



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

CARACTERIZACIÓN PROTEÓMICA DEL RIBOSOMA CITOSÓLICO DE MAÍZ

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA:

RICARDO ADÁN HERNÁNDEZ HERMENEGILDO



MÉXICO, D.F.

AÑO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Estela Sánchez Quintanar

VOCAL: Profesor: J. Eleazar Martínez Barajas

SECRETARIO: Profesor: Sobeida Sánchez Nieto

1er. SUPLENTE: Profesor: Nuria victoria Sánchez Puig

2° SUPLENTE: Profesor: Lilia Angélica Bernal Gracida.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 103, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Estela Sánchez Quintanar

SUSTENTANTE:

Ricardo Adán Hernández Hermenegildo

“Análisis Proteómico del Ribosoma Citosólico de Maíz”

RECONOCIMIENTOS.

Esta tesis de licenciatura se realizó bajo la dirección de la Dra. Estela Sánchez Quintanar de Jiménez en el laboratorio de control traduccional de plantas (L-103), en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se reconoce el apoyo de la Dirección General de Apoyo Académico (DGAPA, UNAM), con el registro del proyecto PAPIIT IN214214.

Durante los estudios de licenciatura se reconoce el apoyo otorgado por CONACYT (Exp. 2515-8369) con una beca de ayudante de investigador nacional para la realización de la tesis.

INDICE GENERAL

RECONOCIMIENTOS.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	3
INDICE GENERAL.....	5
INDICE DE FIGURAS.....	6
INDICE DE TABLAS.....	7
RESUMEN.....	8
INTRODUCCIÓN.....	10
ANTECEDENTES.....	12
El ribosoma eucariote.....	12
Heterogeneidad en los ribosomas citosólicos.....	13
Proteómica en ribosomas.....	20
HIPOTESIS.....	24
OBJETIVO GENERAL.....	25
OBJETIVOS PARTICULARES.....	25
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	26
MATERIALES Y METODOS.....	27
Material biológico.....	27
Aislamiento de ribosomas citosólicos totales (Davies y Abe, 1995; Pérez-Méndez <i>et al</i> , 1993; Williams <i>et al</i> , 2003).....	27
Extracción de proteínas ribosomales (Pérez-Méndez <i>et al</i> , 1993; Ramjoué y Gordón, 1977; Siegmann y Thomas, 1987; Williams <i>et al</i> , 2003).....	28
Determinación de proteínas por Bradford.....	29
Electroforesis en gel SDS-PAGE.....	29
Coomassie coloidal sensible G-250. (Dyballa y Metzger, 2009).....	30
Electroforesis en gel de doble dimensión (2D). Sistema básico con urea/ácido bórico para proteínas ribosomales (Siegmann y Thomas, 1987; Williams <i>et al</i> , 2003).....	30
Electroforesis en gel de doble dimensión (2D). Sistema de Urea- ácido acético/ SDS (Modificación al método descrito por Warner y Gorenstein, 1977)......	32
Análisis de identificación de manchas y densitometría de geles de doble dimensión.....	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
Extracción de material biológico, aislamiento y purificación de proteínas ribosomales.....	34
Separación de las proteínas ribosomales por geles de SDS-PAGE.....	35

Electroforesis en gel de doble dimensión (2D). Sistema básico con urea/ácido bórico para proteínas-r (Siegmann y Thomas, 1987; Williams et al., 2003).....	37
Optimización de la segunda dimensión de la electroforesis.	41
Electroforesis en gel de doble dimensión (2D). Sistema de Urea- ácido acético/ SDS (Warner y Gorenstein, 1977).	45
Comparación entre ambas técnicas.....	47
Modificaciones finales a la técnica de electroforesis en 2D Urea- ácido.	47
Análisis computacionales de los geles obtenidos.	49
Análisis con PD Quest de los geles de 2D de proteínas ribosomales.	51
Detección de manchas utilizando ImageJ.	61
Análisis de densidad de las manchas con Gel Analyzer.	63
CONCLUSION.....	68
PERSPECTIVAS.....	68
BIBLIOGRAFIA.....	71

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curva patrón de BSA construida por el método de Bradford.....	29
Figura 2. Visualización en gel de poliacrilamida-SDS de diferentes concentraciones de proteínas ribosomales.....	35
Figura 3. Resolución de bandas de proteínas ribosomales en una electroforesis en geles grandes (140mm x 120 x1.5mm).....	36
Figura 4. Pasos de la técnica de electroforesis en doble dimensión.....	37
Figura 5. Separación mediante electroforesis Urea-básico en 1D de las proteínas ribosomales.....	39
Figura 6. Separación por electroforesis SDS-PAGE de las proteínas ribosomales recuperadas de los pozos de carga de la 1D Urea- Básico.....	40
Figura 7. Proteínas ribosomales cargadas en geles de 2D, corrida en SDS- PAGE y teñido con azul de Coomassie.....	42
Figura 8. Separación de proteínas ribosomales en gel de electroforesis en 1D Urea – básico, con 800 µg de proteína de ejes embrionarios germinados 24 h de germinación y teñidos con azul de Coomassie.....	43
Figura 9. Gel de electroforesis en 2D mediante la técnica urea- básica.....	43
Figura 10. Separación de proteínas ribosomales en geles de 2D cargados con 800 µg de proteína.....	44
Figura 11. Proteína ribosomal separada en geles de Urea- Ácido acético, teñidos con azul de coomassie.....	45
Figura 12. Separación electroforética de proteínas ribosomales en geles de primera y segunda dimensión usando la técnica Urea- ácido acético y teñidos con azul de	

coomassie.....	46
Figura 13. Separación de proteínas ribosomales mediante geles de electroforesis en 2D usando la técnica urea-ácida modificada usando 300 µg de proteínas ribosomales	49
Figura 14. En azul se representan las áreas que utiliza el programa para medir densidad de las manchas, no todas abarcan la mancha completa.....	53
Figura 15. Detección de manchas en cada repetición con PD Quest.....	54
Figura 16. Distorsión en el campo de análisis por cuadrantes entre las repeticiones, tomando como comparación el gel 2.....	55
Figura 17. Imagen que muestra la diferencia en los geles obtenidos por las técnicas de electroforesis en doble dimensión Urea-SDS e Isoelectroenfoco entre dos muestras de distinto tejido vegetal.....	55
Figura 18. Imágenes de geles maestro resultante de las mismas 3 repeticiones.....	56
Figura 19. Análisis comparativos de densidad de cada mancha de las 3 repeticiones de geles.....	58
Figura 20. Manchas entre las 3 repeticiones que muestran un cambio mayor a 4 veces con respecto a la referencia que es el gel 1.....	60
Figura 21. Detección de manchas de proteínas ribosomales utilizando ImageJ.....	63
Figura 22. Identificación de bandas utilizando el programa de acceso libre GelAnalyzer.....	64

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Rendimiento en la extracción de proteínas ribosomales a partir de ejes embrionarios germinados por 24 horas.	34
Tabla 2. Detección de manchas totales y emparejadas.....	53
Tabla 3. Manchas que cambian al mover los límites de veces cambio.	59
Tabla 4. Valores de densidad obtenidos con Gel Analyzer para las 3 repeticiones, incluye veces de cambio y porcentaje calculado.	65
Tabla 5. Veces y porcentaje de cambio en las manchas analizadas con Gel Analyzer después de normalizar los datos.	66

RESUMEN

El método aquí desarrollado y aplicado para el aislamiento y purificación de proteínas ribosomales a partir de ejes embrionarios germinados por 24 h provenientes de maíz, ha sido adecuado y aplicado para analizar proteínas ribosomales provenientes de ejes embrionarios de semilla de maíz, la purificación y la distribución del peso molecular de las proteínas ha sido comprobada en geles SDS-PAGE, así como el impacto que tiene su correcta purificación en geles de 2D.

Se ha optimizado la técnica de electroforesis en 2D en sistema de Urea-SDS para separar las proteínas ribosomales de ejes embrionarios de semilla de maíz, y se ha analizado el impacto de factores como: la temperatura de corrida, cantidad de muestra, tamaño, grosor del gel, voltaje aplicado y tinción, cuya correcta manipulación resulta en perfiles proteicos cada vez más claros. También ha quedado de manifiesto en los resultados las complicaciones que se presentan al optimizar una electroforesis con sistemas de urea para proteínas ribosomales, ya que por ser proteínas muy básicas tienen puntos isoeléctricos muy altos y se requiere un alto voltaje para separarlas, además presentan dificultades para resuspenderlas y cargarlas al gel.

Las dos técnicas aplicadas en este trabajo y comparadas de electroforesis de doble dimensión, es decir Urea – Ácido acético (pH ácido) y Urea- Ácido Bórico (pH básico) permiten obtener un perfil aceptable de separación de proteínas, sin embargo la técnica Urea – Ácido acético es más ventajosa debido a que se usa un pH ácido que logra que se separen más proteínas, se necesita cargar menos

proteína para obtener perfiles aceptables y por otro lado los geles resultaron con menos tinción de fondo.

Se consiguió obtener mapas de doble dimensión que definen alrededor de 90 proteínas a partir de 300 μg de proteína ribosomal de ejes embrionarios de maíz germinados y con una definición aceptable que sugerimos se puede usar en análisis proteómicos comparativos.

El análisis computacional de los mapas obtenidos muestra que tanto con pD Quest como con programas libres es posible determinar las diferencias en el número de manchas y su intensidad, y aunque PD Quest muestra los resultados más completos ya que está diseñado para eso, utilizando una combinación de software libre también se podrían obtener resultados similares y posiblemente con la misma validez.

INTRODUCCIÓN

En el control de la expresión de un gen hasta llegar a una proteína funcional se tienen varios niveles, desde el control de la transcripción en el DNA hasta las modificaciones post- transcripcionales que sufren para llevar a cabo su función.

Los ribosomas son partículas sub-celulares formadas por RNA y proteínas, que se encargan de traducir los mRNA que codifican para las diversas proteínas que necesite la célula. Diversos trabajos han sugerido que este complejo puede estar formado por una composición proteica variable, dependiendo de las necesidades y condiciones en que se encuentre cada célula. Estos cambios han sido analizados en diversas especies con técnicas de proteómica y espectrometría de masas. Las posibles diferencias en la composición del ribosoma podrían sugerir un nivel de control traduccional en el ribosoma que quizá también esté relacionado con alguna otra función extra-ribosomal. El conocimiento de estos mecanismos será relevante para comprender cómo es controlada la síntesis de proteínas en diferentes etapas de desarrollo de una planta.

Los avances en esta línea de investigación están dirigidos al conocimiento de si la heterogeneidad proteica de los ribosomas los hace selectivos en la traducción de los mRNAs en cuanto a velocidad de traducción.

Así como ocurre con todos los seres vivos, durante cada etapa de desarrollo y proliferación del maíz, se tiene la necesidad de cubrir los requerimientos proteicos que exijan las condiciones a las que está sometida la planta, de esto depende la generación de proteínas que realizan las múltiples funciones que son esencialmente requeridas en cada célula, por lo que la presencia de ribosomas y su composición resulta importante desde las primeras etapas de la germinación,

así como en cada etapa de desarrollo y condición ambiental en la que se encuentra la planta de maíz.

ANTECEDENTES

El ribosoma eucarionte

El ribosoma se define como un complejo ribonucleoproteico formado de 2 subunidades (grande y pequeña), que cataliza la reacción de peptidil-transferasa durante la síntesis de polipéptidos, un requisito indispensable para el crecimiento y la diferenciación celular (Chang *et al.*, 2005). Durante mucho tiempo el ribosoma ha sido considerado como una maquinaria micromolecular altamente conservada, que consiste de una subunidad 40S y otra 60S, compuestos por 4 rRNAs y por unas 79 proteínas ribosomales que se conservan en todos los organismos eucariontes desde levaduras hasta humanos (Venema y Tollervey, 1999).

En todos estos organismos, las dos subunidades coexisten de forma independiente y se asocian eventualmente para formar ribosomas activos y funcionales (Yonath, 2009). La subunidad pequeña del ribosoma es responsable de la unión con el mRNA y de su decodificación, verificando el correcto apareamiento de las bases entre los codones y los tRNAs aminoacilados (Doudna y Rath, 2002). La subunidad grande del ribosoma contiene el sitio activo con la función peptidil-transferasa responsable de catalizar la formación del puente peptídico entre aminoácidos durante la síntesis de proteínas (Doudna y Rath, 2002).

En los esfuerzos por elucidar la función y control que tienen los ribosomas en la traducción de mensajes en eucariontes, en las recientes décadas se han intensificado los estudios para determinar la función que llevan a cabo las estructuras y procesos relacionados con los ribosomas. Es así que la estructura y

función de los ribosomas de eucariontes han sido investigadas con especial énfasis en ribosomas de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y rata (*Rattus rattus* y *Rattus norvegicus*; Chang *et al.*, 2005).

El análisis proteómico de las proteínas ribosomales en geles de dos dimensiones (2D), así como la secuenciación de las mismas por espectrometría de masas (MS) en animales, hongos y levaduras ha permitido reconocer unas 79 proteínas ribosomales con un origen evolutivo común (32 de la subunidad pequeña y 47 de la subunidad grande) (Warner, 1989; Wool *et al.*, 1995; Planta y Mager, 1998; Sugihara *et al.*, 2010). Una valiosa compilación de las proteínas ribosomales y sus genes de varios organismos está disponible en <http://ribosome.med.miyazaki-u.ac.jp> (Nakao *et al.*, 2004).

La electroforesis en geles de 2D se ha empleado para resolver las proteínas ribosomales de varias especies de plantas superiores, incluyendo trigo, frijol (*Glycine max*), tomate (*Lycopersicon peruvianum*), maíz (*Zea mays*), tabaco (*Nicotiana tabacum*) y cebada (*Hordeum vulgare*) (Capel y Bourque, 1982; Gantt y Key, 1983; Sikorski *et al.*, 1983; Scharf y Nover, 1987; Bailey-Serres y Freeling, 1990; Koyama *et al.*, 1996).

Heterogeneidad en los ribosomas citosólicos.

Estudios realizados en 1977, donde se intentaba comparar e implementar una nomenclatura para las proteínas ribosomales que pudiera ser lo más general posible, se comparó la composición proteica ribosomal entre ratón y pollo mediante electroforesis de 2D. Para sorpresa encontraron que unas 7 proteínas ribosomales de la subunidad pequeña y unas 17 de la subunidad grande entre

ambas especies eran significativamente diferentes, identificándolas como proteínas especie- específicas (Ramjoue y Gordon, 1977).

En 1995, Remacha y colaboradores demostraron que ribosomas con composición diferente de la proteína ribosomal P (mutantes nulas vs silvestre), pueden generar diferencias en sus proteomas (Remacha M. *et al.*, 1995). En diversos estudios se cuestiona si existe una especialización funcional de los ribosomas, esto debido a los cambios en su estructura y composición proteica, cuando el organismo se somete a diferentes condiciones de desarrollo y ambiental.

La heterogeneidad ribosomal se define como aquellas diferencias en la composición proteica y/o en los componentes de rRNA, o aquellas derivadas de modificaciones post-traduccionales de los componentes ribosomales (Chang *et al.*, 2005).

Se han reportado diversas fuentes potenciales que pudieran provocar esta heterogeneidad en ribosomas. En una de ellas correspondiente a un estudio proteómico de ribosomas de levadura, fueron identificadas proteínas asociadas a la maquinaria de traducción en cantidades sub-estequiométricas, las cuales podrían potencialmente modular la función del ribosoma bajo ciertas condiciones (Fleischer *et al.*, 2006).

En un estudio en *Arabidopsis* se han identificado 249 genes que codifican para proteínas ribosomales (incluyendo 21 pseudogenes aparentes) los cuales codifican 80 probables tipos de proteínas ribosomales (32 de la subunidad pequeña y 48 de la grande), incluyendo la proteína ribosomal ácida P3 específica

de plantas, algunas de las proteínas ribosomales son codificadas por entre 2 y hasta 7 genes parálogos en algunos casos (Barakat *et al.*, 1998).

Entre las diversas fuentes de heterogeneidad del ribosoma se encuentra información que se refiere a modificaciones post-traduccionales que se llevan a cabo en las proteínas ribosomales, estas incluyen fosforilaciones, metilaciones, ubiquitinaciones y acetilaciones (Kruiswijk *et al.*, 1978; Spence *et al.*, 2000; Szick-Miranda y Bailey-Serres, 2001).

Hasta la fecha se han reportado varios tipos de modificaciones post-traduccionales que tienen las proteínas ribosomales en diferentes organismos, como ejemplos de esto Nesterchuck y colaboradores en 2011, reportaron un compendio con las modificaciones encontradas hasta ese momento en *E. coli*, donde encontramos que seis proteínas ribosomales son metiladas (S11, L3, L11, L7/L12, L16, y L33), tres proteínas son acetiladas (S5, S18, y L7), y la proteína S12 metiltiolada. Hay residuos de aminoácidos extra que son añadidos a la proteína S6 y residuos de aminoácidos son parcialmente removidos del extremo C-terminal de la proteína L31. En eucariontes las modificaciones post- traduccionales están en mayor cantidad, en un artículo donde se reporta el análisis con espectrometría de masas donde se analizaron las modificaciones que tiene la subunidad grande ribosomal citosólica de humano (Odintsova *et al.*, 2003) se encontraron modificaciones por metionina N-terminal en las proteínas L4, L9, L18A, L24, L26, P0 y P2 y acetilación N-terminal en la proteína L7. En las proteínas L12, L27A, L29, y P0 los análisis indican la presencia de metilación u oxidación en una metionina.

En plantas recientemente (Carrol, 2013) se publicó una revisión donde se reportan las modificaciones post-traduccionales en proteínas ribosomales de *A. thaliana* hasta esa fecha, 15 proteínas de la subunidad grande y 12 de la pequeña sufren modificaciones post-traduccionales, varias de ellas tienen más de un tipo de modificación o la misma en diferentes residuos de aminoácidos.

