-López *et al.*, 2011). Además, datos no publicados de nuestro laboratorio muestran que el factor ZmIGF es capaz de competir con insulina por los receptores encargados del transporte de glucosa hacia el interior de las células de hígado de rata. A nivel molecular, ZmIGF manifiesta el mismo efecto metabólico y fisiológico que la insulina bovina: incrementa significativamente la velocidad de germinación y de crecimiento (Figura 4), así como la síntesis de proteínas-(r) (García-Flores *et al.*, 2001; Dinkova *et al.*, 2007), lo cual sugiere que la vía de transducción PI3K-mTOR podría estar conservada en maíz. Adicionalmente, la actividad de la ZmS6K incrementa durante la germinación, consistente con un incremento de la fosforilación de su proteína blanco, la proteína-(r) S6, así como con el incremento en la expresión del factor ZmIGF (Dinkova *et al.*, 2007). La adición de insulina o ZmIGF durante la germinación de ejes embrionarios de maíz induce la fosforilación de ZmS6K, incrementando su actividad como cinasa de la proteína-(r) S6. Estos eventos se restringen en presencia de rapamicina, un inhibidor de la vía de señalización PI3K-TOR en eucariotas. La evidencia de estas observaciones demuestra la conservación de una vía de señalización en maíz similar a la descrita en mamíferos.



**Figura 4. Efecto en el crecimiento durante la germinación de ZmIGF e insulina en maíz.** Tomado de García-Flores *et al.*, 2001

En este contexto, en relación a la expresión de proteínas-(r) durante la germinación de maíz, estudios previos han indicado que durante este período, las proteínas-(r) se sintetizan con el fin de satisfacer las necesidades de un crecimiento acelerado, debido a que la biogénesis de ribosomas es vital para este proceso (Beltrán-Peña *et al.*, 1995). Así entonces, como antecedente a esta investigación, se consideró relevante analizar los niveles de transcritos que codifican proteínas-(r) entre 0 y 24 h de germinación. De forma sorprendente, esta comparación reveló que únicamente unos cuantos mRNAs de proteínas-(r) mostraron un incremento en sus niveles entre 0 a 24 h de germinación (Figura 5) (Jiménez-López *et al.*, 2011 [en publicación]). Estos datos indican que en la poza de mRNAs totales a las 24 h de germinación existen niveles de transcritos de proteínas-(r) similares a aquéllos presentes antes de que la germinación inicie, lo cual no explica el incremento en la síntesis de proteínas-(r) observada en este período (Dinkova *et al.*, 2007). Esto sugiere que no existe una sobre-regulación transcripcional relevante de genes que codifican proteínas-(r) que podría explicar el incremento en la síntesis de proteínas-(r) durante la germinación, y que más bien podría basarse principalmente en los mecanismos de control de la traducción que coordinadamente regulan la síntesis de proteínas-(r).



**Figura 5. Acumulación de mRNAs de proteínas-(r) de maíz entre 0 y 24 h de germinación.** De 103 transcritos de proteínas-(r) analizados, únicamente 6 incrementaron sus niveles entre 0 y 24 h de germinación. (Jiménez-López *et al.*, 2011 [por publicarse])

## V. HIPÓTESIS

Con base en los antecedentes descritos, sugerimos la siguiente hipótesis de trabajo:

La germinación de maíz es un período de rápido crecimiento, durante el cual se da un incremento en la síntesis de proteínas-(r), mientras que los transcritos correspondientes no incrementan sus niveles. Entonces, la expresión de proteínas-(r) durante este período estará regulada a nivel traduccional, a través de la movilización selectiva de sus respectivos transcritos a polisomas, y podría estar asociada a la presencia de motivos 5'TOP-like en las 5'UTRs de dichos transcritos.

## **VI. OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

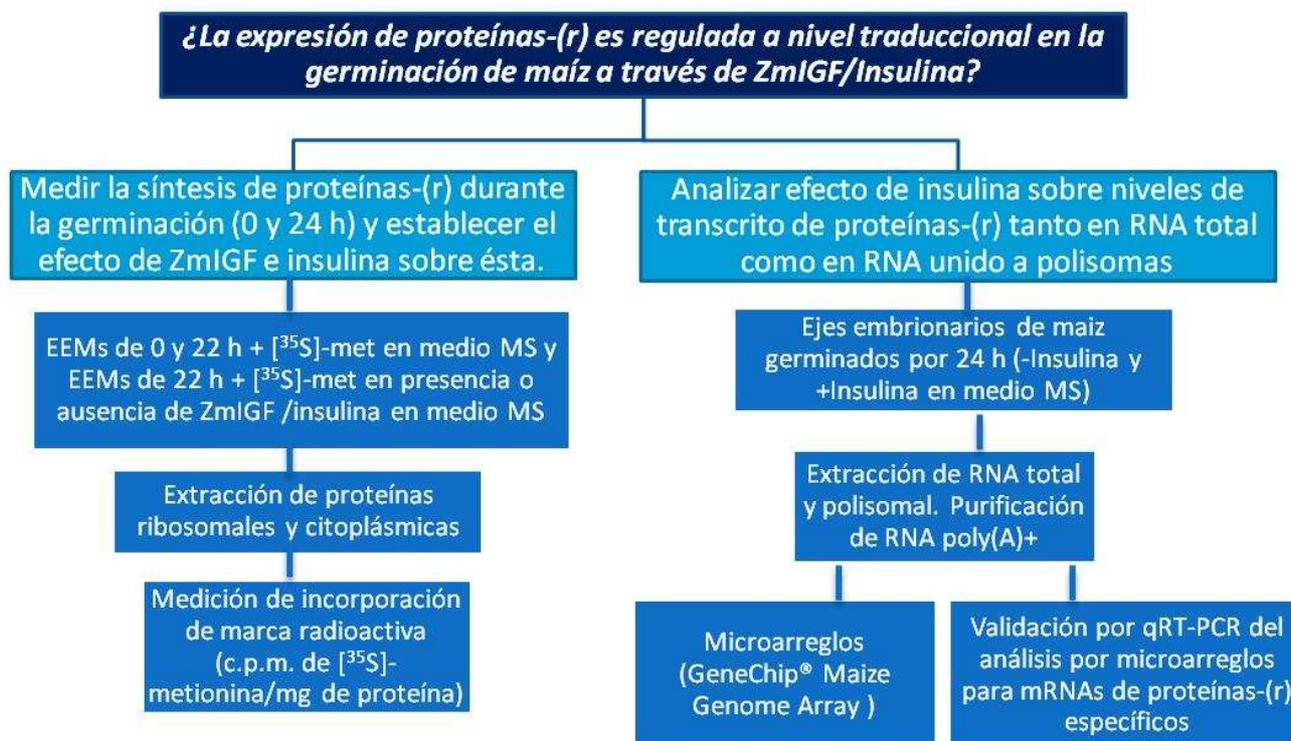
- Considerando que la expresión de los genes de proteínas-(r) constituye una plataforma para el crecimiento y el desarrollo germinativo de las plantas, la presente investigación se llevó a cabo para investigar si durante la germinación, un mecanismo de regulación a nivel traduccional, basado en la acción del factor ZmIGF o insulina, podría explicar el aumento en la síntesis de proteínas-(r) en la ausencia del incremento de sus mRNAs en los ejes embrionarios de de maíz, tomando en cuenta que estos efectores manifiestan efectos metabólicos y fisiológicos equivalentes

### **Objetivos particulares**

1. Establecer si ZmIGF/insulina son capaces de regular la traducción de los mRNAs de proteínas-(r) en la germinación de ejes embrionarios de maíz,
2. Establecer si la regulación traduccional de estos transcritos podría estar asociada a la presencia de motivos 5'-TOPs-like en sus 5'UTRs.

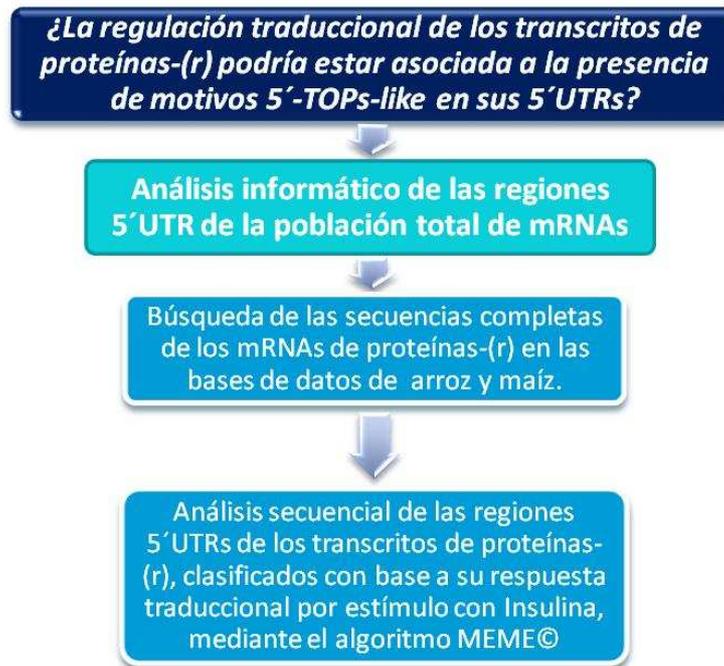
## VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

1. Medir la síntesis de proteínas-(r) *de novo* durante la germinación en ejes embrionarios de maíz de 0 y 24 h y determinar el efecto sobre su síntesis de los efectores ZmIGF e insulina.
2. Establecer mediante un análisis comparativo de microarreglos (GeneChip® Maize Genome Array) el efecto de la insulina sobre los niveles de transcrito de proteínas-(r), tanto en RNA total como en RNA unido a polisomas, obtenidos de ejes embrionarios de maíz de con 24 h de germinación<sup>1</sup>.



<sup>1</sup> El uso de insulina se justifica ya que esta hormona tiene el mismo efecto metabólico y fisiológico que ZmIGF en maíz, en tanto que su disponibilidad es más asequible.

3. Analizar las secuencias 5'-UTR de los transcritos de proteínas-(r) de maíz y arroz, identificando la presencia de 5'-TOPs (ubicación, tamaño y composición nucleotídica).



## VIII. METODOLOGÍA

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

En todos los experimentos se usaron semillas de maíz (*Zea mays* L.) de la raza Mexicana, Tuxpeño var (Chalqueño). Las semillas se germinaron en una incubadora Griffin™ por 24 o 48 h mediante imbibición en agua entre dos capas de algodón, en oscuridad a 28 °C. Los ejes embrionarios (EEMs) se disectaron manualmente tanto de las semillas quiescentes como germinadas, e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido hasta su posterior uso. Adicionalmente, para algunos experimentos, EEMs de semillas germinadas durante 22 h a 28° C en oscuridad se incubaron en medio nutritivo MS (Murashige y Skoog, 1962) por 2 h más, en la presencia o ausencia de 200 µU/mL de insulina bovina (Sigma™) o 200 µU/mL de ZmIGF (el ZmIGF se purificó de EEMs como reportó Rodríguez-López *et al.* en 2011).

### Marcaje *in vivo* de proteínas ribosomales y citoplásmicas

La síntesis de proteínas ribosomales y citoplásmicas se evaluó en EEMs de semillas germinadas. Brevemente, EEMs de semillas de 0 o 22 h de haber sido germinadas, fueron incubadas por 2 h en 3 mL de medio MS con 100 µCi [<sup>35</sup>S]- metionina (Sp. act. 43.475 TBq/mmol, Perkin-Elmer, Boston, MA, EUA), en la presencia o no de 200 µUnits/mL de insulina o ZmIGF. Las proteínas ribosomales, así como las citoplásmicas, se extrajeron de los ejes embrionarios al final de cada

período experimental (García-Flores *et al.*, 2001) y la [<sup>35</sup>S]- metionina incorporada se determinó usando un contador de centelleo líquido

### **Inmunodetección del ZmIGF (Dot blot)**

Cincuenta µg de proteína total de ejes embrionarios de maíz fueron transferidos a una membrana de PVDF (Immobilon-P; Millipore™) usando un “Dot Micro Filtration Apparatus” (Filtration Manifold System, Rockville, MD, EUA). Para la inmunodetección del ZmIGF se empleó como anticuerpo primario un anticuerpo policlonal contra insulina bovina (Sigma™) desarrollado en cobayo, diluido 1:2000 en 5% leche descremada en polvo. Después de varios lavados, se usó para la detección de la señal un anticuerpo de cobayo contra IgG, acoplado a peroxidasa (Sigma™), diluido 1:2000 (sistema ECL, Amersham Pharmacia Biotech™). Para el análisis densitométrico se empleó el software Quantity One® (Biorad™).

