



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**“EFECTO DE LA INSULINA EN LA
BIOGÉNESIS DE RIBOSOMAS EN MAÍZ
(*Zea mays* L.)”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A:

M. en Biol. Exp. JUAN MANUEL VILLA HERNÁNDEZ

CODIRECTORAS:

Dra. LAURA J. PÉREZ FLORES
Dra. ESTELA SÁNCHEZ DE JIMÉNEZ

ASESORA:

Dra. TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA

México, D. F. 19 de noviembre de 2013

El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020. Número de registro de la beca otorgada por CONACYT 176202 e ICyTDF con número BI-080529224744

Este trabajo fue realizado en:

Laboratorio de Fisiología, Bioquímica y Biología Molecular de Plantas.

Edif. S-253 UAM Iztapalapa.

Los miembros del jurado, designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: "EFECTO DE LA INSULINA EN LA BIOGENESIS DE RIBOSOMAS EN MAÍZ (*Zea mays* L.)" con fecha 19 de Noviembre de 2013.

MIEMBROS DEL JURADO

Dr. Francisco J. Fernández Perrino



Departamento de Biotecnología, DCBS, Universidad Autónoma Metropolitana

PRESIDENTE

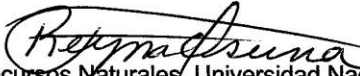
Dr. Fernando Díaz de Leon Sánchez



Departamento de Ciencias de la Salud, DCBS, Universidad Autónoma Metropolitana

SECRETARIO

Dra Helia R. Osuna Fernández



Departamento de Ecología y Recursos Naturales, Universidad Nacional Autónoma de Mexico

VOCAL

Dra. Beatriz Buntello Volante



Instituto de Oftalmología, Conde de Valencia

VOCAL

COMITÉ TUTORAL

CODIRECTORA

Dra. Laura J. Pérez Flores

Profesor Titular "C" T. C.

Laboratorio de Fisiología, Bioquímica y Biología Molecular de Plantas.

Depto. Ciencias de la Salud. DCBS. UAM-I.

ljpf@xanum.uam.mx

CODIRECTORA

Dra. Estela Sánchez de Jiménez

Profesor Titular "C" T. C.

Laboratorio 103

Depto. Bioquímica, Facultad de Química, UNAM

estelas@servidor.unam.mx

Asesora

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

Profesor Titular "A" T. C.

Laboratorio 103. Edif. E.

Depto. Bioquímica. Facultad de Química. UNAM

cesy@unam.mx

“No voy a dejar de hablar sólo porque nadie me esté escuchando. Me gusta escucharme a mí mismo, es uno de mis mayores placeres. A menudo tengo largas conversaciones conmigo mismo, y soy tan inteligente que a veces no entiendo ni una palabra de lo que digo”

RESUMEN

La biogénesis de ribosomas es un requisito para el crecimiento y proliferación celular; es un proceso altamente regulado que consume una gran cantidad de energía. Requiere de la producción coordinada de ARNr, de proteínas ribosomales (PRs) y de factores no ribosomales que participan en el procesamiento y movilización de los nuevos ribosomas. La biogénesis de ribosomas se ha estudiado ampliamente en levaduras y animales; sin embargo se conoce poco acerca de este proceso en plantas. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la biogénesis de ribosomas en semillas de maíz durante la germinación, un estado caracterizado por su rápido crecimiento y el efecto de la insulina en este proceso. Se ha reportado que la insulina acelera la germinación en maíz así como el crecimiento de la plántula. Se observó que entre los primeros eventos reactivados después de las 3 horas de imbibición están la transcripción del ADNr y el procesamiento del pre-ARNr, y que la insulina estimula ambos procesos (40-230%). El transcrito de nucleolina una proteína que regula la transcripción del ADNr y el procesamiento del pre-ARNr, se encuentra entre los mensajes almacenados en la semilla seca quiescente y es movilizada hacia la fracción polisomal durante las primeras horas de imbibición (6 hrs.). En contraste, la síntesis de proteínas ribosomales es baja durante las primeras horas de imbibición (3 y 6 hrs.) y se incrementa 60 veces en la imbibición tardía (24 hrs.). La insulina incrementa esta síntesis (75%) a las 24 horas; sin embargo no todas las proteínas ribosomales son reguladas en forma similar. En este sentido, se observó un incremento en los niveles de las proteínas ribosomales PRS6 y PRL7,

mientras que los niveles de la proteína de PRL3 no cambiaron aunque la transcripción de este gen si se incrementó. Los resultados muestran que la biogénesis de ribosomas en los primeros estados de imbibición se lleva a cabo con ARNr recién sintetizado y con proteínas ribosomales traducidas a partir de ARNm almacenados.

ABSTRACT

Ribosome biogenesis is a pre-requisite for cell growth and proliferation; it is however, a highly regulated process that consumes a great quantity of energy. It requires the coordinated production of rRNA, ribosomal proteins and non-ribosomal factors which participate in the processing and mobilization of the new ribosomes. Ribosome biogenesis has been studied in yeast and animals; however, there is little information about this process in plants. The objective of the present work was to study ribosome biogenesis in maize seeds during germination, a stage characterized by its fast growth, and the effect of insulin, homolog the endogenous maize grow factor ZmIGF in this process. Insulin has been reported to accelerate germination and to induce seedling growth. It was observed that among the first events reactivated just after 3 hours of imbibition are the rDNA transcription and the pre-rRNA processing and that insulin stimulates both of them (40-230%). The transcript of nucleolin, a protein which regulates rDNA transcription and pre-rRNA processing, is among the messages stored in quiescent dry seeds and it is mobilized into the polysomal fraction during the first hours of imbibition (6h). In contrast, *de novo* ribosomal protein synthesis was low during the first hours of imbibition (3 and 6 h) increasing by 60 times in later stages (24 h). Insulin increased this synthesis (75%) at 24 h of imbibition; however, not all ribosomal proteins were similarly regulated. In this regard, an increase in RPS6 and RPL7 protein levels was observed, whereas RPL3 protein levels did not change eventhough its transcription was induced. Results show that ribosome

biogenesis in the first hours of imbibition is carried out with newly synthesized rRNA and ribosomal proteins translated from stored mRNA

ÍNDICE

Antecedentes.....	1
1. Crecimiento y proliferación	1
1.1 Crecimiento celular mediado a través de TOR	1
2. Síntesis de proteínas	4
2.1 Fases de la síntesis de proteínas	5
3. Estructura de los ribosomas	6
3.1 Regulación del inicio de la traducción	7
4. Biogenesis de ribosomas y su regulación	8
4.1 Participación de TOR en la biogenesis de ribosomas	9
4.2 Transcripción y procesamiento del pre-ARNr	13
4.3 Formación de las subunidades ribosomales	17
4.4 Nucleolina	18
5. Efecto de la insulina y factores semejantes a insulina (IGF's) en la biogenesis de ribosomas	20
6. Semillas y germinación	21
6.1 Importancia de la semilla	21
6.2 Germinación	22
7. Biogenesis de ribosomas en plantas	24
8. Efecto de la insulina en plantas	27
Justificación	30
Hipótesis	31
Objetivos	32
Materiales y metodos	34
1. Obtención de material biológico	34
2. Aislamiento de ARN total	34
3. Extracción de ARN de la fracción polisomal	35
4. Análisis po Northern blot de los precursores dea ARN ribosomal	37
5. Obtención de proteínas ribosomales	40
6. Efecto de la insulina en la síntesis <i>de novo</i> de PRS6, PRL7 y PRL3	41
7. Expresión de los niveles de transcritos y PRL3 por RT-PCR	42

8. Caracterización del homólogo de la proteína nucleolina (Zmnuc) por western blot	43
Resultados	45
- Efecto de la insulina en la síntesis <i>de novo</i> del ARN ribosomal	45
- Precursores de los ARN ribosomales maduros durante la germinación temprana	46
- Análisis de los transcritos del gen de nucleolina en las primeras horas de imbibición	50
- Caracterización de la proteína nucleolina en ejes embrionarios de maíz .	53
- Efecto de la insulina en la síntesis <i>de novo</i> de proteínas ribosomales durante la germinación	54
- Efecto de la insulina en la regulación del gen y proteína PRL3 en estados de imbibición tardía	56
Discusión	59
Conclusión	66
Bibliografía	67
Anexo 1	81
Anexo 2	82

ANTECEDENTES.

1. *CRECIMIENTO Y PROLIFERACIÓN*

En general se considera que el crecimiento celular (incremento en tamaño y masa celular) es un prerrequisito para la proliferación (incremento en el número de células), ya que la célula se divide sólo después de haber alcanzado una masa crítica (Hunt y Nasmyth, 1997). Se ha observado que el incremento en la traducción, así como en la síntesis y acumulación de ribosomas son procesos fundamentales para un crecimiento y proliferación celular eficientes. Los factores que dirigen la progresión del ciclo celular pueden también regular el crecimiento de una forma interrelacionada (Hannan y col., 2003).

La coordinación del crecimiento y la división asegura que las células mantengan un tamaño constante, y que los tejidos y órganos en desarrollo lleguen a un tamaño y densidad celular apropiados. La falla en esta coordinación resulta en un crecimiento desbalanceado lo que lleva a un tamaño celular anormal y culmina con la muerte de la célula (Neufeld y Edgar, 1998).

1.1 *CRECIMIENTO CELULAR MEDIADO A TRAVÉS DE TOR*

Los mecanismos que coordinan el crecimiento y la división celular no se conocen del todo, pero se sabe que la vía de señalización mediada por la proteína reguladora TOR (denominada así por sus siglas en inglés Target of Rapamycin y también conocida anteriormente como FRAP, RAFT o RAPT) regula ambos

procesos: el crecimiento celular y la progresión del ciclo celular (Fingar y col., 2004).

Se ha demostrado que TOR, tanto en mamíferos como en levaduras, regula varios procesos que están relacionados con el crecimiento celular. En este sentido, TOR regula directa o indirectamente la iniciación de la traducción, la organización de la polimerización de la actina, la síntesis de ARNt, la biogénesis ribosomal, la degradación de proteínas y la transcripción (Schmelzle y Hall, 2000). Asimismo, la inhibición de TOR bloquea el paso de la fase G1 a S en el ciclo celular (Dutcher, 2004).

Las proteínas TOR pertenecen por homología a una familia denominada PIKKs (quinasas relacionadas con la fosfoinosítido-3 cinasa). La cinasa TOR es un regulador importante del inicio de la traducción a través de dos vías distintas e integradas. Por una parte TOR, fosforila a la 4EBP1 (proteína de unión 1 al factor de iniciación de la traducción 4E), liberando al factor de iniciación eIF4E para que se asocie con eIF4G formando el complejo activo eIF4F, el cual participa en la unión del ARNm por la subunidad ribosomal 40S. Una mayor disponibilidad del factor eIF4E es importante para la traducción de ARNm que contienen regiones no traducibles en el extremo 5' largas y estructuradas (Hannan y col., 2003).

La segunda vía activada por TOR induce a la fosforilación de la proteína cinasa 1 de la proteína ribosomal S6 (S6K1) y estimula la traducción de ARNm conocidos como 5'TOP (mensajes que tienen una secuencia de pirimidinas en el extremo 5')

(Hannan y col., 2003). Entre los mensajes que se han identificado como 5'TOP se encuentran los de componentes de la maquinaria de síntesis de proteínas ribosomales, los factores de inicio y elongación de la traducción, la proteína de unión a poli A, P40 (una proteína ribosomal de rata) y proteínas de unión a cap. En plantas se ha observado que entre los mensajes que codifican los ARNm 5'TOP se encuentran, además de los de proteínas ribosomales, el de eIFiso4E (Dinkova y col., 2000; Meyuhas y Hoonstein 2000).

En mamíferos, en respuesta a factores de crecimiento y aminoácidos, mTOR controla la maquinaria de traducción a través de ambas vías (activación de la protein cinasa S6K1 y la liberación de eIF4E por el inhibidor 4E-BP1). Asimismo, una de las vías que se activa involucra al receptor de insulina, a los sustratos del receptor de insulina y a la PI3K. Río abajo de la PI3K, la vía que controla el crecimiento incluye a la protein cinasa 1 dependiente de 3-fosfonosítido (PDK1), la protein cinasa B (PKB, también conocida como Akt) y a la S6K1. La figura 1 muestra un modelo de la vía de señalización de mTOR en respuesta a algunos efectores (aminoácidos y factores de crecimiento) (Schmelzle y Hall, 2000).

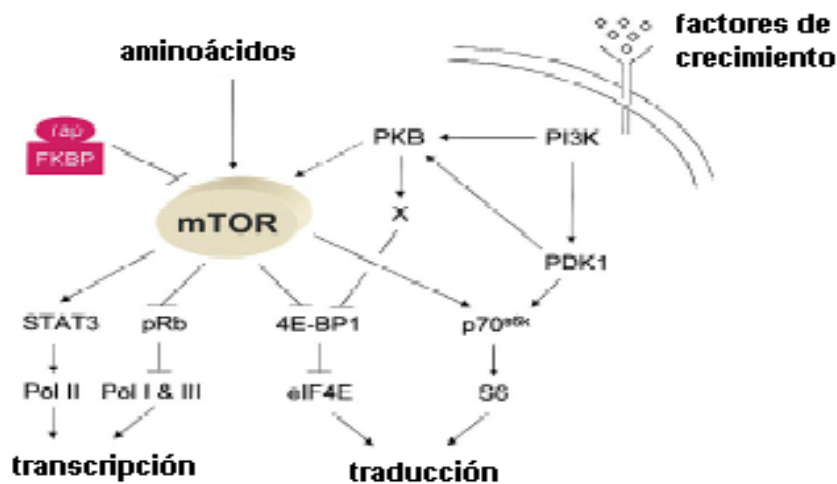


Figura 1. Participación de mTOR en respuesta a efectores en la regulación de la transcripción y traducción.

Sin embargo, en algunos casos se ha reportado que el crecimiento celular no es incondicionalmente dependiente de la progresión del ciclo celular. Algunos estudios han demostrado que el crecimiento celular y la progresión del ciclo celular pueden ser procesos separados. En este sentido, se ha observado en *Saccharomyces cerevisiae* y en *Drosophila melanogaster* que mutaciones que bloquean o alteran la división celular no necesariamente detienen el crecimiento. Por otro lado, se ha observado que huevos fertilizados de rana se dividen sin crecer y las neuronas crecen sin dividirse (Hunt y Nasmyth, 1997; Hannan y col., 2003).

2. SÍNTESIS DE PROTEÍNAS.

La síntesis de proteínas es uno de los procesos celulares que requiere gran consumo de energía y su regulación está acoplada al estado metabólico de las

células (Pestova y Hellen, 2000). Por lo tanto, la velocidad de la síntesis de proteínas se regula integrando el proceso de traducción con otras vías metabólicas y procesos del desarrollo. En este sentido, se han observado cambios rápidos en la regulación de la velocidad de traducción durante la mitosis, en respuesta a diferentes tipos de estrés y a tratamientos con hormonas y factores de crecimiento (Hershey, 1989).

2.1 FASES DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS

El proceso de traducción o síntesis de proteínas puede dividirse en tres fases:

- ❖ Fase de iniciación. Implica el reconocimiento del codón de inicio (AUG) de los ARNm por el ribosoma, y la intervención de un aminoácil ARNt iniciador (cargado con metionina), así como factores de iniciación.
- ❖ Fase de alargamiento. En esta etapa se van adicionando los aminoacil-ARNt, correspondientes a los codones indicados en el ARNm e involucra la formación de uniones peptídicas entre los aminoácidos. En esta etapa se requiere de la participación de factores de elongación.
- ❖ Fase de terminación. En esta etapa se reconoce un codón de terminación que indica el final de la traducción y se agregan factores que liberan el complejo ribosomal, el ARNm y la proteína recién sintetizada. Durante la síntesis de proteínas, una sola molécula de ARNm puede ser traducida simultáneamente por muchos ribosomas formando lo que se conoce como polisomas (Rawn, 1991).

En eucariontes, el paso limitante en la síntesis de proteínas es el reconocimiento y la unión del ARNm a los ribosomas (fase de iniciación). El ARNm sufrirá en el

núcleo una serie de modificaciones, antes de ser liberado al citoplasma para su traducción. Entre estas modificaciones se encuentran la adición de un capuchón (cap, una 7 metil-guanosina con un enlace poco habitual con el primer nucleótido del ARNm) en el extremo 5', que se cree facilita su salida del núcleo, el corte de secuencias no codificantes (procesamiento) y, en la mayoría de los casos, la adición de una cadena de poliadenosinas (poli A) en su extremo 3'.

En células eucariontes existen varias proteínas que ayudan al reconocimiento del ARNm para la traducción, a las que se les denominan genéricamente Factores de Iniciación eucarióticos (eIF). Algunos de estos factores son conocidos como proteínas de unión al "cap" (CBP, por sus siglas del inglés *cap-binding protein*). Estos factores interactúan con el cap 5' y ayudan a reclutar al ARNm para la traducción (Rawn, 1991).

3. ESTRUCTURA DE LOS RIBOSOMAS

La síntesis de proteínas tiene lugar básicamente en los ribosomas. Los ribosomas son complejos ribonucleoproteicos con un coeficiente de sedimentación (CS) de aproximadamente 80S, en el caso de los organismos eucariontes. Estas estructuras están compuestas por dos subunidades de distinto tamaño. En el caso de los eucariontes superiores son las subunidades 40S y 60S. Cada subunidad consta de dos tipos de moléculas: el ácido ribonucleico ribosomal (ARNr) y las proteínas ribosomales (PR) (Rawn, 1991; Mathews y col., 2002).

La función de los ribosomas en todos los organismos eucariontes es la de unir los aminoácidos por medio de enlaces peptídicos para formar proteínas, empleando la secuencia de nucleótidos de un ARNm maduro; este proceso es conocido como traducción o síntesis de proteínas (Nygard y Nilsson, 1990).

La subunidad grande (60S) contiene aproximadamente 50 proteínas diferentes y tres moléculas de ARNr con un CS de 5S, 5.8S y 28S respectivamente y la pequeña (40S) consta de un ARNr de 18S y aproximadamente 30 proteínas ribosomales (Rawn, 1991; Verschoor y col., 1996).