Cerca del 45 % de las proteínas ribosomales de *Arabidopsis thaliana*, identificadas en geles de 2-DE, se encontraron representadas por 2 o más manchas interpretándose como proteínas con modificaciones post-traduccionales o diferentes isoformas. Consistentemente, la identificación de las proteínas por MS ha revelado que un 34 % de las proteínas ribosomales identificadas presenta dos o más miembros de cada familia (Giavalisco *et al.*, 2005).

Mutando el gen NAT1 en *Saccharomyces cerevisiae*, gen que codifica para una acetil-transferasa NH₂- terminal que puede producir acetilaciones en proteínas ribosomales, mediante electroforesis 2-DE se encontró que unas 14 proteínas de ambas subunidades podrían estar modificadas por acetilación (Takakura *et al.*, 1992). Recientemente se ha ampliado esta información a 19 proteínas ribosomales que son acetiladas por los genes NATA y NATB y se ha demostrado que estas modificaciones tienen un efecto en la síntesis de proteínas disminuyendo su eficiencia entre un 27 % y 23 % respectivamente en ribosomas de levadura (Kamita *et al.*, 2011).

La metilación es otra modificación post-traducciona que se ha encontrado en proteínas ribosomales. Un estudio en levaduras demostró que la metilación de la

proteína S2 está diferencialmente presente durante la fase estacionaria de crecimiento (estado pasivo) de este organismo en comparación con la fase de crecimiento exponencial (estado activo). Esta metilación de la proteína S2 tiene un papel en el procesamiento y transporte del rRNA desde el núcleo al citoplasma, lo que sugiere que la modificación traduccional podría tener una participación en la movilización de la proteína S2 desde el ribosoma al núcleo durante el crecimiento (Ladror *et al.*, 2014).

Se han encontrado múltiples formas fosforiladas de la proteína S6 en tejidos de ratón (Siegmann y Thomas, 1987). En nuestro laboratorio se ha demostrado que cambios en el nivel de fosforilación en la proteína ribosomal S6 en maíz activa la síntesis de proteínas durante la germinación (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1997). Así mismo múltiples isoformas fosforiladas de la proteína S6 han sido descritas en otros estudios en maíz (Williams *et al.*, 2003).

En maíz se han encontrado fosfoproteínas ribosomales ácidas asociadas al ribosoma (Proteínas P), las cuales presentan variación en la presencia, abundancia y nivel de fosforilación tanto tejido-específica, así como en estado de desarrollo-específica, sugiriendo que esto podría tener un papel importante en la regulación del proceso de traducción (Szick-Miranda y Bailey-Serres, 2001).

Otros estudios en *Arabidopsis thaliana* y en *Zea mays* han proporcionado evidencia proteómica de variantes de ribosomas en estados de desarrollo específico así como tejido específicos, por lo cual los autores proponen que estas modificaciones pueden tener funciones en el proceso de traducción en relación a

la diferenciación celular (Szick-Miranda y Bailey-Serres, 2001; Chang *et al.*, 2005; Giavalisco *et al.*, 2005).

Aunque en mamíferos los estudios indican que no está tan marcada la heterogeneidad estructural del ribosoma, como lo parece estar en plantas y levaduras, estudios en ratón analizando tejidos como hígado, glándula mamaria y testículo, utilizando electroforesis de 2D, muestran la presencia de proteínas ribosomales tejido – específicas, identificadas como L10-like, L22-like 1, y L39-like cuyos autores sugieren también podrían tener un papel en el control de la traducción (Sugihara *et al.*, 2009).

Recientemente se ha sugerido que la mayoría de las proteínas ribosomales estudiadas podrían estar involucradas en algún otro proceso biológico dentro de la célula, además de las funciones que desempeñan en el ribosoma. Una de ellas es la proteína S3, la cual está implicada en el mecanismo de inicio de la traducción en el sitio de entrada del mRNA al ribosoma y fuera del ribosoma la más conocida es la actividad enzimática que parece tener en la reparación del DNA, aunque está involucrada también en la inducción de apoptosis, ya que se sabe interactúa con varias proteínas y participa en la regulación de la expresión genes entre ellos su auto-regulación (Graifer *et al.*, 2014).

En estudios de la estructura del ribosoma orientados a analizar la separación gradual de las proteínas ribosomales unidas al rRNA, se ha demostrado que la fuerza de interacción proteína-RNA no es la misma para todas las proteínas ribosomales que forman el complejo ribonucleoproteico. El aumento gradual de la

fuerza iónica demostró que esta fuerza de interacción proteína- RNA es diferente entre procariontes y eucariontes, en los eucariontes la unión de las proteínas al rRNA parece ser más débil con respecto a los procariontes, lo que podría sugerir que esto permitiría a las proteínas ribosomales separarse más fácilmente y movilizarse fuera del ribosoma (Piiir *et al.*, 2014).

Recientemente se propuso una nueva nomenclatura para las proteínas ribosomales, debido a que a pesar de que el ribosoma es un complejo ribonucleoproteico altamente conservado en todos los organismos, se sabe que hay proteínas que son exclusivas de alguna especie como se comentó anteriormente, por esta razón esta nueva nomenclatura tiene como objetivo evitar la confusión causada por la asignación de los mismos nombres a proteínas ribosomales de diferentes especies, que no están relacionadas en función o estructura (Ban *et al.*, 2014). En este estudio se reportan varias de las proteínas ribosomales que se han encontrado que son específicas de levaduras, humanos o bacterias.

Estos resultados sugieren que la composición de los ribosomas entre diferentes especies es variable, e inclusive como sugieren algunos autores descritos, en un mismo organismo podría haber variabilidad en diferentes tejidos o estados de desarrollo específicos, y para poder analizar esa variabilidad es necesario contar con una técnica que permita la identificación de esas diferencias. La electroforesis en doble dimensión resulta entonces una técnica muy útil debido a la capacidad que tiene para hacer análisis comparativos entre tejidos y evidenciar estas diferencias. Sin embargo, para ello es necesario definir las condiciones para

garantizar la sensibilidad y reproducibilidad de la técnica necesarias para cumplir estos objetivos.

Proteómica en ribosomas.

El objetivo de la investigación proteómica es determinar los patrones de expresión de proteínas a un nivel global bajo ciertas condiciones (Ruiz-Romero *et al.*, 2009).

Para la investigación proteómica ribosomal, los procedimientos básicos incluyen el aislamiento de ribosomas, la separación proteómica del ribosoma, la identificación del proteoma ribosomal y la validación de las proteínas candidatas. Basados en estos cuatro esenciales procedimientos, múltiples estrategias son aplicadas a la investigación proteómica ribosomal (Yan y Yan, 2015).

En la gran mayoría de investigación usando proteómica, la separación de proteínas se lleva cabo con los métodos de electroforesis en gel o cromatografía. Entre los métodos de electroforesis, la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) es muy común y se lleva a cabo para obtener bandas separadas de varias proteínas. La técnica de electroforesis en doble dimensión (2-DE) es una poderosa técnica basada en la separación en primera dimensión por isoelectroenfoque (IEF) y en segunda dimensión por SDS-PAGE, logrando una separación por punto isoeléctrico y peso molecular de varias proteínas, por lo cual es usada en una gran cantidad de investigaciones proteómicas. Sin embargo, para la proteómica ribosomal está 2-DE estándar falla al separar proteínas pequeñas y muy básicas como lo son las ribosomales, por lo que son empleadas técnicas de 2-DE alternativas.

A partir de la electroforesis desarrollada en 1970 por Kaltschmidt y Wittmann para separar las proteínas ribosomales en *E. coli*, otras variantes modificando esta técnica fueron aplicadas como la electroforesis altamente reductora y de radicales libres (RFHR) (Wada, 1986), y también otra variante utilizando Urea y ácido bórico a pH 8.6 fue utilizada para definir las diferentes fosforilaciones de la proteína ribosomal S6 en *E. coli* (Sieghmann y Thomas, 1987) y en eucariontes incluyendo el maíz se ha empleado con el mismo fin el de definir las fosforilaciones de la proteína S6 (Williams *et al.*, 2003). Por otro lado, una técnica similar fue desarrollada con condiciones más ácidas (pH 5) utilizando ácido acético (Mets y Bogard, 1973) y ha sido aplicada con éxito para resolver las proteínas de ribosomas de trigo (Warner y Gorenstein, 1977).

Otro método utilizado en la separación de proteínas ribosomales es la cromatografía, desde que esta técnica fue desarrollada alrededor de 1900 se han producido muchas variaciones de ella. En la investigación proteómica ha sido usada la cromatografía líquida (LC) con distintas fases, la resolución de esta técnica se puede incrementar usando pasos ortogonales adicionales de cromatografía (2D o 3D) en la separación previa a la identificación (Zhang *et al.*, 2010), además es sencillo acoplarla a espectrometría de masas (MS).

La principal ventaja de la LC contra 2-DE es la de poder separar proteínas presentes en menor abundancia que lo que logra la 2-DE estándar (Link *et al.* 1999), debido a que tiene una gran sensibilidad y suele ser más reproducible en comparación con las técnicas de 2-DE sobre todo cuando no se usa IEF con tiras comerciales en la 1D, esto es debido a que es más automatizada y requiere

menos trabajo manual, desde la realización de la técnica hasta el análisis y reporte de datos (Shi et al., 2004). Ambas técnicas la LC y la 2-DE requieren un tiempo de estandarización y ciertamente la 2-DE estándar tiene las limitaciones en los rangos de puntos isoelectricos que puede separar, así como en lograr separar proteínas con pesos moleculares muy altos (>200 KDa) o muy bajos (<10 KDa).

La ventaja principal de la 2-DE sobre la LC es que aunque es menos sensible con proteínas pequeñas o en menor abundancia, es capaz de mostrar cambios en estequiometría de las proteínas entre dos condiciones debido a los cambios en la densidad de las manchas resultantes, y que se pueden visualizar las diferentes movilidades de proteínas en un gel debidas a cambios discretos en su peso molecular debido a las modificaciones post-traduccionales, donde más de una mancha corresponde a la misma proteína lo cual resulta muy útil en estudios comparativos, además hay bases de datos disponibles de 2-DE estándar para algunos organismos que facilitan los análisis visuales y recursos disponibles para llevar un análisis comparativo de proteínas (Pottiez *et al.*, 2010). Estas ventajas y desventajas las convierten en técnicas que podrían ser utilizadas dependiendo lo que se busque, pero mejor aún han sido usadas como complementarias logrando un exhaustivo análisis proteómico, la 2-DE seguida de LC acoplada a MS logra obtener mayor información que con ninguna de las dos sería posible obtener por sí sola (Liu *et al.*, 2015, Pottiez *et al.*, 2010).

A la hora de identificar las proteínas, la MS es sin duda el método que se usa para la identificación de las proteínas ribosomales y está en desarrollo continuamente, esta técnica se acopla tanto a la MS como a la LC. Métodos alternativos usando

MS como SILAC, iTRAQ y ICAT pueden basarse en etiquetas moleculares, son bastante específicos pero requieren bastante manipulación, aún están en desarrollo y suelen requerir un precio más alto que la MS estándar. Técnicas avanzadas de MS han sido desarrolladas para lograr una mayor identificación de proteínas a gran escala, como la denominada MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight) que incluso ha reemplazado en muchos aspectos a la 2-DE pero sigue teniendo el inconveniente de un precio considerablemente más alto (Andersen y Mann, 2006).

Finalmente, aunque hay algunas bases de datos de estudios con información de proteómica ribosomal como uniprot y NCBI, no existe una base de datos única y específica de estudios de proteómica ribosomal, la cual es necesaria construir. Lo mismo sucede con la información a gran escala correspondiente a modificaciones post- traduccionales de proteínas ribosomales, la cual proveería un mayor y más profundo entendimiento de la función del ribosoma (Yan y Yan, 2015).

Con base en los antecedentes descritos anteriormente que indican la importancia que tiene conocer la composición de diferentes grupos de proteínas en los ribosomas, planteamos la siguiente hipótesis de trabajo:

HIPOTESIS

- ▶ Mediante el uso y optimización de un sistema de electroforesis en 2D Urea-SDS, es posible identificar de manera reproducible la composición proteica de la mayoría de las proteínas que conforman el ribosoma citosólico de maíz.

Dada la importancia que podría tener el conocer si la variabilidad en la composición proteica de los ribosomas tiene un peso específico en el control traduccional, el presente proyecto de investigación tiene por objetivo:

OBJETIVO GENERAL

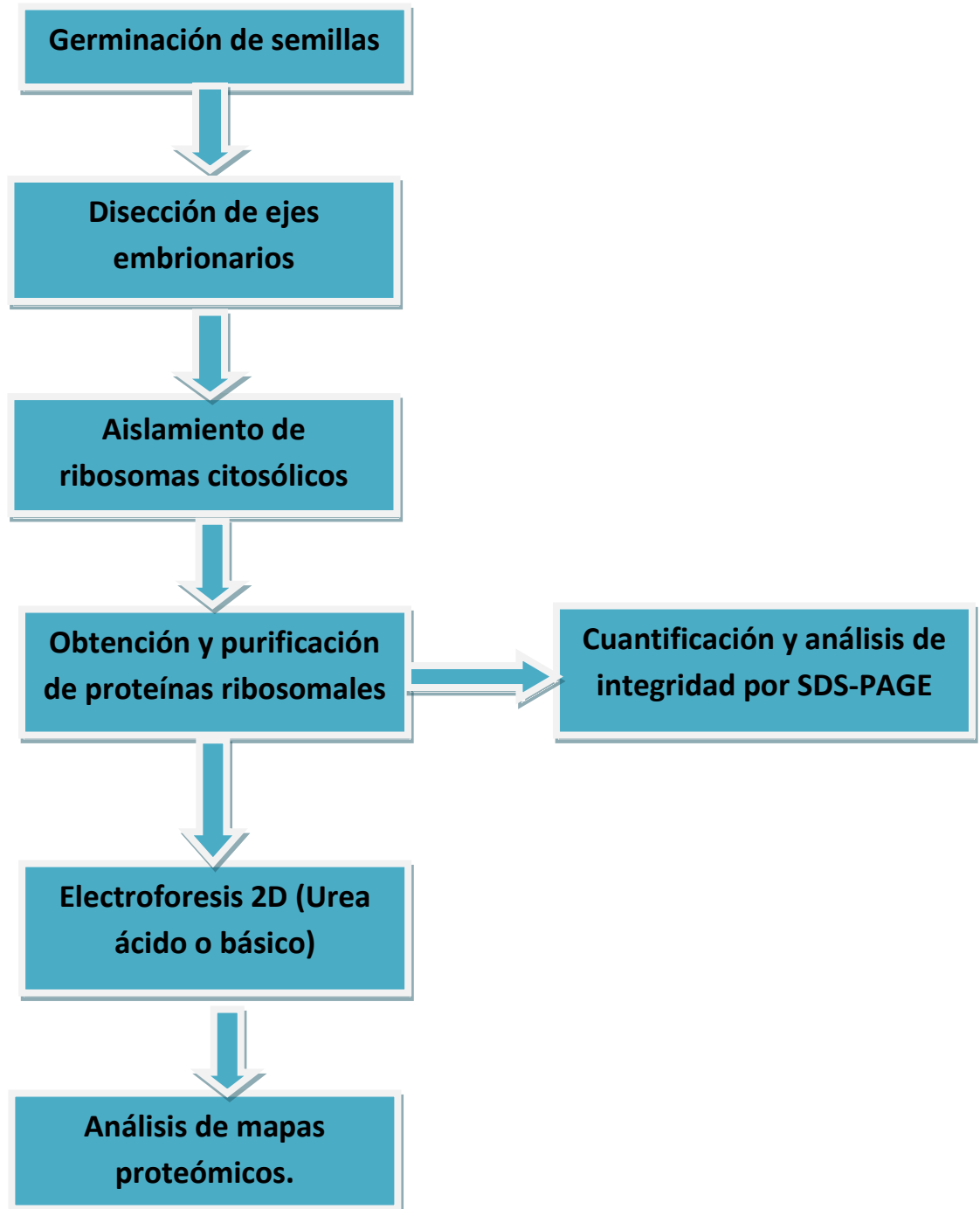
Optimizar un método de análisis mediante electroforesis en 2D capaz de separar a la mayoría de proteínas ribosomales en forma reproducible, para ser usado en análisis comparativos de ribosomas de muestras de diferentes tejidos o etapas fisiológicas de un organismo.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislamiento y purificación de las proteínas ribosomales de maíz, obtenidas a partir de ribosomas totales de ejes embrionarios germinados de maíz.
- Optimización de la técnica de electroforesis en 2D capaz de separar adecuadamente la mayoría de las proteínas ribosomales de este tejido en forma reproducible.
- Analizar los perfiles optimizados obtenidos con programas computacionales para establecer la capacidad de resolución de las proteínas ribosomales y que la reproducibilidad es suficiente para ser utilizada en análisis comparativos y estadísticos.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Establecer una metodología para poder analizar la composición proteica de los ribosomas citosólicos en ejes embrionarios de maíz.



MATERIALES Y METODOS.

Material biológico.

Se utilizaron en todos los experimentos ejes embrionarios de semillas de *Zea mays L.* cv Chalqueño, los cuales germinaron 24 h entre algodón húmedo dentro de charolas en condiciones de 28°C y oscuridad en una incubadora. Los ejes se disecaron manualmente de las semillas sanas y fueron inmediatamente congelados en nitrógeno líquido hasta que fueron usados en el aislamiento de ribosomas.

Aislamiento de ribosomas citosólicos totales (Davies y Abe, 1995; Pérez-Méndez *et al*, 1993; Williams *et al*, 2003).