### **Extracción de RNA total (Chomczynski y Sacchi, 1987)**

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 100 mg de tejido. Para remover el material insoluble se centrifugó a 12,000 x g por 10 min 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 min 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 s, se incubaron a 15-30° C por 2 o 3 min y se centrifugaron a no más de 12,000 x g por 15 min 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 1 h para precipitar al RNA. Se removió el sobrenadante mediante una centrifugación a 12,000 x g por 10 min a 4° C y el precipitado se lavó tres veces por centrifugación con etanol al 75 % mezclado con vortex, a no más de 7,500 x g por 5 min a 4° C adicionando 1 mL de etanol por cada mL de Trizol™ empleado. Se agregó agua libre de RNAsas c.b.p. redissolver el precipitado.

Para la cuantificación (por triplicado) el RNA se diluyó 1:100 mezclando 1 µL de RNA y 99 µL de agua en una celda de cuarzo y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro UV a 260 nm.

Para obtener la concentración de RNA en la muestra se empleó la siguiente fórmula:

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

### **Extracción de RNA polisomal (Arava, 2003)**

Dos g de ejes embrionarios se homogeneizaron con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino que se suspendió en 6 volúmenes de buffer B1 (200 mM Tris-HCl pH 9, 200 mM KCl, 25 mM EGTA, 36 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 50 µg/mL cicloheximida, 0.5 mg/mL heparina, 1% triton X-100,

1% Tween 20, 1% Brij-35, 1% igepal CA-630, 2% polioxietileno, 1% ácido deoxicólico) (Arava, 2003). Se homogeneizó en vortex por 1 min y se centrifugó a 15,000 x g a 4° C por 15 min, se extrajo el sobrenadante evitando la contaminación con la capa superficial (lípidos). El sobrenadante se centrifugó a través de un colchón de sacarosa, en proporción de 1 mL de sobrenadante / 1 mL de colchón a 1.5 M (50%) de sacarosa en buffer B2 (40 mM Tris-HCl pH 8.4, 0.8 M KCl, 0.1 M MgCl<sub>2</sub>, 50 µg/mL cicloheximida) por 4 h a 4 °C a 50,000 rpm (rotor Beckman 75 Ti). El sedimento corresponde al precipitado polisomal. Se resuspendió el precipitado en 500 µL de buffer de resuspensión (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 200 mM KCl, 25 mM EGTA, 36 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 50 µg/mL cicloheximida), se agregaron 25 µL de SDS al 10% y 1 µL de proteinasa K (1mg/mL), se mezcló en vortex y se incubaron a 37° C por 30 min. Posteriormente se agregaron 250 µL de cloroformo y 250 µL de Trizol™, se mezcló en vortex y se centrifugó a 12000 g por 5 min a 4° C. Cuidadosamente se recuperó la fase acuosa en un tubo Eppendorf estéril. Se adicionó LiCl estéril para obtener una concentración final 1.5 M y 1 mL de isopropanol frío, las fases se mezclaron por inversión y almacenadas a -20° C por 1 h para precipitar el RNA. El precipitado casi imperceptible corresponde al RNA. Se centrifugó a 12000 x g por 10 min a 4° C. El sobrenadante se removió y se lavó tres veces con etanol al 75%, adicionando 1 mL de etanol por cada mL de Trizol™ empleado, se mezcló en vortex y se centrifugó a no más de 7500 x g por 5 min a 4°C. Se agregó agua libre de RNAsas c.b.p. redissolver el precipitado y se cuantificó por triplicado.

## Análisis por microarreglos (Lockhart y Winzeler, 2000)

Con el objetivo de eliminar residuos de RNA degradado y otras impurezas y aprobar la calidad requerida para el análisis por microarreglos, las muestras individuales de RNA total y polisomal bajo estudio se purificaron en columnas de exclusión usando el Kit RNeasy Plant Mini de acuerdo a la metodología del manual. Réplicas técnicas de muestras de RNA total y polisómico de EEMs de 24 h de germinación tratados con o sin insulina, fueron mezcladas para preparar 4 µg por muestra. La calidad del RNA de las mezclas de RNA fue determinada con el kit Lab on a Chip® y el bioanalizador Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). Las muestras con su respectiva réplica biológica (n=2) fueron procesadas para su posterior hibridación en el microarreglo Affymetrix GeneChip Maize de acuerdo al protocolo del fabricante. Estos microarreglos contenían 17,555 sondas que exploraban aproximadamente 14,850 transcritos de maíz. La metodología para procesar las muestras fue la siguiente: 4 µg de los RNAs agrupados fueron reverso transcritos a cDNA de cadena sencilla usando la reverso-transcriptasa SuperScript II cebada con oligómero poli(T). Esto significa que únicamente fueron analizados mRNAs íntegros con cola de poli(A). La síntesis de cDNA fue seguida de una transcripción *in vitro*, en donde se incorporaron dNTPs biotinilados con el fin de generar cRNA de cadena sencilla. Los productos de cRNA fueron fragmentados en cadenas de 200 pb o menos, y 15 µg del producto de fragmentación fueron añadidos al coctel de hibridación (100 mM MES, 1 M NaCl, 20 mM EDTA, 0.01% Tween-20, 0.1 mg\*mL<sup>-1</sup> HS DNA, y 0.5 mg\*mL<sup>-1</sup> albúmina bovina sérica). Después, 300 µL de estas muestras se calentaron a 95° C e hibridadas al microarreglo GenChip Maize® (Affymetrix Inc.®) por 16 h a 45° C. Las muestras fueron lavadas con buffers de alta y baja astringencia y teñidas con estreptavidina-ficoeritrina usando Affymetrix 450 Fluidics Stations. El

GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix, Santa Clara CA) fue usado para coleccionar las señales fluorescentes y mediante el software GCOS se obtuvieron las señales de intensidad y los datos de control de calidad de los microarreglos escaneados.

### **Tratamiento y análisis de datos de microarreglos (Smyth, 2005)**

Cada experimento por microarreglos se replicó dos veces para la robustez biológica y estadística (ver modelo en apartado de Resultados). Los datos fueron analizados en dos partes: primero, se realizó un análisis de “bajo nivel” usando un Bioconductor. Este análisis incluye pruebas de control de calidad sobre los controles de hibridación para generar un rango dinámico de las intensidades de expresión. Se aplicaron para esto dos procesos de normalización: normalización por cuantiles (Bolstad *et al.*, 2003) sobre las réplicas técnicas, seguida por una normalización de Loess en todos los microarreglos con el fin de hacerlos comparables y remover variación sistemática.

Para identificar los genes expresados diferencialmente se implementó un modelo lineal mediante una aproximación Bayesiana usando el software Limma® (Smyth, 2005). La decisión de expresión diferencial significativa se basó en dos criterios estadísticos: “2 veces de cambio” (2 fold-change) y un valor Bayesiano estimado (estadístico-B) cuyo valor límite para cambios significativos fue de  $B=2.2$  (90%). *Los contrastes realizados fueron los siguientes: RNA total de EEMs-24 h vs RNA total de EEMs-24 h con estímulo de insulina y RNA polisomal de EEMs-24 h vs RNA polisomal de EEMs-24 h con estímulo de insulina.*

La base de datos de mRNAs de proteínas-(r) con ID Affymetrix asignado se enriqueció mediante búsquedas en las bases de datos de arroz (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>) y alineamientos con BLAST en las bases de datos del NCBI, Maizesequence y Affymetrix Maize-Chip.

### **Análisis por RT-PCR cuantitativo de los niveles de transcrito de proteínas-(r)**

Con el objetivo de validar los patrones de expresión mostrados en microarreglos, la expresión de genes seleccionados se cuantificó relativamente por qRT-PCR. Diez µg de RNA total o polisomal íntegros de EEMs, con o sin estímulo de insulina (ver geles de integridad en Resultados) fueron tratados con 2 U de TURBO DNA-free™ DNase (Ambion). El cDNA se sintetizó usando SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) de acuerdo al protocolo del fabricante partiendo de 2.5 µg de RNA tratado. Los oligos para el qRT-PCR se generaron mediante el software Vector NTI Advance® 11 usando las secuencias de las bases de datos de Maize sequence (<http://www.maizesequence.org>). El diseño consideró únicamente las regiones de unión Intrón/Intrón (I/I) de acuerdo al splicing que sufren los pre-mRNAs, ésto con el objetivo de amplificar productos específicos para los mRNAs maduros. Las secuencias de los oligos específicos se reportan en la Tabla suplementaria 1. Los genes escogidos para su validación fueron normalizados respecto al gen de referencia *ubc* (*ubiquitin-conjugating enzyme*). Reportes previos en arroz confirman la viabilidad de usar este gen de referencia en análisis de qRT-PCR sobre el efecto en la expresión génica de diversas hormonas y durante la germinación (Jain *et al.*, 2006). La ausencia de dímeros de oligos, la especificidad de la reacción y la eficiencia de los oligos se confirmaron mediante el análisis de curvas de alineamiento

(melting) y curvas de eficiencia con diluciones seriales de cDNA (25, 50, 100, 200, 400 ng de cDNA por reacción). Las reacciones de qRT-PCR (para este caso ya era qPCR) fueron realizadas en placas de 96 pozos usando Express SYBR® GreenER™ qPCR Super Mix Universal (Invitrogen) y un sistema ABI Prism® 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) para monitorear la amplificación específica de cDNA. Las reacciones se desarrollaron por tetraplicados técnicos para dos réplicas biológicas en una mezcla que contenía 0.2 µL de cDNA en un volumen de reacción de 20 µL (25 ng de cDNA por reacción). Se usó un perfil térmico estándar: 2 min a 50 °C y 10 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 60 s a 60 °C. El umbral medio de ciclo de cuantificación (Cq) y las cantidades relativas se calcularon usando el software SDS v2.1 (Applied Biosystems). El análisis estadístico se realizó automáticamente en el mismo software.

### **Análisis de motivos en las 5'-UTRs de los mRNAs de proteínas-(r)**

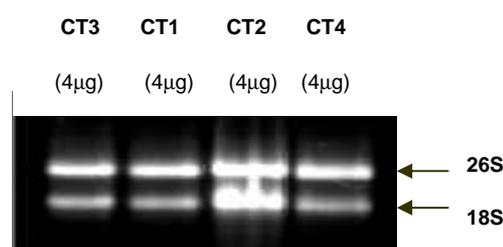
Motivos potencialmente regulatorios se encontraron usando la herramienta de búsqueda “Find potential regulatory sequences” en la plataforma informática MEME v4.3. (Bailey and Elkan, 1994). Se buscaron secuencias con un tamaño de 5 a 22 bases dentro de las regiones 5'UTR de cada mRNA del set de proteínas-(r), clasificados por subunidad ribosomal y por su respuesta traduccional en presencia de insulina. No se consideraron ‘gaps’ o discrepancias y el corte de probabilidad fue de 0.01.

## IX. RESULTADOS

### Extracción de RNA total de EEMs

Para cada una de las réplicas biológicas del análisis de microarreglos y del qRT-PCR, se obtuvieron muestras de RNA total extraídas a partir de 0.5 g de tejido de EEMs variedad Chalqueño, germinados por 24 h sin tratamiento (control) y tratados con insulina. En la figura 1.1 se muestran los datos de concentración de un ejemplo de las muestras correspondientes a la última réplica biológica de los análisis por microarreglos, así como la electroforesis en gel de agarosa que valida la integridad de la muestras. La imagen mostrada en el panel derecho de la figura 1.1 es representativa también para las muestras de las demás réplicas biológicas. Todas las muestras de RNA aisladas para todo estudio, mostraron el bandeo electroforético característico de un RNA íntegro, y al medir su relación de absorbencia 260/280 los valores oscilaron entre 1.8 y 2.1.