3.1 REGULACIÓN DEL INICIO DE LA TRADUCCIÓN

Los estudios sobre regulación de la traducción por los ribosomas se han enfocado en la proteína S6, constituyente de la subunidad 40S del ribosoma y que se encuentra localizada en el área relacionada con la unión al ARNm, ya que como, se mencionó antes, parece ser el blanco de la actividad de diversos efectores del crecimiento (Ferrari y Thomas, 1994; Turck y col., 2004).

La proteína S6 es regulada por fosforilación sobre residuos de serina y treonina. En animales existen varias cinasas que fosforilan a S6, la p70S6K (S6K1), la p85 S6K (S6K2) y la MAPK APK1 (proteína cinasa activada por mitógenos, activada por la proteína cinasa 1). La fosforilación de los 7 a 9 sitios fosforilables de S6 ocurre en una secuencia específica. Estos sitios están localizados en un fragmento de 15 residuos en el extremo C-terminal. Se ha observado que las subunidades ribosomales con la proteína S6 fosforilada se encuentran

preferentemente en la fracción de los polisomas asociada con ARNm 5' TOP (Duncan y McConkey, 1982; Kleijn y col., 1998).

En los mensajes 5' TOP el sitio del cap es seguido por un grupo de 4-14 pirimidinas (extensión de pirimidinas en posición 5' terminal). Aunque dicha composición de pirimidinas varía entre las distintas especies, mantienen una proporción similar de C y U. Poseen también una región 5' no traducible (5'UTR) que varía en longitud de 21 a 505 nucleótidos antes del codón de inicio, además de un elemento cis-regulatorio traduccional (TLRE) (Meyuhas y Hornstein, 2000).

En células intactas, la fosforilación de S6 es uno de los primeros eventos detectados después de la estimulación mitogénica de células quiescentes al entrar al ciclo celular y está estrechamente relacionada con la activación de la vía TOR lo cual conlleva a un incremento en la síntesis de proteínas (Harold y col., 1996).

4. *BIOGÉNESIS DE RIBOSOMAS Y SU REGULACIÓN.*

La síntesis de ribosomas es un proceso fundamental para la vida de la célula, consume una vasta porción de metabolitos y energía celular, está relacionada con el crecimiento y requiere de la producción coordinada de proteínas ribosomales (PR) y ARNr. La regulación de la síntesis de ribosomas ocurre en respuesta a condiciones favorables y permite a la célula crecer más rápido. Esto ocurre sólo si los componentes del ribosoma y la maquinaria de ensamblaje están disponibles.

Existen puntos de regulación de la biogénesis de ribosomas, a través de los cuales la célula determina si crece y, si es así, en qué proporción. Para la producción de ribosomas en la célula eucarionte se ensamblan más de 70 proteínas ribosomales con cuatro diferentes especies de ARNr (25S/28S, 18S, 5.8S y 5S), y para que se lleve a cabo este proceso se requieren de otras proteínas. Los factores que se asocian con los precursores incluyen RNP pequeños nucleolares (ribonucleoproteínas conocidas como snoRNPs) y proteínas no ribosomales que modifican los pre-ARNr (tales como endo y exonucleasas, metiltransferasas) o ARN helicasas y chaperonas, que ayudan a la remodelación y doblamiento de RNPs y a la asociación/disociación de proteínas. Este proceso depende de la acción coordinada de las tres polimerasas implicadas en la transcripción: ARN Polimerasa I, II y III (Pol I, II y III). La Pol I produce los ARNr 25S/28S, 5.8S y 18S. La Pol III sintetiza los ARNr 5S y la Pol II transcribe los ARN mensajeros, entre ellos los de las proteínas ribosomales (Schmelzle y Hall, 2000; Tschochner y Hurt, 2003).

4.1 PARTICIPACIÓN DE TOR EN LA BIOGENESIS DE RIBOSOMAS

El mecanismo del procesamiento del pre-ARNr, los intermediarios y el ensamblaje de los ribosomas se ha estudiado más intensamente en la levadura *S. cerevisiae* ya que es un organismo modelo para el estudio de este proceso. Estudios hechos en este organismo han demostrado que, al igual que en mamíferos, TOR regula la biogénesis ribosomal a través del control tanto de la transcripción de genes de proteínas ribosomales como de la síntesis y el procesamiento subsecuente del precursor del ARNr 35S. Tratamientos con rapamicina reducen la transcripción de

genes que codifican para proteínas ribosomales, un proceso mediado por la ARN Pol II así como el procesamiento del precursor del ARNr 35S. Las proteínas TOR de levadura también controlan la síntesis de ARNr y proteínas ribosomales (Powers y Walter, 1999; Schmelzle y Hall, 2000; Granneman y Baserga, 2004).

En estudios hechos con células HEK293 (una línea celular de animales que está en continua proliferación) se ha observado que las vías de PI3K y MAPK modulan la vía TOR durante la regulación de la transcripción de genes de ARNr por la ARN Pol I, en respuesta a señales ambientales, y a factores de crecimiento, como el IGF-1, y nutrimentos, como aminoácidos (James y Zomerdijk, 2004).

Los resultados obtenidos en células de mamíferos y levaduras indican que la vía de señalización mediada por TOR tiene un papel esencial en la biogénesis ribosomal a diferentes niveles: transcripcional, postranscripcional (procesamiento del precursor de los ARNr) y traduccional. Los resultados de la participación de TOR en el control de la biosíntesis y la actividad de la maquinaria traduccional enfatizan el papel clave de TOR en el control del crecimiento celular (Schmelzle y Hall, 2000).

Estudios realizados en la línea celular NIH 3T3 (células de fibroblastos) y en células de miocitos demostraron que para la transcripción de genes ribosomales se requiere la regulación mediada por mTOR de la fosforilación de S6 y el factor de unión al ADN denominados UBF (por sus siglas en inglés, Upstream Binding Factor). Se ha propuesto que UBF es un factor clave en la síntesis de ARNr, en el

crecimiento y en la diferenciación celular. Por otro lado, se ha demostrado que en células humanas el factor UBF interacciona con otra proteína, denominada SL1, formando el complejo UCE, que reconocería el promotor del ADNr y potenciaría la actividad de la ARN Pol I para la transcripción de los genes ribosomales (Bell y col., 1988; Brandenburger y col., 2001; Hannan y col., 2003).

Como ya se mencionó anteriormente, la vía de señalización mediada por mTOR es un mecanismo por el cual las células eucariontes ajustan la capacidad de biosíntesis de proteínas a la disponibilidad de nutrientes. Tanto en levaduras como en mamíferos, la vía TOR regula la síntesis de componentes ribosomales, incluyendo la transcripción y procesamiento del pre-ARNr, la expresión de proteínas ribosomales y la síntesis del ARNr 5S (Figura 2) (Mayer y Grummt, 2006).

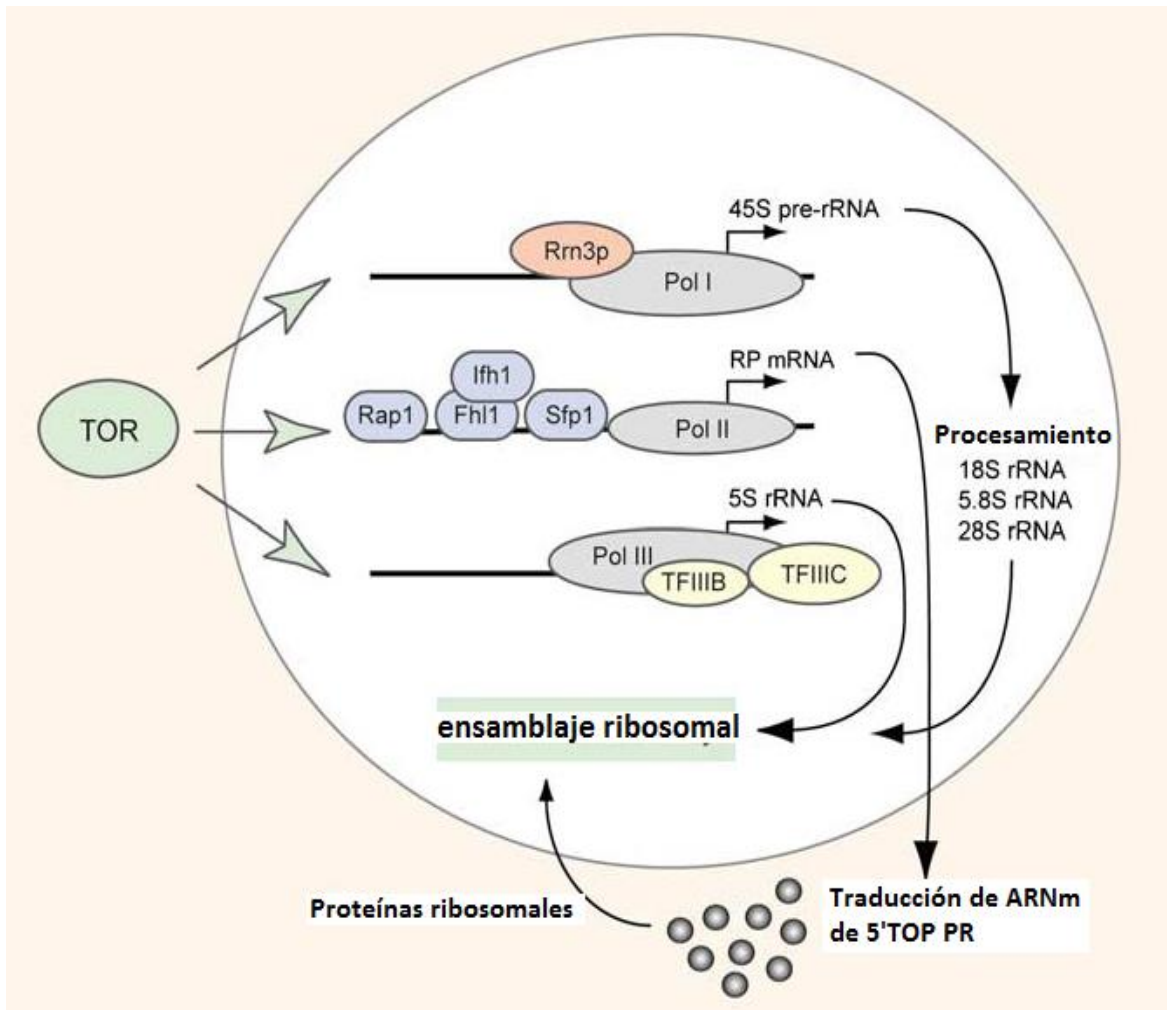


Figura 2. TOR coordina la biogénesis de ribosomas controlando la transcripción mediada por las ARN polimerasas I, II y III (Mayer y Grummt, 2006).

Como se mencionó, en células de mamíferos la síntesis de proteínas ribosomales es inducida por la vía de señalización mTOR-S6K1 a través de la estimulación de la traducción de 5'TOP ARNm. Diversos reportes indican que, tanto la síntesis de proteínas ribosomales como la síntesis de ARNr, se inhiben en presencia de rapamicina porque son procesos controlados por la acción de mTOR, ya que esta enzima controla positivamente la actividad la ARN Pol I y la ARN Pol III, por medio de la inactivación de la proteína del retinoblastoma (pRb). La proteína pRb inhibe

la transcripción de la Pol I y III y la inactivación por fosforilación de esta proteína es bloqueada por la rapamicina (Schmelzle y Hall, 2000; Schawalder y Shore, 2003; Warner y col. 2003).

La biogénesis de ribosomas en eucariontes involucra el procesamiento del pre-ARNr y el ensamblaje secuencial de un gran número de PR en el ARNr. Por tanto, la regulación de la transcripción de los genes de ARNr por la ARN Pol I es un proceso fundamental para la biogénesis del ribosoma y, por consiguiente la capacidad de traducción y el crecimiento también en plantas (Granneman y Baserga; 2004; James y Zomerdijk, 2004).

4.2 TRANSCRIPCIÓN Y PROCESAMIENTO DEL pre-ARNr

La ARN Pol I transcribe un precursor policistrónico que contiene la secuencias de ARNr maduros (ARNr 18S, 5.8S, 25-28S), dos secuencias transcritas externas (EST) y dos secuencias transcritas internas (ITS). Esta característica está conservada en los organismos de todos los reinos de vida conocidos, como puede verse en la figura 3 (Granneman y Baserga 2004; Phipps y col.y 2011; Mullineux y Lafontaine 2012).

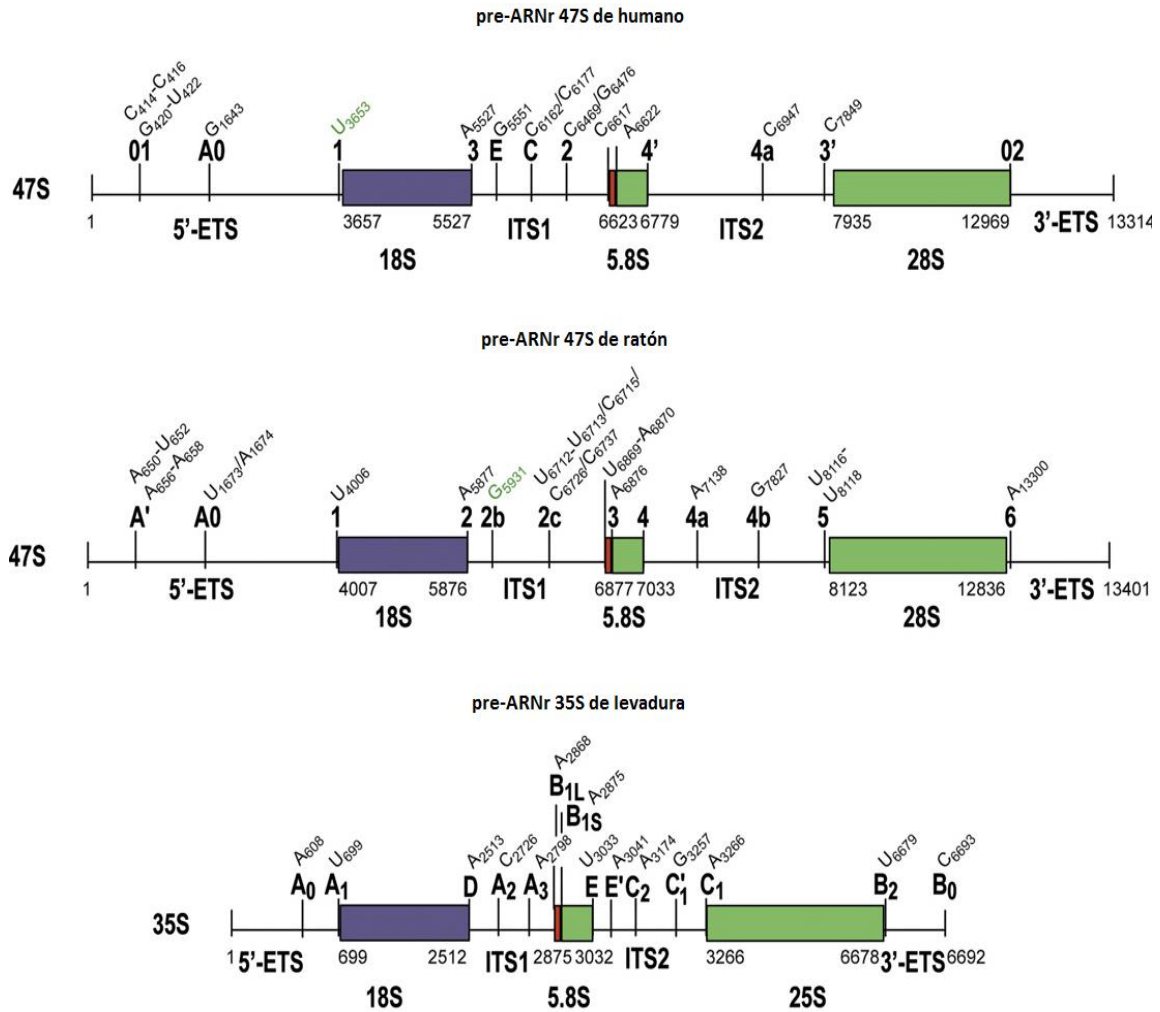


Figura 3. Transcrito primario del ARN ribosomal en diferentes organismos. Se muestran los pesos del pre-ARNr así como los ARN ribosomales 18S, 5.8S y 28S flanqueadas por las secuencias ETS (*External Transcribed Spacer*, en los extremos 5' y 3') y las secuencias ITS (*Internal Transcribed Spacer*) (Mullineux y Lafontaine; 2012).

El procesamiento del pre-ARNr en células eucariontes se lleva a cabo sucesivamente en el nucleolo, nucleoplasma y citoplasma. En estudios hechos en *S. cerevisiae* se ha observado, que el pre-ARNr se transcribe como un solo

precursor, denominado pre-ARNr 35S, que presentará modificaciones químicas en los sitios denominados A₀, A₁, A₂ y D. Uno de los primeros componentes que actúan en el procesamiento del pre-ARNr es el denominado U3 snoRNP (partícula snoRNP pequeña nucleolar, de más de 2 MDa). Se ha propuesto que la unión de U3 snoRNP al pre-ARNr es necesaria para llevar a cabo los cortes primarios del precursor y para el subsecuente ensamblaje de la subunidad 40S (Venema y Tollervey, 1999; Fromont-Racine y col., 2003; Tschochner y Hurt, 2003).

El sitio A₀ en el extremo 5'-ETS genera el pre-ARNr 33S, el sitio A₁ genera el pre-ARNr 32S y el sitio A₂ en ITS1 genera los pre-ARNr 20S y 27SA₂. Los pasos subsecuentes del procesamiento del pre-ARNr 20S ocurren en el citoplasma. El ARNr 18S maduro es liberado del sitio D a partir del pre-ARNr 20S, mientras que el procesamiento del pre-ARNr 27SA₂ continúa en el núcleo. El 27SA₂ es madurado para convertirse en los ARNr 5.8S y 25S por dos vías alternativas: cerca del 85% de la población 27SA₂ es cortada en el sitio A₃ en la secuencia ITS1 por la ARNasa MRP, seguido por un corte en el sitio B₁₅ por la ARNasa Rat1; mientras que el 15% del 27SA₂ es cortado directamente en el sitio B_{1L}. El corte en el sitio B₂, en el extremo 3' del 25S, está asociado con el corte en el sitio B₁. Las dos formas de 27SB (27SB_S y 27SB_L) son maduras en vías seguidas e idénticas que involucran el procesamiento en los sitios C₂ → C₁ y una digestión exonucleolítica en el sitio E por un complejo exosoma con dirección 3' a 5' (Figura 4) (Fromont-Racine y col., 2003).