De 1 a 8 g de ejes embrionarios germinados por 24 h, se homogenizó con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Este fue resuspendido con 5 mL/g tejido de buffer A (20 mM de Tris – HCl pH 7.8, 20 mM de KCl, 5 mM de MgCl₂, 0.25 M de sacarosa, 0.5 % de β- mercaptoetanol y 1 % de tritón X-100) en las primeras extracciones y posteriormente se usó el Buffer B (200 mM Tris-HCl pH 7.6, 50 mM KCl, 10mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 0.5% β-mercaptoetanol, 0.5 mg/mL heparina, 2% PTE, 1% DOC), después se incubó en hielo por 20 min. Se homogeneizo con politrón Ultra Turrax TP 18/10S2 de la marca Tekmar a unas 10,000 rpm por 5 min. Después de una centrifugación 27000 x g por 30 min, por cada 5 mL del sobrenadante se colocaron sobre 2.5 mL de un colchón de sacarosa (1 M Sacarosa, 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 25 mM KCl, 10 mM MgCl₂,

0.5% β -mercaptoetanol). Los ribosomas citoplásmicos fueron sedimentados mediante ultracentrifugación durante 3 h a 250,000 x g a 4 °C. Los pellets ribosomales crudos se enjuagaron brevemente 3 veces con 1 mL agua estéril sin agitar y fueron almacenados a -20°C hasta su uso.

Extracción de proteínas ribosomales (Pérez-Méndez *et al*, 1993; Ramjoué y Gordón, 1977; Siegmann y Thomas, 1987; Williams *et al*, 2003).

Las proteínas ribosomales fueron extraídas con ácido acético y cloruro de magnesio y precipitadas con acetona como se describe esencialmente en Ramjoué y Gordón, 1977. Las fracciones con las subunidades ribosomales 40S o 60S fueron resuspendidas en la mínima cantidad de agua estéril conteniendo 0.5% β -mercaptoetanol, entonces fueron adicionados 0.1 volúmenes de 1 M $MgCl_2$ y 2 volúmenes de ácido acético glacial en rápida sucesión y agitados por 1 h a 4 °C, centrifugados 10 min a 4 °C a 14,000x g para remover el rRNA. El pellet de RNA se lavó con 0.5 volúmenes de la mezcla original al 67 % de ácido acético, agitado en vortex a 4 °C por 10 min y centrifugado a 10,000 rpm por 10 min. Los sobrenadantes se mezclaron y la precipitación de proteínas ribosomales se llevó a cabo con 5 volúmenes de acetona a -20 °C por 30 min (puede dejarse toda la noche) y su posterior centrifugación a 14,000 x g a 4 °C por 10 min. Los pellets fueron lavados dos veces con acetona, luego con etanol absoluto, secados completamente a temperatura ambiente por 5 min y liofilizados. Los pellets liofilizados se almacenaron a -20 °C hasta su posterior uso.

Determinación de proteínas por Bradford.

Las proteínas ribosomales obtenidas fueron cuantificadas usando el método de Bradford, se usó la proteína Albumina Sérica Bovina (BSA) para realizar la curva patrón que se muestra en la Figura 1. Para tener resultados más confiables solo se tomaron los valores entre 1.5 µg y 16 µg de proteína cuyo comportamiento es más lineal, se usó la ecuación correspondiente para hacer todos los cálculos posteriores.

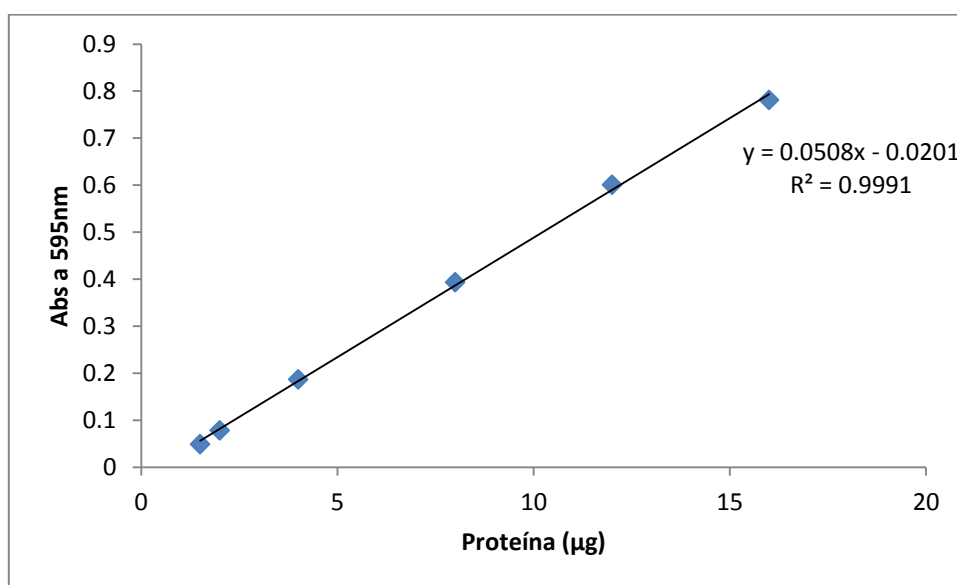


Figura 1. Curva patrón de BSA construida por el método de Bradford. los valores de la ecuación resultante se usaron para las determinaciones posteriores de proteína ribosomal.

Electroforesis en gel SDS-PAGE.

La electroforesis en 1D se realizó en geles de 140 mm x 120 mm x 1.5 mm en la cámara de Hoeffler o bien en el sistema de mini-geles de Bio-Rad (Mini-Protean II®) bajo las siguientes condiciones:

El gel inferior o separador (acrilamida 15%, bis-acrilamida 0.4%, Tris 375 mM, SDS 0.1% (m/v), TEMED 0.05% (v/v), APS 0.15%(v/v)) se dejó gelificando por 20

min entre las placas, se asperjó en la parte superior buffer de corrida (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1% (m/v)) que servirá para tener una interfaz plana y homogénea. Se removió el buffer de corrida y posteriormente se colocó la solución del gel apilador o superior (acrilamida 5%, bis-acrilamida 1.3%, Tris 12.5mM, SDS 0.1% (m/v), TEMED 0.2%(v/v), APS 1%(v/v)) y se dejó gelificar por 20 min. La corrida se llevó a cabo con buffer de corrida frío a 50 V por 90 min y posteriormente a 150 V hasta que el frente llegara casi al final del gel.

[Coomassie coloidal sensible G-250 \(Dyballa y Metzger, 2009\).](#)

Para preparar este reactivo fue importante mantener el orden de adición de los componentes al hacer la solución. Se disolvió el sulfato de aluminio (5% m/v) en agua (1.5 L), se añadió el etanol (10 % v/v) y se homogenizó, luego se añadió el azul de Coomassie brillante (CBB) G-250 (0.02 % m/v) y se dejó disolver por lo menos unas 3 h o toda la noche, cuando la solución estuvo completamente disuelta se añadió el ácido ortofosfórico (2 % v/v) para obtener el coloide con una coloración verde y finalmente se aforó a 2 L.

[Electroforesis en gel de doble dimensión \(2D\). Sistema básico con urea/ácido bórico para proteínas ribosomales \(Siegmann y Thomas, 1987; Williams et al., 2003\).](#)

El pellet de proteínas ribosomales de cada muestra biológica fue resuspendido en el buffer de muestra fresco a una concentración final de 7.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (8 M urea, 40 mM Tris-HCl, pH 8.6, 2.3 mM EDTA- Na_4 , 0.06 % [v/v] TEMED, 52 mM ácido bórico, y 5% [v/v] β -mercaptoetanol [BME], 5 % glicerol y 0.04 % pirronina G) a

temperatura ambiente por 20 min con agitación antes de la electroforesis. La separación en la primera dimensión se desarrolló en un sistema de electroforesis en un gel de acrilamida urea-básico. La electroforesis se desarrolló en una cámara en tubo vertical con 12 cm de gel separador (6 M urea, 8% [w/v] acrilamida, 0.3% [w/v] bis-acrilamida, 21 mM EDTA Na₄, 520 mM ácido bórico, 200 mM Tris-HCl, pH 8.6, 0.08% [m/v], persulfato de amonio o APS y 0.1% [v/v] TEMED) y 0.5 cm de gel apilador (6 M urea, 4 % [w/v] acrilamida, 0.2 % [w/v] bis-acrilamida, 2.3 mM EDTA Na₄, 52 mM ácido bórico, pH 8.6, 0.5% [w/v], APS, y 0.06% [v/v] TEMED) en buffer de corrida (6.5 mM EDTA Na₄, 156 mM ácido bórico, y 120 mM Tris-HCl, pH 8.6). La corrida se realizó en un cuarto frío (5°C) a 100 V por 30 min y luego a 143 V por 16 h, con migración hacia el cátodo. En este punto se puede almacenar el gel hasta 48 h a 0 °C o hasta una semana a -70 °C sin pérdida de resolución.

La separación en la segunda dimensión se hizo en un gel de SDS-poliacrilamida (15% Acrilamida, 0.4% Bisacrilamida, 0.1% SDS y Tris-HCl 0.175 M pH 8.8). Antes de la segunda dimensión, los geles de la primera dimensión se incubaron en buffer de equilibrio por 20 min (0.05 M Tris-HCl, pH 6.8, 5 % [v/v] BME, 10% [v/v] glicerol, 2 % [w/v] SDS, y 0.1 % [w/v] de azul de bromofenol). Posteriormente el gel se embebió por encima del gel de la segunda dimensión con agarosa (0.05 M Tris-HCl, pH 6.8, 5% [v/v] BME, 10% [v/v] glicerol, 2% [w/v] SDS, y 1% [w/v] agarosa). La segunda dimensión fue desarrollada usando una cámara Hoeffer© con geles de 14 cm x 12 cm x 1.5 mm en un cuarto frío a 50 V por 60 min y luego a 150 V por 8 h hasta que el frente de corrida llegara al final del gel. Los geles fueron teñidos con Azul de Comassie Colidal G250 por unas 12 h y desteñidos por 6 h.

Electroforesis en gel de doble dimensión (2D). Sistema de Urea- ácido acético/ SDS (Modificación al método descrito por Warner y Gorenstein, 1977).

Las proteínas ribosomales (800-1000 μg) fueron resuspendidas en 60 μl de buffer de muestra (10 % β - mercaptoetanol, 10 % Glicerol, 1 % ácido acético, 8 M Urea y 0.01% Fucsina Básica) e incubadas a 30°C por 15 min antes de ser cargadas en el gel.

Se preparó la solución A (acrilamida 4%, bisacrilamida 0.1%, Urea 8 M, 0.057 M Bis-Tris, pH 5.0 ajustado con ácido acético, 0.1 % TEMED y 0.6 % APS), se desgasificó y se añadió entre las placas y se colocó 0.5 ml buffer de corrida B en la interface superior con mucho cuidado, entonces se dejaron polimerizando por 30 min los geles (120 mm largo x 4 mm de radio en tubos de acrílico). La corrida se llevó a cabo en una cámara de electroforesis en tubo vertical CBS Scientific a 100 V por 60 min y posteriormente a 150 V por 12 h a 4°C o hasta que el frente de corrida estuviera a 1 cm del final. Esta primera dimensión se llevó a cabo con buffer de corrida B (0.01 M Bis-Tris pH 4.0 ajustado con ácido acético) en la cámara superior y buffer C (0.179 M Acetato de potasio pH 5.0 ajustado con ácido acético) en la cámara inferior. Los geles pueden ser almacenados a -70°C hasta un mes para la corrida en segunda dimensión. Cada gel fue incubado durante media hora en buffer de equilibrio (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 1 % SDS y 0.01 % azul de bromofenol) con agitación constante antes de la corrida en segunda dimensión. La segunda dimensión se llevó a cabo en una cámara Hoeffer con geles de 140 mm x 120 mm x 1.5 mm, se preparó el gel separador (15 % Acrilamida, 0.4 % Bisacrilamida, 0.1 % SDS y Tris-HCl 0.175 M pH 8.8) y el gel de la primera

dimensión se fijó con agarosa (0.05 M Tris-HCl, pH 6.8, 5 % [v/v] BME, 10 % [v/v] glicerol, 2 % [w/v] SDS, y 1 % [w/v] agarosa) en la parte superior del gel y separado 0.5 cm del gel separador, los geles se corrieron en frío (hielo local) a 50 V por 90 min y posteriormente a 150 V por unas 6 h o hasta que el frente de corrida llegara al final del gel. Los geles se tiñeron con Azul de Comassie Colidal G250, por unas 12 h y desteñidos hasta eliminar el fondo con solución para desteñir, los geles pueden ser almacenados a -70°C indefinidamente sin pérdida de resolución.

[Análisis de identificación de manchas y densitometría de geles de doble dimensión.](#)

Para el análisis de los geles se uso el software PD Quest versión 8.0 de Bio-Rad, la identificación de manchas y los análisis de densitometría se hicieron de acuerdo a la metodología sugerida en las guías oficiales de uso del software.

Por otro lado se realizaron los análisis con software de acceso libre de acuerdo a como lo describe Natale y colaboradores (Natale et al., 2011). El artículo (DOI: [10.4137/PRI.S7971](https://doi.org/10.4137/PRI.S7971)) cuenta con la descripción y los link web necesarios para descargar todo lo necesario para reproducir los análisis. También se uso el software Gel Analyzer <http://www.gelanalyzer.com/index.html> desarrollado por el Dr. Itzvan Lazar para el análisis de densitometría de geles en 1D y se uso la guía disponible en la página del programa para realizar los análisis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Extracción de material biológico, aislamiento y purificación de proteínas ribosomales:

A partir de unas 100 semillas de maíz que se pusieron a germinar, se obtuvieron entre 1 y 2 gramos de ejes embrionarios, los cuales se usaron para analizar el rendimiento e integridad de las proteínas ribosomales y fueron posteriormente analizadas mediante la electroforesis de doble dimensión.

En la Tabla 1 se muestran los rendimientos aproximados obtenidos de la purificación:

Tabla 1. Rendimiento en la extracción de proteínas ribosomales a partir de ejes embrionarios germinados por 24 horas.

Ejes embrionarios (g)	Proteína ribosomal obtenida (mg)	Rendimiento (mg de proteína/g de ejes)
3.43	2.97	0.86
7.28	6.30	0.86
A partir de aquí se usó homogeneizador politrón posterior al molido con mortero.		
8.84	9.34	1.05
A partir de aquí se comenzó a usar la extracción con Buffer B en lugar de A.		
8.53	13.30	1.56
6.00	9.42	1.57

El rendimiento aumentó cuando además de moler con el mortero la extracción se realizó con el uso del politrón, sin embargo el uso del buffer B mejoró considerablemente el rendimiento, ya que al contener mayor cantidad de detergentes se consigue una mayor extracción de proteínas ribosomales por la liberación de aquellos ribosomas asociados a membrana y citoesqueleto.

Al final, la proteína mostraba una apariencia de un polvo blanco fino, que se almacenó en fracciones de aproximadamente entre 500 μg hasta 2000 μg para su uso en los geles. Con la práctica se hizo evidente que lavados posteriores con acetona y etanol fríos a -20°C ayudaba a tener mayor pureza en las proteínas y así consecuentemente mejor definición en las bandas o manchas obtenidas en los perfiles.

Durante estos procedimientos se logró mejorar tanto el rendimiento en unidades de mg de proteína ribosomal/ g de eje así como la pureza de las proteínas ribosomales obtenidas.

Separación de las proteínas ribosomales por geles de SDS-PAGE

Para descartar algún problema en la integridad de las proteínas ribosomales o alguna contaminación, fue necesario realizar análisis en geles de SDS-PAGE antes de realizar el corrimiento de las muestras en los geles de 2D. En la figura 2 se muestra un análisis de SDS-PAGE de las proteínas ribosomales obtenidas.

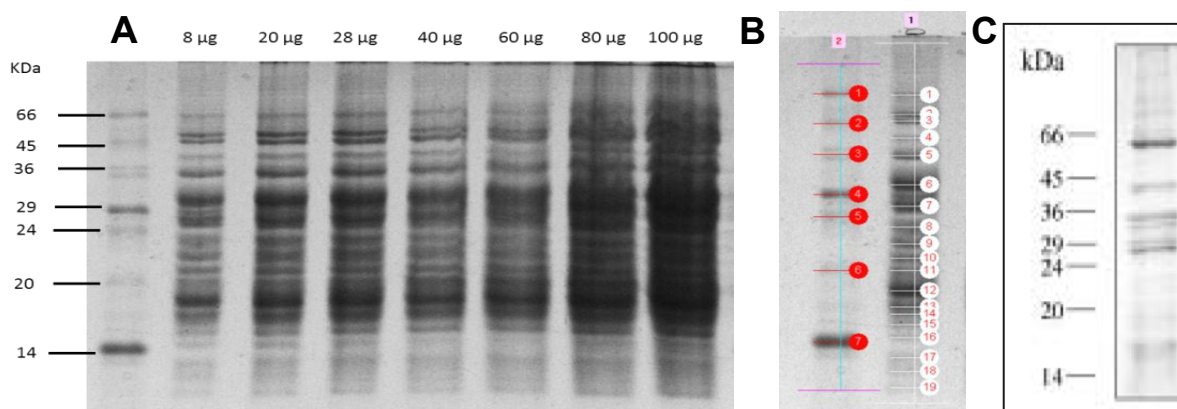


Figura 2. Visualización en gel de poliacrilamida-SDS de diferentes concentraciones de proteínas ribosomales A) Geles mini de proteínas ribosomales en condiciones de 0.02 A por 3 h y teñido con azul de Coomassie para analizar la separación las proteínas antes de la corrida 2D Urea-ácido acético. B) Análisis llevado a cabo con un programa computacional que identifica bandas en el perfil obtenido. C) Perfil de SDS-PAGE (Beltrán-Peña et al, 2001), para maíz germinado por 22 h en medio MS.

Se lograron visualizar unas 19 bandas de proteínas con pesos moleculares entre 10 y 66 KDa definidos en geles mini, sin embargo al hacer este análisis en geles grandes (12.5 cm x 14 cm x 1.5 mm) se encontró que se pueden observar más de 60 bandas (Figura 3), lo que nos indica el número de las proteínas que se puede definir en una gel de una dimensión, sin embargo las bandas están muy juntas como para lograr cortar una banda con solo una proteína y mandarla a identificar, además de que varias proteínas pueden compartir el mismo peso o muy similar por lo que fue necesario realizar una doble dimensión.