Muestra	Relación de absorbencia 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

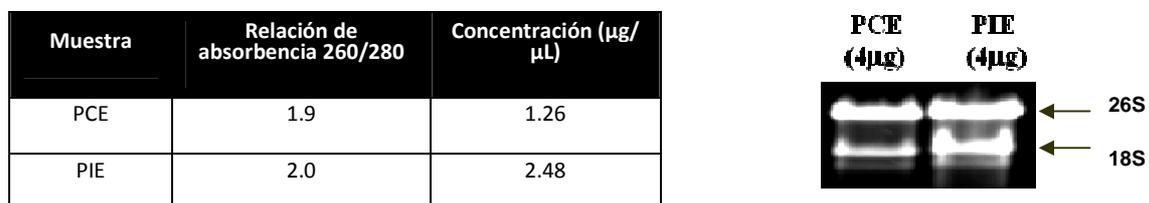


**Figura 1.1.** Las muestras aisladas de RNA total de EEMs germinados por 24 h sin tratamiento (ejemplo), muestran integridad para los ensayos de microarreglos y qRT-PCR. **A).** Cuantificación de las concentraciones de las muestras de RNA total CT1, CT2, CT3 y CT4. Las relaciones de absorbencia 260/280 de cada muestra correlacionan con la integridad del RNA y su pureza. **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  $\mu\text{g}$  de RNA y la intensidad homogénea de las bandas valida su concentración. La presente figura es representativa de todas las muestras extraídas para las demás réplicas técnicas y biológicas de todos los experimentos.

Las muestras de los replicados técnicos y biológicos se enviaron al INMEGEN para realizar los análisis del efecto sobre los niveles de transcrito de los genes ribosomales al estimular la germinación con insulina (ver apartado “Control traduccional de la expresión de proteínas-[r]”). A partir de muestras de RNA total de la última réplica biológica, fueron sintetizados los cDNAs que se emplearon para el análisis por RT-PCR en tiempo real (ver apartado “Control traduccional de la expresión de proteínas-[r]”).

### Extracción de RNA polisomal de EEMS

Después de preparar el material biológico de acuerdo a Arava, 2003 (ver metodologías), se extrajo RNA polisomal a partir de lotes de 4 g de tejido de EEMs variedad Chalqueño, germinados por 24 h sin tratamiento (control, PCE) y tratados con insulina (PIE). Los resultados del análisis para verificar la integridad del RNA polisomal que se muestran en la Figura 1.2 corresponden a la última réplica biológica y son representativos para las demás réplicas técnicas y biológicas con las que se desarrolló el análisis por microarreglos y qRT-PCR.



**Figura 1.2. Las muestras aisladas de RNA polisomal de EEMs germinados por 24 h sin tratamiento y con insulina, muestran integridad para los ensayos por microarreglos y qRT-PCR. A).** Cuantificación de las concentraciones de las muestras de RNA polisomal de la última réplica biológica. Las relaciones de absorbencia 260/280 de cada muestra correlacionan con la integridad del RNA y su pureza; **B).** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras de RNA total de la última réplica biológica. En el gel se cargaron 4 µg de RNA y la intensidad homogénea de las bandas valida su concentración. La presente figura es representativa de todas las muestras extraídas para las demás réplicas técnicas y biológicas con las que se desarrollaron todos los experimentos.

Las muestras de los replicados técnicos y biológicos se enviaron al INMEGEN para realizar los análisis del efecto sobre los niveles polisomales de los transcritos de proteínas-(r) al estimular la germinación con insulina (ver apartado “Control traduccional de la expresión de proteínas-[r]”).

### **Recopilación de las secuencias de mRNAs de proteínas-(r) y asignación en la base de datos de Affymetrix™.**

Al explorar la base de datos correspondiente al chip Affymetrix™ de maíz, plataforma empleada para el análisis por microarreglos, observamos que la mayor parte de los genes no cuentan con la asignación de su producto respectivo. Por ello nos dimos a la tarea de generar una población representativa que englobara a los mRNAs que codifican para la mayoría de proteínas-(r) de maíz, ya que el número de genes-(r) identificados en el arreglo era limitado, y sólo representaba un 40% del total de genes del grupo de interés. Para lograr ésto, fue necesario realizar la búsqueda del mayor número posible de secuencias de mRNAs de proteínas-(r) en maíz; para ello, se utilizaron las ya reportadas en el Gene Bank, cuyo número también es limitado, o se recopilaron secuencias de otros organismos como *Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana* o *Triticum aestivum*, las cuales se alinearon mediante BLAST con las recopiladas en las bases de datos de maíz. Habiendo recopilado un 100% de las secuencias de los mRNAs de proteínas-(r) de maíz, se les asignó el identificador correspondiente a la base de datos del microarreglo de Affymetrix™ de maíz mediante BLAST. Inicialmente se contaba con 35 secuencias de genes de proteínas-(r) identificadas en la base de datos del chip Affymetrix™ de maíz, y durante el transcurso de esta investigación se amplió la población a 103 transcritos de proteínas-(r). A continuación se presenta la lista final de IDs asignados.

**Tabla 2.1. Transcritos ribosomales de maíz asociados a un ID Affymetrix (clasificados por subunidad ribosomal)**

ID	Ribosomal Protein mRNA	ID	Ribosomal Protein mRNA
Zm.17000.1.A1_s_at	L10-3	ZmAffx.1307.1.S1_at	S7 cl
Zm.7409.1.A1_at	L1	ZmAffx.1306.1.S1_s_at	S7-1
Zm.4015.1.A1_a_at	IP0	Zm.16537.1.S1_at	SA
Zm.465.1.A1_at	IP2a-3	Zm.17271.8.A1_at	S10
Zm.6748.1.A1_at	L26	Zm.536.1.S1_at	S10mit
Zm.9038.1.S1_at	L12-1	Zm.7012.4.A1_x_at	S8
ZmAffx.262.1.A1_s_at	IP3	Zm.16024.1.S1_a_at	S24
Zm.466.1.S1_at	IP2a-4	Zm.7006.1.A1_a_at	S3
Zm.5862.1.A1_at	L18B	Zm.7140.1.A1_at	S2B
Zm.14596.1.S1_a_at	IQM protein	Zm.516.1.A1_at	S6-2
Zm.14471.1.A1_a_at	L7-1	Zm.6069.2.S1_at	S2C
Zm.16909.1.A1_at	L27a-3	Zm.6207.1.A1_at	S17-4
Zm.15495.2.S1_a_at	L17	Zm.432.1.A1_at	S27
Zm.7124.1.A1_a_at	L33	Zm.7146.1.A1_at	S17
Zm.6662.1.A1_a_at	L20	Zm.8045.2.A1_a_at	sRACK1
Zm.5313.1.A1_a_at	L12	Zm.341.1.A1_at	S4
Zm.13812.1.A1_a_at	L11-1	Zm.13228.2.A1_at	S9
Zm.7056.1.A1_a_at	L5-1	Zm.16311.2.S1_at	S23B
Zm.6079.1.S1_at	L25	Zm.15855.3.A1_a_at	S25-1
Zm.5789.6.A1_x_at	L3	Zm.2157.1.A1_a_at	S11
ZmAffx.1516.1.S1_s_at	L2cl	Zm.3899.7.S1_at	S6
Zm.7300.1.S1_at	IP2a-2	Zm.14354.1.S1_at	S29
Zm.2895.4.S1_a_at	L44	Zm.1056.1.S1_at	S22
Zm.6207.2.A1_at	L15	Zm.206.4.A1_s_at	S21
Zm.348.2.A1_a_at	IP3-1	Zm.4824.6.A1_a_at	S3a
Zm.6977.2.A1_at	L41	ZmAffx.1320.1.S1_at	S2A
Zm.4020.1.A1_at	L13a	Zm.4447.1.A1_at	S26
Zm.15405.1.A1_at	L18A	Zm.31.2.A1_a_at	S23A
Zm.7081.1.S1_x_at	L32	Zm.6629.1.S1_at	S30
Zm.16747.1.A1_at	L2	Zm.3223.3.A1_a_at	S13
Zm.7032.1.A1_at	L7-2	Zm.14129.1.A1_a_at	S24-1
Zm.878.1.S1_x_at	L35	Zm.6030.1.S1_x_at	S14
Zm.1724.1.S1_at	L4a1	Zm.7097.2.A1_x_at	S18
Zm.7636.1.A1_at	L35-1 cl	Zm.2076.1.A1_at	S16
Zm.18293.1.S1_at	L11	Zm.12737.1.A1_at	S12-1
Zm.15891.2.A1_at	L13-2	Zm.7072.1.S1_at	S9B
Zm.16482.3.A1_x_at	L4a2	Zm.15971.1.S1_at	S27a
Zm.5786.1.A1_at	L19	Zm.6840.1.S1_at	S26-1
Zm.350.1.S1_at	IP2b	Zm.16049.2.A1_a_at	S28
Zm.7081.2.S1_a_at	L24	Zm.7095.1.A1_a_at	S20
Zm.3188.1.A1_at	L40	Zm.16593.5.A1_a_at	S19
Zm.14497.8.A1_s_at	L27	Zm.6569.1.A1_a_at	S15
Zm.15936.1.A1_a_at	IP1a	Zm.598.1.A1_at	slem1 cl
Zm.6206.1.A1_at	L35a		
Zm.7094.1.A1_a_at	L7a		
Zm.999.1.A1_at	L34		
Zm.3892.5.A1_at	L28-1		
Zm.6465.1.A1_at	L23a		
Zm.12150.1.S1_at	L30		
Zm.17856.1.A1_at	L38		
Zm.16508.1.S1_at	L39		
Zm.14283.2.A1_at	L19-3		
Zm.16502.6.A1_a_at	L36-2		
Zm.12634.4.S1_a_at	L23-2		
Zm.6748.2.A1_at	L26-1		
Zm.12634.1.A1_x_at	L23		
Zm.457.1.S1_at	L29		
Zm.6763.2.A1_at	L21		
Zm.6625.1.A1_at	L9		
Zm.14073.1.S1_s_at	L28		

asignados mediante la plataforma de Las asignaciones se riterio estadístico:

## Control traduccional de la expresión de proteínas-[r] en la germinación de maíz

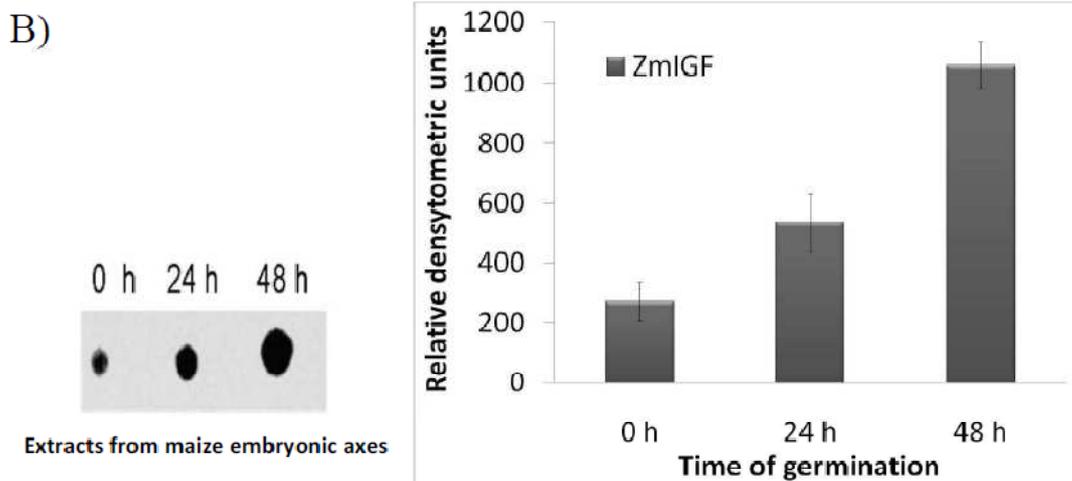
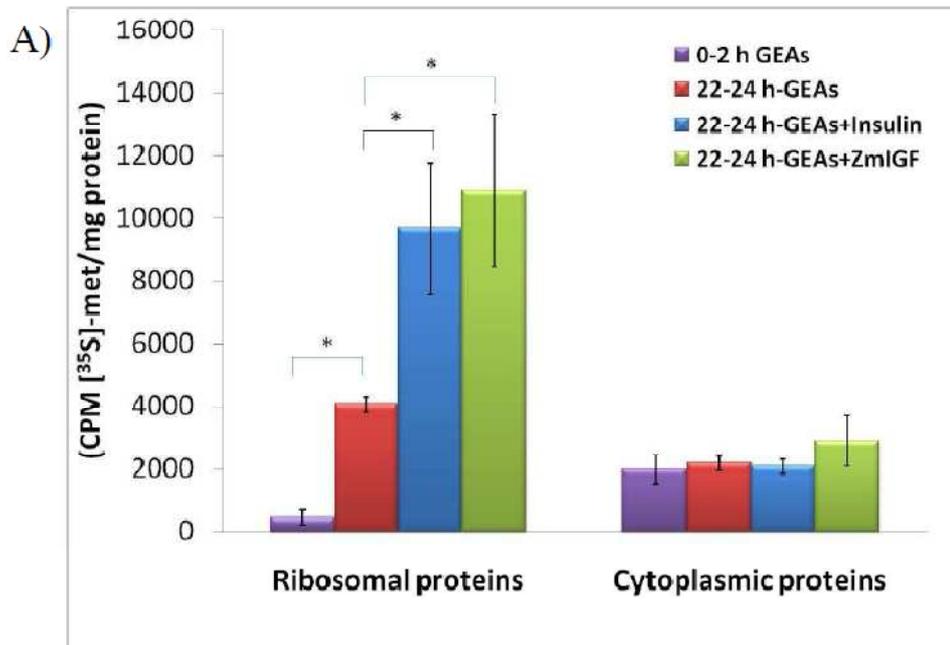
Reportes previos han demostrado que la insulina es capaz de estimular el crecimiento en la mayoría de los eucariontes (Leevers *et al.*, 2004; Fingar *et al.*, 2004) mediante la inducción de la síntesis selectiva de proteínas-(r) (Hamilton *et al.*, 2006; Markou *et al.*, 2010). Además, se ha demostrado que la insulina y los IGFs también son capaces de estimular el crecimiento germinativo en diversas especies de plantas, incluyendo maíz, sorgo, melón, girasol, pepino, frijol y soya (Goodman y Davis, 1993; García-Flores *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2004). Adicionalmente, se ha observado un incremento en la síntesis de proteínas-(r) en semillas de maíz, germinando en presencia de insulina o del IGF de maíz endógeno (ZmIGF) (García-Flores *et al.*, 2001; Rodríguez-López *et al.*, 2011).