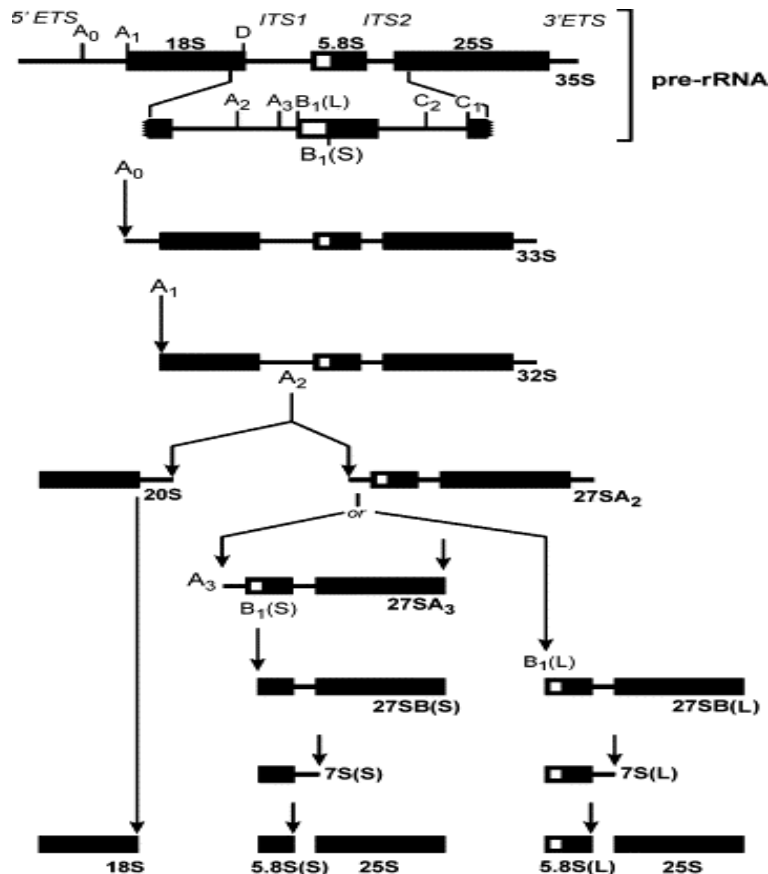


Figura 4. Representación esquemática de la vía de procesamiento del pre-ARNr en *Saccharomyces cerevisiae* (Fromont-Racine y col., 2003).

Durante el procesamiento del pre-ARNr también hay modificaciones postranscripcionales, como la isomerización de uridinas a pseudouridinas y la metilación de las ribosas en el grupo 2'-hidroxilo de los ARNr recién sintetizados, que se ha propuesto que están implicadas en la conformación y estabilización del ARNr, así como en la actividad de las subunidades ribosomales maduras durante la traducción. El número de modificaciones no se encuentra conservado entre las especies (Fromont-Racine y col., 2003).

4.3 FORMACIÓN DE LAS SUBUNIDADES RIBOSOMALES

La formación de los ribosomas es un proceso coordinado que requiere de la síntesis, procesamiento y modificación del pre-ARN ribosomal, del ensamblaje con las proteínas ribosomales y de la interacción de numerosos factores no ribosomales que en conjunto forman las partículas pre-ribosomales (Tschochner y Hurt, 2003).

En estudios en levadura se encontró que las subunidades 40S y 60S son generadas en el nucleolo a partir de un precursor denominado pre-ribosoma 90S (partícula pre-ribosomal que contiene el pre-ARN 35S, proteínas ribosomales y factores no ribosomales) antes de ser exportadas al citoplasma. El ensamblaje y procesamiento de estas subunidades son llevados a cabo por un complejo de pequeñas proteínas no ribosomales denominadas "procesoma SSU (por sus siglas en inglés de *small subunit processome*), para que sean exportadas del núcleo como subunidades maduras, es decir los complejos de proteínas ribosomales y ARNr (Tschochner y Hurt, 2003; Granneman y Baserga, 2004).

En los ribosomas eucariontes se caracterizó una proteína denominada Nug1, perteneciente a la familia de las GTPasas, que está involucrada en la biogénesis de la subunidad 60S (Babler y col., 2003).

En levaduras se han caracterizado al menos 170 factores no ribosomales participantes en este proceso, la mayoría han implicado en la maduración del ARNr (procesamiento y modificaciones nucleotídicas). Por otro lado, en bacterias

se han caracterizado menos factores no ribosomales de este tipo, entre los que se encuentran las chaperonas Era, Obg, YjeQ e Y1qF involucradas en la maduración, el ensamblaje y la actividad de los ribosomas (Fromont-Racine y col., 2003, Comartin y Brown; 2006).

Uno de los factores no ribosomales más caracterizado, desde levaduras hasta mamíferos es la proteína nucleolina, una fosfoproteína que se encuentra distribuida en el nucleolo, núcleo y citoplasma de todos los eucariontes. Regula varios aspectos del metabolismo del ADN y ARN, entre ellos la estructura de la cromatina, la transcripción del ADNr y la maduración del ARNr, la citocinesis, la nucleogénesis, la proliferación celular y el crecimiento, así como el plegamiento, la maduración y el ensamblaje de las subunidades ribosomales y el transporte nucleocitoplasmático de los pre-ARNr recién sintetizados. Se ha reportado que dicha proteína presenta actividad de chaperona de histona y ayuda a promover la transcripción del ARN remodelando la estructura del nucleosoma (Ginisty y col, 1999; Mongelard y Bouvet, 2006; Tajrishi y col., 2011).

4.4 NUCLEOLINA

La proteína nucleolina consiste de tres estructuras y dominios multifuncionales:

- una región N-terminal, que contiene varios dominios ácidos y que interactúan con las regiones espaciadoras no transcritas en el ADNr y con la histona H1 para influir en la transcripción,

- de dos a cuatro dominios de unión al ARN denominados motivos de reconocimiento del ARN (RRM, por sus siglas en inglés) en la región central. Se ha reportado que estos dominios interactúan con la estructura tallo-asa del ARNr y participan en la modificación y procesamiento del pre-ARNr.
- un tercer dominio en la región C-terminal rico en glicina/arginina denominado dominio GAR. La longitud del dominio GAR es variable entre proteínas de diversas especies y la secuencia y ordenamiento de las repeticiones no se encuentra conservada. Este dominio se encuentra implicado en el ensamblaje ribosomal y en la salida de las subunidades ribosomales del núcleo al citoplasma, así como en interacciones proteína-proteína (Tajrishi y col., 2011)

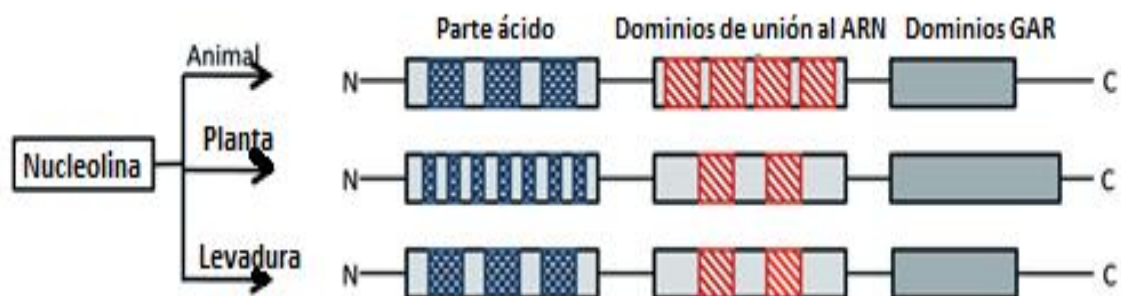


Figura 5. Representación esquemática de los dominios de la secuencia primaria de nucleolina y proteínas semejantes a nucleolina en animales, plantas y levaduras (Tajrishi y col., 2011).

En células en interfase el nucleolo está formado por tres componentes básicos: los centros fibrilares, los componentes fibrilares densos y los centros granulares. La nucleolina se localiza en los centros fibrilares densos, donde se lleva a cabo el procesamiento temprano del pre-ARNr, así como en los centros granulares donde

se lleva a cabo el procesamiento tardío del pre-ARNr además de la formación de las partículas preribosomales (Mongelard y Bouvet, 2006; Tajrishi y col., 2011).

5 EFECTO DE LA INSULINA Y FACTORES SEMEJANTES A INSULINA (IGF's) EN LA BIOGÉNESIS DE RIBOSOMAS

Hannan y col. reportaron en 1998 que la insulina regula la transcripción del ADN ribosomal en la línea celular H4-II-E-C3 y en cultivos de fibroblastos de ratón; dicha regulación no se encontraba asociada con un cambio en el contenido celular de la ARN polimerasa I. Sin embargo, se ha observado un incremento en los niveles del factor de transcripción UBF y de la proteína PAF53, factores asociados a la ARN polimerasa I y que forman parte del complejo de iniciación de la transcripción.

Estudios realizados con cultivos de hepatocitos de ratón, en presencia de insulina, mostraron un incremento en los niveles de los ARN ribosomales 18S y 28S, así como de las proteínas ribosomales y del número de ribosomas; además de un incremento en la síntesis de proteínas celulares, lo que sugería que el número de ribosomas era el factor primario para determinar la velocidad de síntesis de proteínas (Antonetti y col., 1993). Así mismo, Hammond y Bowman demostraron en 1988 que la insulina regula la síntesis de proteínas ribosomales en cultivos de mioblastos de ratón.

Además, Csermely y col. demostraron en 1993 que en la línea celular preadipocítica 3T3-442A la insulina induce un incremento en la fosforilación de la nucleolina, reacción mediada por la casein cinasa II. Dicha fosforilación regula la salida de los ARN ribosomales del núcleo hacia el citoplasma.

En estudios hechos en células mieloides y fibroblastos de embrión de ratón se observó que el factor semejante a insulina tipo 1 (IGF1) induce la activación y fosforilación de UBF e incrementa la transcripción del ADNr. El mecanismo de acción de este factor se demostró que es a través de la activación y translocación de IRS1 (Insulin Receptor Substrate 1) del citoplasma al núcleo y de su interacción con PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase). Esta cinasa es la encargada de fosforilar a UBF y potenciar la actividad de la ARN pol I (Drakas y col., 2004; Wu y col., 2005).

6 SEMILLAS Y GERMINACIÓN

6.1 IMPORTANCIA DE LAS SEMILLAS

Las semillas son un componente vital de la dieta mundial. Los granos de cereales, que comprenden el 90% de todas las semillas cultivadas, contribuyen a la mitad de abastecimiento de energía por persona. Las semillas se consideran como la unidad básica de dispersión de la planta para su supervivencia, contienen al embrión como una nueva plántula en miniatura, están estructural y fisiológicamente equipadas para funcionar como una unidad de dispersión, de tal forma que contienen reservas alimenticias para sostenerse mientras la plántula en

desarrollo se establece como un organismo autótrofo (Bewley, 1997). Por ser producto de la reproducción sexual, las semillas son fuente de variación genética (Moreno, 1996).

6.2 GERMINACIÓN

Ya que la mayoría de las semillas pasan por un período de desecación durante su maduración, la germinación comienza cuando la semilla quiescente (madura deshidratada (con baja actividad metabólica) entra en contacto con el agua. La primera fase de la germinación consiste en la absorción de agua (imbibición), aunque ésta puede tener éxito sólo cuando la temperatura es apropiada y hay disponibilidad de oxígeno. Las estructuras y enzimas necesarias para la germinación se encuentran en la semilla seca, por lo que en las primeras horas de imbibición se reactiva el metabolismo y se llevan a cabo diversos procesos de reparación. La germinación es completa cuando una parte del embrión en crecimiento se extiende para penetrar las estructuras que la circundan y emerge de la semilla (conocida como protrusión de la radícula a través de la testa). Para entender los eventos bioquímicos y moleculares que ocurren durante la germinación de las semillas se han llevado a cabo distintos experimentos. Entre ellos, se ha establecido que los ejes embrionarios de semillas de cereales reinician la síntesis de proteínas tempranas durante las primeras etapas de la imbibición mediante la traducción de ARNm que quedaron almacenados en los ejes embrionarios desde su maduración (Sánchez de Jiménez y col., 1981; Bewley, 1997). Posteriormente, durante la germinación las células reactivan su metabolismo. El reinicio de la actividad metabólica está relacionado con la

rehidratación. La toma de agua por la semilla madura deshidratada es trifásica, con una toma inicial rápida (fase I) debida a la rehidratación de las biomoléculas, seguida de una meseta (fase II) en la que se reactiva el metabolismo. Un incremento posterior en la toma de agua ocurre solo cuando la germinación se ha completado, conforme el eje embrionario se alarga (fase III) (Figura 6) (Bewley, 1997; Nonogaki y col., 2010).

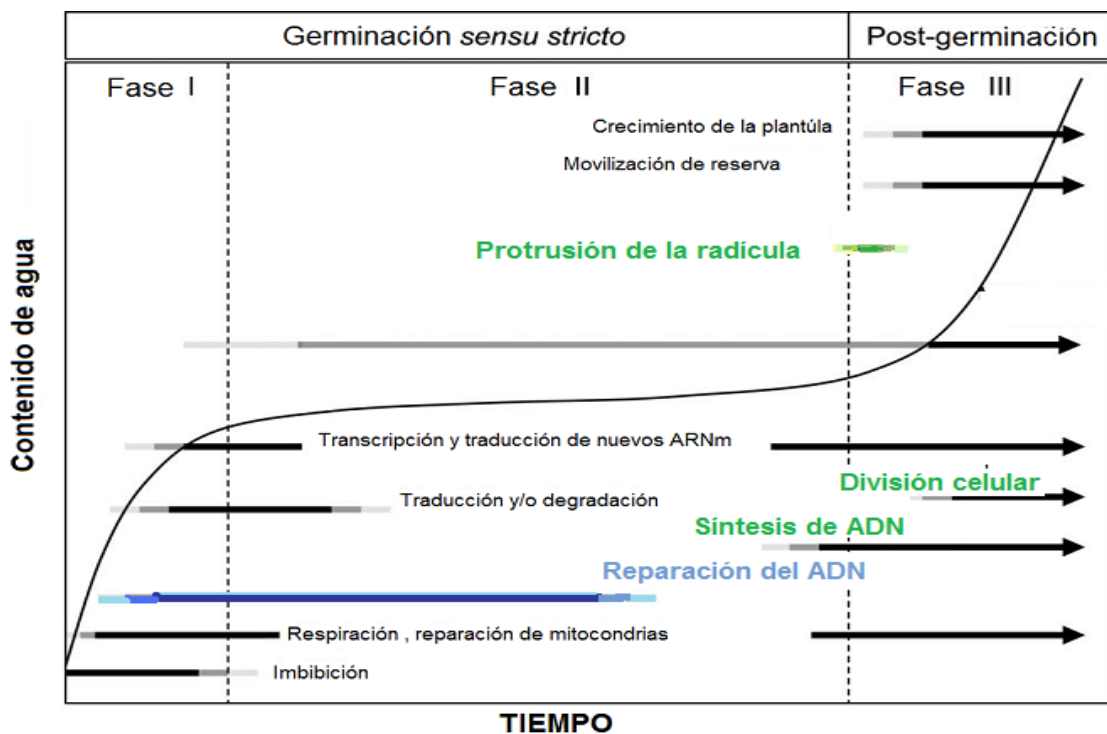


Figura 6. Eventos metabólicos durante la germinación y postgerminación (Nonogaki y col., 2010).

A medida que se imbebe la semilla seca quiescente, se restablece rápidamente su actividad metabólica. Se piensa que las estructuras y enzimas necesarias para el restablecimiento inicial del metabolismo están generalmente presentes dentro de la semilla seca, habiéndose mantenido parcialmente intactas, al menos durante la

deseccación con la que concluye la maduración de la semilla. Por lo anterior, la reabsorción de agua durante la imbibición es suficiente para restablecer las actividades metabólicas, realizándose el recambio o reemplazamiento de los componentes en un lapso de pocas horas a medida que se alcanza el metabolismo óptimo. Uno de los primeros cambios durante la imbibición es el reestablecimiento de la actividad respiratoria, la cual puede ser detectada en minutos de iniciada la imbibición. Después de un rápido incremento inicial en el consumo de oxígeno, éste alcanza una meseta que se sostiene hasta que la radícula penetra las estructuras circundantes (Bewley, 1997) (figura 6).

Todos los componentes necesarios para el restablecimiento de la síntesis de proteínas durante la imbibición ya están presentes dentro de las células de los embriones secos maduros, aunque los polisomas no están formados. Sin embargo, en pocos minutos de rehidratación hay una disminución gradual de los monosomas y subunidades ribosomales, conforme éstos van siendo reclutados para formar complejos de polisomas para la síntesis de proteínas. Esta síntesis inicial es dependiente de los ribosomas y ARN mensajeros preexistentes. Sin embargo, en las primeras horas que siguen al ensamblaje inicial de los polisomas, nuevos ribosomas y ARN mensajeros son sintetizados y utilizados. Los eventos postgerminativos incluyen la movilización de las reservas almacenadas y están asociados con el crecimiento y establecimiento de la nueva plántula (Bewley, 1997).

7 BIOGÉNESIS DE RIBOSOMAS EN PLANTAS

En estudios hechos en ejes embrionarios de *Raphanus sativus* se observó que hay un incremento en la transcripción del ARNr y el procesamiento de su precursor es lento durante las primeras horas de imbibición. Por otro lado, la reactivación de la transcripción ocurre primero en el tejido provascular y en células del ápice y posteriormente en células de la raíz (Aspart y col., 1980).