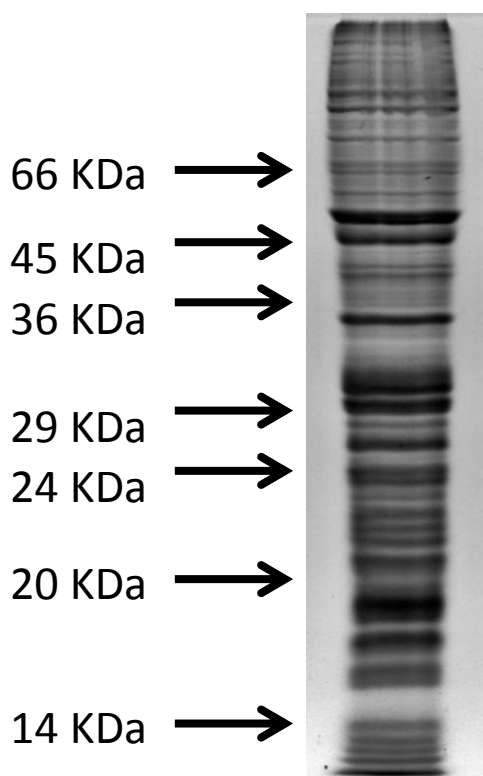


Figura 3. Resolución de bandas de proteínas ribosomales en una electroforesis en geles grandes (140 mm x 120 mm x1.5 mm). Se cargaron los geles con 40 µg de proteína ribosomal de ejes embrionarios germinados 24 h, se muestran un gran número de bandas que no lograron definirse con geles mini.

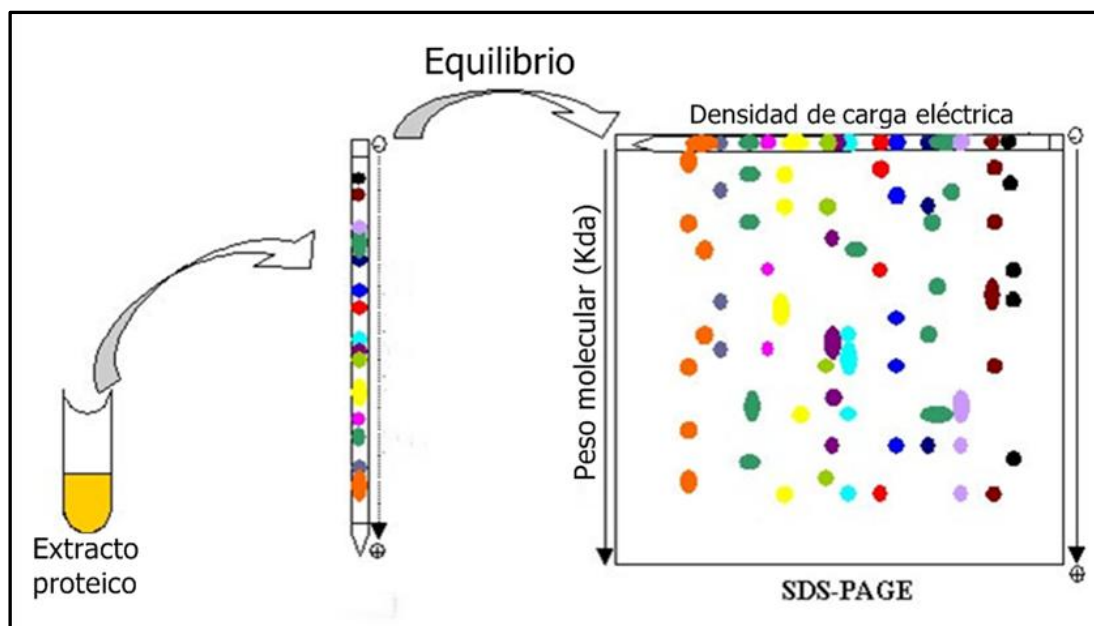


Figura 4. Pasos en la técnica de electroforesis en doble dimensión. Imagen tomada y modificada de www.seed-proteome.com

El esquema ejemplifica de manera general lo que ocurre al llevar a cabo una electroforesis de 2D y el objetivo que se espera es lograr una separación adecuada en el perfil de proteínas.

Electroforesis en gel de doble dimensión (2D). Sistema básico con urea/ácido bórico para proteínas-r (Siegmann y Thomas, 1987; Williams et al., 2003).

Desarrollo y optimización en la primera dimensión.

La optimización de la técnica de separación de proteínas ribosomales incluyó que en la 1D se llevaran a cabo diversas modificaciones que mejoraron los resultados como se mostrará a continuación.

La primera dimensión se realizó en un principio en un sistema de electroforesis en placa del sistema Hoeffer en geles de 140 mm x 120 mm x 1.5 mm y disectando el carril correspondiente con navaja para usarlo en la 2-DE.

En primer lugar se tomó la consideración de cargar más proteína de acuerdo a lo propuesto por Pérez-Méndez et al, 1993, ya que al teñirlo no eran visibles las bandas o manchas, y además se consideró en disminuir el tiempo de corrida, considerando que pudieron haberse salido las proteínas del gel por exceso de tiempo de corrida. En la Figura 5A se muestra que la proteína cargada era muy poca para poder visualizarse correctamente, esta figura también pone de manifiesto que las proteínas se difundían lateralmente en el carril lo que dificultaba cortar el carril justo por donde la proteína corría en el gel, ya que no siempre avanza de manera recta.

Debido a que la electroforesis de estos geles grandes genera calor, la corrida se puede ver afectada por esto, haciendo que corra más rápido que en frío y que las bandas producidas no sean definidas por la difusión que se facilita con el calor. Por esta razón se llevó a cabo la corrida en frío para disminuir el efecto de calentamiento del gel debido al voltaje, además se cargó más proteína y también se cuidó de ajustar el pH del buffer de corrida. Las proteínas en una corrida de electroforesis en frío migran más lento, su movilidad es menor, esto mejoró notablemente la resolución como se muestra en la Figura 5B. Sin embargo también se pueden observar problemas en la corrida debido al efecto “sonreído” del gel, es decir un ensanchamiento y difusión de los carriles, debido quizá a la fuerte carga de las proteínas ribosomales que son muy básicas, muchas de ellas

con puntos isoeléctricos de más de 10, y por otro lado la gran cantidad de proteínas cargadas (aprox. 800 μ g).

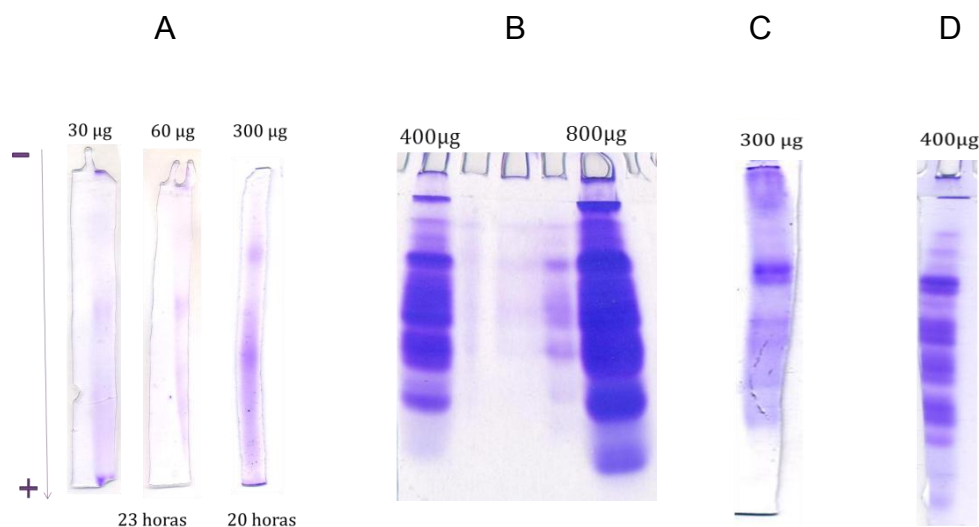


Figura 5. Separación mediante electroforesis Urea-básico en 1D de las proteínas ribosomales. Los carriles cortados fueron teñidos con azul de Comassie. A) Condiciones iniciales de tiempo y cantidad de proteína cargada, corrida a temperatura ambiente, 20 h a 145 V B) Cambio a condiciones de 4°C en la corrida y con más proteína ribosomal C) Condiciones de corrida por 19 h a 143 V en frío pero sin lavar la proteína con acetona y etanol D) Condiciones de 19 h a 143 V lavando la proteína con acetona y etanol.

En las figuras 5C y 5D podemos ver el efecto que tienen los lavados con acetona y etanol a la proteína ribosomal para finalmente liofilizar. En la figura 5C solamente se obtuvo el pellet y se dejó secar a temperatura ambiente como se sugiere en Ranjoue y Gordon, 1977. La posible eliminación de remanentes de RNA y lípidos que pudieran afectar la resolución en la 1D es alguna de las causas probables por las que el lavado mejoró la resolución. Además hasta este punto se había logrado una separación correcta de las proteínas ribosomales mostrando varias bandas, pero persistía el problema de la difusión de las proteínas al correr en el gel, por lo que resultaba muy difícil cortar un carril correctamente, este problema ocasionaba que al disecar el carril se perdiera proteína de algunas bandas y al cargar este

carril en la segunda dimensión se generaran diferencias en la cantidad de proteína ribosomal cargada lo cual ya no sería reproducible.

Proteína que no entraba al gel separador.

Otro problema que se presentó en este proceso fue que había proteína que no entraba al gel separador y se queda en los pozos del gel apilador, disminuyendo así el rendimiento de proteína que realmente se está separando. Como se puede observar en la parte superior de las figuras 5B, 5C y 5D al teñir el gel hay proteína en la parte superior. Para demostrar que realmente se trataba de proteína ribosomal y la cantidad que era, se colectó con cuidado esta proteína después de haber corrido una primera dimensión y fue analizada con SDS-PAGE, en la Figura 6 se demuestra que se trata de proteína ribosomal que no entra en el gel, se cuantificó por el método de Bradford y se encontró que es una cantidad de alrededor de 200 μg de proteína ribosomal, es decir un 25 % de proteína cargada que no entra en el gel de electroforesis.

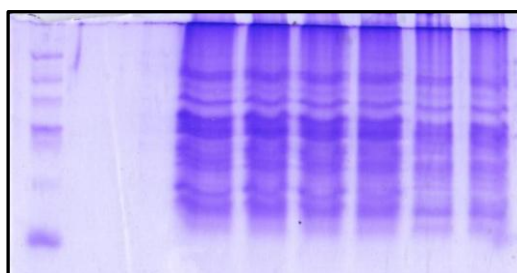


Figura 6. Separación por electroforesis SDS-PAGE de las proteínas ribosomales recuperadas de los pozos de carga de la 1D Urea- Básico, gel teñido con Azul de Coomassie.

La razón de este problema nuevamente podría haber sido debido a la carga eléctrica de las proteínas ribosomales, por esa razón se usan tan altas concentraciones de Urea (8M) para poder solubilizarlas en el buffer de muestra y

en los geles, pero al entrar en contacto con el buffer de corrida que no contiene Urea, podría formar agregados que ya no podrían entrar en el gel y separarse.

Para solucionar este problema de acuerdo con Ranjone y Gordon, 1977 la proteína fue cargada en los pozos sin buffer de corrida, el cual es adicionado posteriormente con cuidado sobre la muestra re-suspendida en buffer de carga, y se llevaba a cabo la separación electroforética lo antes posible.

Optimización de la segunda dimensión de la electroforesis.

La segunda dimensión primero se llevó a cabo utilizando el carril cortado y obtenido de la primera dimensión, los primeros resultados obtenidos mostraban que los geles en la primera dimensión no tenían suficiente proteína o bien corrían más tiempo del adecuado (Figura 7A), estos problemas fueron similares a los encontrados en un principio con la 1D, explicados como poca proteína cargada en la 1D y el calentamiento del gel por falta de enfriamiento, lo que provocó difusión de las bandas y el corrimiento acelerado de las proteínas. Se logró mejorar el perfil corriendo el gel a 4°C y con más proteína, además se probó sellando el gel de la 1D sobre la 2D con agarosa (Figura 7B) y con gel apilador de sistema SDS-PAGE (Figura 7C). No hubo diferencia considerable en ambos tipos de sellado así que se decidió usar agarosa para las posteriores pruebas ya que facilitaba su uso. Aún hasta este punto era necesario mejorar la resolución de los perfiles hasta que permitieran identificar aprox. 60-70 spots visibles en el gel de segunda dimensión (Siegmann y Thomas, 1987; Williams et al., 2003) pero más importante era lograr la reproducibilidad lo cual hasta este momento no se había logrado obtener.

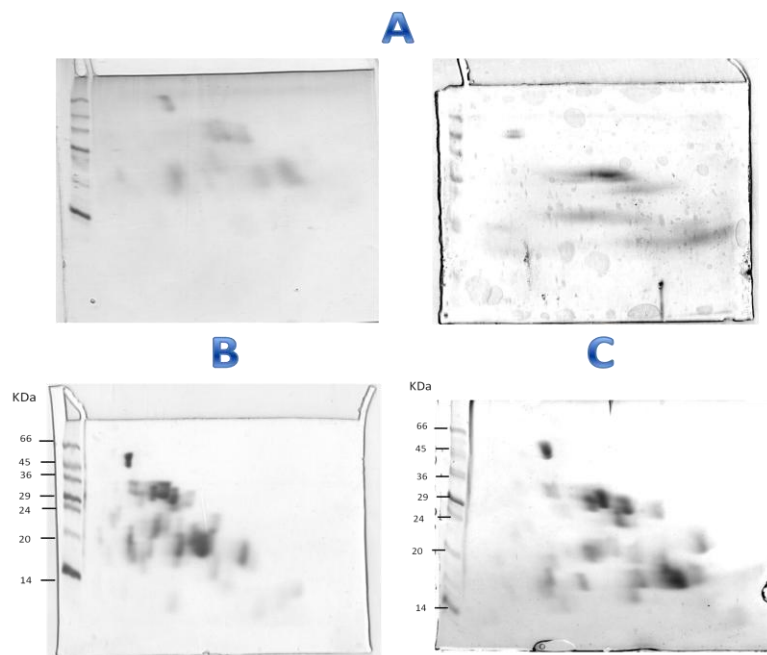


Figura 7. Proteínas ribosomales cargadas en geles de 2D, corrida en SDS- PAGE y teñido con azul de Coomassie A) Ejemplos de geles que muestran que faltaba cargar mayor cantidad de proteína en el gel y difusión en la 1D. B) Gel sellado con agarosa C) gel sellado con gel apilador de SDS.

Utilización del sistema de electroforesis en gel vertical en tubo de CBS Scientific para la primera dimensión.

Los resultados anteriores mostraron que era necesario el uso de un sistema especializado para llevar a cabo la electroforesis en primera dimensión y así lograr mayor definición y sobre todo mejor reproducibilidad en los geles.

Por lo que se comenzó a usar el sistema de geles en tubo vertical a partir de las condiciones optimizadas anteriormente y los resultados fueron notablemente mejores (Figura 8).



Figura 8. Separación de proteínas ribosomales en gel de electroforesis en 1D Urea – básico, con 800 μg de proteína de ejes embrionarios germinados 24 h de germinación y teñidos con azul de Coomassie. Se logran apreciar con claridad bandas definidas.

Separación de proteínas ribosomales en 2-DE utilizando el sistema de electroforesis en tubo vertical.

Los geles obtenidos en la primera dimensión mediante la electroforesis en tubo de vidrio fueron sometidos a una 2D, la cual fue modificada para que la tira de gel de 1D pudiera entrar en la placa, esto ocasionó que el grosor de los geles en 2D aumentara de 2 mm a 3 mm. Esto provocó que se usara más proteína para poder visualizar las proteínas y que usaran unos 1000 μg por cada gel, lo cual era benéfico ya que se lograrían visualizar mejor las manchas en el gel (Figura 9).

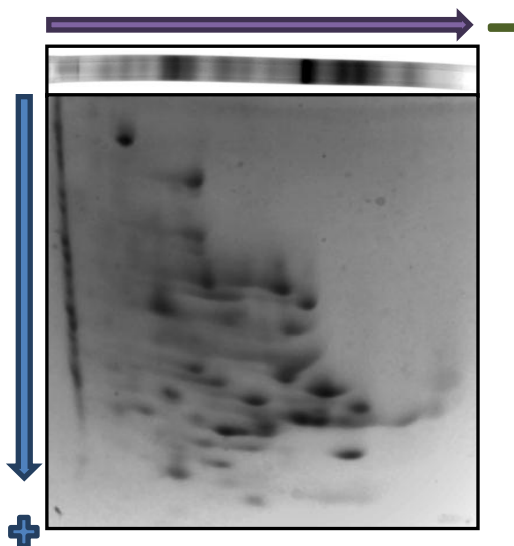


Figura 9. Separación de proteínas en gel en 2D mediante la técnica urea- básica. Los geles fueron cargados con aprox. 1000 μg de proteína ribosomal en la 1D, y corrieron a 4°C por 30 min a 50 V y posteriormente por 8 h a 143 V en la 2D.

Sin embargo, al utilizar tubos de vidrio con esta técnica de electroforesis vertical, una gran cantidad de geles se rompían al tratar de sacarlos del tubo de vidrio al cual quedan muy adheridos, esto ocurre porque los geles al contener 8 M de urea y 8 % de acrilamida son muy quebradizos y se rompen al intentar sacarlos de los tubos y posteriormente embeberlos entre las placas de la segunda dimensión, por lo que ya no resultaban confiables al unir las partes rotas. En un intento de evitar este problema se silanizaron los tubos de vidrio lo cual aunque ayudó pero no resolvió el problema.