Tomando en cuenta estos antecedentes, se consideró relevante investigar si durante la germinación, un posible mecanismo de control traduccional puede explicar el incremento en la síntesis de proteínas-(r) durante esta etapa en ausencia de un incremento en los niveles de mRNAs de proteínas-(r) en los ejes embrionarios de maíz. Para este fin y como un primer experimento exploratorio, ejes embrionarios de maíz de 0 y 22 h de germinación, fueron expuestos durante 2 h a un pulso de [<sup>35</sup>S]-metionina bajo condiciones normales de crecimiento en ausencia o presencia ya sea de insulina o ZmIGF. Al final de este período, fueron extraídas tanto proteínas citoplásmicas como ribosomales, y la incorporación de marca radioactiva fue determinada como c.p.m. de [<sup>35</sup>S]-metionina/mg de proteína (Figura 3.1)

Se encontró un incremento significativo en la síntesis *de novo* de proteínas-(r) entre los períodos de 0-2 y 22-24 h de germinación (Figura 3.1 [A]), esos valores se incrementaron cuando los EEMs de 22 h de germinación fueron expuestos durante 2 h a un pulso de [<sup>35</sup>S]-metionina en presencia de insulina o del factor ZmIGF. Por otra parte, este incremento no se detectó para las proteínas citoplásmicas (Figura 3.1 [A]), lo que indicó que la síntesis de proteínas-(r) se incrementa de forma selectiva durante la germinación.

Para entender el significado fisiológico de este fenómeno, el contenido de ZmIGF fue determinado en EEMs de 0, 24 y 48 h de germinación mediante un análisis de 'dot blot' y densitometría (Figura 3.1 [B]). Interesantemente, se detectó un incremento en la cantidad de ZmIGF endógenos en los EEMs durante la germinación, la cual fue significativamente diferente entre 0 y 24 h, fenómeno que correlaciona con el incremento en la síntesis *de novo* de proteínas-(r) durante este período en ausencia de estímulos externos (Figura 3.1 [A]).

En general, estos datos previos indican que existe un mecanismo de control traduccional que gobierna el incremento en la síntesis de proteínas-(r) observado en EEMs durante la germinación de la semilla, muy probablemente asociado al contenido del factor endógeno similar a insulina (ZmIGF). Esto indica que el factor ZmIGF juega un papel endógeno importante durante la germinación y, de acuerdo a estos resultados, podría estar controlando directamente la síntesis de proteínas-(r).



**Figura 3.1. Síntesis *de novo* de proteínas ribosomales o citoplásmicas y efecto de ZmIGF e insulina sobre ésta. A)** Incorporación de [35S]-metionina a proteínas ribosomales y citoplásmicas de EEMs de 0 y 22 h de germinación expuestas 2 h a ZmIGF, insulina o agua (control). **B)** Identificación del péptido de maíz ZmIGF durante la germinación (0, 24 y 48 h) en exmotivos de proteína total de EEMs, mediante “dot blot”. Para la inmunodetección del ZmIGF, se empleó como anticuerpo primario un anticuerpo policlonal contra insulina bovina (Sigma™) desarrollado en cobayo, diluido 1:2000 en 5% leche descremada en polvo. La estimación de la concentración relativa de ZmIGF se calculó en base a una curva patrón de insulina (50-500  $\mu$ unit/mL) revelada mediante el “dot blotting” de alícuotas de 10  $\mu$ L. Las barras de error indican los promedios de tres réplicas técnicas.

Tomando en cuenta estos resultados, era relevante estudiar si durante la germinación existe un mecanismo regulatorio a nivel traduccional que pudiera explicar el incremento de la síntesis de proteínas-(r) en la ausencia de un incremento en los niveles de mRNAs de proteínas-(r) (ver antecedentes) en los EEMs. Para este fin, se purificaron RNA polisomal y total de EEMs germinados por 24 h, estimulados o no con insulina. Los mRNAs con poly(A+) se aislaron de ambas fracciones para llevar a cabo un análisis comparativo por microarreglos (ver metodologías). Dos experimentos independientes se llevaron a cabo, donde los niveles de los transcritos de proteínas-(r), en RNA total y RNA unido a polisomas, se determinaron mediante microarreglos con matrices de oligonucleótidos de maíz. Para ello se consideró el diseño experimental descrito en la figura 3.2. En esta figura se muestra parte del documento final que nos hizo llegar el INMEGEN, donde se muestra el conjunto de N=19 muestras, correspondientes a 3 réplicas biológicas establecidas inicialmente para este diseño experimental, y del cual se descartaron 2 muestras por su pobre calidad para hibridación.

TODOS Maiz proyecto polisomales

Nombre	Modificación
Total_I_Rap_RB2.CEL	Hoy, 11:51 AM
T_control_RB2.CEL	Hoy, 11:51 AM
P_Insulina_RB3.CEL	Hoy, 11:51 AM
P_I_Rap_RB3.CEL	Hoy, 11:51 AM
P_control_RB3.CEL	Hoy, 11:51 AM
Total_I_Rap.CEL	17/03/2009, 08:27 AM
T_Insulina_RB2.CEL	17/03/2009, 08:27 AM
T_Rap.CEL	17/03/2009, 08:27 AM
T_Insulina.CEL	
T_Insulina_RB.CEL	
T_control.CEL	
T_control_RT.CEL	
T_control_RB.CEL	17/03/2009, 08:27 AM
P_Rap.CEL	17/03/2009, 08:27 AM
P_Insulina.CEL	17/03/2009, 08:27 AM
P_Insulina_RB.CEL	17/03/2009, 08:27 AM
P_I_Rap.CEL	17/03/2009, 08:27 AM
P_control.CEL	17/03/2009, 08:27 AM
P_control_RB.CEL	17/03/2009, 08:27 AM

Son los chips que se procesaron a penas y que su calidad es excelente

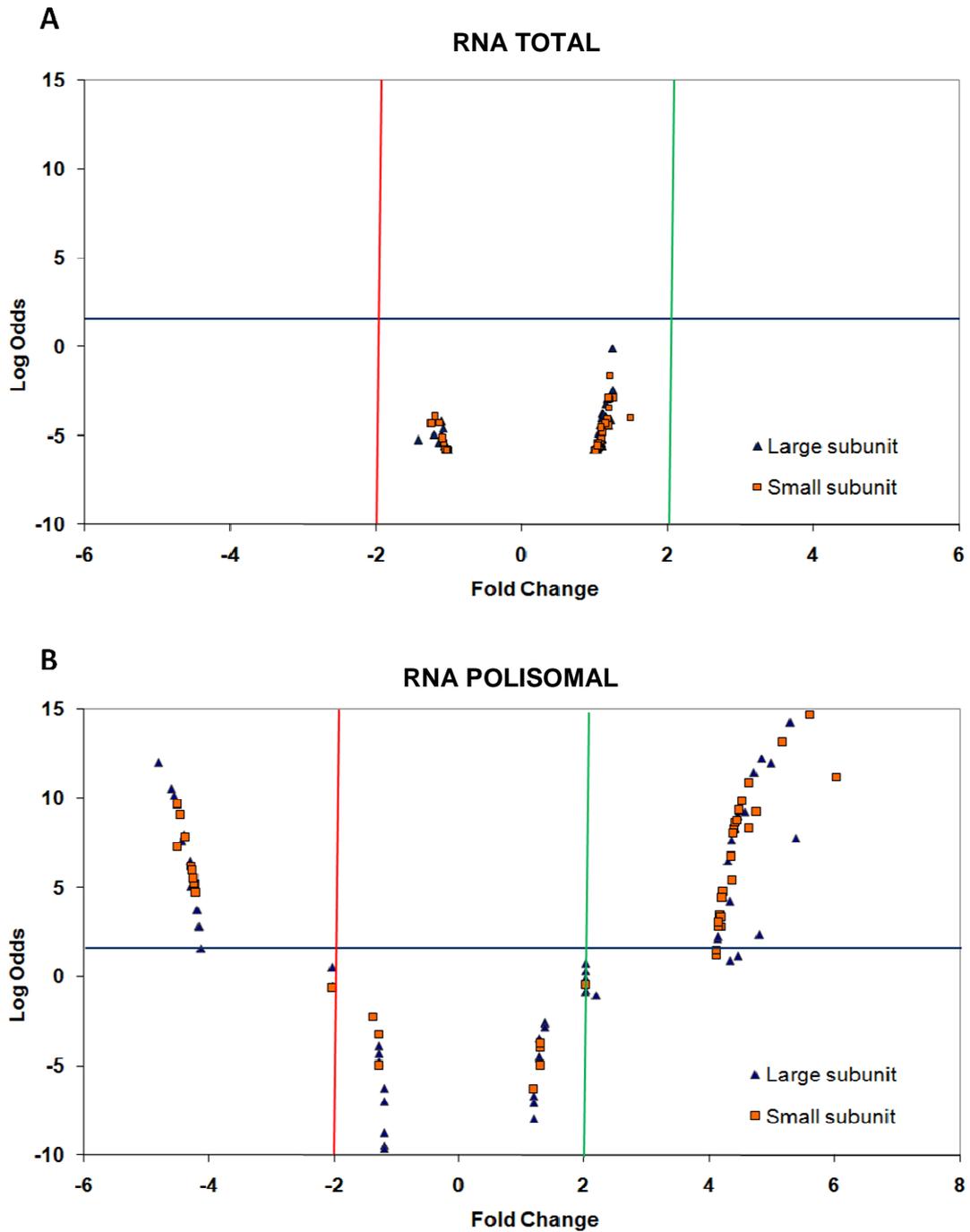
Son los chips que no podemos confiar pues sus controles están muy mal

**Figura 3.2. Los chips que se procesaron durante la investigación fueron de excelente calidad.** El modelo experimental con el cual se analizaron los resultados mostrados a lo largo de este apartado, implica la siguiente distribución de muestras para  $n=17:n_{\text{total ctrl}}=3 \text{ rb} + 1\text{rt}$ ,  $n_{\text{total ins}}=3\text{rb}$ ,  $n_{\text{polis ctrl}}=3 \text{ rb}$ ,  $n_{\text{polis ins}}=2 \text{ rb}$ . Rb: réplicas biológicas, rt: réplicas técnicas