La expresión de genes de proteínas ribosomales es un proceso muy coordinado, desde bacterias hasta vertebrados y se requieren de cantidades equimolares de proteínas ribosomales para su ensamblaje en los ribosomas. El mecanismo de expresión de genes ribosomales en plantas no se encuentra completamente definido. Estudios en células de *Nicotiana tabacum* donde se incrementó la expresión de la proteína L3 (RPL3) se observó un incremento del crecimiento y desarrollo de la planta. L3 está codificada por dos genes, RPL3A y RPL3B. Estudios en plantas transgénicas que presentan altos niveles de ARNm para RPL3B mostraron un mayor crecimiento de las hojas. Las células epidérmicas se incrementaron en número y decrecieron en tamaño. El precursor del ARNr (pre-ARNr) y los ARNr maduros se acumularon, sugiriendo que hay una regulación de la biogénesis de ribosomas. Por otro lado, en las plantas en las que fueron silenciados los genes RPL3A y B se redujeron los niveles de L3 y las plantas presentaron un fenotipo anormal caracterizado por un retraso en el desarrollo e inhibición del crecimiento de raíces laterales. Se encontró que la deficiencia de L3 llevó a la reducción en el número de células y a un incremento en el tamaño

celular, sugiriendo que L3 regula positivamente la división celular. El decremento en la expresión de los genes RPL3 resultó en un decremento en la acumulación de los pre-ARNr, confirmando que L3 tiene un papel en la biogénesis de los ribosomas (Popescu y Tumer, 2004).

Así mismo, en *Arabidopsis thaliana* se ha descubierto un complejo multiproteico que está involucrado en los primeros pasos del procesamiento del pre-ARNr, al cual se le ha denominado NFD (por las siglas en inglés de *Nuclear Factor D*). Dicho factor contiene homólogos de las proteínas fibrilarina y nucleolina, así como ARNsno U3 y U14 asociados con la fibrilarina los cuales son requeridos en las primeras etapas del procesamiento del pre-ARNr. Es así que el complejo NFD se ensambla primero con el ADNr y continúa unido al pre-ARNr durante los primeros cortes del procesamiento (Sáez-Vasquez y col., 2004a; Sáez-Vásquez y col., 2004b)

Como se mencionó anteriormente, la producción de ribosomas requiere de síntesis de ARNr y snoRNA, los cuales son sintetizados y procesados en el nucleolo y el nucleoplasma. Ambos mecanismos requieren de un procesamiento endonucleolítico para generar las formas maduras correspondientes. Estudios hechos en *Arabidopsis thaliana* han descrito en el núcleo una proteína denominada RNasall-Like la cual pertenece a una familia pequeña de genes distinta a la familia DICER-RNasall. Análisis por western blot han demostrado que en plántulas jóvenes existen dos diferentes formas de AtRNasall en todo el extracto celular, mientras que solo existe una forma en el extracto nuclear. En

flores, se han detectado preferencialmente las formas nucleares y ninguna de las dos formas se ha encontrado en semillas secas. A través de mutantes de inserción de T-DNA en *A. thaliana*, se ha observado que la *AtRNasIII* está implicada en el procesamiento del pre-ARNr y los precursores snoRNA policistronicos, indicando que la proteína *AtRNasIII* está involucrada en la biogénesis de ribosomas participando directamente en el procesamiento del pre-ARNr (en el núcleo y/o citoplasma) y/o afectando la síntesis de snoRNA en el núcleo (Barbezier y col., 2004).

8 EFECTO DE LA INSULINA EN PLANTAS

En semillas de maíz, la insulina acelera la germinación y el crecimiento de las plántulas y promueve el paso de la fase G₁ a S. Este efecto está acompañado por una estimulación en la síntesis de proteínas. Los ejes embrionarios quiescentes de maíz contienen una gran cantidad de ARNm almacenados, así como una poza abundante de subunidades ribosomales que se encuentran en el eje embrionario de la semilla seca, de forma que cuando la imbibición comienza son utilizadas directamente en la síntesis de proteínas (Rincón-Guzmán y col., 1998; Sánchez de Jiménez, 2000; García-Flores y col., 2001).

Otro rasgo interesante del efecto de la insulina es que se ha observado que promueve un incremento en la expresión y la traducción de mensajes 5'TOP en plantas como la PRS6 y el factor eIFiso4E, fosforilación de S6 mediante ZmS6K, un homólogo de la proteína p70^{S6K}, regulación de la síntesis de ADN.

Probablemente este efecto ocurre por la misma vía (TOR-S6K) utilizada en animales, ya que la aplicación de rapamicina inhibe estos efectos (Dinkova y col., 2000; Reyes de la Cruz y col., 2004; Paz-Lemus 2005).

Estudios recientes han reportado un factor endógeno semejante a insulina en maíz denominado ZmIGF (Rodríguez-López y col., 2011). Dicho péptido actúa de manera similar a la insulina y también interviene en la inducción de la fosforilación de S6 y en la estimulación del crecimiento del embrión, ya que en semillas imbibidas en presencia de insulina o ZmIGF se observó un incremento en el crecimiento de la plántula superior al reportado para el testigo imbibido sólo en agua (Jiménez-López y col., 2011; Ávila-Alejandre y col., 2013)

El patrón de proteínas sintetizadas bajo el tratamiento con insulina es muy similar al patrón de síntesis de proteínas en ejes embrionarios tratados con ácido fosfatídico (PA), lo que sugiere que el PA puede ser un intermediario de la vía TOR de señalización de insulina en plantas. Así mismo, al analizar el patrón de proteínas ribosomales sintetizadas en la parte aérea de ejes embrionarios de maíz se observó que la insulina y el PA aumentan la síntesis de una proteína de aproximadamente 32 kDa (posiblemente la proteína ribosomal S6) (Buentello-Volante y col., 2010).

Por otro lado, se ha observado que los factores de crecimiento insulina/IGF han mostrado tener un papel clave en el crecimiento, proliferación y supervivencia celular en mamíferos. La vía de señalización activada por estos factores regula

procesos específicos, entre los que están la progresión de la fase G1/S del ciclo celular y la activación de la síntesis de proteínas. En plantas se conoce poco sobre este proceso, sin embargo se ha reportado que durante la maduración de las semillas de maíz, las células se detienen en la fase G1/S (Oldham y Hafen, 2003; Vázquez-Ramos y Sánchez., 2003; Fingar y col., 2004). Más aún, recientemente Ávila-Alejandre y col. en 2013 demostraron que la insulina estimula la transición de la fase G1/S y reactiva el ciclo celular después de las 15 horas de imbibición. En este sentido, en meristemos radiculares de *Arabidopsis thaliana* se observó que la glucosa regula la señalización mediada por TOR fosforilando al factor de transcripción E2Fa para una activación no convencional de los genes de la fase S del ciclo celular (Xiong y col., 2013).

JUSTIFICACIÓN

En animales se ha observado que durante el crecimiento celular hay un incremento en la síntesis de proteínas y de ribosomas. La insulina y factores semejantes a insulina regulan estos procesos a través de la vía de transducción de señales que involucra la fosforilación consecutiva de la cinasa TOR, la cinasa S6K y la proteína ribosomal S6 conduciendo a la traducción selectiva de ARNm.

En maíz se ha observado que la insulina o el homólogo del factor de crecimiento (ZmIGF) (Rodríguez-López y col., 2001) aceleran la germinación e induce el crecimiento de los ejes embrionarios por división celular, promoviendo la transición de la fase G₁ a S en la radícula (Ávila-Alejandre y col., 2013).

Por estos antecedentes, resulta interesante analizar el efecto que tiene la insulina en la biogénesis de ribosomas y en la síntesis de proteínas ribosomales, en tejidos que están en crecimiento acelerado como los ejes embrionarios de maíz en germinación.

HIPÓTESIS.

La inducción por insulina de la germinación y el crecimiento de ejes embrionarios de maíz esta mediada por división celular y requiere de la aceleración de la síntesis de proteínas. Por lo que se postula que la insulina induce la biogénesis de ribosomas mediante un incremento en la síntesis y procesamiento del pre-ARNr y de las proteínas ribosomales.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Conocer la regulación de la biogénesis de ribosomas en ejes embronarios de semillas de maíz en germinación (*Zea mays* L) en respuesta a insulina.

OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Analizar el efecto de la insulina en la transcripción del ADNr y en el procesamiento del pre-ARNr durante la germinación.
2. Analizar el efecto de la insulina en la síntesis *de novo* de los ARNr 18S y 25S maduros.
3. Determinar el efecto de la insulina en la expresión del gen que codifica para la proteína homóloga de nucleolina y caracterizar la secuencia de aminoácidos de dicha proteína.
4. Analizar el efecto de la insulina en los niveles de transcritos de PRL3 y su reclutamiento en polisomas.
5. Analizar el efecto de la insulina en la síntesis *de novo* de proteínas ribosomales totales y en los niveles de las proteínas ribosomales PRS6, PRL7 y PRL3 en etapas avanzadas de imbibición.

6. Determinar la participación de la vía de transducción de la cinasa TOR en la síntesis *de novo* de proteínas ribosomales en respuesta a insulina.

MATERIALES Y MÉTODOS.

1. OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO.

Se usaron semillas de maíz (*Zea mays* L. var. Chalqueño), las cuales se desinfestaron superficialmente mediante un lavado con etanol al 70% v/v durante 3 minutos y se enjuagaron con agua desionizada estéril. Posteriormente, se trataron durante 5 minutos con una solución de hipoclorito de sodio (NaHOCl) al 10% v/v y se enjuagaron tres veces con agua desionizada estéril.

Las semillas se imbibieron en algodón humedecido con agua desionizada estéril a 25 ± 1 °C durante 22 horas, posteriormente se disectaron los ejes embrionarios. Para la síntesis *de novo* de ARNr los ejes embrionarios se imbibieron en medio MS más 200 μ Ci de [³²P]-ortofosfato o medio MS más 200 μ Ci de [³²P]-ortofosfato más 200 μ U/ml de insulina. En este caso, el tiempo de imbibición total fue de 24 horas. Posteriormente, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

2. AISLAMIENTO DE ARN TOTAL.

La extracción de ARN total se realizó usando el reactivo Trizol (Invitrogen®, CA, USA) con las modificaciones indicadas para tejidos vegetales. Se usó una proporción de 0.1 g de ejes embrionarios de cada tratamiento pulverizado con N₂ líquido y homogenizado con 1 ml de Trizol y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 12 000 x g durante 10 minutos a 4 °C, se desechó la pastilla y el sobrenadante se pasó a un tubo Eppendorf

estéril, se añadieron 0.3 ml de cloroformo, se agitó durante 30 segundos en un vórtex y se incubó 3 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a $12\ 000 \times g$ durante 15 minutos a $4\ ^\circ\text{C}$, el sobrenadante se paso a un tubo Eppendorf estéril, se añadieron 0.2 ml de cloroformo, se agitó durante 30 segundos en un vórtex y se incubó 3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a $12\ 000 \times g$ por 15 minutos a $4\ ^\circ\text{C}$. La fase superior acuosa se paso a un tubo Eppendorf estéril y se agregaron 250 μl de isopropanol y 250 μl de la mezcla de citrato de sodio 0.8 M/cloruro de sodio 1.2 M (p/v), se mezcló y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a $10\ 000 \times g$ durante 10 minutos a $4\ ^\circ\text{C}$, se desechó el sobrenadante y la pastilla de ARN se lavó con 1 ml de etanol al 75% (v/v) frío. Se centrifugó a $10\ 000 \times g$ durante 10 minutos a $4\ ^\circ\text{C}$, se desechó el sobrenadante y la pastilla de ARN se secó al aire durante 20 a 30 minutos. El ARN se resuspendió en 125 μl de agua libre de ARNasas.

3. EXTRACCIÓN DE ARN DE LA FRACCIÓN POLISOMAL

Se pulverizaron con nitrógeno líquido 0.75-1 g de ejes embrionarios imbibidos durante diferentes periodos (3, 6 ó 24 horas) hasta obtener un polvo fino. Posteriormente, la muestra se homogeneizó con 5 ml de buffer de extracción (anexo 2) y se centrifugó a $14\ 000 \times g$ durante 15 minutos. El sobrenadante se colocó en 5 ml de colchón de sacarosa 0.5 M y se centrifugó a $50\ 000 \times g$ durante 4 horas. La pastilla polisomal se resuspendió en 500 μl de agua libre de ARNasas. Se añadieron 20 μl de EDTA 0.5 M pH 8.5 para una concentración final de 20 mM y 25 μl de SDS 10% (p/v) para una concentración final de 0.5% (p/v).

Se agitó en el vórtex durante 30 segundos. Posteriormente, se le añadieron 500 µl de fenol para ARN (fenol saturado con agua libre de ARNasas, al que se le agregó hidroxiquinoleina 40 mM para evitar la oxidación) y 100 µl de alcohol isoamílico (49:1 v/v) y se agitó en el vórtex durante 30 segundos. Se centrifugó a 10 000 × *g* durante 15 minutos a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se añadieron 450 µl de acetato de potasio 2 M pH 4.8. Se incubó en hielo durante 45 minutos y se centrifugó a 44 000 × *g* durante 20 minutos a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se añadieron 650 µl de isopropanol frío, se dio un pulso en el vórtex y se incubó a -20 °C durante 45 minutos; posteriormente, se centrifugó a 10 000 × *g* durante 20 minutos a 4 °C. Se recuperó la pastilla y se lavó con 1 ml de etanol al 70% v/v y se centrifugó a 10 000 × *g* durante 5 minutos a 4 °C. La pastilla se resuspendió en 80 µl de agua libre de ARNasas y se añadieron 20 µl de cloruro de litio 10 M. Se agitó con un pulso en el vórtex y se incubó a 4 °C durante 12 horas. Se centrifugó a 13 000 × *g* durante 20 minutos a 4 °C. La pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 70% v/v y se centrifugó a 13 000 × *g* durante 5 minutos a 4 °C. Este paso se repitió dos veces. La pastilla se resuspendió en 100 µl de buffer TEN (anexo 2). Se añadieron 300 µl de etanol absoluto, incubándose a -20 °C durante 15 a 30 minutos. Se centrifugó a 13 000 × *g* durante 15 minutos a 4 °C. La pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 70% (v/v) y se centrifugó a 13 000 × *g* durante 5 minutos a 4 °C. Finalmente, el ARN de la fracción polisomal se resuspendió en 40-50 µl de agua libre de ARNasas y se almacenó a -70 °C hasta su uso.

Tanto para el ARN total como para el ARN de la fracción polisomal el rendimiento se expresó como μg de ARN por gramo de tejido, tomando en cuenta que 1 DO = 40 μg de ARN/ml. La integridad de las muestras se verificó separando mediante electroforesis 2 μg del ARN obtenido en geles de agarosa al 1% (p/v) en buffer TAE 1X y tiñendo los geles con bromuro de etidio 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

4. ANÁLISIS POR NORTHERN BLOT DE LOS PRECURSORES DEL ARN RIBOSOMAL.

Una muestra de 10 μg de ARN total de cada uno de los tratamientos se resolvió en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes (MOPS/formaldehído). Se pesaron 1.5 g agarosa, se añadieron 87 ml de agua estéril y se calentaron a 85-90 °C. Posteriormente, cuando la solución se encontraba entre 50-55 °C aproximadamente se agregaron 10 ml de MAE 10X (anexo 2) y 3 ml de formaldehído (este paso se realizó en la campana de extracción). Después de la polimerización, se agregó dentro del tanque de electroforesis buffer MAE 1X. Se colocó la muestra dentro del pocillo y se corrió la electroforesis durante 4 horas a 40 V. Las bandas se visualizaron con radiación UV (para detectar el bromuro de etidio asociado a los ácidos nucleicos de las bandas), se tomó la foto y se procedió a la transferencia a una membrana de nylon Hybond N⁺. Se limpió la cámara para la transferencia con SDS al 10% (p/v) y se enjuagó con agua-DEPC (anexo 2). Se colocó buffer SSC 10X (anexo 2) en la cámara hasta los bordes, inmediatamente se colocaron tres tiras largas de papel de filtro 3M (Whatman) y se verificó que los extremos estuvieran sumergidos en el buffer. Con cuidado, se colocó el gel boca abajo (de manera que la transferencia se realizó de la parte

más plana), se colocó la membrana y después se colocaron 3 cuadros de papel de filtro 3M, seguido de 10 cm de papel absorbente y 5 cm de papel periódico, ambos del tamaño del gel. Se colocó un peso sobre el sistema y se dejó transfiriendo toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente, se desmontó el sistema y la membrana se retiró con pinzas Millipore (marcándose la parte superior). Se fijó el ARN a la membrana en un UV-Stratalinker 1800 a 1200 μ Joules x 100. Después del fijado, la membrana se colocó en SSC 2X unos minutos y se envolvió en egapack. La membrana se observó en el transiluminador, se marcaron los ARN ribosomales, así como los marcadores de peso molecular y se almacenó a 4 °C.

Por otro lado, se generaron primers con el programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) a partir de la secuencia del ARN ribosomal 18S maduro, del pre-ARNr (que contiene la secuencia de ITS1, 5.8S e ITS2) y del ADNr 25S maduro reportadas para maíz (números de acceso AF168884, AF019817 y AY097330, respectivamente). Los primers usados fueron: para 18S Fwr: 5'-GTGGCCTAAACGGCCATAGTCCCTC-3' y Rv: 5'-GGAAACTTACCAGGTCCAGAGATAG-3'; pre-ARNr Fwd: 5'-TGACCCTTAAACAAAACAGACC-3' y Rv: 5'-CACCGAGAACAACAACCTTG-3'; 25S Fwr: 5'-AACACGGACCAAGGAGTCTG-3' y Rv: 5'-CCCAAGTCAGACGAACGATT-3' y las temperatura de alineamiento fueron de 60, 58 y 60 °C, respectivamente. Los fragmentos amplificados se usaron para generar sondas de acuerdo al siguiente protocolo. Se preparó una dilución (con agua estéril) de cada una de las sondas para un volumen final de 50 μ l con

aproximadamente 40 ó 50 ng del gen amplificado y purificado. Se puso la mezcla 10 minutos en ebullición (95 °C), inmediatamente se pasaron a hielo por lo menos 5 minutos. Se adicionaron 45 µl de la sonda a un tubo del kit Ready-To-Go DNA Labeling Beads (GE Healthcare, UK) y se añadieron con cuidado 5 µl de [³²P]-dCTP (Sp. Act. 29.6 TBq/mmol, Perkin-Elmer, Boston, MA, USA). Se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Posteriormente, se añadieron 175 µl de NaOH 0.1 M para detener la reacción. A la par, se preparó un control positivo de cada una de las sondas colocando 5 µl de sonda en una membrana de 2 x 2 cm aproximadamente y se fijó con NaOH 0.05 M durante 5 minutos, se lavó con agua destilada y se colocó en SSC 2X.