La reproducibilidad es algo complicado de obtener y más aun con la ruptura de los geles, lo que provocaba que algunos geles se obtuvieran como se muestra en la Figura 10.

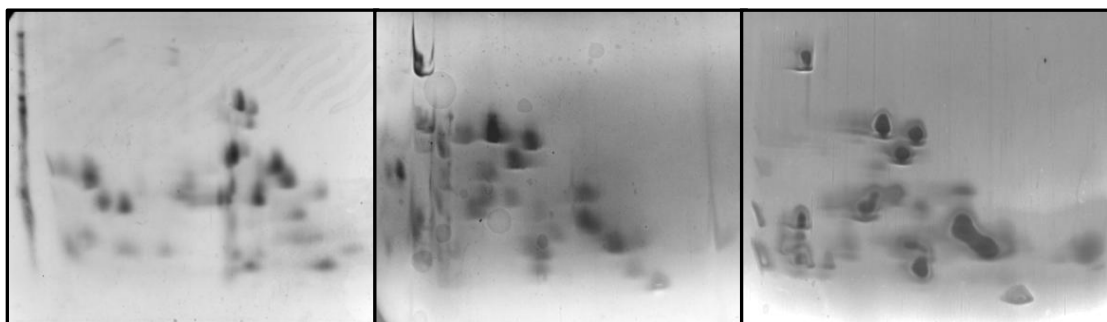


Figura 10. Separación de proteínas ribosomales en geles de 2D cargados con 800 μ g de proteína. Al unir fragmentos rotos de la 1D se tiene la posibilidad de no lograr una buena definición o problemas en la corrida que afectan la reproducibilidad.

Electroforesis en gel de doble dimensión (2D). Sistema de Urea- ácido acético/ SDS (Warner y Gorenstein, 1977).

Esta técnica fue empleada con el objetivo de comparar la resolución que se pudiera obtener con estos geles en comparación con los descritos anteriormente, ya que al tener un pH de 5 se esperaba que se resolvieran proteínas ribosomales con un punto isoeléctrico más bajo de 8.6 que se usa en la técnica antes descrita, además de una mejor separación debido a la carga.

Se realizó de acuerdo a Warner y Gorenstein (1977) en frío para evitar pérdida de resolución por el calor que genera el voltaje, y los resultados de la 1D se muestran en la Figura 11 A. La segunda dimensión se corrió a temperatura ambiente sin embargo no tuvo los resultados esperados (Figura 11 B y C).

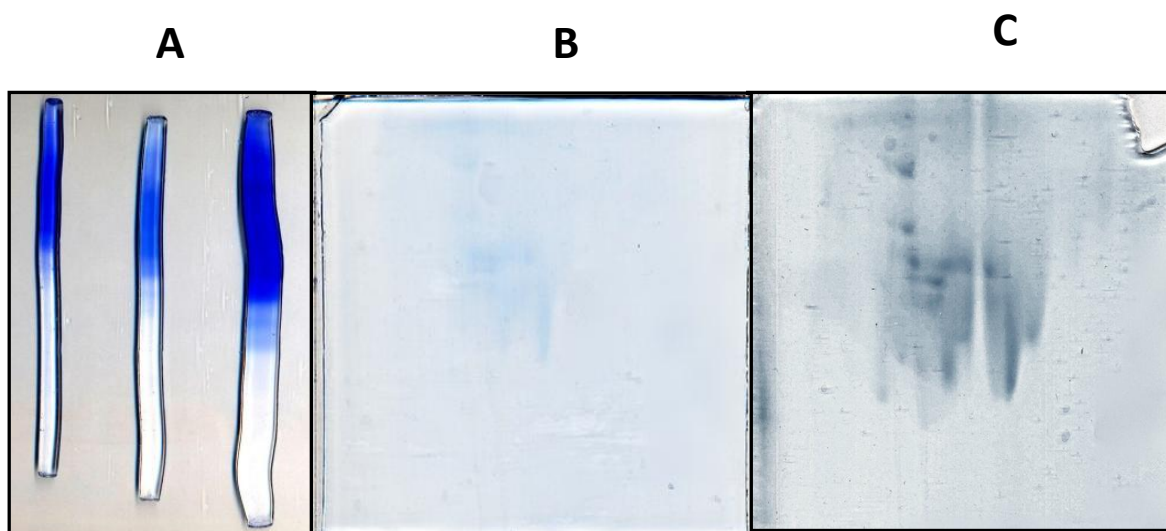


Figura 11. Proteínas ribosomales separada en geles de Urea- Ácido acético, teñidos con azul de coomassie. A) Geles de 1D Urea 8M pH 5, corrido por 8 h B) Gel de 2D corrido a 100 V por 14 h a temperatura ambiente, no hubo manchas presentes. C) Gel de 2D corrido a 150 V por 1.5 h a temperatura ambiente, hay difusión en las manchas.

Con los resultados anteriores se observó que en la primera dimensión era necesario adaptar algún cambio como correr los geles por más tiempo ya que como se observa quedan las proteínas en la primera mitad del gel. En la segunda dimensión la corrida sería por menos tiempo y en frío, ya que era probable que la proteína se estuviera saliendo del gel y había difusión. Por lo que se realizaron pruebas para encontrar el tiempo adecuado en ambas dimensiones, los resultados después de llevar a cabo esto se muestran en la figura 12 A. se logró encontrar el tiempo para tener una separación adecuada en la 1D a 4°C por 12 h, donde el frente de corrida con fucsina básica quedaba a aproximadamente a 1 cm del frente del gel. Y para la segunda dimensión corriendo a 4°C por 8 h la separación parecía ser adecuada (figura 12 B)

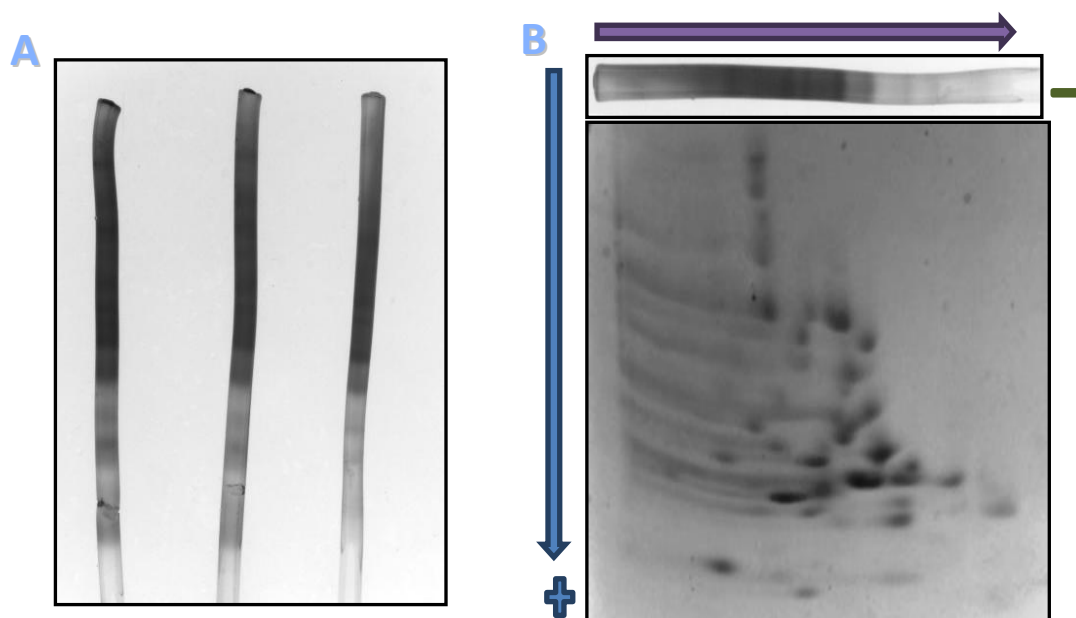


Figura 12. Separación electroforética de proteínas ribosomales en geles de primera y segunda dimensión usando la técnica Urea- ácido acético y teñidos con azul de coomassie. A) Electroforesis en tubo vertical con 600 μ g de proteína ribosomales, se corrió en las condiciones descritas en la metodología y se logran apreciar algunas bandas. B) Electroforesis en doble dimensión de los geles mostrados en A.

Comparación entre ambas técnicas.

Hasta este punto ambas técnicas de doble dimensión producían mapas bidimensionales y con una definición aceptable, aunque presentaban detalles como las líneas horizontales en los geles que parecían haberse formado en la 1D. Sin embargo la técnica de urea-ácida presentaba algunas ventajas sobre la urea-básica:

1. Solo necesitaban 600 μg en lugar de 1000 μg para lograr una definición parecida.
2. Al tener un pH más ácido era más probable que pudiera definir mayor cantidad de proteínas ribosomales, como por ejemplo aquellas con puntos isoeléctricos entre 5 y 8.6.
3. Al tener los geles la mitad de la concentración de acrilamida, eran mucho menos quebradizos, por lo que resultaba probable intentar meterlos en un gel de 2D más delgado, para usar menos proteína, y también resultaba más sencillo sacarlos de los tubos de vidrio.
4. Los tiempos de corrida fueron un poco más rápidos. Se necesitaron unas 12 h para separar la 1D de la técnica a pH 5 mientras a pH 8.6 fueron necesarias al menos 16 h.

Modificaciones finales a la técnica de electroforesis en 2D Urea-ácido.

Por estas razones se hicieron más modificaciones para que pudiera ser usada en el análisis comparativo, la técnica que se necesita debe ser reproducible, práctica y con buena definición, por lo que se llevaron a cabo las siguientes modificaciones adicionales a la técnica de Urea-ácido.

1. Se usó otra técnica de tinción de proteínas (Dyballa y Metzeger, 2009), azul de Comassie coloidal, que es más rápida y sensible que la usada anteriormente, la cual está descrita en la metodología.
2. Se usaron a partir de aquí tubos de acrílico (Talens *et al*, 1973 y Dice y Schrike, 1971) para obtener los geles de 1D más fácilmente y sin rupturas, y resultara más sencillo colocarlos en la 2D.
3. Gracias a lo anterior se logró embeber un gel de 1D en un gel de 2D de 1.5 mm de grosor, lo que permitió disminuir la cantidad de proteína necesaria de 600 μg a solo 300 μg .
4. Se alargó el tiempo de corrida para el gel apilador de 30 min a 90 min en la 2D, para asegurar una definición adecuada al permitir a las proteínas apilarse por más tiempo.
5. Contrario a la 1D, se encontró que para la 2D no era necesario correr en el cuarto frío sino solo en condiciones de enfriamiento local con hielo para evitar el calentamiento, esto hace más rápida la corrida ya que no es tan intenso el enfriamiento.

Con base en las modificaciones anteriores se logró obtener geles con una definición muy buena, sin bandas horizontales, con menor cantidad de proteína que la usada anteriormente e incluso en la técnica original, la reproducibilidad es aceptable como se muestran en la Figura 13.

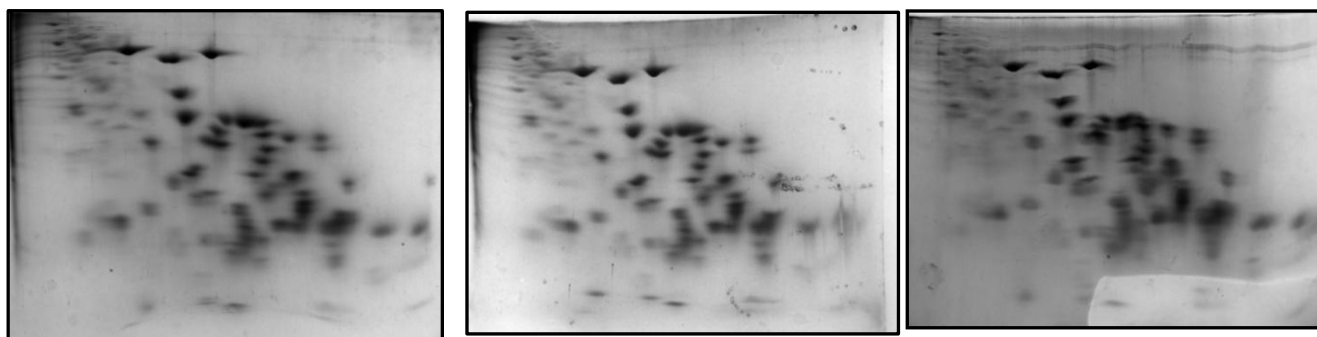


Figura 13. Separación de proteínas ribosomales mediante geles de electroforesis en 2D usando la técnica urea-ácida modificada usando 300 µg de proteínas ribosomales. Las condiciones de corrida son en 1D a 4°C primero 50 V por 60 min y luego a 150 V por 12 h, y para la 2D en frío a 50 V por 90 min y luego a 150 V por 3.5 h.

Análisis computacionales de los geles obtenidos.

Una vez conseguidos los resultados anteriores en los geles de doble dimensión, es necesario utilizar algún programa computacional para poder analizar las manchas de proteínas que resultan, comprobar que hay reproducibilidad en los perfiles y conocer el alcance que tiene la técnica, esta información permitiría poder usarla en análisis comparativos de proteomas ribosomales.

Aunque no se ha reportado el uso de programas computacionales para analizar geles obtenidos mediante esta técnica de 2D, decidimos utilizar programas para analizar los geles ya que:

- Mediante algoritmos y pruebas estadísticas se puede tener mayor confiabilidad en los resultados obtenidos para determinar si existen diferencias.
- Proporcionan un análisis más fino y detallado de los geles, permitiendo incluso el análisis de cada mancha para determinar las diferencias.

- Cada vez es más común e incluso necesario (en geles de isoelectroenfoque) analizar los perfiles obtenidos con programas computacionales.

Sin embargo, publicaciones recientes (Natale *et al*, 2011; Natale *et al*, 2012; Li y Seillier, 2011; Øye *et al*, 2013) han discutido sobre este tema, debido a que existen múltiples plataformas de análisis computacional de geles de doble dimensión a la venta, todas ellas con costos bastante elevados. Se argumenta que estas plataformas de análisis comerciales no tienen un mismo criterio para hacer el análisis de geles, por lo que los resultados obtenidos con una u otra pueden ser bastante diferentes entre sí, y van a depender mucho del tipo de algoritmos que utilicen y los parámetros que el experimentador pueda controlar.

Incluso se menciona que realizando pruebas con software de acceso libre, es posible lograr la misma capacidad de análisis, comparado con lo que lograrían los programas comerciales, ahorrándose los costos excesivos que tienen.

Por esta razón se decidió probar esto con los geles obtenidos, realizando una comparación entre los análisis que se pueden hacer en uno de los programas comerciales más conocidos como es PdQuest, comparado con análisis llevados cabo con software libre, que incluyen programas como Image J y Gel Analyzer.

Con esta idea en mente se analizaron los siguientes parámetros, usando dos tipos de programas para cada juego de experimentos:

- La capacidad que tienen de detectar manchas de proteínas.
- La capacidad que tienen de detectar diferentes manchas juntas. Definición.

- La capacidad que tienen para detectar diferencias entre las manchas, y si corresponden a lo que realmente se ve a simple vista. Cambios reales.
- El nivel de reproducibilidad que reportan entre las diferentes repeticiones de geles.
-

[Análisis con PD Quest de los geles de 2D de proteínas ribosomales.](#)

PD Quest es una de las plataformas más utilizadas para analizar geles de doble dimensión. Es un software desarrollado por BioRad, es capaz de detectar manchas de proteínas en un gel, analizar diferencias entre grupos de geles comparándolos mediante un gel maestro que es formado por las repeticiones de un mismo tratamiento, y puede hacer análisis estadísticos de las diferencias que encuentra. A pesar de que tiene una interfaz amigable, requiere bastante manipulación de los datos por el usuario y por lo tanto los análisis son dependientes de eso, además de requerir tiempo para realizar el proceso.

Comparación entre los triplicados usando PD Quest.

Para comparar las manchas detectadas de los diferentes triplicados utilizando PD Quest se trató a cada repetición como un tratamiento, analizando las diferencias que el programa detecta y en qué medida hay reproducibilidad en los resultados obtenidos, el programa no puede arrojar resultados estadísticos ya que se requieren al menos dos repeticiones por tratamiento, sin embargo nos ayuda a darnos una idea de la reproducibilidad y comparar el número de manchas y la intensidad de ellas en los 3 geles.

Detección de manchas utilizando PD Quest.

El programa PD Quest utiliza algoritmos para detectar manchas el algoritmo “Rolling ball” que es capaz de detectar diferencias de densidad en escala de grises en una superficie en 3D a partir de una imagen obtenida de un gel, ya sea por fotografía o escaneo. El proceso requiere bastantes parámetros que se deben cambiar hasta encontrar los más adecuados para cada imagen. Sin embargo, una vez elegidos los parámetros más adecuados, la detección de las manchas, la obtención del maestro de una condición específica y la medida de las diferencias son procesos que se hacen automáticamente. Sin embargo, una vez terminado el proceso es necesario un nuevo análisis para asegurarse que el programa realmente detecta las manchas que deseamos comparar.

Después del proceso automatizado de detección de manchas que el programa realizó comparando los geles 1 y 3, con 2 respectivamente, se procedió a revisar si cada mancha correspondía a una proteína y finalmente se alinearon en cada repetición. Los resultados antes y después de alinear manualmente los geles y de revisar mancha por mancha para asegurarse de que realmente está comparando lo que se requiere se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Detección de manchas totales y emparejadas.

Numero de Gel (repetición)	Manchas detectadas automáticamente	Manchas emparejadas automáticamente	Manchas detectadas después del análisis manual.	Manchas emparejadas después de análisis manual.
1	133	61	97	97
2	143	143	97	97
3	120	53	93	94

Como podemos observar en la tabla 2 la detección automática no fue muy eficiente, probablemente a que las manchas que obtuvimos de proteínas ribosomales proveniente de nuestros geles son mucho más grandes que aquellas obtenidas con geles de isoelectroenfoco, las áreas no siempre corresponden de manera correcta a la mancha completa, muchas veces solo abarca una parte de ella como se muestra en la figura 14, y los algoritmos del programa no están optimizados para manchas tan grandes, sin embargo una vez eliminando falsos positivos y alineando manualmente es posible llevar a cabo una comparación de la mayoría de las manchas.