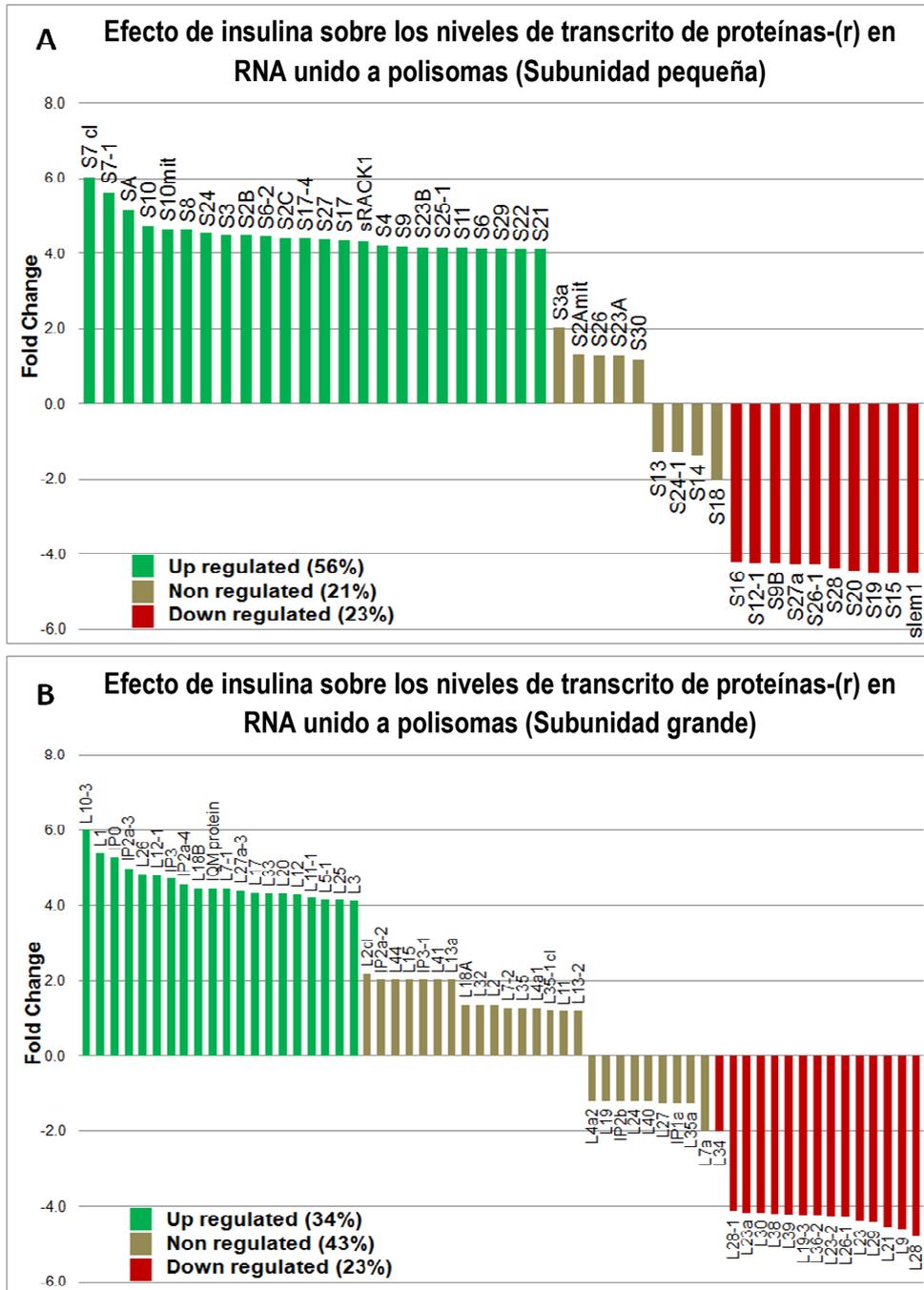
Los resultados del análisis de microarreglos en RNA total no mostró diferencias significativas entre los dos conjuntos de mRNAs, con o sin estimulación de insulina, lo que indica que este efector no altera la expresión transcripcional de los mRNAs de maíz (datos no mostrados), incluyendo los 103 transcritos de proteínas-(r) (Figura 3.3 [A]). Los análisis realizados con RNAs polisomales, sin embargo, demostraron que las muestras estimuladas con insulina presentaron una acumulación de transcritos de proteínas-(r) (Figura 3.3 [B]). Estos datos indican que la insulina induce el reclutamiento a polisomas de transcritos de proteínas-(r) sin generar un incremento significativo de los niveles de transcrito totales, lo cual implica la presencia de un mecanismo de control traduccional selectivo que regula la expresión de proteínas-(r) (Figura 3.3).

Un examen a profundidad de estos datos experimentales mostraron que los niveles de 44 transcritos que codifican proteínas-(r) se incrementaron significativamente en la fracción de mRNA polisomal extraído del set estimulado con insulina: 20 transcritos correspondientes a proteínas-(r) de la subunidad grande y 24 de la subunidad chica (Figura 3.4). Otro grupo de 24 transcritos de proteínas-(r) redujo su nivel dentro de la fracción de RNA polisomal. Este conjunto está conformado de 14 y 10 transcritos que codifican proteínas-(r) de la subunidad grande y pequeña, respectivamente, mientras que los niveles de transcrito en las fracciones polisomales de 9 y 26 genes de la subunidad pequeña y grande, respectivamente, no cambiaron después del estímulo con insulina (Figura 3.4). Estos resultados revelaron que el mecanismo de control traduccional no aplica a todos los transcritos de proteínas-(r), pero parece discriminar entre mRNAs específicos dentro de este grupo. El análisis de microarreglos realizado en este estudio proporcionó un conjunto de datos sobre los genes de proteínas-(r) que se regulan traduccionalmente bajo la estimulación de insulina de una manera selectiva y diferencial.

Adicionalmente, fueron obtenidos datos generados en muestras de RNA total y polisomal de EEMs-24h con y sin insulina+rapamicina (este último compuesto es inhibidor específico de la cinasa TOR en mamíferos); sin embargo, fueron omitidos para fines de esta investigación, ya que por el momento no tenemos referencia experimental sólida, que nos permita saber si el efecto en la expresión y traducción de genes esté asociado a la capacidad inhibitoria de rapamicina sobre la vía PI3K-TOR, o bien sobre su efecto tóxico.



**Figura 3.3.** Distribución de los transcritos de proteínas-(r) totales o unidos a polisomas en EEMs germinados por 24 h y estimulados o no por 2 h (22-24 h) con insulina. **A)** Efecto de insulina sobre la expresión total de transcritos que codifican proteínas-(r). **B)** Efecto de insulina sobre la expresión polisomal de transcritos que codifican proteínas-(r). Los límites de las líneas verticales definen los rangos mínimo inferior y máximo superior, dentro de los cuales se establece si un gen dado incrementa o disminuye su expresión (basado sobre 2 veces de cambio [fold change]). La línea horizontal define un valor mínimo de significancia del 90 % ( $\text{LogOdds}[B] = 2.2$ ).



**Figura 3.4. Efecto de insulina sobre la expresión de mRNAs de proteínas-(r) unidos a polisomas.** Ejes embrionarios de maíz de semillas germinadas por 24 h, fueron estimulados con insulina y la distribución de los transcritos de proteínas-(r) fue analizada en RNA polisomal. A) Efecto de insulina sobre la movilización a polisomas de mRNAs cuyos productos son proteínas-(r) de la subunidad grande. Transcritos con un incremento significativo en sus niveles polisomales ( $B > 2.2$ ,  $> 2$ -fold change) son mostrados en barras de color verde. Transcritos sin cambios significativos en sus niveles polisomales ( $B < 2.2$ ) son mostrados en barras grises, mientras que aquellos que los disminuyeron ( $B > 2.2$ ,  $< -2$ -fold-change) son mostrados en barras rojas. B) Efecto de la insulina sobre la movilización a polisomas de mRNAs cuyos productos son proteínas-(r) de la subunidad pequeña. Transcritos con un incremento significativo en sus niveles polisomales ( $B > 2.2$ ,  $> 2$ -fold change) son mostrados en verde. Transcritos sin cambios significativos en sus niveles polisomales ( $B < 2.2$ ) son mostrados en gris, mientras que aquellos que los disminuyeron ( $B > 2.2$ ,  $< -2$ -fold-change) son mostrados en rojo.

## Control traduccional de la expresión de genes asociados al control del ciclo celular en la germinación de maíz

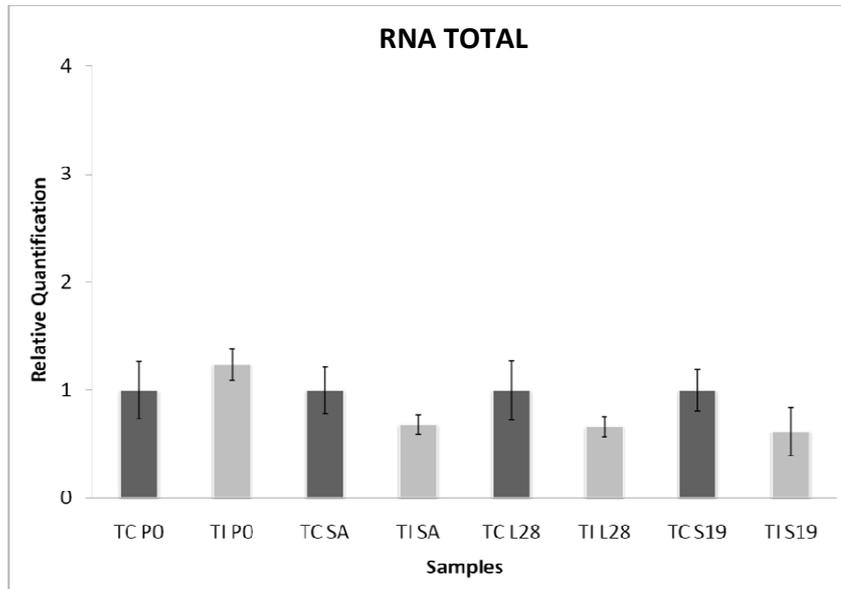
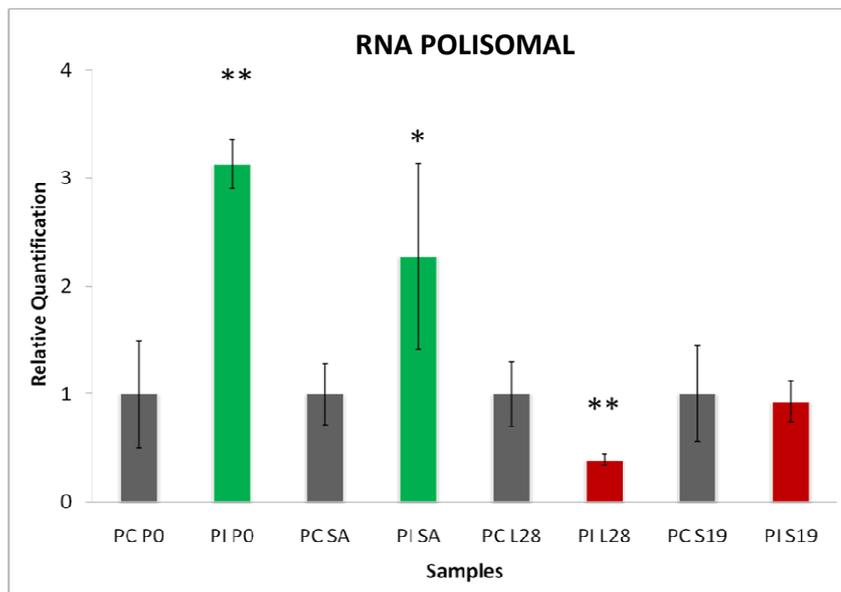
Por otro lado, se sabe que la vía de señalización PI3K-TOR juega un papel importante en el control del crecimiento celular en levaduras, animales y plantas (Nakashima *et al.*, 2008; Deprost *et al.*, 2007). Al interrumpir las funciones de la proteína TOR en plantas y levaduras, las células inhiben su crecimiento celular y promueven un arresto en su ciclo celular en las fases G1 (G0), así como en la transición G2/M, lo cual indica que la vía controlada por la cinasa TOR, juega también un papel importante en la regulación del ciclo celular y la proliferación (Deprost *et al.*, 2007; Nakashima *et al.*, 2008). Si bien existe información abundante en eucariotas no-fotosintéticos que propone un importante papel de la cinasa TOR en el control del ciclo celular, a través de la regulación de las funciones de la proteína AKT, la cual regula la transición G1/S, poco se sabe acerca del probable control traduccional que podría ejercer la vía PI3K-TOR sobre genes íntimamente relacionados con la proliferación celular.