Las membranas y controles se prehibridaron con 10 ml de PSE (anexo 2) y se incubaron a 65 °C durante 10 minutos. Se desechó el PSE y se añadieron 10 ml más, agregándose a continuación 225 µl de la sonda marcada e incubándose a diferentes temperaturas (dependiendo de la sonda usada), durante 24 horas en rotación constante. Posteriormente, se recuperó la sonda y las membranas y controles se lavaron con 100 ml de la solución de lavado (anexo 2), calentándose a 65 °C durante 20 minutos en rotación constante, este paso se realizó dos veces. Se quitó el exceso de líquido a las membranas y a los controles y se colocaron entre dos acetatos y se envolvieron con egapack. La membrana y controles se colocaron en un cassette con una pantalla intensificadora y película KODAK Blue X-Omax, posteriormente se refrigeró a -70 °C. El tiempo de refrigeración dependió de la intensidad de las bandas a detectar. Finalmente, se revelaron las películas y se analizaron los resultados.

5. OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS RIBOSOMALES.

La síntesis *de novo* de proteínas ribosomales se evaluó a diferentes tiempos (3, 6, 12, 18 y 24 horas). Los ejes embrionarios se incubaron en 3 ml de medio MS más 300 μCi de [^{35}S]-metionina (Sp. Act. 43.475 TBq/mmol, Perkin-Elmer, Boston, MA, USA) con o sin 200 $\mu\text{U/ml}$ de insulina durante las 2 últimas horas. Los ejes embrionarios se homogeneizaron con 4 volúmenes de buffer de extracción para proteínas ribosomales (anexo 2) por gramo de tejido. Posteriormente, se centrifugaron a 27 000 $\times g$ durante 30 minutos a 4 °C y el sobrenadante se colocó en un colchón de sacarosa (anexo 2), centrifugándose a 100 000 $\times g$ durante 4 horas a 4 °C para obtener la pastilla ribosomal, que se resuspendió en 500 μl de buffer A3 (anexo 2). Las proteínas ribosomales se extrajeron con ácido acético glacial y 1 M $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, se precipitaron con 5 volúmenes de acetona fría y se conservaron a -20°C durante 18 horas. Posteriormente, se centrifugaron a 8 000 $\times g$ durante 15 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y las proteínas ribosomales se resuspendieron en 0.1 mM Tris-HCl, pH 7.2. La incorporación de [^{35}S]-methionina se determinó en un contador de centelleo Beckman, usando 20 μl de la muestra en 5 ml de líquido de centello ACS ® (Amersham Biosciences). La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (Bradford; 1976), usando una alícuota de 20 μl de muestra y albumina serica bovina (BSA) como estándar. Los resultados se reportaron como cpm μg^{-1} de proteínas. La muestra de 24 horas de proteínas sintetizadas *de novo* se resolvieron mediante electroforesis SDS-PAGE en geles al 13% (p/v) y las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF. Las membranas se expusieron a películas KODAD Blue

X-Omax durante 7 días a -70 °C. Las películas se revelaron y las imágenes se analizaron con un sistema Molecular Image (Carestream Health, INC).

6. EFECTO DE LA INSULINA EN LA SÍNTESIS DE NOVO DE PRS6, PRL7 Y PRL3.

Las proteínas ribosomales se separaron mediante SDS-PAGE en geles de acrilamida al 13% (p/v) y se transfirieron a una membrana de nylon Hybond-P (Amersham, CA, USA) mediante transferencia semi-seca con 8 mA cm⁻². Posteriormente, la membrana se bloqueó con leche libre de grasa al 5% (p/v) disuelta en PBS 1X y Tween 20 al 0.05% (v/v) durante 60 minutos a 25 °C, lavándose a continuación tres veces durante 10 minutos con PBS 1X y Tween 20 al 0.05% (v/v). La membrana se incubó con el anticuerpo contra PRL3 (dilución 1:1 000), PRS6 (dilución 1:2 000) o PRL7 (dilución 1:2 000) en PBS 1X, Tween 20 al 0.05% (v/v) y albumina bovina sérica al 1% (p/v) durante toda la noche a 4 °C. La membrana se lavó dos veces con PBS 1X y Tween 20 al 0.05% (v/v) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (dilución 1:5 000) para detectar PRL3 o con anticuerpo secundario anti-cabra conjugado con peroxidasa de rábano (dilución 1:5 000) para detectar PRS6 y PRL7, en leche libre de grasa al 5% (p/v) disuelta en PBS 1X y Tween 20 al 0.05% (v/v) durante 60 minutos. Todos los anticuerpos se obtuvieron de Santacruz Biotechnology Inc. (CA, USA). La membrana se lavó tres veces con PBS 1X y Tween 20 al 0.05% (v/v) durante 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detectó por quimioluminiscencia, usando 1:1 (v/v) de kit Immobilon

Western Chemilum Hrp Substrate (Millipore Inc, USA) y la imagen se reveló con una película KODAD Blue X-Omax.

7. EXPRESIÓN DE LOS NIVELES DE TRANSCRITOS DE NUCLEOLINA Y PRL3 POR qRT-PCR

Se trataron 2 µg tanto de ARN total como de ARN de la fracción polisomal con 1.5 U de ADNasa (Promega, CA, USA) durante 60 minutos a 37 °C, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La reacción se detuvo usando 1 µl de EDTA 250 mM, con un volumen final de la reacción de 11 µl. Para la reacción de qRT-PCR se usó 1 µl de las muestras tratadas con ADNasa. Las amplificaciones se realizaron con el kit One step qPCR (Invitrogen™, CA, USA) en un equipo Rotor Gene 3000 (Corbett Research Quiagen, CA. USA). Los cebadores se diseñaron con base en la secuencia de maíz reportada. Para el caso de la nucleolina (nº de acceso EU960380) se usaron Fwd: 5'-GCAAGCGTACCACAAGTGAA-3' y Rv: 5'-GGTGGTCTGGGTTTAGCGTA-3', con una temperatura de alineamiento de 60 °C y un producto de amplificación de 210 pares de bases de longitud. La identidad del amplicon producto de la amplificación se verificó antes de llevar a cabo las reacciones de qRT-PCR. Para PRL3 (nº de acceso EC379972), los cebadores usados fueron Fwd: 5' CCGCACTGAGATGAACAAGA-3' y Rv: 5'-ATCAGGTAFTCACCCTTCACG-3', con una temperatura de alineamiento de 58 °C y un producto amplificado de 153 pares de bases de longitud. Se usó a PRS13 (nº de acceso NM_001112238) como gen de normalización, el cual fue amplificado simultáneamente usando las mismas condiciones de cada gen analizado. Los primers usados para este gen fueron Fwd:

5'AAAGAAGCTTCCACCCACCT-3' y Rv: 5'-GATGAGGTCCGTTGTCCATT-3', con un producto de amplificación de 151 pares de bases de longitud.

Previo a la determinación de la regulación de la expresión genica por insulina, se revisó que la eficiencia de amplificación para cada uno de los genes (nucleolina y prS13) tuvieran valores entre 95 y 100% (Bustin y col., 2009). Por otro lado, se verificó que el tratamiento con insulina y el tiempo de imbibición no alteraran la expresión de referencia usando el programa GeNorm versión 3.5 (<http://medgen.ugent.be/~jvdesom/genorm/>).

8. CARACTERIZACIÓN DEL HOMÓLOGO DE LA PROTEÍNA NUCLEOLINA (Zmnuc) POR WESTERN BLOT

Para analizar la expresión de la proteína nucleolina se disectaron los ejes embrionarios y se incubaron durante 6 horas en medio MS. Posteriormente se purificaron los núcleos para la obtención de proteínas nucleares totales. Se pesaron 0.75 g de ejes embrionarios y se fijaron en acetona durante 2 horas, se pulverizaron con nitrógeno líquido y a continuación el tejido se homogenizó con 5 ml de buffer de extracción de núcleos (anexo 2). El homogenado se filtró a través de una capa de malla Miracloth (Calbiochem, CA. USA) con un tamaño de poro de 22-25 μm . El filtrado se centrifugó durante 10 minutos a 5 000 $\times g$ a 4 $^{\circ}\text{C}$ y la pastilla se resuspendió en 1.5 ml de buffer de lavado de núcleos. Posteriormente, los núcleos se purificaron en un gradiente discontinuo de Percoll® (Sigma, CA, USA) al 80%, 40% y 20%, de acuerdo a Luthe y Quatrano (1980). Los núcleos se obtuvieron entre las fracciones 40 y 80% (v/v) de Percoll y se diluyeron en 1 ml de

buffer de lavado de núcleos, centrifugándose a continuación durante 20 minutos a $14\ 000 \times g$ y $4\ ^\circ\text{C}$. Finalmente, la pastilla de núcleos se resuspendió en $150\ \mu\text{l}$ de buffer de aislamiento de núcleos y se almacenó a $-70\ ^\circ\text{C}$ hasta su uso. Para la obtención de las proteínas nucleares totales, los núcleos congelados se agitaron en vórtex a máxima velocidad en tres periodos de 1 minuto cada uno. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford usando una alícuota de $20\ \mu\text{l}$ de muestra y albumina serica bovina (BSA) como estándar (Bradford; 1976).

Las proteínas nucleares se resolvieron en geles SDS-PAGE al 12% (p/v) en condiciones desnaturizantes. El homólogo de nucleolina en maíz se analizó por inmunodetección mediante análisis de Western blot. Par este fin, se uso un anticuerpo que reconoce un epítoto de nucleolina de *Arabidopsis* (donado por el Dr. Julio Sáez-Vásquez de la Universidad de Perpignan, Francia) en dilución 1:10 000.

RESULTADOS

EFFECTO DE LA INSULINA EN LA SÍNTESIS DE NOVO DEL ARN RIBOSOMAL

La biogénesis de ribosomas requiere de la síntesis *de novo* de proteínas ribosomales y de ARN ribosomal. En ejes embrionarios de maíz se ha observado que la insulina induce la síntesis *de novo* de proteínas ribosomales a las 24 horas de imbibición (Dinkova y col., 2007; Jiménez Dinkova y col., 2007; Jiménez-López y col., 2011-López y col., 2011). Por lo tanto, se analizó la síntesis *de novo* de los ARN ribosomales maduros mediante la incorporación de [³²P]-ortofosfato a las 24 horas de imbibición. La figura 7 muestra que la insulina indujo un incremento significativo de entre 40 y 50% en los ARN ribosomales maduros 18S y 25S con respecto al control. Sin embargo, no se lograron detectar los precursores del ARNr en este tiempo de imbibición.

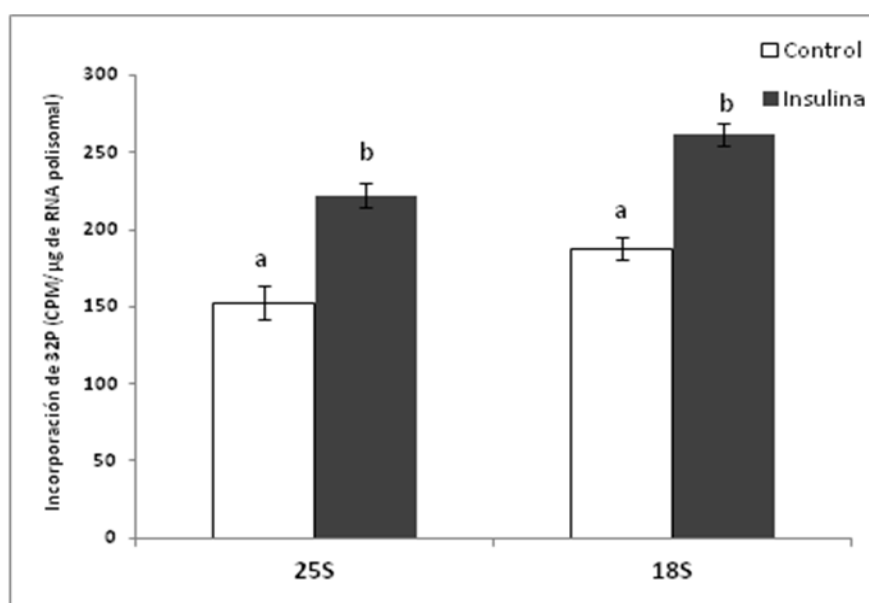


Figura 7. Efecto de la insulina en la síntesis *de novo* de los ARNr maduros a las 24 horas de imbibición.

PRECURSORES DE LOS ARN RIBOSOMALES MADUROS DURANTE LA GERMINACIÓN TEMPRANA

Para detectar los precursores del ARNr se realizaron experimentos en tiempos anteriores (3 y 6 horas de imbibición). Se sintetizaron sondas a partir de los ARNr maduros (25S y 18S) y de un fragmento que contiene la secuencia ITS1, 5.8S e ITS2, como se describió en Materiales y Métodos.

La figura 8 muestra la electroforesis en gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes de las muestras de ARN total de ejes embrionarios con y sin insulina a las 3 y 6 horas de imbibición. Se observan dos bandas con pesos moleculares de 2.37 kb y 1.35 kb que corresponden a los RNA ribosomales maduros 25S y 18S respectivamente. Además, se observan bandas con pesos moleculares superiores a 2.37 kb que se propone corresponden a los precursores de los ARN ribosomales.

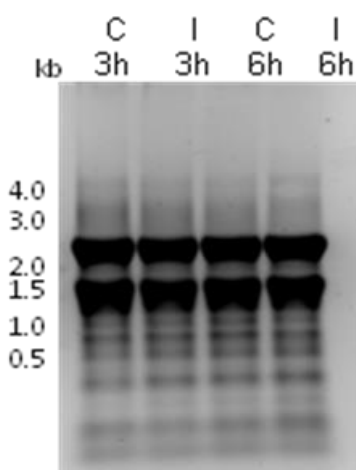


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de muestras de ARN total teñidas con bromuro de etidio.

En la figura 9 se presentan los resultados de los experimentos de Northern blot usando la sonda contra el ARNr maduro 25S. Se detecton dos bandas con pesos moleculares de 4.9 kb y 3.2 kb que se propone corresponden a los precursores de los ARNr, además del ARNr 25S maduro observado en la tinción con bromuro de etidio (Figura 8). Se observa que hay una acumulación de hasta 50% de los precursores con el tiempo de imbibición (de las 3 a las 6 horas). Por otro lado, la insulina indujo un incremento de 50 a 80% en la síntesis de los precursores comparado con el control a las 3 y 6 horas de imbibición, respectivamente. Como era de esperarse, al usar esta sonda no se observó el ARNr 18S maduro.

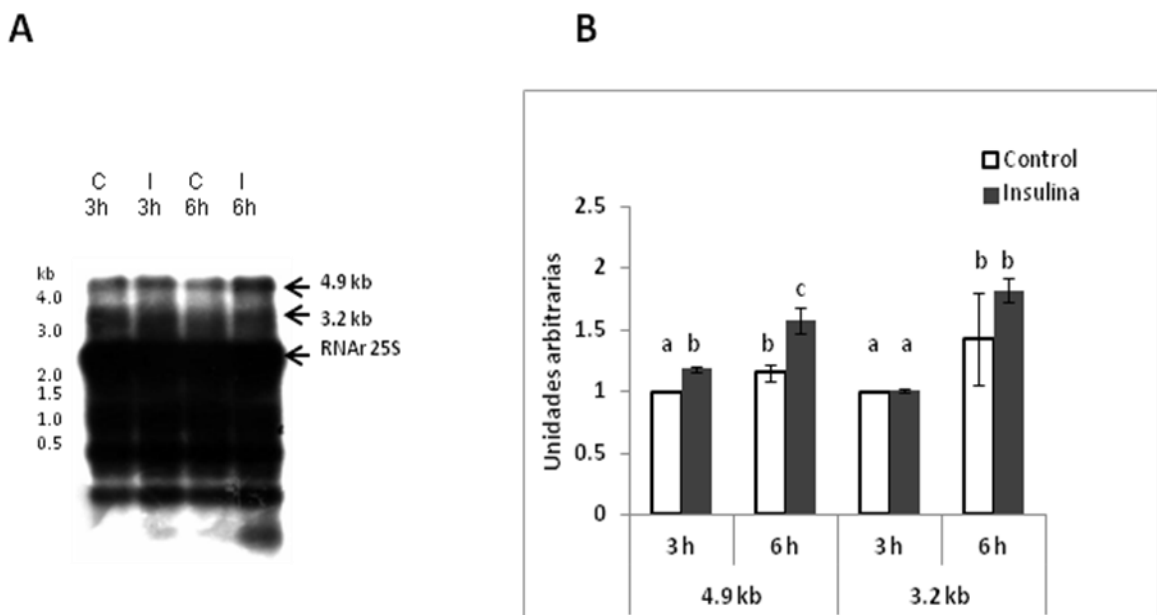


Figura 9. Análisis por Northern blot de los precursores del ARNr 25S. A) Fluorografía de los precursores del ARNr 25S, B) Análisis densitométrico de las bandas detectadas con las sondas contra el ARNr 25S maduro.

La Figura 10 muestra la fluorografía del Northern blot con una sonda que abarca un fragmento del pre-ARNr (que incluye el ITS1, el ARNr 5.8S y el ITS2). Se observan tres bandas definidas con pesos moleculares de 7 kb, 4.9 kb que corresponden a los precursores y una banda de 0.17 kb que corresponde al ARNr 5.8S maduro. Por otro lado, hay una acumulación de las bandas detectadas de hasta 2 veces con respecto al tiempo de imbibición. La insulina indujo un incremento de 40 a 230%, comparados con el control de 3 horas de imbibición.