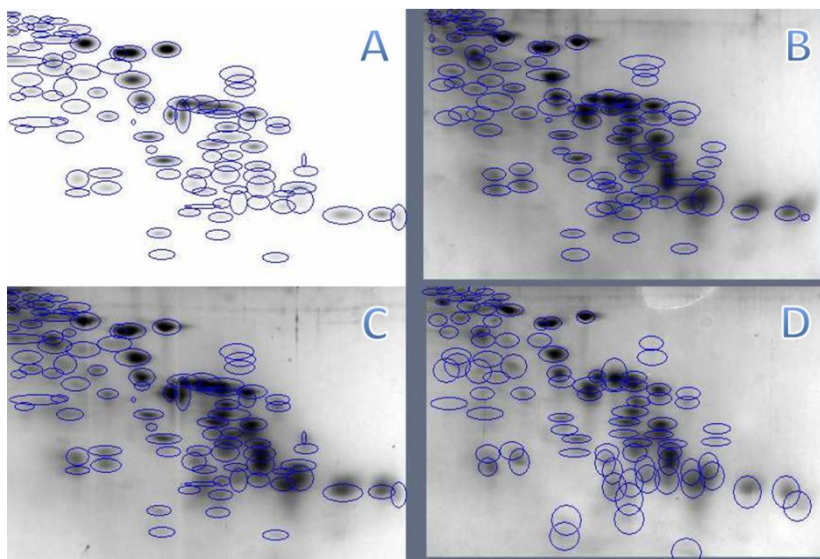


Figura 14. Identificación de bandas mediante el programa PD Quest. En azul se representan las áreas que utiliza el programa para medir densidad de las manchas, no todas abarcan la mancha completa. Geles maestro (A) y repeticiones 1,2 y 3 (B, C y D respectivamente).

La imagen de la Figura 15 muestra la detección de manchas de proteínas de las diferentes repeticiones, y en A se muestra la imagen resultante o maestro de las 3 imágenes analizadas, este maestro contiene las manchas consenso en los 3 geles y es la que se usaría en el caso de tener otras condiciones para analizar.

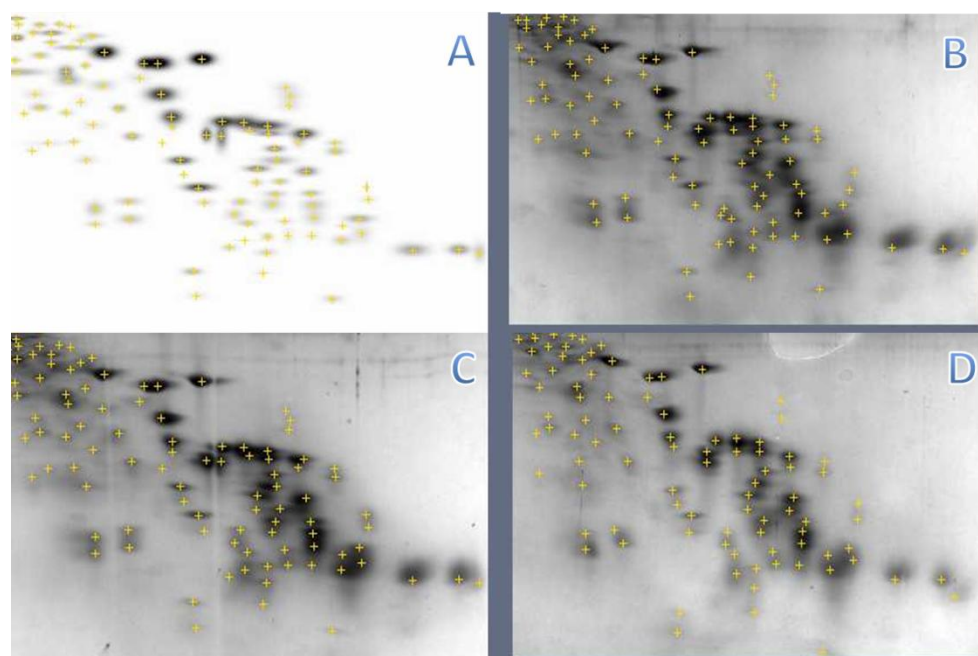
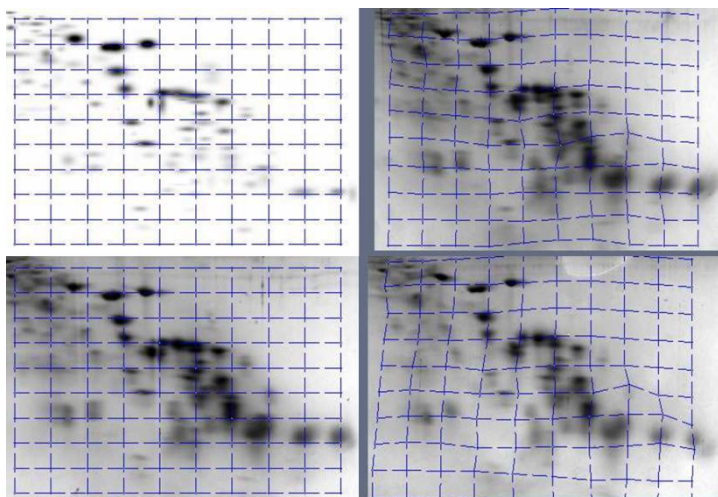


Figura 15. Detección de manchas en cada repetición mediante el programa PD Quest. Geles maestro (A) y repeticiones 1,2 y 3 (B, C y D respectivamente).

El alineamiento manual y emparejamiento de manchas tiene como resultado un campo de distorsión que representa la variación entre un gel y otro en cuanto a la ubicación de las manchas en general por cuadrantes como se ve en la figura 16.

Figura 16. Distorsión en el campo de análisis por cuadrantes entre las repeticiones, tomando como comparación el gel 2 (izquierda-abajo).



El tamaño del gel que tiene un impacto en el tamaño de la mancha (píxeles) así como la circularidad de las manchas, estos son otros parámetros que seguramente el algoritmo del PD Quest utiliza para detectar y medir han sido optimizados para un gel comúnmente obtenido por isoelectroenfoque (Figura 17).

Sin embargo PD Quest es capaz de detectar prácticamente todas las manchas de nuestro interés para compararlas, más adelante se mostrará SU capacidad para detectar las diferencias de manera congruente a lo que se ve a simple vista.

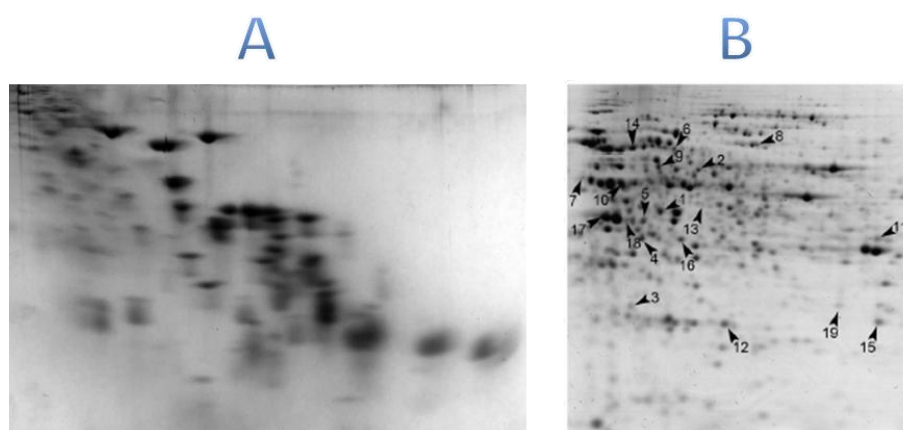


Figura 17. Imagen que muestra la diferencia en los geles obtenidos por las técnicas de electroforesis en doble dimensión Urea-SDS e Isoelectroenfoque entre dos muestras de distinto tejido vegetal. A) Gel de proteínas ribosomales de ejes embrionarios de maíz (este trabajo) B) Gel de proteínas totales de anteras de maíz (Ubackova et al, 2012).

Obtención de la imagen maestro.

La imagen maestro es el resultante de las diferentes repeticiones de una condición, es aquel que se va a comparar con otras condiciones, es importante que contenga realmente la información que se quiere comparar y que represente a todos los geles de la mejor manera posible. En la Figura 18 se muestran un par de geles maestros de proteínas ribosomales, es importante señalar que se obtienen diferencias en la imagen dependiendo de los valores dados a los parámetros elegidos. E inclusive se puede observar que pudieran no representar fielmente a todas las manchas que se pueden observar a simple vista en los geles originales, algunas están cambiadas en cuanto a intensidad y tamaño, lo que podría ser un problema para obtener las diferencias reales entre distintas condiciones.

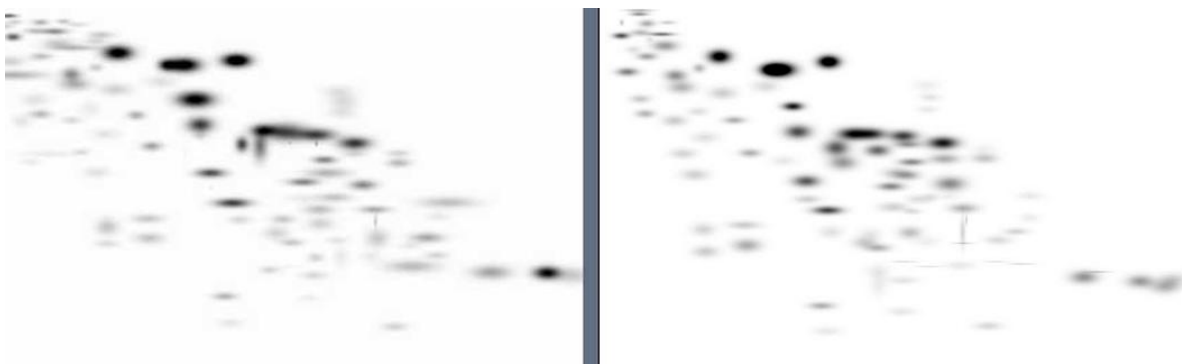


Figura 18. Imágenes de geles maestro resultante de las mismas 3 repeticiones, pero utilizando diferentes valores en los parámetros.

Análisis de densidad de las manchas con PD Quest.

Los análisis de densidad muestran la intensidad de las manchas obtenidas de acuerdo a los parámetros establecidos, sirve para comparar esta intensidad y

representar de manera aproximada la cantidad de proteína presente en los geles, La imagen de la Figura 19 muestra las intensidades de cada una de las manchas analizadas en los triplicados de un análisis donde se encontraron 96 manchas en común, es importante señalar en este punto que el promedio resultante de cada medida será la utilizada en el maestro, y debido a que cada una de las repeticiones son analizadas bajo los mismos parámetros, habrá diferencias debido a cambios en la intensidad de exposición de la imagen obtenida, diferencias en el fondo o incluso en la cantidad de proteína cargada en cada gel, por lo que se llevó a cabo una normalización de acuerdo a la densidad total de manchas en cada gel.



Figura 19. Análisis comparativos de densidad de cada mancha de las 3 repeticiones de geles.

El análisis de densidad obtenido proporciona las manchas que varían más entre cada repetición y aunque no es un resultado estadístico se pueden comparar las diferencias de densidad para determinar las veces de cambio que hay entre las 3 repeticiones. En la tabla 3 se muestra la cantidad de manchas que varían al modificar los límites de veces de cambio tomando como referencia al gel 1 contra 2 y 3 respectivamente.

Tabla 3. Manchas que cambian al mover los límites de veces cambio.

Geles comparados	Veces de cambio como límite elegido.	Número de manchas fuera de los límites (manchas que cambian).
1 vs 2	2	16
1 vs 3	2	20
1 vs 2	3	7
1 vs 3	3	10
1 vs 2	4	5
1 vs 3	4	5
1 vs 2	5	3
1 vs 3	5	3

Al tener 2 veces de cambio como límite hay aun bastantes manchas que varían entre los geles, al aumentar a 3 el número es discreto, y al aumentar a 4 y 5 veces de cambio son muy pocas las manchas que supuestamente están variando.

Por lo anterior se analizaron cuáles eran las manchas que tenían mayor variación sobre todo arriba de cuatro veces de cambio, las cuales están representadas en la Figura 20, se observa que se trata de manchas que o son muy tenues, se encuentran muy encimadas una con otra o son muy grandes como para ser comparadas bien por el software, lo que podría representar el hecho de que como

se mencionó anteriormente, el programa no está optimizado para analizar manchas tan grandes.

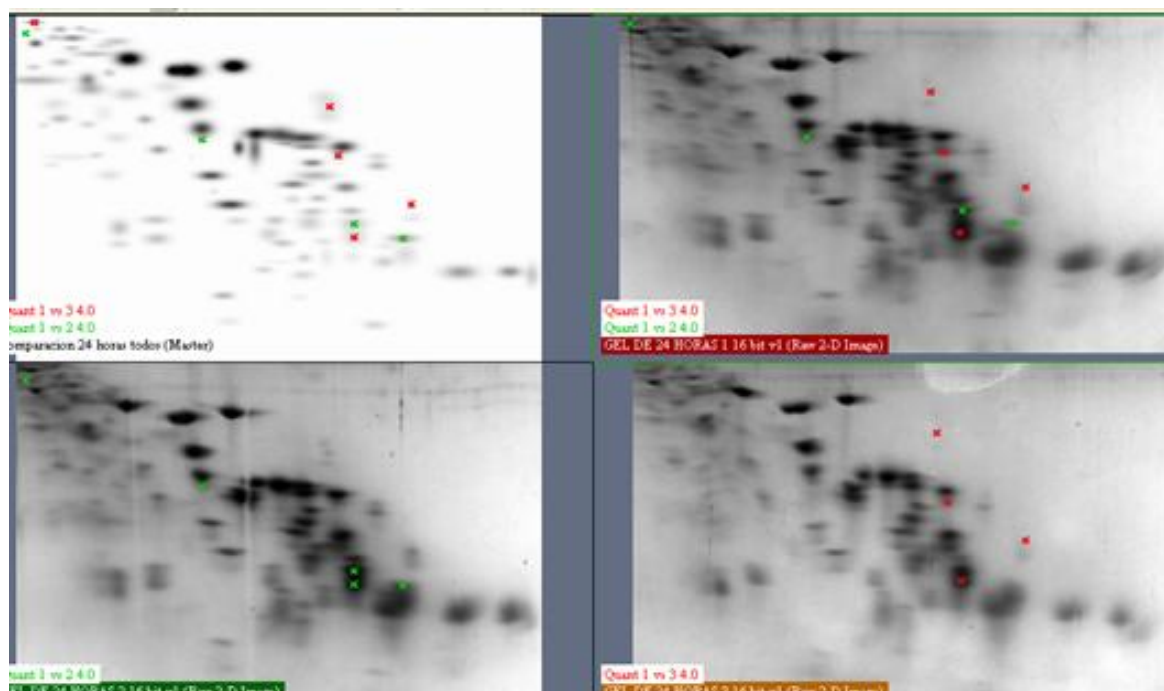


Figura 20. Manchas entre las 3 repeticiones que muestran un cambio mayor a 4 veces con respecto a la referencia que es el gel 1. En verde se representan las manchas que cambian en el gel 2 y en rojo las del gel 3.

Los valores de los análisis de densidad de cada una de las manchas en los 3 geles están disponibles en la tabla suplementaria 1 y la ubicación numérica precisa de cada mancha en los geles se encuentra en la figura suplementaria 1.

Hubo 3 manchas que no fueron posibles detectar en el gel 3 y como fue aquel que resultó con menor densidad total entre las 3 repeticiones, es muy probable que sea debido a que entrara menos proteína o se haya desteñido más. De las 94 manchas que si se pudieron comparar solo 9 sobrepasan un límite de 4 veces de cambio, algunas parecen representar cambios reales que se observan a simple

vista pero otras sin embargo no, esto es quizá debido a que el programa no esté especializado en comparar adecuadamente este tipo de geles.

Detección de manchas utilizando ImageJ.

ImageJ es un programa de acceso libre, que es usado para análisis de imágenes.

Massimo Natale y colaboradores publicaron en 2011 una forma de analizar geles de doble dimensión mediante ImageJ, ellos muestran una eficiencia notable en la detección de manchas de geles obtenidos mediante Isoelectroenfoque, y su posterior análisis estadístico.

Por lo tanto para analizar los geles que se obtuvieron de la 2-DE de proteínas ribosomales, se comprobó en primer lugar si el programa era capaz de detectar las manchas en los geles para después ser comparados entre sí.

Uno de los geles obtenidos, fue transformado con ImageJ a la imagen a formato Tiff de 8 bits para poder analizarlo con el complemento “Watershed” de ImageJ. Al analizar la imagen original sin cambios, los resultados en la detección de manchas fueron muy malos, incluso realizando un barrido Gaussiano que permite realizar el programa y que ayuda a no sobredetectar manchas.

Por lo anterior, se hicieron modificaciones ligeras a la imagen en cuanto a brillo y contraste, para no alterar demasiado los resultados y que no fueran muy dependientes de la manipulación del usuario, o pudieran cambiar los resultados.