En una aproximación inicial y breve, en colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Laura Pérez de la UAM-I, se analizó el efecto de insulina sobre la traducción de un grupo particular de genes no vinculados a la maquinaria traduccional. En este contexto, se analizaron en total 70 genes asociados con el control del ciclo celular, que comprenden principalmente genes que codifican cinasas del tipo CDK, proteínas del ciclo celular cuya expresión a nivel transcripcional es controlada por el factor E2F, como lo son PCNA, RNA pol II y III, así como algunas ciclinas tipo D (Ávila-Alejandre, tesis doctoral de la UAM-I por ser publicada en 2011). Los datos de microarreglos revelan que en presencia de insulina existe una acumulación

significativa en polisomas de 34 de los 70 transcritos analizados (Ávila-Alejandre, tesis doctoral de la UAM-I por ser publicada en 2011), dentro de los que se destacan las proteínas CDC5, diversas isoformas de la proteína CDKA, PCNA1, PCNA2, RNA pol I, RNA pol III, una ciclina tipo D (D2) y E2F. Lo anterior representa una amplia evidencia sobre el posible papel que juega en plantas la vía PI3K-TOR a través de su estímulo con insulina, en el control traduccional de genes asociados directamente con el ciclo celular.

### **Validación de datos de microarreglos por qRT-PCR**

Para confirmar los datos de microarreglos, la expresión de algunos genes representativos fue validada mediante qRT-PCR. En consecuencia, con base a sus patrones de expresión y veces de cambio (Fold change) observados en los experimentos de microarreglos, 4 de los 44 transcritos diferencialmente expresados en la fracción de RNA polisomal fueron seleccionados para la validación (Tabla suplementaria 1). Estos incluyen a los genes que codifican a las proteínas-(r) P0 y SA (sobre-regulados en polisomas por efecto de insulina), y L28 y S19 (reprimidos en polisomas por efecto de insulina) (Figura 3.3 [A y B]). El gen endógeno de maíz *UBC* (ubiquitin-conjugating enzyme) fue usado como una referencia en este experimento. Las eficiencias de las PCR para los genes blanco y de referencia fueron del rango de 1.58 a 1.79 (Figura suplementaria 1). La especificidad de amplificación fue confirmado mediante las curvas de un solo pico en los análisis de “melting” (Figura suplementaria 1). En dos réplicas biológicas observamos que los transcritos analizados en RNA total (Figura 4.1 [A]) y RNA polisomal (Figura 4.1 [B]) mostraron patrones de expresión similares en microarreglos y qRT-PCR.

**A****B**

**Figura 4.1. Perfil de expresión obtenido mediante qRT-PCR para 4 transcritos de proteínas-(r) en 24 h-EEMs con o sin estímulo de insulina. A)** Muestras de RNA total preparadas a partir de semillas germinadas por 24 h fueron usadas como plantillas para los análisis de qRT-PCR. (TC= RNA total de 24 h-EEMs no estimulados, TI= RNA total de 24 h-EEMs estimulados con insulina). Las barras de error indican los promedios obtenidos de cuatro experimentos de amplificación. Los niveles de transcritos de los genes no fueron regulados mediante el estímulo de insulina (t-test;  $P < 0.05$ ). **B)** Muestras de RNA polisomal preparadas a partir de semillas germinadas por 24 h fueron usadas como plantillas para los análisis de qRT-PCR. (PC= RNA polisomal de 24 h-EEMs no estimulados, PI= RNA polisomal de 24 h-EEMs estimulados con insulina). Las barras de error indican los promedios obtenidos de cuatro experimentos de amplificación. Los niveles polisomales de los mRNAs de RPP0 y RPSA fueron sobre-regulados mediante el estímulo de insulina (t-test; \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$  relativo a los controles PC) mientras que solo el mRNA de RPL28 fue reprimido (t-test;  $P < 0.01$  relativo a los controles PC).

## Análisis bioinformático de las secuencias 5'UTR de proteínas-(r)

Los datos anteriores nos llevaron a evaluar si este mecanismo de regulación involucra el reconocimiento de un blanco específico en los mRNAs seleccionados para inducir su movilización a la fracción polisomal traduccionalmente activa. En este sentido, para la mayoría de eucariontes, desde levaduras hasta mamíferos, se ha descrito una vía de transducción de señales conocida como PI3K-TOR, la cual se activa por insulina o IGFs (conocidos como factores de crecimiento), y regula la síntesis de proteínas-(r) (Hay and Sonenberg, 2004). Esta vía tiene como blanco la maquinaria traduccional y ejerce un fuerte control traduccional a través de la movilización a polisomas de los mRNAs que codifican una gran mayoría de las proteínas que la constituyen (Hamilton *et al.*, 2006). Aunque el mecanismo preciso para este proceso no se ha dilucidado completamente, se ha propuesto que un *cluster* específico de pirimidinas consecutivas que empieza con citosina (C), presente en las 5'-UTRs de mRNAs específicos, funciona como señal blanco de reconocimiento (Meyuhas *et al.* 2000). Esta región, conocida como 5'TOP (Tract of oligopyrimidines), se ha asociado a un mecanismo de control traduccional selectivo (Rubinsky and Meyuhas, 2006).

Para explicar este fenómeno, se desarrolló un análisis bioinformático que se basó primeramente en las secuencias recopiladas de arroz, un cereal cuyo genoma es accesible vía internet y que permite una búsqueda rápida y precisa de las secuencias de los transcritos de interés (Figura suplementaria 2), y posteriormente en las secuencias recopiladas de maíz. Análisis bioinformáticos previos desarrollados en nuestro laboratorio basados en alineamientos de secuencias, demuestran que existe un alto grado de conservación entre las secuencias de

transcritos de proteínas-(r) de maíz, arroz y sorgo (trabajo desarrollado por Donayre y Mancera-Martínez en 2010 [datos no mostrados]). Basados en esta información y considerando que los resultados de microarreglos anteriores representan un set adecuado de datos experimentales, se llevó a cabo el análisis bioinformático de las 5'UTRs de los transcritos de proteínas-(r), con el fin de encontrar señales que podrían ser responsables del comportamiento traduccional observado mediado por insulina en maíz. Para ello, desarrollamos un análisis usando las secuencias de las 5'UTR de los 103 genes de proteínas-(r) de maíz recopilados. Debido a que se obtuvieron tres diferentes sets de mRNAs cuyos niveles polisomales responden diferencial y selectivamente al estímulo de insulina, las secuencias de las 5'UTR de estos transcritos fueron analizadas por separado. Cada grupo de transcritos de proteínas-(r), clasificado de acuerdo a la subunidad a la que pertenecen sus productos, fue analizado usando el programa Multiple Motif Elicitation "The MEME suite" (Bailey and Elkan, 1994). Los resultados mostraron que los mRNAs sobre-regulados en polisomas por efecto de insulina, comparten un motivo rico en pirimidinas embebido en sus 5'UTR, que comienza con una C (Figura 5.1) y se asemeja a la secuencia TOP reportada para otros mRNAs eucarióticos (Meyuhas, 2000; Grolleau *et al.*, 2002). Por otra parte, las 5'UTRs de los sets de transcritos que disminuyeron sus niveles en polisomas, así como los no-regulados por efecto de insulina, no exhibieron este tipo de motivo rico en pirimidinas. En conjunto, estos datos sugieren fuertemente que un elemento *cis*, compuesto por un cluster de pirimidinas, participa en la regulación traduccional de mRNAs de proteínas-(r) en tejidos embrionarios de maíz estimulados con insulina. Estos nuevos resultados proporcionan un medio para comprender el contexto del control de la regulación traduccional de proteínas-(r) durante la germinación del maíz.



Figura 5.1. Análisis bioinformático de las 5'UTRs de los transcritos de proteínas-(r), usando el algoritmo MEME Suite. A) Análisis de las 5'UTRs de los transcritos traducionalmente sobre-regulados con insulina, cuyos productos son proteínas-(r) de la subunidad grande. El motivo rico en pirimidinas CCTCCCTT es representado en la gráfica superior. Las 5'UTRs son distribuidas en orden jerárquico, basado en la predominancia del consenso. B) Análisis de las 5'UTRs de los transcritos traducionalmente sobre-regulados con insulina, cuyos productos son proteínas-(r) de la subunidad pequeña. El motivo CTCCCCT encontrado por MEME es representado en la gráfica superior.

## X. DISCUSIÓN

La tecnología de microarreglos para estudios con maíz (*Zea mays L.*) se ha aplicado recientemente para evaluar la expresión de genes en diferentes tejidos y estadios de desarrollo (Lee *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2009.), como por ejemplo en hojas jóvenes *versus* hojas adultas de plantas de cultivos rejuvenecidos (Strable *et al.*, 2008), así como en la embriogénesis somática durante el desarrollo embriogénico (Love and Carriquiry, 2009). Sin embargo, actualmente, no existen reportes basados en la tecnología de microarreglos, que estudien la germinación, un proceso crítico en el desarrollo de maíz.

En el presente estudio, se realizaron experimentos dirigidos al análisis de los mRNAs de proteínas-(r), debido al papel relevante que tienen en los tejidos en crecimiento rápido (como es el caso de ejes embrionarios de maíz durante la germinación). Reportes previos han indicado que todos los componentes necesarios para la reanudación de la síntesis de proteínas están ya presentes desde la quiescencia dentro de las células de embriones de maíz maduros y secos; estos componentes son los ribosomas, aunque los polisomas están ausentes (Bewley, 1997; Beltran-Peña *et al.*, 1995). Sin embargo, a pocos minutos de la rehidratación, se observa una disminución en el número de ribosomas libres, a medida que estos son reclutados en complejos polisómicos traduccionalmente activos (Bewley, 1997). Por lo tanto, la síntesis de proteínas durante la germinación inicial temprana, depende de los ribosomas pre-existentes y de los mRNAs de proteínas-(r) almacenados (Beltrán-Peña *et al.*, 1995). Más tarde, los mRNAs de proteínas-(r) almacenados se sustituyen por mensajes de nueva síntesis, y es cuando la síntesis

de proteínas se vuelve más dependiente de los mRNAs recién transcritos (Holdsworth *et al.*, 2008). En este contexto, resultados previos a esta investigación obtenidos en nuestro laboratorio por Jiménez-López en 2009, indican que no hay cambios significativos en la concentración total de transcritos de proteínas-(r) entre 0 y 24 h de germinación. Por lo tanto, basados en estas observaciones que sugieren que en esta etapa fisiológica, el incremento progresivo de proteínas-(r) sintetizadas *de novo*, no está regulado a nivel transcripcional, los resultados aquí obtenidos indican que se trata de un mecanismo de control de la traducción, a través del cual se regula la síntesis de proteínas-(r) (Figura 3.3). Para la mayoría de los eucariotas, una vía de transducción de señales conocida como la vía PI3K-TOR, que se activa por la insulina o péptidos similares a la insulina (IGFs), es la responsable de regular el crecimiento y la síntesis de proteínas-(r) a nivel de su traducción (Hay y Sonenberg, 2004; Holdsworth *et al.*, 2008). La evidencia experimental sugiere la conservación de la vía PI3-TOR en el maíz (Agredano-Moreno *et al.*, 2007; Dinkova *et al.*, 2007), gobernada durante la germinación por el incremento progresivo del factor similar a insulina ZmIGF (Rodríguez-López *et al.*, 2011) y la cual es sensible a los estímulos de la insulina (García-Flores *et al.*, 2001; Dinkova *et al.*, 2007). De tal manera que existe un marco básico para la interpretación de los datos del análisis por microarreglos en la presente investigación. Por lo tanto, los resultados aquí presentados indican que durante el proceso de germinación, ya sea en condiciones normales, donde el ZmIGF incrementa progresivamente su concentración, o bien estimulando con insulina, la expresión génica de los transcritos de proteínas-(r) se regula a nivel traduccional (Figuras 3.3 y 3.4), al mismo tiempo que estimula al eje de maíz para crecer (García-Flores *et al.*, 2001). Es interesante tener en cuenta que la mayoría de las proteínas-(r), necesarias en los ribosomas para mantener

la síntesis de proteínas, pertenecen a la subunidad ribosomal pequeña (Dresios *et al.*, 2006), mientras que otras funciones de regulación se han encontrado en varias proteínas-(r) de la subunidad grande (Chaudhuri *et al.*, 2007). De acuerdo con esta información, nuestros resultados indican que en el conjunto de mRNAs de proteínas-(r) que están fuertemente regulados a través del mecanismo de regulación traduccional mediado por la vía PI3K-TOR, predominan los transcritos de proteínas-(r) de la subunidad pequeña sobre los de la subunidad grande (Figura 3.4). Es interesante observar que los niveles polisomales de algunos transcritos de proteínas-(r) de ambas subunidades son significativamente disminuidos por el estímulo de insulina (Figuras 3.3 [B] y 3.4). En este caso, estos datos podrían interpretarse como un indicio de cambios en la composición del ribosoma que se produce durante este período de desarrollo de rápido crecimiento.