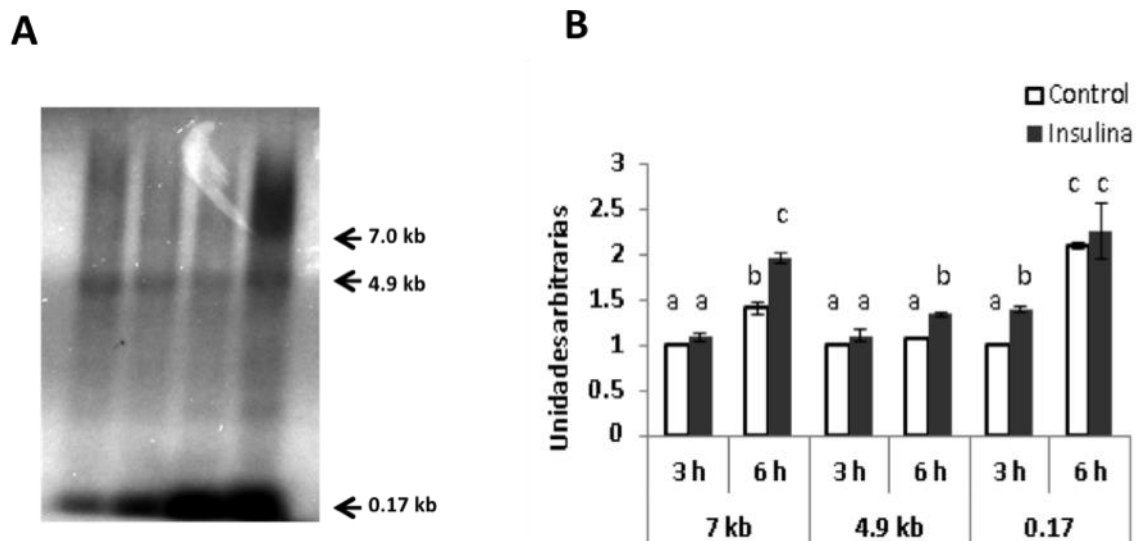


Figura 10. Análisis de los precursores del ARNr 5.8s y 25S. A) Fluorografía de los pre-ARNr, B) Análisis densitométrico de las bandas detectadas con la sonda contra los pre-ARNr.

En la figura 11 se presenta la fluorografía con una sonda contra el ARNr 18S maduro. Se observa una banda con peso molecular de 2.1 kb, la cual se propone corresponde al pre-ARNr 20S. La insulina indujo una acumulación de entre 40-50% comparado con el control de 3 horas de imbibición. La banda del ARN ribosomal 25S no se detectó con esta sonda como era de esperarse.

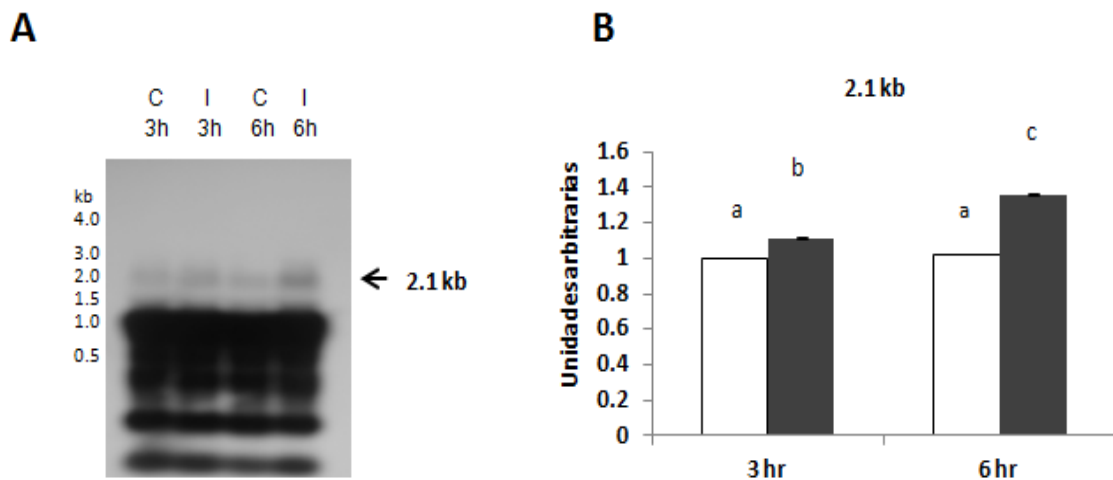


Figura 11. Análisis de los precursores del ARNr 18S. A) Fluorografía del pre-ARNr 20S, B) Análisis densitométrico de las bandas detectadas con la sonda contra el ARNr maduro 18S.

Se han descrito las secuencias completas de los genes de ADNr en diferentes organismos, tanto en mamíferos como en algunas plantas. Sin embargo, no se han reportado hasta la fecha en maíz: en esta especie sólo están reportadas las secuencias del ARNr 18S y 25S maduro, así como una secuencia parcial del pre-ARNr que contiene el ITS1, el 5.8S y el ITS2. Para obtener las secuencias del pre-ARNr de maíz se comparó los genes de ADNr humanos obtenido mediante el software *Ensembl* (www.ensembl.org) con el genoma de maíz y se obtuvo un fragmento de 4552 bases localizado en el cromosoma 6 (chromosome:AGPv2:6:116511614:116516155:1) (ver figura en anexo 1). Este fragmento incluye los ARN ribosomales maduros 18S, 25S y 5.8S, así como las secuencias de los ITS1 y 2, además de una secuencia de 48 bases localizada entre el ARNr 18S e ITS1, no descrita anteriormente. Sin embargo, en este fragmento no están incluidos los ETSs.

El fragmento obtenido que incluye la secuencias de los ARN ribosomales maduros 18S, 25S y 5.8S, así como las secuencias de los ITS1 y 2 se alineó con las secuencias reportadas del ADNr de ratón y humano mediante el programa *ClustalW* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Los resultados mostraron que hay una similitud entre el 75% y el 81% entre el fragmento del ADNr de maíz y dichas secuencias (tabla 1).

Organismo	Longitud	Organismo	Longitud	Similitud
<i>Homo sapiens</i>	13357	<i>Mus musculus</i>	13334	76
<i>Homo sapiens</i>	13357	<i>Zea mays L.</i>	4552	81
<i>Mus musculus</i>	13334	<i>Zea mays L.</i>	4552	75

Tabla 1. Similitud de las secuencias de los genes de ADNr reportados en humano y ratón con el fragmento de ADNr de maíz obtenido en el presente trabajo.

ANÁLISIS DE LOS TRANSCRITOS DEL GEN DE NUCLEOLINA EN LAS PRIMERAS HORAS DE IMBIBICIÓN

Durante la síntesis de ribosomas se requiere de factores no ribosomales que participan durante todo el proceso, desde la transcripción del ADNr hasta la salida de las subunidades ribosomales del núcleo al citoplasma. Uno de los factores más estudiados es la proteína nucleolina, que está conservada desde levaduras hasta humano. Con base en la secuencia parcial del gen de nucleolina reportada en maíz se realizó un alineamiento con las secuencias de los transcritos de

nucleolinas de especies vegetales con el programa *ClustalW*. Se observó que hay una homología de entre el 60% y 75% (tabla 2).

Organismo	Longitud	Organismo	Longitud	Similitud
<i>Arabidopsis</i>	1966	<i>Medicago sativa</i>	2255	56
<i>M. sativa</i>	2255	<i>Pisum sativum</i>	2188	71
<i>Arabidopsis</i>	1966	<i>P. sativum</i>	2188	55
<i>Arabidopsis</i>	1966	<i>Zea mays</i>	813	68
<i>M. sativa</i>	2255	<i>Zea mays</i>	813	73
<i>P. sativum</i>	2188	<i>Zea mays</i>	813	71

Tabla 2. Similitud de las secuencias de los ARNm de nucleolina reportados en *Arabidopsis*, chícharo (*Pisum sativum*) y alfalfa (*Medicago sativa*) con la secuencia de maíz encontrada en el genoma.

Al analizar el ARN de ejes embrionarios secos se observó que el transcrito de nucleolina se encuentra entre los ARNm almacenados en semillas secas (Figura 12)

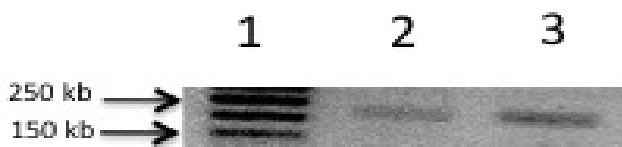


Figura 12. Análisis por PCR de punto final de los transcritos de nucleolina en ejes embrionarios secos. 1: estándar de peso molecular, 2 y 3 muestras diferentes.

Por otro lado, mediante análisis por qRT-PCR se encontró que el ARNm de nucleolina se recluta en la fracción polisomal a medida que transcurre el tiempo de imbibición (3 a 6 horas), mientras que no se observó un efecto del tiempo de imbibición sobre la transcripción de este gen. (Figura 13).

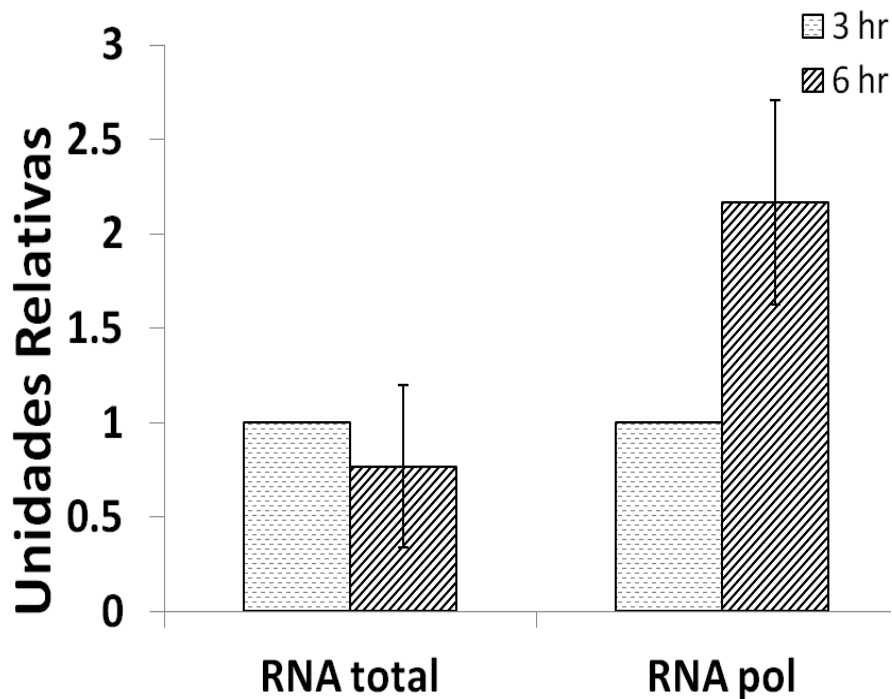


Figura 13. Niveles de expresión del gen de nucleolina durante las primeras horas de imbibición.

En cuanto al efecto de la insulina no se observó un incremento en la síntesis *de novo* del transcrito (ARN tot) ni en el reclutamiento del transcrito a la fracción polisomal (ARN pol) durante la germinación (Figura 14)

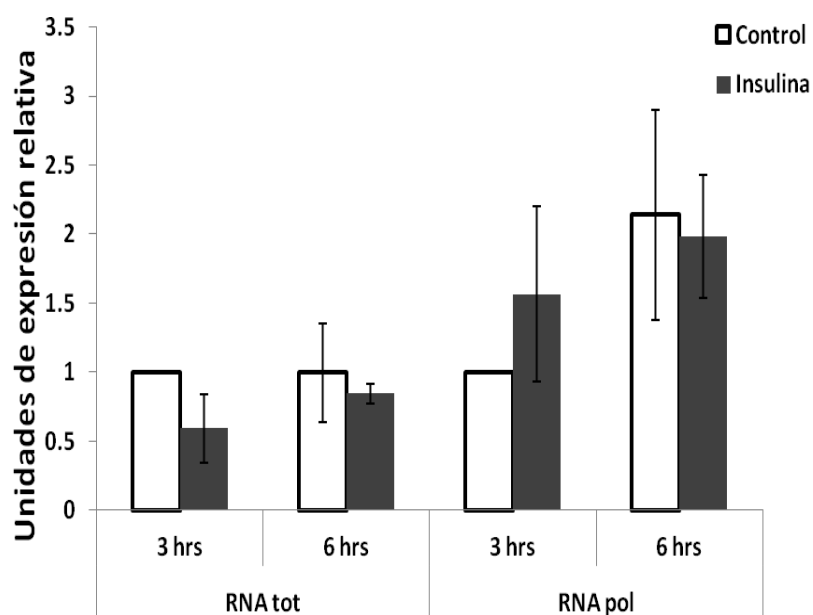


Figura 14. Efecto de la insulina en la expresión del gen de nucleolina durante las primeras horas de imbibición.

CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA NUCLEOLINA EN EJES EMBRIONARIOS DE MAÍZ

Los resultados anteriores muestran que los transcritos de nucleolina se reclutan a la fracción polisomal durante las primeras horas de imbibición (Figura 13), por lo que se pretendió caracterizar mediante Western blot la proteína homóloga de nucleolina en ejes embrionarios de maíz imbibidos durante 6 horas. Se aislaron los núcleos de ejes embrionarios y posteriormente se purificaron las proteínas nucleares totales, separándose en geles SDS-PAGE al 12% (p/v), como se describió en Materiales y Métodos.

Se inmunodetectaron tres bandas con pesos moleculares de 110, 100 y 40 kDa, sin embargo, al analizar la secuencia de aminoácidos de las proteínas inmunolocalizadas con ambos anticuerpos se encontró que no correspondían a la secuencia de nucleolina, sino que corresponden a proteínas homólogas con factores de traducción, así como con algunas chaperonas (Figura 15).

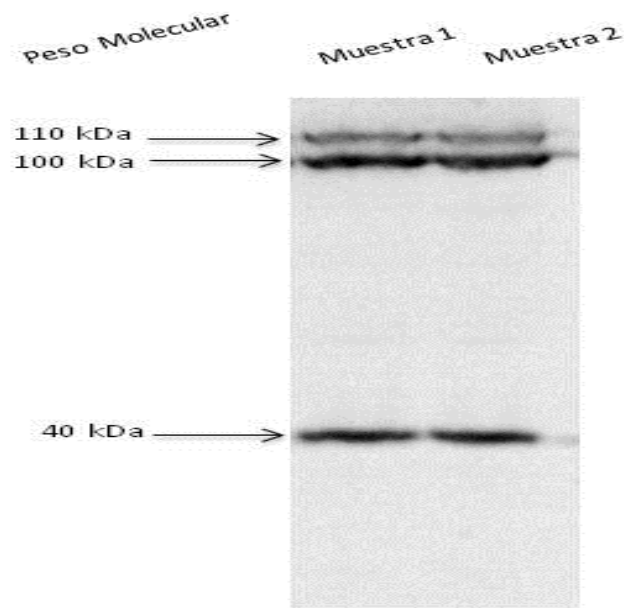


Figura 15. Análisis por western blot para la detección de una proteína homóloga de nucleolina en ejes embrionarios de maíz.

EFECTO DE LA INSULINA EN LA SÍNTESIS DE NOVO DE PROTEÍNAS RIBOSOMALES DURANTE LA GERMINACIÓN

Durante la germinación de las semillas hay un incremento en la síntesis de proteínas. Se midió la incorporación de [³⁵S]-metionina en la síntesis de proteínas ribosomales durante la imbibición de semillas de maíz. Se observó que la incorporación de metionina aumenta durante el tiempo de imbibición

incrementándose 60 veces en comparación con las 3 horas de imbibición. Por otro lado, la insulina sólo indujo un incremento significativo (75%) en la incorporación de metionina en PRs a las 24 de imbibición. Sin embargo, cuando se aplicó la mezcla rapamicina/insulina la inducción de la síntesis de proteínas ribosomales observada con insulina se revirtió (Figura 16).

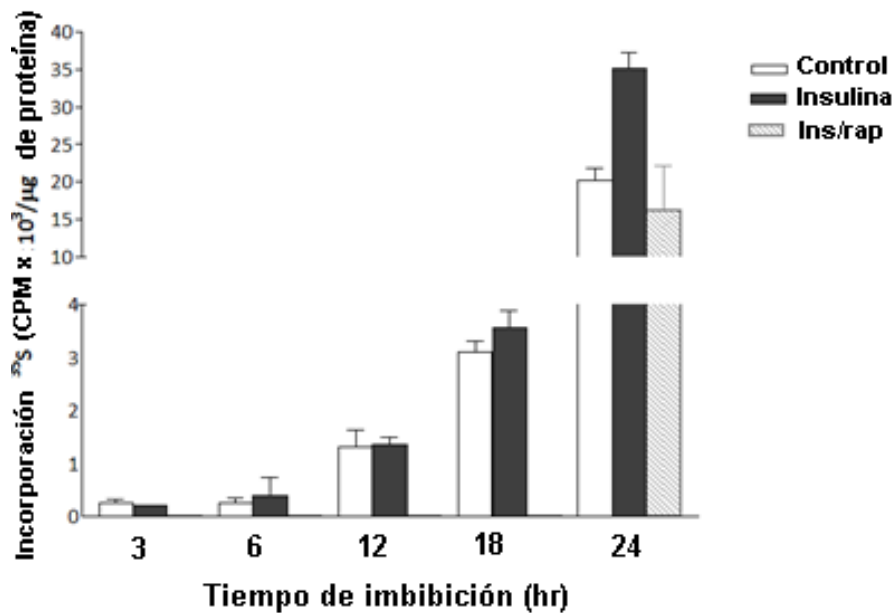


Figura 16. Efecto de la insulina en la incorporación de [³⁵S]-metionina durante la germinación (3, 6, 12, 18 y 24 horas), e insulina/rapamicina (24 horas) en la síntesis de proteínas ribosomales.