La imagen resultante se muestra en el panel A de la Figura 21 a partir de esta figura se llevó a cabo la detección de manchas la cual se muestra en el panel B, la imagen binaria resultante que se usaría para la comparación y cuantificación de

manchas que se muestran en el panel C y D, donde se observa claramente que esta imagen está muy lejos de parecerse a la imagen original y por lo tanto las manchas no representan fielmente lo que realmente se obtuvo. Se procedió a modificar más la imagen en cuanto a brillo, exposición, contraste hasta lograr una imagen más simple como se ve en el panel E con la cual se consiguió un mejor resultado, que es más parecida a la imagen original y que puede ser usada para compararse con otras, sin embargo para conseguir esto es necesario hacer demasiadas modificaciones a la imagen original, lo que tiene como consecuencia cambios dramáticos en la intensidad de las manchas originales, y demasiada manipulación del usuario, que podría conllevar a resultados subjetivos.

Por lo anterior, se sugiere manipular la imagen lo menos posible o tratar todas las imágenes de la misma forma para minimizar los cambios que puedan darse al mover los parámetros. Sin embargo, se puede ver una imagen que es comparable con la obtenida como maestro con PD Quest que anteriormente se analizó, inclusive se consiguió cuantificar 95 manchas, número similar al encontrado con PD Quest y no se descarta el uso de este programa para análisis comparativos, aunque requerirá mayor estandarización.

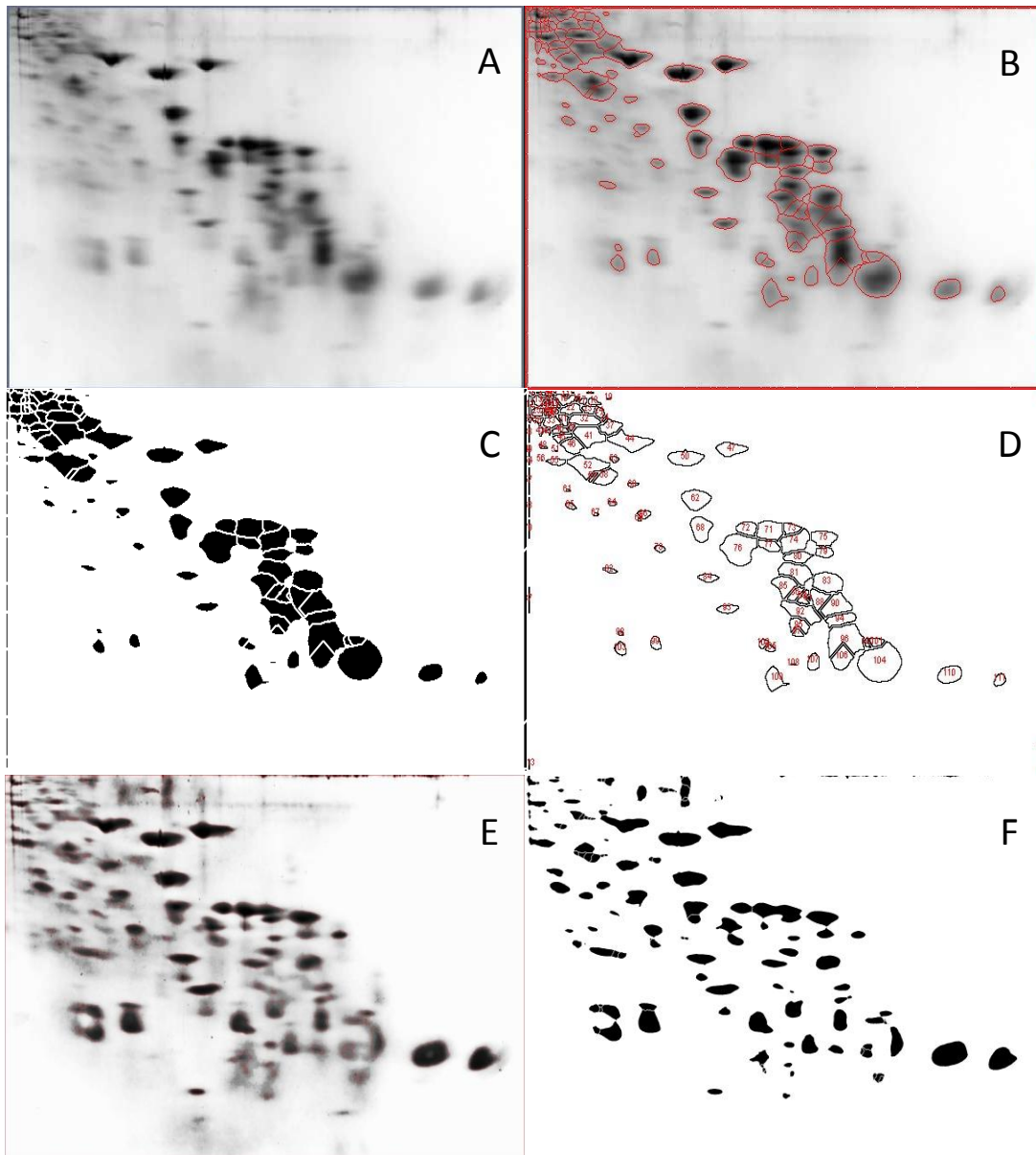


Figura 21. Detección de manchas de proteínas ribosomales utilizando ImageJ. A) Gel de Urea-SDS que se le ha dado un aumento ligero de contraste. B) Detección de manchas en el gel obtenido en A. C) Máster resultante del obtenido en A. D) Conteo de manchas del máster en C. E) Imagen obtenida modificando contraste, exposición y brillo de A. F) Máster obtenido de la imagen E.

Análisis de densidad de las manchas con Gel Analyzer.

Gel Analyzer es un programa también de uso libre que básicamente se usa para crear líneas donde se pueden detectar bandas, substraer el fondo, y medir picos y valores de densidad de las regiones de interés, incluye entre sus algoritmos “roller

ball” que también usa PD Quest y análisis “de valle a valle” para encontrar y cuantificar densidades de las manchas, este programa tiene múltiples archivos de salida, gráficos y realmente es sencillo de usar y funcional. Aunque está especializado para análisis de electroforesis de 1D se decidió usarlo porque es sencillo de usar y utiliza el mismo algoritmo que encontramos en PD Quest pero en acceso libre, y nos permitirá analizar algunas manchas significativas.

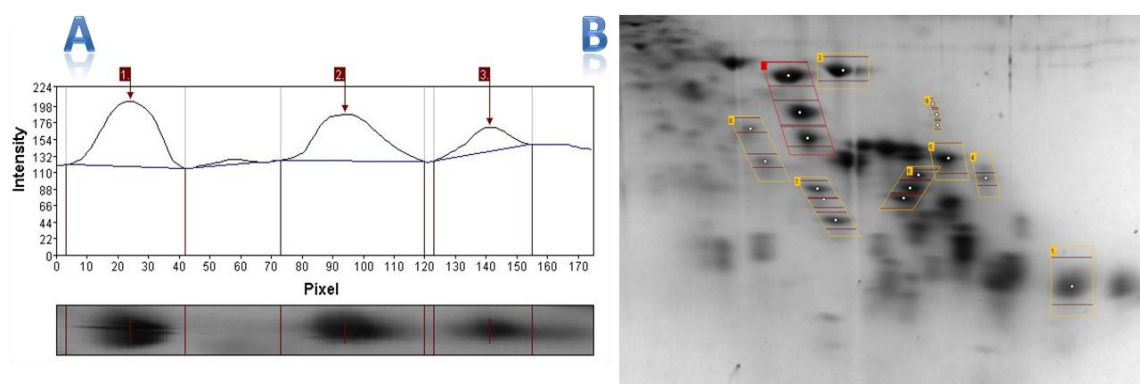


Figura 22. Identificación de bandas utilizando el programa de acceso libre GelAnalyzer. A) Líneas y bandas elegidas para analizar. B) Análisis de densidad de bandas en una línea por medio del algoritmo rolling ball

En primer lugar se requiere elegir líneas de interés donde se encuentren bandas, es posible una identificación automática o manual, se eligieron unas líneas donde las manchas fueran claras y no estuvieran encimadas y se consiguió encontrar en ellas unas 18 bandas las cuales se usaron para los análisis entre las repeticiones (Figura 22 B).

Una vez identificadas las bandas fueron analizadas, fue importante tratar de elegir siempre la misma región de interés en cada gel analizado para evitar variaciones, se puede obtener el pico correspondiente y la medida de cada área bajo la curva correspondiente a la intensidad que cada banda tuvo (Figura 22 A). Una vez

realizado esto con cada gel los datos obtenidos fueron analizados para encontrar alguna tendencia. Las intensidades del gel 2 con respecto de 1 fueron mayores (Tabla 4) y es consistente en cada mancha lo que podría indicar que tuvo mayor exposición, contraste o proteína en el gel. Lo mismo sucedió con el gel 3 con respecto de los otros dos. Se calcularon las veces de cambio y porcentajes de variación con estos geles directamente (tabla 4).

Tabla 4. Valores de densidad obtenidos con Gel Analyzer para las 3 repeticiones, incluye veces de cambio y porcentaje calculado.

Valores de densidad de las manchas.			Veces de cambio 1 vs 2	Porcentaje de cambio de 1 vs 2	Veces de cambio 1 vs 3	Porcentaje de cambio de 1 vs 3
Gel1	Gel2	Gel3				
1727	2282	1536	1.32136653	32.1366532	1.12434896	12.4348958
1460	1777	1368	1.21712329	21.7123288	1.06725146	6.7251462
508	778	490	1.53149606	53.1496063	1.03673469	3.67346939
1558	1837	1378	1.17907574	17.9075738	1.13062409	13.0624093
238	368	218	1.54621849	54.6218487	1.09174312	9.17431193
345	442	339	1.28115942	28.115942	1.01769912	1.7699115
424	505	347	1.19103774	19.1037736	1.22190202	22.1902017
61	50	37	0.81967213	18.0327869	1.64864865	64.8648649
482	675	463	1.40041494	40.0414938	1.04103672	4.10367171
1213	1364	1051	1.12448475	12.4484749	1.15413892	15.4138915
205	235	130	1.14634146	14.6341463	1.57692308	57.6923077
276	293	262	1.0615942	6.15942029	1.05343511	5.34351145
250	344	212	1.376	37.6	1.17924528	17.9245283
211	235	204	1.11374408	11.3744076	1.03431373	3.43137255
2426	3530	1788	1.45507007	45.5070074	1.35682327	35.6823266
37	72	14	1.94594595	94.5945946	2.64285714	164.285714
76	102	10	1.34210526	34.2105263	7.6	660
59	81	22	1.37288136	37.2881356	2.68181818	168.181818

Considerando las tendencias anteriormente descritas se procedió a "normalizar" los datos para tener una comparación más precisa, para esto se obtuvo la media del cambio de los geles 2 y 3 con respecto al del gel 1 que se tomó como referencia, se decidió usar la media porque el promedio era afectado por algunos datos de manchas que variaban mucho, posteriormente cada columna de datos de los geles 2 y 3 fue dividido entre su respectiva media, este valor multiplicado por

100 es una acercamiento al porcentaje de cambio de cada mancha (Tabla 5), y aunque no es una medida estadística da una idea de la variabilidad en las manchas analizadas de los geles.

Tabla 5. Veces y porcentaje de cambio en las manchas analizadas con Gel Anlyzer después de normalizar los datos.

Área bajo la curva gel1	Área bajo la curva gel 2	Área bajo la curva gel3	veces de cambio 1 vs 2	veces de cambio 1 vs 3	Porcentaje de cambio 1 vs 2	Porcentaje de cambio 1 vs 3
1727	1753.68088	1754.69799	0.98478578	0.98421495	1.52142159	1.5785047
1460	1365.59637	1562.7779	1.06912996	0.93423384	6.91299633	6.57661577
508	597.880685	559.766937	0.84966786	0.90752055	15.0332144	9.24794474
1558	1411.70542	1574.20171	1.10362968	0.98970798	10.3629677	1.02920182
238	282.802175	249.039168	0.84157769	0.95567297	15.8422314	4.43270349
345	339.670004	387.26733	1.01569169	0.89085749	1.56916894	10.9142514
424	388.084507	396.406382	1.09254555	1.06960942	9.25455481	6.96094194
61	38.4242086	42.2681157	1.58754083	1.44316819	58.7540831	44.3168191
482	518.726816	528.922636	0.92919815	0.91128639	7.08018453	8.87136098
1213	1048.21241	1200.64296	1.1572082	1.01029202	15.7208204	1.02920182
205	180.59378	148.509596	1.1351443	1.38038219	13.5144298	38.0382185
276	225.165862	299.303954	1.22576308	0.9221395	22.5763076	7.78604952
250	264.358555	242.184879	0.9456853	1.03226924	5.43146977	3.22692365
211	180.59378	233.045827	1.16836803	0.90540132	16.8368034	9.45986767
2426	2712.74913	2042.57813	0.89429574	1.18771467	10.5704255	18.7714666
37	55.3308604	15.9933411	0.66870458	2.31346283	33.1295415	131.346283
76	78.3853855	11.423815	0.96956849	6.65276878	3.04315081	565.276878
59	62.2472179	25.1323931	0.94783353	2.34756793	5.21664743	134.756793

Los resultados anteriores muestran que la variabilidad de las manchas se encuentra debajo de las 2 veces de cambio para la mayoría de las manchas analizadas, excepto de aquellas más tenues que muestran cambios más dramáticos, lo se hace más evidente al observar los porcentajes de cambio. Los resultados demuestran que se necesitan al menos 2 veces de cambio detectadas

por este análisis para poder definir diferencias significativas cuando se realicen análisis comparativos, todos los análisis se hicieron con respecto al gel 1 y fueron normalizados mancha por mancha de acuerdo a un valor medio de veces de cambio de todas las manchas analizadas.

Los resultados en conjunto muestran que es posible realizar análisis similares con software libre así como con PD Quest que es un software comercial, en cualquiera de los casos se requiere aun bastante análisis manual y van a depender de las consideraciones del usuario, ya que no son muy automatizados y menos aun con este tipo de geles, pero si pueden para realizar análisis comparativos de acuerdo a un criterio que el experimentador fije como cambio mínimo.

CONCLUSION.

Se logró determinar que los geles de doble dimensión, mediante las técnicas de electroforesis Urea- ácido en tubo de vidrio seguido de SDS-PAGE en placa, logra separar eficientemente 300 µg de proteínas ribosomales provenientes de ejes embrionarios de maíz con una definición aceptable para llevar a cabo análisis comparativos.

PERSPECTIVAS

Esta tesis contribuye a contar con una herramienta que permite comparar los ribosomas de dos condiciones o tejidos para analizar la heterogeneidad entre muestras. Para este propósito será necesario realizar análisis comparativos de dos condiciones diferentes que se espera muestren algún cambio en la composición de sus ribosomas.

La separación de los ribosomas en sus subunidades sería algo muy prometedor porque permitiría analizar a cada subunidad por separado y sin la presencia de proteínas asociadas al ribosoma en traducción activa, lo cual permitiría analizar si la heterogeneidad sería debida principalmente a proteínas asociadas al ribosomas o aquellas que se conocen como estructurales del ribosoma y que están unidas más fuertemente.

El objetivo de este trabajo finalmente se dirige a tratar de entender qué significado tiene la heterogeneidad ribosomal, ya que para poder hablar de una especialización ribosomal es importante que se cumplan las siguientes condiciones: a) que las células produzcan ribosomas que sean bioquímicamente diferentes bajo las diferentes condiciones de desarrollo y b) que estos ribosomas

diferentes afecten o influyan en cambios en la fisiología de la célula debidos a cambios en el proceso de traducción (Gilbert, 2011).

Quedan muchas preguntas por resolver sobre la funcionalidad que tienen los ribosomas en el desarrollo de organismos eucariontes y las investigaciones en un futuro en este campo más allá de la actual descripción y especulación requerirá que se lleven a cabo estudios que describan el significado funcional de la heterogeneidad ribosomal.

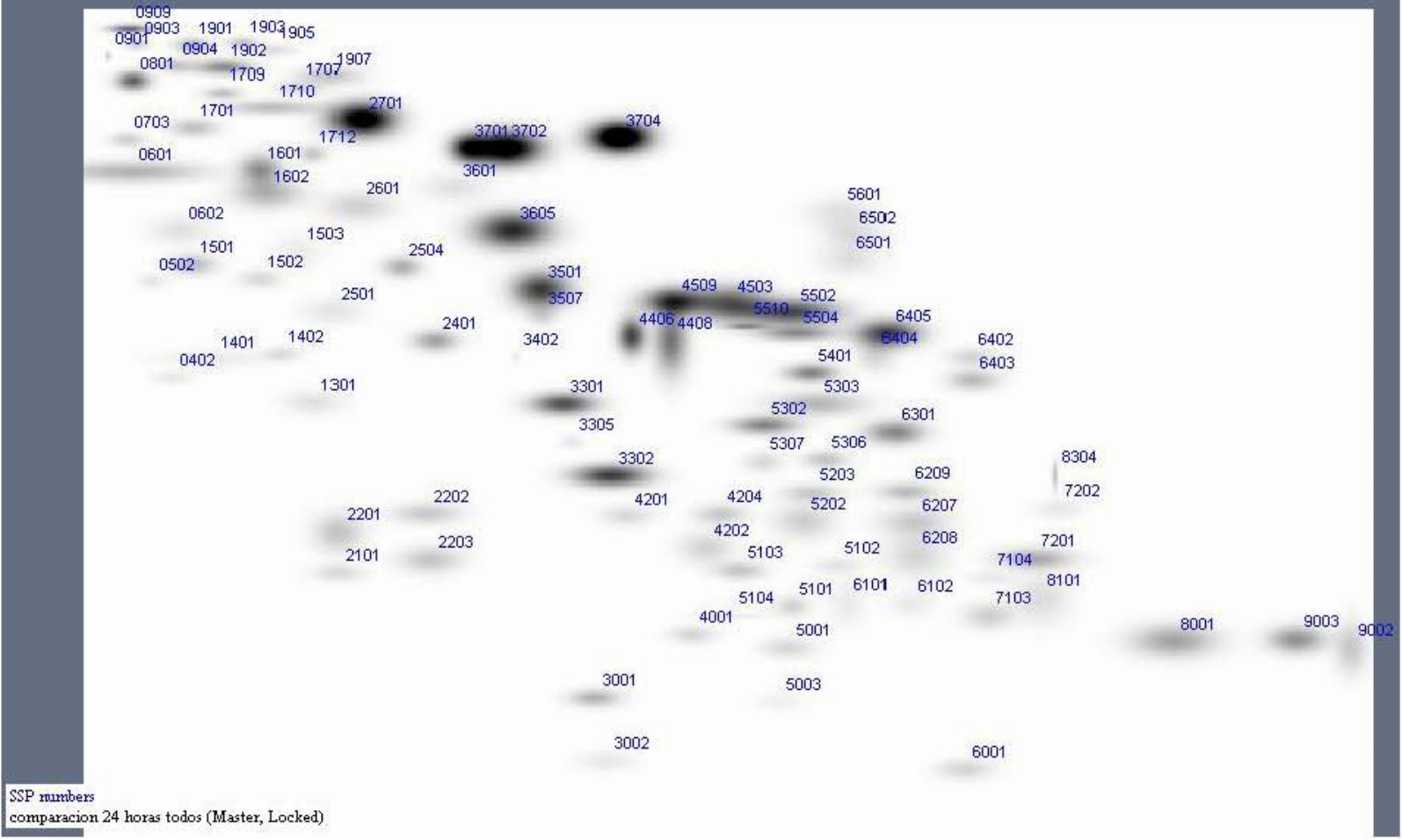
Tabla suplementaria 1.