Para la mayoría de los eucariotas, se ha encontrado la presencia de un motivo compuesto por un motivo de pirimidinas (TOP) en la región 5'UTR de los mRNAs que codifican proteínas-(r) y factores de traducción (Iadevaia *et al.*, 2008). Por lo que se ha propuesto que esta señal actúa como un sitio blanco para el reclutamiento selectivo de mRNAs específicos a polisomas para su traducción (Patursky-Polischuk *et al.*, 2009). En la actualidad, las secuencias de TOP en mRNAs de plantas no han sido estudiadas, aunque se ha sugerido que están presentes en *Arabidopsis* (Tzeng *et al.*, 2009). En la presente investigación, hemos identificado la presencia de una secuencia TOP-like de 5 a 11 residuos de oligopirimidinas, comenzando con una C, embebida en la región 5'-UTR de los mRNAs de proteínas-(r) de maíz que son movilizados a polisomas después de la estimulación con insulina (Figura 5.1). Sin embargo, este tipo de motivos estuvo ausente en mRNAs de proteínas-(r) que redujeron o no afectaron sus niveles por efecto de

insulina (datos no presentados). Estos datos nos permiten proponer que esta secuencia podría ser equivalente al TOP que se ha reportado en otros eucariotas (Meyuhas, 2000) y que, recientemente, se ha confirmado en humanos (Yamashita *et al.*, 2008). Más apoyo para esta propuesta viene de la constatación de que esta secuencia similar a TOP también se encuentra en los mRNAs de proteínas-(r) de otros cereales, como el sorgo (datos no mostrados) y el arroz (Figura suplementaria 2), lo que sugeriría un mecanismo común altamente conservado para la regulación de la traducción de estos mRNAs en estos cereales.

En relación a datos encontrados en la literatura, se ha confirmado la presencia de motivos 5'TOP en algunas proteínas-(r), así como en factores de inicio y elongación de la traducción y han sido descritas como traduccionalmente reguladas por la vía PI3K-TOR (Jefferies *et al.*, 1997; Grolleau *et al.*, 2002; Iadevaia *et al.*, 2008). De hecho, en nuestro estudio un gran número de proteínas-(r) (Figuras 3.3 [B] y 3.4) y factores de inicio de la traducción como el eIF4E y el eIF4A (datos no mostrados) son sobre-regulados a nivel traduccional en presencia de insulina. Sorprendentemente, no solo este grupo es regulado a nivel traduccional por efecto de insulina en maíz, ya que hemos descubierto un gran número de genes adicionales. En este contexto, además del control traduccional ejercido por insulina sobre genes relacionados a la maquinaria traduccional, este efector también es capaz de reclutar selectivamente a polisomas transcritos de proteínas que tienen funciones relacionadas con el ciclo celular. Por ejemplo los transcritos que codifican CDC5, diversas isoformas de la proteína CDKA, PCNA1, PCNA2, RNA pol I, RNA pol III, una ciclina tipo D (D2) y E2F fueron reclutados selectivamente a polisomas en presencia de insulina (datos no mostrados). En general, se observó un reclutamiento a polisomas concomitante de transcritos que promueven el crecimiento y la proliferación celular. Estos

genes incluyen particularmente a la ciclina D2, la cinasa CDC5 y PCNA, reguladores importantes de la transición G1/S. Interesantemente 22 transcritos analizados de los 34 relacionados con el ciclo celular que fueron reclutados selectivamente en presencia de insulina contienen un motivo similar a 5'-TOP en sus 5'UTRs (Figura suplementaria 3).

En general, los datos aquí presentados demuestran que la expresión de proteínas-(r) de maíz se regula traduccionalmente durante la germinación, proceso que probablemente ocurre a través de la vía PI3K-TOR. Este mecanismo parece ser una característica funcional general en todos los eucariotas, incluidas las plantas, y al parecer no es exclusivo para transcritos relacionados con la maquinaria traduccional.

## **XI. CONCLUSIONES GENERALES**

La regulación de la biosíntesis de las proteínas ribosomales durante la germinación de maíz, un período de crecimiento rápido y relevante en el desarrollo de esta planta, ocurre principalmente a nivel traduccional, a través de la acción del factor de crecimiento ZmIGF sobre una vía similar a la descrita en eucariontes no-fotosintéticos, que podría tener como blanco las secuencias 5'TOP-like presentes en las 5'UTR de los mRNAs que las codifican.

Por otro lado es probable que algunos transcritos que codifican proteínas asociadas con el control positivo del ciclo celular, estén siendo reclutados selectivamente a polisomas a través de un mecanismo similar al descrito vía motivos 5'-TOP.

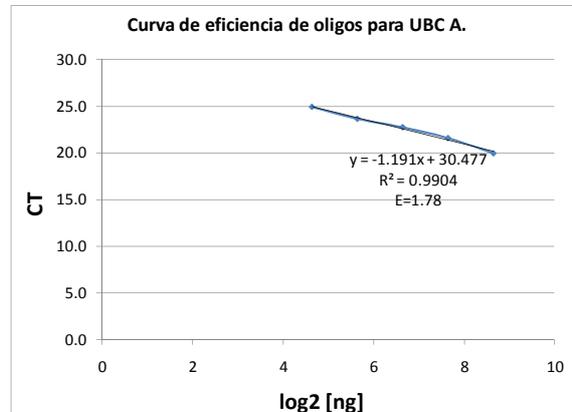
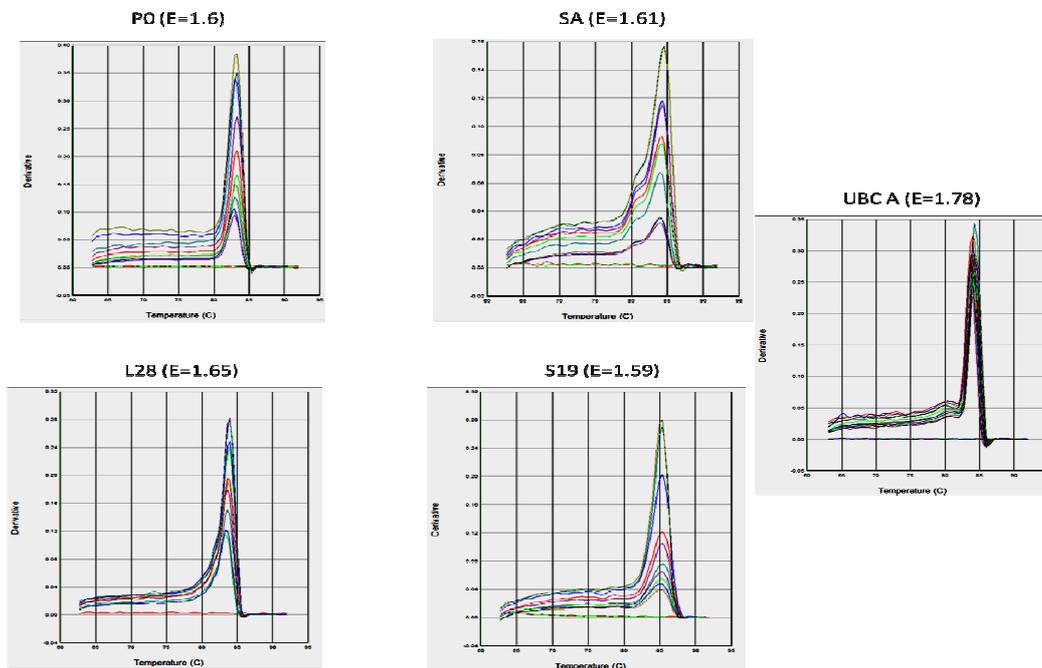
Lo anterior sugiere una interconexión entre la presencia de estímulos de crecimiento externos, como la insulina o el ZmIGF, con la biogénesis de ribosomas y, probablemente, con la promoción de la transición G1/S en el ciclo celular, que ocurre a través del control traduccional selectivo de genes involucrados en estos procesos cuyas regiones 5'UTR presentan motivos similares a los 5'TOPs.

## XII. TABLAS Y FIGURAS SUPLEMENTARIAS

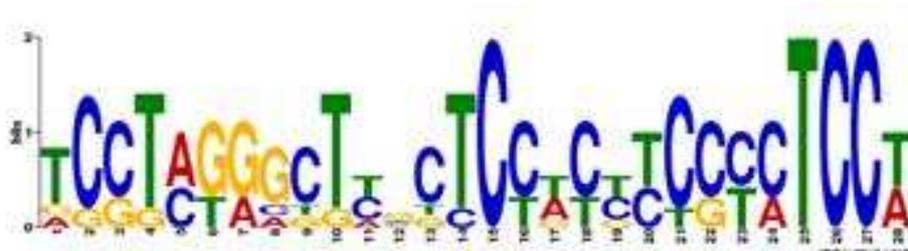
**Tabla suplementaria 1.** Detalles de los primers usados para el qRT-PCR

Gen	Secuencia del primer <i>forward</i> [5' → 3']	Posición en cDNA (Exon)	Secuencia del primer <i>reverse</i> [5' → 3']	Posición en cDNA (Exon)	Tamaño del producto (bp)
<i>UBC</i>	AGGAGTTTGCATGGCGTCTA	1er, 2do	GTAATCTGGCGGGAAATGAA	3er	191
<i>RPP0</i>	CTGTCCTGGCGATCTCGTA	3er	TGGGTCCTTGAGGTACTCCT	3er,4to	144
<i>RPSA</i>	CATCAGCCAATCAAGGAGTCT	2do, 3er	TCAACCATGACTTCCCCTT	3er,4to	209
<i>RPL28</i>	ACCAAGACCAAGAAGCAGAAC	2do	CAACCTGGTTTTTACAGCC	2do, 3er	100
<i>RPS19</i>	TCAGGGCTGCATCTGTAGCAA	2do, 3er	TCCACCCTGGGATCGACAT	3er,4to	197

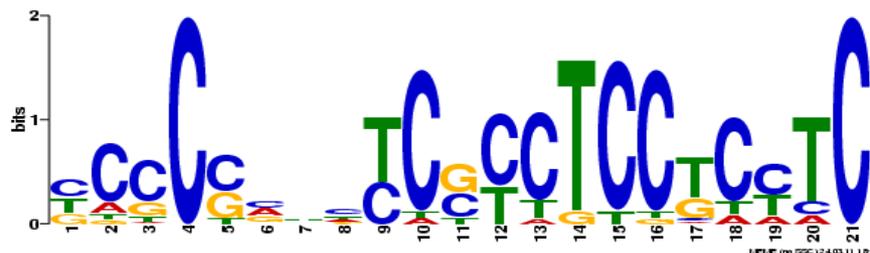
Los 5 pares de oligos, incluyendo el gen de referencia, mostraron especificidad, eficiencia y viabilidad adecuadas de acuerdo a los parámetros establecidos en la qPCR Technical Guide (Sigma™), en los manuales del ABI Prism® 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) y en Bustin *et al.*, 2009 (MIQE-Guidelines for qPCR and qRT-PCR). En la figura suplementaria 1 se presentan las gráficas térmicas de alineamiento y los valores de eficiencia obtenidos. Las gráficas térmicas de alineamiento (d(Fluorescencia) vs temperatura) habrían de mostrar, exclusivamente, un único pico que refleja la especificidad particular del fragmento de interés en los ciclos de amplificación. De acuerdo al tratamiento matemático de las curvas de eficiencia (Cq vs Log2[concentración]), la eficiencia ideal es E=2 (100%), sin embargo eficiencias desde E=1.5 son válidas de acuerdo a Bustin *et al.*, 2009.