Las proteínas ribosomales recién sintetizadas obtenidas de ejes embrionarios imbibidos durante 24 horas se resolvieron mediante electroforesis SDS-PAGE al 12% (p/v) y se analizaron por fluorografía. Aunque la insulina indujo un incremento general en la síntesis de PRs, el análisis por fluorografía reveló que no todas las PRs son reguladas de la misma forma por insulina. En la figura 17 (A) se

muestran las PRs teñidas con azul de Coomassie, mientras que en la figura 17 (B) se presenta la fluorografía. Las flechas indican las PRs sintetizadas *de novo* estimuladas por insulina.

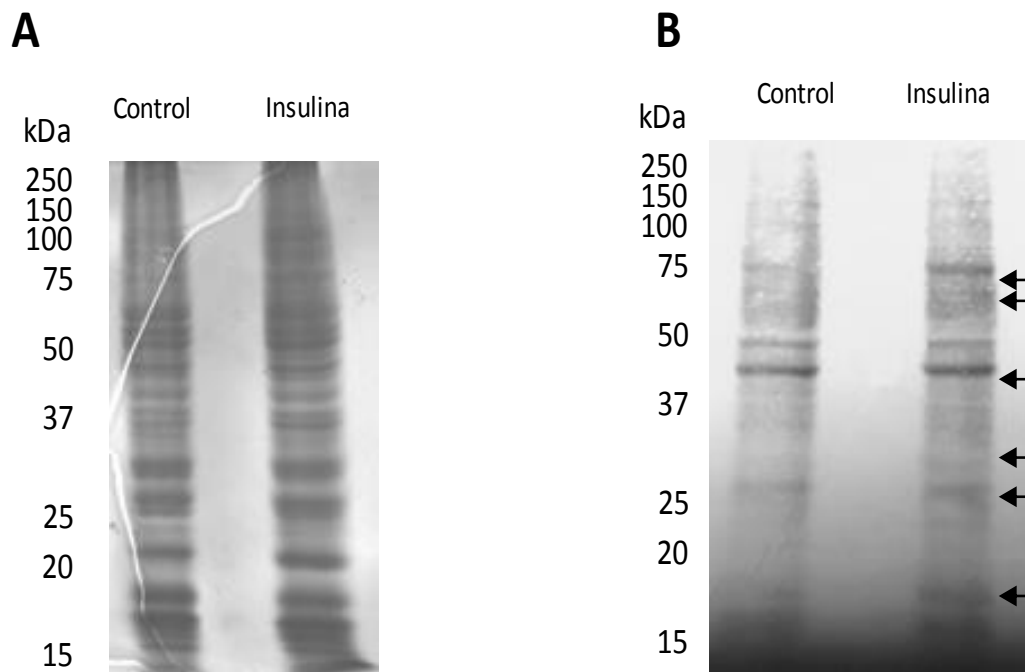


Figura 17. Análisis electroforético de PRs. (A) tinción con azul de Coomasie. (B) Fluorografía de PRs sintetizadas *de novo* a las 24 horas de imbibición.

EFFECTO DE LA INSULINA EN LA REGULACIÓN DEL GEN Y PROTEÍNA PRL3 EN ESTADOS DE IMBIBICIÓN TARDÍA

Para verificar el efecto diferencial de la insulina en la regulación de la síntesis de PRs (Figura 16B) se analizó por Western blot el efecto de la insulina en los niveles de PRL3, PRL7 y PRS6 sintetizadas *de novo*. Se observó que los niveles de PRS6 y PRL7 se incrementaron un 300% y un 70%, respectivamente, en

presencia del efector; sin embargo los niveles de PRL3 no se afectaron en presencia de insulina (Figura 18).

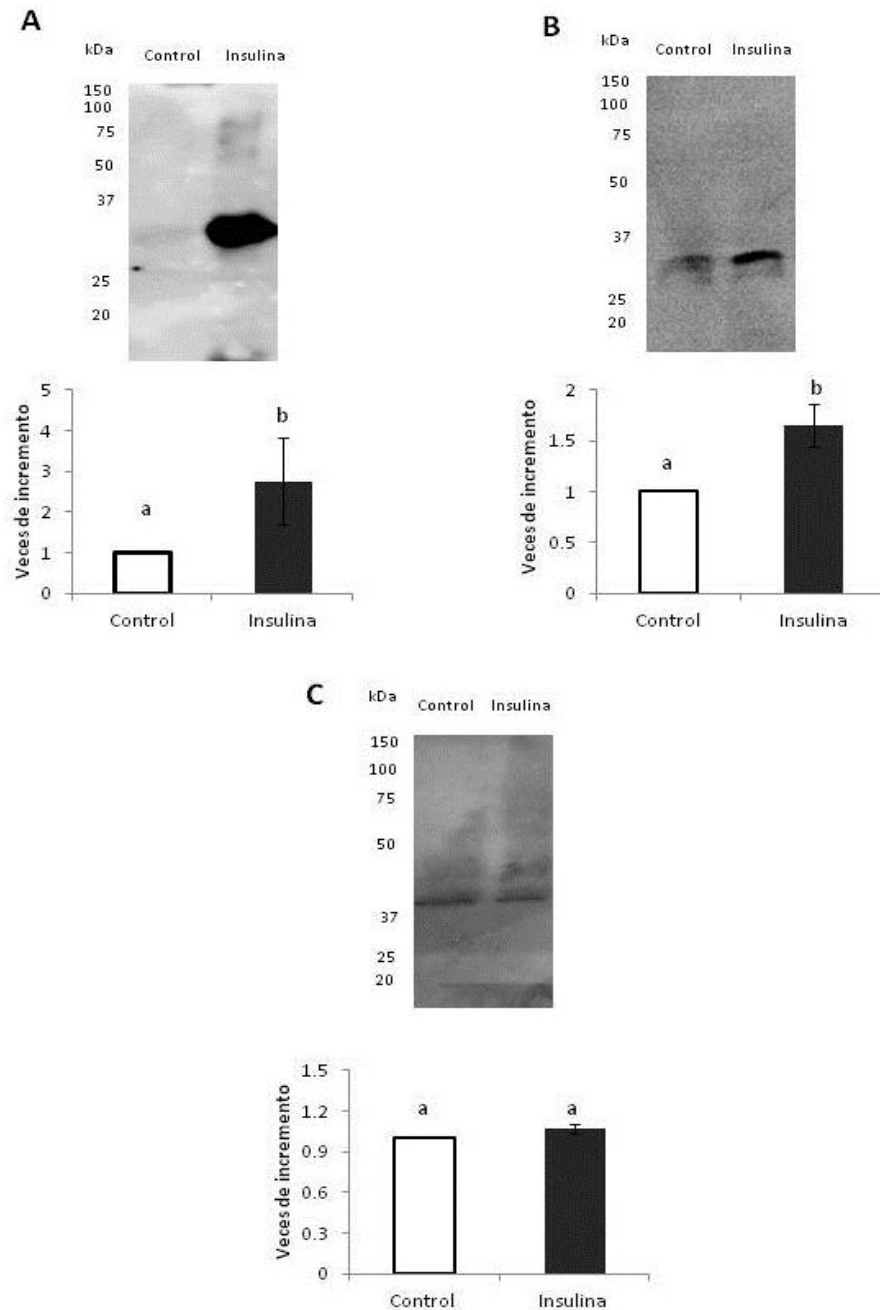


Figura 18. Efecto de la insulina en los niveles de PRs sintetizadas *de novo*. (A) PRS6, (B) PRL7 y (C) PRL3 a las 24 horas de imbibición. Se presentan los análisis densitométricos de la intensidad de las bandas de cada proteína.

En la figura 19 se observa que la insulina indujo un incremento en la transcripción de PRL3, sin embargo no hay un reclutamiento en la fracción polisomal a las 24 horas de imbibición. Estos resultados concuerdan con lo presentado en la figura 18C, que muestran que la síntesis de la proteína ribosomal L3 no está afectada por insulina.

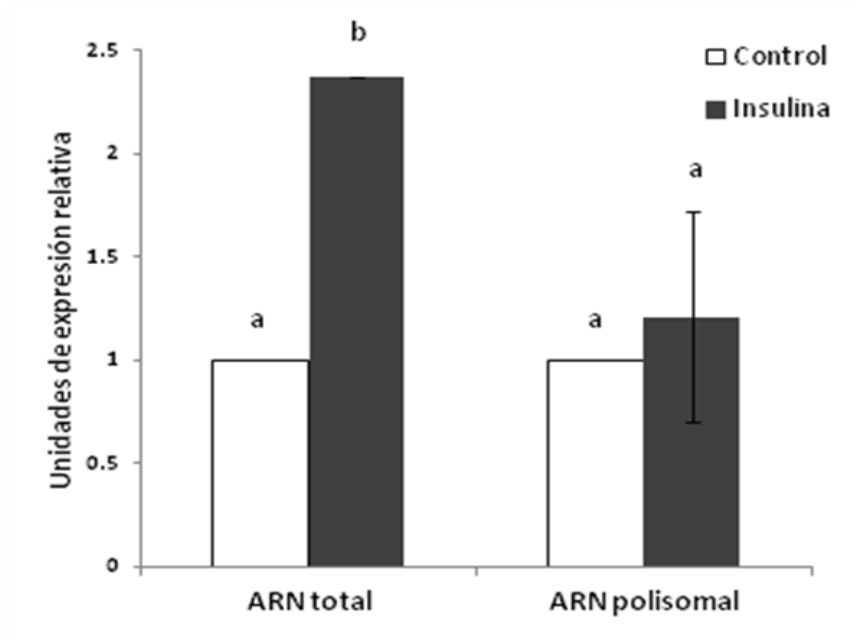


Figura 19. Análisis de los transcritos de PRL3 a las 24 horas de imbibición en el ARN total y el ARN de la fracción polisomal con o sin insulina. Los resultados se normalizaron con el gen de referencia y se expresan como múltiplos de incremento en los niveles de transcripción con respecto al valor de tratamiento control al cual se le asignó valor 1.

DISCUSIÓN

En células animales, la biogénesis de ribosomas es un prerequisite para el crecimiento y división celular (Baserga., 2007). Se ha demostrado que la insulina incrementa la transcripción del ADNr y el número de ribosomas en cultivos primarios de fibroblastos de ratón (Antonetti y col., 1993; Hannan y col., 1998; Wu y col., 2005). En plantas se conoce poco sobre el mecanismo de crecimiento celular; sin embargo, en ejes embrionarios de semillas de maíz se caracterizó un factor semejante a insulina, denominado ZmIGF (Rodríguez-López y col., 2011) y se ha reportado que tanto la insulina como el ZmIGF aceleran la germinación e inducen el crecimiento en plántulas de maíz (García-Flores y col., 2001; Dinkova y col., 2007; Jiménez-López y col., 2011). En el presente trabajo se usó insulina como efector para estudiar la regulación de la biogénesis de ribosomas en semillas de maíz durante la germinación. La insulina indujo la acumulación del ARNr maduro recién sintetizado (aproximadamente 50%) a las 24 horas de germinación (Figura 7). Esto indica que la insulina promueve la transcripción del ADNr.

Las semillas de maíz deshidratadas se encuentran en estado quiescente y sus células detenidas en la transición G1-S. Cuando son imbibidas el ciclo celular se reactiva (Vázquez-Ramos y Sánchez., 2003). Recientemente, en nuestro grupo de trabajo se demostró que la insulina estimula la transición G1/S y reactiva el ciclo celular después de las 15 horas de imbibición en presencia de este efector (Ávila-Alejandre y col., 2013), por lo que se decidió buscar los precursores del

ARNr en semillas de maíz en tiempos anteriores a las 15 horas (3 y 6 horas de imbibición) usando sondas marcadas contra el ARNr maduro 25S y 18S, así como una secuencia reportada previamente del pre-ARNr que incluye ITS1, el ARN 5.8S y el ITS2. Los resultados muestran que la insulina induce un incremento en la acumulación de los precursores de ARNr y del ARN maduro 5.8S (Figuras 9, 10 y 11), lo que concuerda con lo reportado para semillas de rábano, en las cuales la transcripción del ADNr es reactivada en las primeras horas de imbibición (cuando la incorporación de marca radiactiva fue detectada en moléculas de ARNr de alto peso molecular, mayor al peso de los ARNr maduros; correspondiendo posiblemente a los precursores del ARNr), mientras que en la germinación tardía el marcaje sólo se detectó en los ARNr maduros y no en los posibles precursores (Aspart y col., 1980).

Por otro lado, estudios hechos por Grzelczak y Buchowicz (1977) demostraron que la síntesis de ARNr en semillas de cereales es activada casi inmediatamente después de iniciada la imbibición en embriones aislados de *Triticum aestivum* L. La transcripción del ADN ribosomal se inicia durante las primeras horas de imbibición. Se observó un incremento en la incorporación de [¹⁴C]-uridina tanto en los ARNr 25S y 18S como en el precursor 31S a las 3 horas de imbibición, mientras que en semillas completas la incorporación de radiactividad se detectó hasta las 6 y 12 horas para el pre-ARNr y los ARNr maduros, respectivamente.

Con las secuencias reportadas previamente en la literatura se obtuvo una secuencia parcial del ADNr en maíz (Figura anexo 1). Para obtener dicha

secuencia, tanto los ITS1 y 2 y las secuencias de los ARNr maduros 18S y 25S se introdujeron en el software Ensembl para el genoma humano y la secuencia obtenida se comparó con el genoma de maíz. Se obtuvo una secuencia de 4552 bases localizada en el cromosoma 6. Esta secuencia contenía los ARNr maduros 18S, 25S y 5.8S; así como una secuencia extra de 48 bases localizada entre el ARNr 18S y el ITS1, la cual no se había reportado previamente.

Los alineamientos realizados entre esta secuencia del ADNr de maíz contra el ADNr 45S de humano y de ratón mostraron una similitud entre el 75% y el 81% entre el fragmento del ADNr de maíz y dichas secuencias. Se observó que las regiones con mayor similitud se encuentran en las secuencias de los ARNr maduros 18S, 25S y 5.8S; mientras que las regiones con menor similitud fueron las secuencias ITS1 e ITS2. Estos resultados concuerdan con los reportados en la literatura, que indican que tanto los ETS en 5' y 3', como las secuencias de ITS1 y 2 son las regiones con mayor variabilidad en las secuencias de ADNr de distintas especies (Layat y col., 2012).

Cuando se usa como sonda un fragmento que contiene a ITS1, 5.8S e ITS2 (figura 10) se detecta un barrido por arriba de la banda de 7 kb, que se observa más claramente en el tratamiento con insulina a las 6 horas de imbibición. Este barrido podría corresponder a precursores del ARNr de mayor peso molecular y/o al transcrito primario, aún no caracterizados. En este sentido, se ha reportado que existen precursores específicos para algunos organismos, por ejemplo en el caso de humanos y ratón (Mullineux y Lafontaine, 2012).

Como se mencionó anteriormente, la síntesis de ribosomas requiere tanto de ARNr como de proteínas ribosomales y factores no ribosomales que participan en este proceso. En este sentido, la nucleolina es uno de los factores no ribosomales que participa en varios pasos desde la transcripción del ADNr hasta la salida de las subunidades ribosomales del núcleo al citoplasma. En el presente trabajo se encontró que los transcritos de nucleolina se encuentran entre los ARN mensajeros almacenados en los ejes embrionarios de maíz secos. Los niveles del transcrito en ARN total no cambian durante la imbibición temprana (3 y 6 horas); sin embargo hay un incremento de 2 veces aproximadamente en el reclutamiento del mensajero a la fracción polisomal a las 6 horas comparado con las 3 horas de imbibición (Figura 13). La movilización del mensaje de nucleolina a la fracción polisomal a las 6 horas de imbibición sigue una cinética similar a la movilización observada para algunos mensajes de proteínas ribosomales en semillas de maíz en germinación (E. Sánchez, datos no publicados). Esto sugiere que los mensajes de factores no ribosomales como la nucleolina y de proteínas ribosomales estarían sujetos a un mecanismo de regulación común que garantizaría la disponibilidad de todos los componentes necesarios para la síntesis de nuevos ribosomas.

En cuanto al efecto de la insulina, no se observó un incremento en los niveles del transcrito de nucleolina, ni en el ARN total ni en el reclutamiento del ARNm en la fracción polisomal (Figura 14). Los resultados indican que el efecto de la insulina en el procesamiento del pre-ARNr no está mediado por un aumento en la expresión de la nucleolina. Csermely y col. (1993) reportaron que la insulina

regula la fosforilación de nucleolina en células de preadipocitos, por lo tanto existe la posibilidad de un mecanismo de regulación similar en maíz.

En el presente trabajo se trató de obtener la proteína nucleolina de núcleos aislados de ejes embrionarios de maíz imbibidos por 6 hs, mediante inmunoprecipitación con anticuerpos contra nucleolina de humano y de *A. thaliana*. En la figura 15 se presentan las proteínas de núcleos aislados de ejes embrionarios de maíz imbibidos por 6 hs inmunodetectadas con anticuerpos contra nucleolina de *Arabidopsis* y separadas mediante electroforesis. Se observan bandas de pesos moleculares de 110, 100 y 40 kDa. Se ha reportado que la proteína nucleolina de mamíferos tiene un peso molecular de 100 kDa, sin embargo en plantas como *A. thaliana* y *A. cepa* tienen un peso molecular de 67 y 64 kDa respectivamente, debido a que presentan menor número de dominios de unión al ARN. Sin embargo, en células meristemáticas de raíz de *A. cepa* se inmunodetectó una banda de 100 kDa, proponiendo que correspondía a la proteína nucleolina y que la banda de menor peso molecular era un fragmento de dicha proteína (Lapeyre y col., 1985; Srivastava y col., 1989; Bourbon y Amalric, 1990; de Cárcer y col., 1997; Pontvianne y col., 2007). No obstante, la secuencia de aminoácidos obtenida de las proteínas inmunodetectadas y purificadas de maíz no presenta homología con las secuencias reportadas de proteínas semejantes a nucleolina

Como se mencionó anteriormente, la síntesis de ribosomas requiere la transcripción del ADNr y del procesamiento del preARNr, así como de la síntesis

de proteínas ribosomales. Por ello, se estudió la síntesis de PRs durante la imbibición, así como el efecto de la insulina en este proceso. Los resultados muestran que hay un incremento de la síntesis de PRs a partir de las 12 horas de imbibición, alcanzando una inducción máxima de 600% a las 24 horas de imbibición. Por otro lado, la insulina sólo produjo un incremento en la síntesis de PRs de 75% a las 24 horas de imbibición (Figura 16). En animales se ha reportado que el efecto de la insulina en la síntesis de PRs está mediado por la vía de señalización de la cinasa TOR, por lo que se decidió aplicar rapamicina, un inhibidor de la cinasa TOR, para analizar su efecto en la inducción de PRs por insulina. Se encontró que la rapamicina revirtió el efecto inductor de la insulina en la síntesis *de novo* de PRs, sugiriendo la participación de la vía de señalización TOR en la biogénesis de ribosomas inducida por insulina en semillas de maíz en germinación. Se ha reportado que el dominio cinasa de TOR se une al promotor del ADNr 45S regulando su transcripción tanto en animales como en plantas (Tsang y col., 2010; Ren y col., 2011). Asimismo, se ha reportado que la proteína TOR de maíz contiene el sitio de unión de rapamicina (Agredano-Moreno y col., 2007; Dinkova y col., 2007).