No. de mancha	Valores de densidad dados por PD Quest		
	Gel 1	Gel 2	Gel 3
402	3464268311	2442667725	2453477783
502	1655659180	2065650635	2705602295
601	1.2386E+10	3.5128E+10	6083930664
602	1.1729E+10	8262660156	4983551270
703	2988354492	4361289551	4084014404
801	1.4348E+10	1.5077E+10	1.176E+10
901	3937143799	475557831	2388293945
903	1214909546	2333685547	3824774658
904	3136564209	5223639648	4339093262
909	2615803955	8737972656	1.2608E+10
1301	9481280273	6777715820	7330432129
1401	5092716797	7190380371	-1
1402	9159122070	3246718750	4892175781
1501	7866684570	1.1385E+10	1.7427E+10
1502	6960424316	4992165527	1.0503E+10
1503	6944506348	5724738770	3559679443
1601	1.6906E+10	2.2343E+10	1.2389E+10
1602	1.2626E+10	2.5939E+10	8972725586
1701	9103862305	8507066406	6856802734
1707	3438208496	4289780273	2589659912
1709	4936769531	4531839355	9467811523
1710	8300396484	1.5834E+10	1.0106E+10
1712	3285202881	4533384766	6171507324
1901	6234342773	7130325195	8671014648
1902	1.3414E+10	1.5469E+10	9777392578
1903	2401082031	3640642578	3607168701
1905	1966648071	3518477783	2078978027
1907	5790922363	1.1453E+10	2248347412
2101	8887725586	5097849609	3829585449
2201	8060738281	1.722E+10	4444979004
2202	832292188	1.3399E+10	6634176270
2203	1.5623E+10	1.5675E+10	1.8088E+10
2401	1.4905E+10	1.407E+10	7654847168
2501	1.3072E+10	7563131836	3987493164
2504	9031759766	1.0519E+10	1.4627E+10
2601	7406527344	1.6036E+10	6427216309
2701	5.5677E+10	1.0752E+11	6.1589E+10
3001	1.0746E+10	1.1637E+10	1.0135E+10
3002	3287134766	4493225098	3766799316
3301	2.6923E+10	3.5473E+10	1.1445E+10
3302	3.1074E+10	4.8425E+10	2.045E+10
3305	2640374268	1939963867	4257723633
3402	370832062	339431396	-1
3501	4.2045E+10	6.3074E+10	3.1311E+10
3507	2.4203E+10	3905102295	6545183105
3601	4775100586	9961718750	4876085449
3605	6.0542E+10	9.6914E+10	5.8447E+10
3701	3.0311E+10	3.0951E+10	2.4739E+10
3702	6.2157E+10	1.1379E+11	4.9086E+10

No. de mancha	Valores de densidad dados por PD Quest		
	Gel 1	Gel 2	Gel 3
3704	6.8519E+10	1.0378E+11	4.9435E+10
4001	6224483398	5093184570	-1
4201	4526332520	6290042480	5189891113
4202	6596696777	1.2986E+10	1.1936E+10
4204	3759536133	9125514648	3809981934
4406	2.3074E+10	2.8631E+10	3.078E+10
4408	2.8515E+10	5.0675E+10	1.4914E+10
4503	6.789E+10	7.1067E+10	5.7182E+10
4509	3.2344E+10	5.4492E+10	1.2577E+10
5001	5571022949	7372944824	6416803711
5003	4205103027	2269899902	1.5907E+10
5101	7980583008	5485417969	9436182617
5102	1743038940	3713118652	2312585693
5103	1.0652E+10	7968268066	8408960938
5104	5419087891	4293700195	7086851563
5202	1.0173E+10	1.7129E+10	1.0153E+10
5203	4444520020	8800205078	4281810059
5302	1.7546E+10	2.5197E+10	1.7141E+10
5303	1.6851E+10	2.4937E+10	2.1932E+10
5306	5060882324	7729289063	3274954834
5307	5703115723	5168753418	8596277344
5401	1.2947E+10	1.8965E+10	1.1644E+10
5502	3.758E+10	7.3751E+10	2.6764E+10
5504	1.1308E+10	2.1032E+10	2.0843E+10
5510	1.1391E+10	3129644775	5881239258
5601	5634782715	1.0915E+10	-1
6001	6455092285	8133323242	1.1391E+10
6101	7496395020	5563093262	1.1136E+10
6102	4929601074	4010644531	8099258789
6207	3910758057	1.7714E+10	1.524E+10
6208	1016664978	1.7538E+10	1.2334E+10
6209	7843429199	1.14E+10	4890391113
6301	3.0433E+10	2.63E+10	2.5926E+10
6402	7021409668	6994287109	2354912109
6403	1.1649E+10	1.1702E+10	6555042480
6404	1.8342E+10	8617133789	4338089355
6405	5.6939E+10	5.4347E+10	2.6758E+10
6501	5240430176	9340567383	2135807617
6502	5640051758	1.0536E+10	490832794
7103	1.477E+10	1.0718E+10	1.6763E+10
7104	3398983154	2349525146	2312585693
7201	4914403809	2.2709E+10	9016791992
7202	2089291260	3650205811	3274954834
8001	2.921E+10	4.384E+10	4.868E+10
8101	2.6014E+10	1.6055E+10	2.9714E+10
8304	2779733154	1772826904	417151825
9002	1.9333E+10	1.4835E+10	2.4912E+10
9003	2.0219E+10	2.7788E+10	3.6988E+10

Figura suplementaria 1.

Numeración y ubicación de cada mancha dada por PD Quest en el gel master.



BIBLIOGRAFIA

Andersen JS y Mann M. (2006). Organellar proteomics: turning inventories into insights. *EMBO Reports* 7: 874–879

Bailey-Serres J, Freeling M. (1990). Hypoxic stress-induced changes in ribosomes of maize seedling roots. *Plant Physiology* 94: 1237–1243

Bailey-Serres J, Vangala S, Szick K, Lee CHK. (1997). Acidic phosphoprotein complex of 60S ribosomal subunit of maize seedlings roots. Components and changes in response to flooding. *Plant Physiology* 114:1293–1305

Ban N, Beckmann R, Cate JH, Dinman JD, Dragon F, Ellis SR, Lafontaine DL, Lindahl L, Liljas A, Lipton JM, McAlear MA, Moore PB, Noller HF, Ortega J, Panse VG, Ramakrishnan V, Spahn CM, Steitz TA, Tchorzewski M, Tollervey D, Warren AJ, Williamson JR, Wilson D, Yonath A, Yusupov M. (2014). A new system for naming ribosomal proteins. *Current Opinion in Structural Biology* 24:165–169

Barakat A., Kathleen Szick-Miranda, Ing-Feng Chang, Romain Guyot, Guillaume Blanc, Richard Cooke, Michel Delseny, y Julia Bailey-Serres. (2001). The organization of cytoplasmic ribosomal protein genes in the Arabidopsis genome. *Plant Physiology* 127: 398–415

Carrol Adam J. (2013). The Arabidopsis cytosolic ribosomal proteome: from form to function. *Frontiers in Plant Science* 1;4:32

Chang I, Szick-Miranda K., Pan S., and Bailey-Serres J. (2005). Proteomic characterization of evolutionarily conserved and variable proteins of Arabidopsis cytosolic ribosomes. *Plant Physiology* 137:848-862

Capel MS, Bourque DP. (1982). Characterization of *Nicotiana tabacum* chloroplast and cytoplasmic ribosomal proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 257: 7746–7755

Davies E1, Abe S. (1995). Methods for isolation and analysis of polyribosomes. *Methods in Cell Biology*. 50:209-22

Dice and Schmike. (1971). Turnover and exchange of ribosomal proteins from rat liver. *The Journal of Biological Chemistry* 247 1:98-111

Dyballa N, Metzger S. (2012). Fast and sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteins in polyacrylamide gels. *Journal of visualized experiments* 30:1431

Doudna JA and Virginia LR. (2002). Structure and function of the Eukaryotic Ribosome. *Cell* 109:153–156

Erikson, E. y Maller J. (1985). A protein kinase from *Xenopus* eggs specific for ribosomal protein S6. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82: 742-746

Fehling E. and Weidner M. (1986). Adaptive potential of wheat ribosomes toward heat depends on the large ribosomal subunit and ribosomal protein phosphorylation. *Plant Physiology* 87:562-565

Fehling E, Weidner M. (1986). Temperature characteristics and adaptive potential of wheat ribosomes. *Plant Physiology* 80:181–186

Fleischer TC, Weaver CM, McAfee KJ, Jennings JL, Link AJ. (2006). Systematic identification and functional screens of uncharacterized proteins associated with eukaryotic ribosomal complexes. *Genes and Development* 20:1294–1307

Gantt JS, Key JL. (1985). Coordinate expression of ribosomal mRNAs following auxin treatment of soybean hypocotyls. *The Journal of Biological Chemistry* 260: 6175-6181

Gilbert W. (2011). Functional specialization of ribosomes?. *Trends in Biochemical Sciences* 36:127-132

Kamita M, Yayoi K, Ino Y, Kamp RM, Plevoda B, Sherman F, Hirano H. (2011) N(alpha)-Acetylation of yeast ribosomal proteins and its effect on protein synthesis. *Journal of Proteomics* 74(4):431-41

Koyama K, Wada A, Maki Y and Tanaka A. (1996) Changes in the protein composition of cytoplasmic ribosomes during the greening of etiolated barley leaves. *Physiology Plant* 96: 85–90

Kruiswijk T, Kunst A, Planta RJ, Mager WH. (1978) Modification of yeast ribosomal proteins. Methylation. *Biochemistry Journal* 175, 221-225

Maller, J., y Smith D., (1885). Two-Dimensional polyacrylamide gel analysis of changes in protein phosphorylation during maturation of *Xenopus* oocytes. *developmental biology* 109, pp.150-156.

Natale M, Maresca B, Abrescia P, Bucci EM. Image analysis workflow for 2-D electrophoresis gels based on ImageJ. (2011). *Proteomics Insights* 4: 37–49.

Natale M, Caiazzo A, Bucci EM, Ficarra Elisa. A novel gaussian extrapolation approach for 2D gel electrophoresis saturated protein. *Spots Genomics Proteomics Bioinformatics* 10 (2012) 336–344.

Nakao A, Yoshihama M, Kenmochi N., 2004. RPG: the ribosomal protein gene database. *Nucleic Acids Res* 32D: 168–170

Nesterchuk M.V., Sergiev P. V., Dontsova 2011 O. A. Posttranslational modifications of ribosomal proteins in *Escherichia coli*. *Acta Naturae*. Apr-Jun; 3(2): 22–33.

Ladror DT, Frey BL, Scalf M, Levenstein ME, Artymiuk JM, Smith LM. (2014) Methylation of yeast ribosomal protein S2 is elevated during stationary phase growth conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 445(3):535-41.

Li F, Seillier-Moiseiwitsch F. (2011). Analyzing 2D gel images using a two-component empirical bayes model. *BMC Bioinformatics*.12:433

Zhonghua Liu, Yong Lin, Sheng Zhang, Die Wang, Qionglin Liang, Guoan Luo. (2015). Comparative proteomic analysis using 2DE-LC-MS/MS reveals the mechanism of Fuzhuan brick tea extract against hepatic fat accumulation in rats with nonalcoholic fatty liver disease. *Electrophoresis* 36:2002-2016

Odintsova TI, Müller EC, Ivanov AV, Egorov TA, Bienert R, Vladimirov SN, Kostka S, Otto A, Wittmann-Liebold B, Karpova GG. (2003) Characterization and analysis of posttranslational modifications of the human large cytoplasmic ribosomal subunit

proteins by mass spectrometry and Edman sequencing. *J Protein Chem.* Apr;22(3):249-58.

Øye OK, Jørgensen KM, Hjelle SM, Sulen A, Ulvang DM, Gjertsen BT. (2013). Gel2DE - a software tool for correlation analysis of 2D gel electrophoresis data. *BMC Bioinformatics* 14:215

Pérez-Méndez A, Aguilar R, Briones E, Sánchez de Jiménez E. Characterization of ribosomal protein phosphorylation in maize axes during germination. *Plant Sci.* 1993;94:71–79.

Piir K, Tamm T, Kisly I, Tammsalu T, Remme J (2014) Stepwise Splitting of Ribosomal Proteins from Yeast Ribosomes by LiCl. *PLoS ONE* 9(7): e101561. doi:10.1371/journal.pone.0101561

Planta RJ y Mager WH (1998) The list of cytoplasmic ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14(5):471-7

Pottiez G, Deracinois B, Duban-Deweere S, Cecchelli R, Fenart L, Karamanos Y, Flahaut C. (2010). A large-scale electrophoresis- and chromatography-based determination of gene expression profiles in bovine brain capillary endothelial cells after the re-induction of blood-brain barrier properties. *Proteome Science* 8:57

Ramjoue HPR, Gordon J. (1977). Evolutionary micro divergence of chick and rat liver ribosomal proteins. *Journal of Biological Chemistry* 252(24): 9065-9070

Remacha M, Jimenez-Diaz A, Bermejo B, Rodriguez-Gabriel MA, Guarinos E, Ballesta JP. (1995) Ribosomal acidic phosphoproteins P1 and P2 are not required

for cell viability but regulate the pattern of protein expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 15:4754-62

Ruiz-Romero C, Blanco FJ. (2009). Mitochondrial proteomics and its application in biomedical research. *Molecular Biosystems* 5:1130-1142.

Sikorski MM, Przybyl D, Legocki AB, Nierhaus KH. (1983). Group fractionation of wheat germ ribosomal proteins. *Plant Sci Lett* 30:303–320

Scharf KD, Nover L. (1987) Control of ribosome biogenesis in plant cell cultures under heat shock conditions. II. Ribosomal proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 909: 44–57

Sánchez de Jiménez E, Aguilar R, Dinkova T. (1997). S6 ribosomal protein phosphorylation and translation of stored mRNA in maize. *Biochimie*, 79:187-194

Shi Y, Xiang R, Horváth C, Wilkins JA. (2004). The role of liquid chromatography in proteomics. *Journal of Chromatography. A.* 1053(1-2):27-36.

Siegmann M y George Thomas. (1987). Separation of multiple phosphorylated forms of 40 S ribosomal protein S6 by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Methods in Enzymology* 146:362-369

Spence J, Gali RR, Dittmar G, Sherman F, Karin M, Finley D. (2000). Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain. *Cell*. 102:67-76

Sugihara Y, Honda H, Iida T, Morinaga T, Hino S, Okajima T, Matsuda T, Nadano D. (2010). Proteomic analysis of rodent ribosomes revealed heterogeneity

including ribosomal proteins L10-like, L22-like 1, and L39-like. *Journal of Proteome Research* 5:9:1351-66

Szick-Miranda K y Bailey-Serres J. (2001). Regulated heterogeneity in 12-kDa P-protein phosphorylation and composition of ribosomes in maize (*Zea mays* L. *The Journal of Biological Chemistry* 276:10921–10928

Takakura H, Tsunasawa S, Miyagi M, Warner JR. (1992). NH₂-terminal acetylation of ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 267:5442-5

Talens A, van Diggelen OP, Brongers M, Popa LM, Bosch L. (1973). Electrophoretic separation of *Escherichia coli* ribosomal particles on polyacrylamide gels. *European Journal of Biochemistry* 37:121-133

Veuthey AL, Bittar G. (1998). Phylogenetic relationships of fungi, plantae, and animalia inferred from homologous comparison of ribosomal proteins. *Journal of Molecular Evolution* 47: 81–92

Venema J y Tollervey D. (1999). Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Review of Genetics* 33:261-311

Warner J R. (1989). Synthesis of ribosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews* 53: 256–271

Warner J y Gorenstein C. (1977). The Synthesis of Eucaryotic Ribosomal Proteins in Vitro. *Cell* 11:201-212

Williams A, Werner-Fraczek, J, Chang I y Bailey-Serres J. (2003). Regulated Phosphorylation of 40S Ribosomal Protein S6 in Root Tips of Maize¹. *Plant Physiology* 132:2086–2097

Wool IG, Chan YL, Gluck A. (1995). Structure and evolution of mammalian ribosomal proteins. *Biochemistry and Cell Biology* 73: 933–947

Yonath A. (2009). Large facilities and the evolving ribosome, the cellular machine for genetic-code translation. *Journal of Royal Society, Interface* 6: S575–S585

Zhang X, Fang A, Riley CP, Wang M, Regnier FE, Buck C. (2010). Multi-dimensional liquid chromatography in proteomics--a review. *Analytica Chimica Acta* 664:101-13