**Figura suplementaria 1. Curvas térmicas de alineamiento y eficiencias, obtenidas de la amplificación de los genes candidatos mediante reacciones de qRT-PCR (dos pasos, RT-PCR + qPCR), con diluciones seriales de cDNA de 24 h-EEMs. Todos los pares de oligos presentan eficiencias mayores a E=1.5 y un único pico en las curvas térmicas de alineamiento. En la parte inferior del panel se presenta un ejemplo de la gráfica de la curva de eficiencia para el par de oligos con los que se amplificó el gen de referencia *UBC*. Las eficiencias de reacción ( $E = 2^{(-1/\text{slope})}$ ), fueron derivadas de los datos de calibración obtenidos de las qRT-PCRs realizadas con cDNA serialmente diluido: 400, 200, 100, 50, 25 ng y agua libre de RNAsas, en 20  $\mu$ L de volumen de reacción.**



**Figura suplementaria 2. Análisis bioinformático de las 5'UTRs de los transcritos de proteínas-(r) de arroz, usando el algoritmo MEME Suite. A)** Análisis de las 5'UTRs de los transcritos traduccionalmente sobre-regulados con insulina, cuyos productos son proteínas-(r). El motivo rico en pirimidinas CTCCTTCCCCTCCT es representado en la parte derecha de la gráfica. Al igual que en maíz, solo este set de 5'UTRs mostró significativamente un motivo rico en pirimidinas.



**Figura suplementaria 3. Análisis bioinformático de las 5'UTRs de los transcritos de proteínas relacionadas con el ciclo celular, usando el algoritmo MEME Suite. A)** Análisis de las 5'UTRs de los transcritos traduccionalmente sobre-regulados con insulina, cuyos productos son proteínas asociadas con el control del ciclo celular. El motivo rico en pirimidinas es representado en la parte derecha de la gráfica. Al igual que para el caso del grupo de transcritos de proteínas-(r), solo este set de 5'UTRs mostró significativamente un motivo rico en pirimidinas respecto a los 36 que no fueron sobre- regulados.

### **XIII. AGRADECIMIENTOS**

Reconocimiento especial a la Dra. Laura Pérez y al Dr. Fulgencio Espejel de la UAM-I por su apoyo inicial en los experimentos de qRT-PCR. Agradecimiento infinito a los Drs. L. Martínez-Castilla y C. Peña-Montes de los Departamentos de Bioquímica y Alimentos respectivamente, por su asistencia con los análisis bioinformáticos y de qRT-PCR respectivamente. Esta investigación fue apoyada por la Dirección General de Apoyo Académico (DGAPA, UNAM), (IN212910). El autor de esta tesis recibió una beca de maestría de parte de CONACyT, (número de becario 265055).

## XIV. BIBLIOGRAFÍA

- Affymetrix, Inc. (2009).
- Agredano-Moreno, L.T., Reyes de la Cruz, H., Martínez-Castilla, L.P. and Sánchez de Jiménez, E. (2007) Distinctive expression and functional regulation of the maize (*Zea mays* L.) TOR kinase ortholog, *Mol Biosyst.* 3(11), 794-802.
- Bailey, T. and Elkan, C. (1994) Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. In *Proceedings of the Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*. California: AAAI Press, Menlo Park pp. 28-36.
- 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 $\zeta$  (PKC $\zeta$ ) and PKC-related kinase 2 by PDK1, *J. Biol. Chem.* 275: 20806–20813.
- Beltrán-Peña, E., Ortíz-López, A. and Sánchez de Jiménez E. (1995) Synthesis of (r)-proteins from stored mRNAs early in seed germination, *Plant Mol. Biol.* 28, 327-336.
- Bewley, J. D. (1997) Seed Germination and Dormancy, *Plant Cell*, 9,1055-1066.
- Bewley, J. D. and Black, M. (1994) *Seeds: Physiology of development and germination*. 2nd ed. Plenum Press: New York.
- Bolstad, B.M., Irizarry, R.A. and Astrand, M. (2003) Speed TP: A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias, *Bioinformatics*, 19,185-193.

- 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, *J. Cell Sci.* 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 J.* 13: 2224-2237.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Clemens, M.J., and Bommer, V.-A. (1999) Translational control: the cancer connection, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31, 1-23.
- Dinkova, T.D., Reyes de la Cruz H., García-Flores C., Aguilar R., Jiménez-García L.F., Sánchez de Jiménez E. (2007) Dissecting the TOR-S6K signal Transduction Pathway in Maize Seedlings: Relevance on Cell Growth Regulation, *Physiol. Plant.* 130, 1-10.
- 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.
- Dresios, J., Panopoulos, P. and Synetos, D. (2006) Eukaryotic (r)-proteins lacking a eubacterial counterpart: important players in ribosomal function. *Mol. Microbiol.* 59 (6), 1651–1663.
- Fingar, D.C. and Blenis, J. (2004) Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression, *Oncogene*, 23, 3151–3171.

- García-Flores, C., Aguilar, R., Reyes de la Cruz, H., Albores, M. and Sánchez de Jiménez E. (2001) A maize insulin-like growth factor signals to a transduction pathway that regulates protein synthesis in maize, *Biochem. J.* 358(1), 95-100.
- Gingras, A. C., Raught, B. and Sonenberg, N. (2004). mTOR signaling to translation, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 279, 169-197.
- 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.
- Girke, T., Todd, J., Ruuska, S., White, J., Benning, C., Ohlrogge, J. (2000) Microarray analysis of developing Arabidopsis seeds. *Plant Physiol.* 124,1570–1581.
- Goodman, D.B. and Davis, W.L. (1993) Insulin accelerates the postgerminative development of several fat-storing seeds, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190, 440-446.
- 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. and 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 $\beta$ 1 modulates translation independently from mTOR and through RACK1, *Biochem. J.* 415, 77-85
- Hamilton, T. L., Stoneley, M., Spriggs, K. A. and Bushell, M. (2006) TOPs and their regulation, *Biochem. Soc. Trans.* 34(1), 12-16.

- Hay, N. and Sonenberg, N. (2004) Upstream and downstream of mTOR, *Genes Dev.* 18, 1926-1945.
- Hayes, P.M., and Jones, B.L. (2000) Malting quality from a QTL perspective. In Eighth International Barley Genetics Symposium. Adelaide, South Australia, pp. 99–105.
- Heid, C. A., Setevens, J., Livak, K. J., et al. (1996) Real time quantitative PCR, *Genome Res.* 6:986-994
- Hellen, C.V., and Sarnow, 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.* 65, 2334-2359.
- 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.
- Hiahara, 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
- Holdsworth, M.J., Finch-Savage, W.E., Grappin, P. and Job D. (2008) Post-genomics dissection of seed dormancy and germination, *Trends Plant Sci.* 13 (1), 7-13.

- Iadevaia, V., Caldarola, S., Tino, E., Amaldi, F. and Loreni, F. (2008) All translation elongation factors and the e, f, and h subunits of translation initiation factor 3 are encoded by 5'-terminal oligopyrimidine (TOP) mRNAs, *RNA*. 14(9), 1730-1736.
- 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 desoxyribonucleic 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., Merrick, 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.
- Leever, S.J. and Hafen, E. (2004) Growth regulation by insulin and TOR signaling in *Drosophila*. In *Cell Growth: Control of Cell Size* (Hall, M.N., Raff, M. and Thomas, G. eds). Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press pp. 167–192.
- Lockhart, D. J., and Winzeler, E. A. (2000) Genomics, gene expression and DNA arrays, *Nature* 405, 827–836
- Lonnstedt, I. and Speed, T. (2002) Replicated microarray data. *Statist. Sinica*. 12, 31 – 46.

- 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
- Love, T. and Carriquiry, A. (2009) Repeated Measurements on Distinct Scales With Censoring-A Bayesian Approach Applied to Microarray Analysis of Maize, *J. Am. Stat. Assoc.* 104 (486), 524-540.
- 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.
- Markou, T. Marshall, A., Cullingford, T., Tham, E. and Clerk, A. (2010) Regulation of the cardiomyocyte transcriptome vs translome by endothelin-1 and insulin: translational regulation of 5' terminal oligopyrimidine tract (TOP) mRNAs by insulin, *BMC Genomics*. 11(343), 1-16.
- 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-(r) ácidas P1 y P2 de EEMs" Tesis de licenciatura (Química de Alimentos). Facultad de Química. UNAM

- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.* 15:473–497.
- Nakashima, A., Maruki, Y., Imamura, Y., Kondo, C., Kawamata, T., Kawanishi, I., Takata, H., Matsuura, A., Lee, K., Kikkawa, U., Ohsumi, Y., Yonezawa, K., Kamada, Y. (2008) The yeast Tor signaling pathway is involved in G2/M transition via polo-kinase, *PLoS One*, 21;3(5):e2223
- 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
- Oliveira, A.A. E., Ribeiro, E.S., Da Cunha, M., Gomes, V.M., Fernandes, K.V.S. and Xavier-Filho, J. (2004) Insulin Accelerates Seedling Growth of *Canavalia ensiformis* (Jack bean), *Plant Growth Regul.* 43(1), 57-62.
- 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.
- Patursky-Polischuk, I., Stolovich-Rain, M., Hausner-Hanochi, M., Kasir, J., Cybulski, N., Avruch, J., Rüegg, M., Hall, M. and Meyuhass, O. (2009) The TSC-mTOR Pathway Mediates Translational Activation of TOP mRNAs by Insulin Largely in a Raptor- or Rictor-Independent Manner, *Mol. Cell. Biol.* 29, 640-649.
- 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
- Potokina, E., Sreenivasulu, N., Altschmied, L., Michalek, W. and Graner, A. (2002) Differential gene expression during seed germination in barley (*Hordeum vulgare* L.), *Funct. Integr. Genomics.* 2, 28–39.
- 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. and Sánchez de Jiménez, E. (2004) Functional characterization of a maize ribosomal S6 protein kinase (ZmS6K), a plant ortholog of metazoan p70(S6K). *Biochemistry*, 43(2), 533-539.
- Rhoads, R.E. (1999). Signal transduction pathways that regulate eukaryotic protein synthesis, *J. Biol. Chem.* 274, 30337-30340.
- Rodríguez-López, C. D., Rodríguez-Romero, A., Aguilar, R., Sánchez de Jiménez, E. (2011) Biochemical characterization of a new maize (*Zea mays* L.) peptide growth factor, *Protein Peptide Letters.* 18.
- 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. and Meyuhas, O. (2006) Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size, *Trends Biochem. Sci.* 6, 342-348.
- 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.
- Schmidt, E. (1999) The role of c-myc in cellular growth control, *Oncogene* 18, 2988–2996
- 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.
- Smyth, G. K. (2004). Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* 3(1), 3.
- Smyth, G. K. (2005). *Limma: linear models for microarray data*. In: *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*, R. (Gen-tleman, V. Carey, S., Dudoit, R. and Irizarry, W. H. eds.). New York, Springer 2005, pp. 397–420.
- 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
- Strable, J., Borsuk, L., Nettleton, D., Schnable, P.S. and Irish, E.E. (2008) Microarray analysis of vegetative phase change in maize, *Plant J.* 56(6), 1045-1057.
- 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
- Tzeng, T.Y., Kong, L.R., Chen, C.H., Shaw, C.C. and Yang, C.H. (2009) Overexpression of the Lily p70s6k Gene in Arabidopsis Affects Elongation of Flower Organs and Indicates TOR-Dependent Regulation of AP3, PI and SUP Translation, *Plant Cell Physiol.* 50(9),1695-1709.
- 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
- Yamashita, R. S., Takeuchi, N., Wakaguri. H., Ueda, T., Sugano, S. and Nakai, K. (2008) Comprehensive detection of human terminal oligo-pyrimidine (TOP) genes and analysis of their characteristics, *Nucleic Acids Res.* 36(11), 3707–3715.
- Zhu, Y., Fu, J., Zhang, J., Liu, T., Jia, Z., Wang, J., Jin, Y., Lian, Y., Wang, M., Zheng, J., Hou, W. and Wang, G. (2009) Genome-wide analysis of gene expression profiles during ear development of maize, *Plant Mol. Biol.* 70(1-2), 63-77.