En la figura 17 se observa que la insulina induce la síntesis de PRs aunque esta inducción no es igual para todas las PRs. En este trabajo se encontró que mientras que la insulina induce la síntesis de PRS6 y PRL7 no afectó a la síntesis de PRL3 (una proteína ribosomal con función dual). Este efecto diferencial puede ser explicado por la función dual de algunas proteínas ribosomales, se ha observado que además de participar en la estructura del ribosoma regulan otros

procesos. Por ejemplo PRL3, la cual esta implicada en la síntesis de ARNr; la PRS6, las proteínas ácidas y RACK1, las cuales regulan la traducción (Sánchez de Jimenez y col., 1997; Montoya-García y col., 2002; Williams y col., 2003; Popescu y Tumer, 2004; Wilson y Nierhaus, 2005; Jannot y col., 2011; Xue y col., 2012). En concordancia con estos resultados se observó que aunque la insulina estimuló la transcripción de PRL3 no afectó el reclutamiento de este mensaje en la fracción polisomal (Figura 19). Estos resultados también coinciden con los obtenidos en el western blot con anticuerpos contra PRL3 en los que se observó que la síntesis de PRL3 no se altera por insulina (Figura 18) . En este mismo sentido, existen reportes de que tanto la insulina como el ZmIGF no inducen la síntesis *de novo* de PRs ácidas en ejes embrionarios de maíz imbibidos por 24 hs, aunque si regulan su fosforilación (Montoya-García y col., 2002). Por otro lado, en estudios con microarreglos se encontró que la insulina induce el reclutamiento de algunos mensajes de PRs en la fracción polisomal mientras que inhibe el reclutamiento de otros mensajes de PRs (Jiménez-López y col., 2011). Estos resultados apoyan que la expresión de las PRs no se regula por igual en todas ellas.

CONCLUSIÓN

La insulina estimula la síntesis de ribosomas durante la germinación de semillas de maíz por la vía TOR. La transcripción del ADNr y el procesamiento de los precursores del ARNr están entre los primeros eventos que se reactivan durante la imbibición temprana. En estados tardíos de imbibición (24 h) la insulina estimula la síntesis *de novo* de algunas PRs. Estos resultados sugieren que la biogénesis de ribosomas durante las primeras horas de imbibición se lleva a cabo con ARNr recién sintetizados y proteínas ribosomales traducidas a partir de ARNm almacenados. Por otro lado, se mostró que el transcrito de nucleolina es movilizado a la fracción polisomal después de 6 h de imbibición, lo cual sugiere que esta proteína es traducida activamente, apoyando su participación en el procesamiento de los precursores del ARNr.

BIBLIOGRAFÍA

Agredano-Moreno LT., Reyes de la Cruz H., Martínez-Castilla LP., Sánchez de Jiménez E. (2007). Distinctive expression and functional regulation of the maize (*Zea mays* L.) TOR kinase ortholog. *Molecular Biosystem.* **3**: 974-802.

Antonetti D., Kimball S., Horetsky R., Jefferson L. (1993). Regulation of rDNA transcription by insulin in primary cultures of rat hepatocytes. *The Journal of Biological Chemistry.* **268**: 25277-25284.

Aspart L., Cooke R., Michaux-Ferriere N., Delseny M. (1980). Ribosomal RNA synthesis in imbibing radish (*Raphanus sativus*) embryo axes. A biochemical and cytological study. *Planta.* **148**: 17-23.

Ávila-Alejandro AA., Espejel F., Paz-Lemus E., Cortés-Barberena E., Díaz de León-Sánchez F. Tzvetanka D. Dinkova, Sánchez de Jiménez E., Pérez-Flores LJ. (2013). Effect of insulin on the cell cycle of germinating maize seeds (*Zea mays* L.). *Seed Science Research.* **23**: 3-14.

Baserga R. (2007). Is cell size important?. *Cell Cycle.* **7**: 814-816.

Babler J., Kallas M., Hurt E. (2003). Binding of the of the Nug1 GTPase to the pre-ribosome is essential for 60S biogenesis. *Ribosome Synthesis 2003.* 6th International Conference on Ribosome Synthesis, Toulouse Francia. p 16.

Barbezier N., Pontvianne F., Lahmy S., Echeverria M., Sáez-Vásquez J. (2004). Nucleo-cytoplasmic localization of an RNase III-like protein in *Arabidopsis*: role in synthesis of snoRNA and rRNA. The 5th Symposium on Post-transcriptional Regulation of Plant Gene Expression. The University of Texas at Austin. p. 16.

Bell S., Learned R., Jantzen H-M., Tjian R. (1988). Functional cooperativity between transcription factors UBF1 and SL1 mediates human ribosomal RNA synthesis. *Science*. **241**: 1192-1197.

Bewley D. (1997). Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*. **9**: 1055-1066.

Bourbon HM., Amalric F. (1990). Nucleolin gene organization in rodents: highly conserved sequences within three of the 13 introns. *Gene*. **88**: 187-196

Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. **72**: 248-254.

Brandenburger Y., Jeankins A., Autelitano D., Hannan R. (2001). Increased expression of UBF is a critical determinant for rRNA synthesis and hypertrophic growth of cardiac myocytes. *The Federation of American Societies for Experimental Journal*. **15**: 2051-2053.

Buentello-Volante B., Díaz de León Sánchez F., Rivera-Cabrera F., Aguilar Caballero R., Ponce-Valadez M., Sánchez de Jiménez E., Pérez-Flores LJ. (2010). Apparent cross-talk of two signaling pathways that regulate *Zea mays* coleoptile growth. *Phyton*. **79**: 101-108.

Bustin SA., Benes V., Garson JA., Hellemans J., Husggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl MW., Shipley GL., Vandesompele J., Wittwer CT. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*. **55**: 611-662.

Comartin DJ., Brown ED. (2006). Non-ribosomal factors in ribosome subunit assembly are emerging targets for new antibacterial drugs. *Current Opinion in Pharmacology*. **6**: 453-458.

Csermely P., Schnaider T., Cheatham B., Olson MOJ., Roland Kahn C. (1993). Insulin induce the phosphorylation of nucleolin. A possible mechanism of insulin-induced RNA efflux from nuclei. *The Journal of Biological Chemistry*. **268**: 9747-9752.

de Carcer G., Cerdido A., Medina FJ. (1997). Nop64, a novel nucleolar phosphoprotein from proliferating onion cells, sharing immunological determinants with mammalian nucleolin. *Planta*. **201**: 487-495

Dinkova D., Aguilar R., Sánchez de Jiménez E. (2000). Expression of maize eukaryotic initiation factor (eIF) iso4E is regulated at the translational level. *Biochemistry*. **351**: 825-831.

Dinkova D., Reyes de la Cruz H., García-Flores C., Jimenez-García LF., Sánchez de Jimenez. (2007). Dissecting the TOR-S6K signal transduction pathway in maize seedling: relevance on cell growth regulation. *Physiologia Plantarum*. **130**: 1-10.

Drakas R., Tu X., Baserga R. (2004). Control of cell size through phosphorylation of upstream binding factor 1 by nuclear phosphatidylinositol 3-kinase. *Proceedings of the National Academy of Science*. **101**: 9272-9276.

Duncan R., McConkey E. (1982). Preferential utilization of phosphorylated 40S ribosomal subunits during initiation complex formation. *European Journal of Biochemistry*. **123**: 535-538.

Dutcher J. (2004). Mammalian target of rapamycin inhibition. *Clinical Cancer Research*. **10**: 6382S-6387S.

Ferrari S., Thomas G. (1994). S6 phosphorylation and the p70^{S6K}/p⁸⁵. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. **29**: 385-413.

Fingar D., Richardson C., Tee A., Cheatham L., Tsou., Blenis J. (2004). mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4EBP1?. *Molecular and Cell Biology*. **24**: 200-216.

Fromont-Racine M., Senger B., Saveanu C., Fasiolo F. (2003). Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene*. **313**: 17-42.

García-Flores C., Aguilar R., Reyes de la Cruz H., Alboresa M., Sánchez de Jiménez E. (2001). A maize insulin-like growth factor signals to a transduction pathway that regulates protein synthesis in maize. *Biochemistry*. **358**: 95-100.

Ginisty H., Sicard H., Roger B., Bouvet P. (1999). Structure and functions of nucleolin. *Journal of Cell Science*. **112**: 761-772.

Granneman S., Baserga S. (2004). Ribosome biogenesis: of knobs and RNA processing. *Experimental Cell Research*. **296**: 43-50.

Grzelczak Z., Buchowicz J. (1977). A comparison of the activation of ribosomal RNA synthesis during germination of isolated and non-isolated embryos of *Triticum aestivum* L. *Planta*. **134**: 263-265

Hammond ML., Bowman LH. (1988). Insulin stimulates the translational of ribosomal proteins and the transcription of rDNA in mouse myoblast. *Journal Biological Chemistry.* **263:** 17785-17791

Hannan K., Rothblum L., Jefferson L. (1998). Regulation of ribosomal DNA transcription by insulin. *American Journal of Physiology. Cell Physiology.*) **275:** C130-C138.

Hannan K., Brandenburger Y., Jeankins., Sharker K., Cavanaugh A., Routhlym L., Moss T., Portinga G., McArthur G., Pearson R., Hannan R. (2003). mTOR – dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcription factor UBF. *Molecular Cell Biology.* **23:** 8862-8877.

Harold B., Jefferies J., Thomas G. (1996). Ribosomal protein S6 phosphorylation and signal transduction. *In* translational control. Eds Hersey, JWB, Mathews, MB and Sonenberg N. Cold Spring Harbor Laboratory Press USA.

Hershey JWB. (1989). Protein phosphorylation controls translation rates. *Journal Biological Chemistry.* 264: 20823-20826

Hunt T., Nasmyth K. (1997). Cell multiplication. *Current Opinion in Cell Biology.* **9:** 765-767.

James J., Zomerdijk J. (2004). Phosphatidylinositol 3-kinase and mTOR signalling pathways regulate RNA polymerase I transcription in response to IGF-1 and nutrients. *The Journal of Biological Chemistry*. **279**: 8911-8918.

Jannot G., Bajan S., Giguere N., Bouasker S., Bamville IB., Piquet S., Hutvagner G., Simard M. (2011). The ribosomal protein RACK1 is required for microRNA function in both *C. elegans* and human. *EMBO Report*. **12**: 581-586.

Jiménez-López S., Mancera-Martínez E., Donayre-Torres A., Rangel C., Uribe L., March S., Jiménez-Sánchez G., Sánchez de Jiménez E. (2011). Expression profile of maize (*Zea mays* L.) embryonic axes during germination: translational regulation of ribosomal protein mRNAs. *Plant and Cell Physiology*. **52**: 1719-1733

Kleijn M., Scheper C., Voorma H., Thomas A. (1998). Regulation of translation initiation factors by signal transduction. *European Journal of Biochemistry*. **253**: 531-544.

Lapeyre B., Caizerques-Ferrer M., Bouche G., Amalric F. (1985). Cloning of cDNA encoding a 100 kDa nucleolar protein (nucleolin) of Chinese hamster ovary cells. *Nucleic Acids Research*. **13**: 5805-5816.

Layat E., Sáez-Vásquez J., Tourmente S. (2012). Regulation of Pol-I transcribed 45S DNA and Pol-III transcribed 5S DNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology*. **53**: 276-276.

Luthe DS., Quatrano RS. (1980). Transcription in isolated wheat nuclei: I. Isolation of nuclei and elimination of endogenous ribonuclease activity. *Plant Physiology*. **65**: 305-308.

Mathews C., van Holde KE., Ahern KG. (2002). *Bioquímica*. Tercera Edición. España. Addison Wesley. 1172-1177.

Mayer C., Grummt I. (2006) Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases. *Oncogene*. **25**: 6384-6391.

Meyuhas O., Hornstein E. (2000). Translational control of TOP mRNAs. In translational control. Eds. Hersey, JWB, Mathews, MB and Sonenberg N. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.

Mongelard F., Bouvet P. (2006). Nucleolin: a multifaceted protein. *Trends in Cell Biology*. **17**: 80-86

Montoya-García L., Muñoz-Ocotero V., Aguilar R., Sánchez de Jiménez E. (2002). Regulation of acidic ribosomal protein expression and phosphorylation in maize. *Biochemistry*. **41**: 10166-10172.

Moreno CP. (1996). *Vida y obra de granos y semillas*. Col. La ciencia desde Mexico 146. Fondo de cultura económica. Mexico.

Mullineux S. T., Lafontaine D. I. J. (2012). Mapping the cleavage sites on mammalian pre-rRNA: where do we stand? *Biochimie*. **94**: 1521-1532.

Neufeld T., Edgar B. (1998). Connections between growth and the cell cycle. *Current Opinion in Cell Biology*. **10**: 784-790.

Nonogaki H., Bassel GW., Bewley JD. (2010). Germination, still a mystery. *Plant Science*. **179**: 574-581.

Nygard O., Nilsson L. (1990). Translational dynamics. Interaction between the translational factors. tRNA and ribosomes during eukaryotic protein synthesis. *European Journal Biochemistry*. **191**: 1-17.

Oldham S., Hafen E. (2003). Insulin/IGF and target of rapamycin signalling: a TOR de force in growth control. *Trends in Cell Biology*. **13**: 79-85.

Paz Lemus E. (2005). Efecto de la insulina en la síntesis de proteínas, síntesis de DNA y síntesis de RNA en semillas de maíz (*Zea mays* L.). Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

Pestova, TV., Hellen CU. (2000). The structure and function of initiation factors in eukaryotic protein synthesis. *Cell and Molecular Life Science*. **57**:651-674.

Phipps K., Charette M., Baserga S. (2011). The small subunit processome in ribosome biogenesis-progress and prospects. *Wiley Interdiscip Review RNA* **2**: 1-21.

Pontvianne f., Matía I., Douet J., Tourmente S., Medina FJ., Echeverria M., Sáez-Vásquez J. (2007). Characterization of AtNUC-L1 reveals a central role of nucleolin in nucleolus organization and silencing of AtNUC-L2 gene in *Arabidopsis*. *Molecular Biology of the Cell*. **18**: 369-379.

Popescu S., Tumer N. (2004). Silencing of ribosomal protein L3 genes in *N. tabacum* reveals coordinate expression and significant alterations in plant growth, development and ribosome biogenesis. *Plant Journal*. **39**: 29-44.

Powers T., Walter P. (1999). Regulation of ribosome biogenesis by the rapamycin-sensitive TOR-signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*. **10**: 987-1000.

Rawn J. (1991). *Bioquímica*. Vol. II. McGraw Hill-Interamericana de España. Madrid , España.

Ren M., Qiu S., venglat P., Xiang D., Feng L., Selvaraj G., Datla R. (2011). Target of rapamycin regulates development and ribosomal RNA expression through kinase domain in *Arabidopsis*¹^{[w][OA]}. *Plant Physiology*. **155**: 1367-1382.

Reyes de la Cruz H., Aguilar R, Sánchez de Jiménez E. (2004). Functional characterization of Maize ribosomal S6 protein Kinase (ZmS6K), a plant ortholog of metazoan p70 (S6K). *Biochemistry* **43**: 533-539.

Rincón-Guzmán A., Beltrán E., Ortiz A., Sánchez de Jiménez E. (1998). Ribonucleoprotein particles of quiescent maize embryonic axes. *Plant Molecular Biology*. **38**: 357-364.

Rodríguez-López CA., Rodríguez-Romero A., Aguilar R., Sánchez de Jiménez E. (2011). Biochemical characterization of a new maize (*Zea mays* L.) peptide growth factor. *Protein Peptide Letters*. **18**: 89-91.

Sáez-Vásquez J., Caparros-Ruíz D., Barneche F., Echeverría M. (2004a). Characterization of a crucifer plant pre-rRNA processing complex. *Biochemical Society Transactions*. **32**: 578-580.

Sáez-Vásquez J., Caparros-Ruíz D., Barneche F., Echeverría M. (2004b). A plant snoRNP complex containing snoRNAs, fibrillarin, and nucleolin-like proteins is competent for both rRNA gene binding and pre-rRNA processing *in vitro*. *Molecular and Cellular Biology*. **24**: 7284-7297.

Sánchez de Jiménez E. (2000). Protein synthesis in seed germination: connecting external cell signals with the ribosome. In *Seed Biology: Advances and Applications*. USA.

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

Sánchez de Jiménez E., Aguilar R., López S. (1981). Distinctive characteristics of protein synthesis in maize embryos during the early stages of germination. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **99**: 445-450

Schawalder S., Shore D (2003). Transcriptional control of ribosomal protein genes in budding yeast. En *Ribosome Synthesis 2003.* 6th International Conference on Ribosome Synthesis, Toulouse, Francia. p 54.

Schmelzle T., Hall M. (2000). TOR, a central control of cell growth. *Cell.* **103**: 253-262.

Srivastava M., Fleming PJ., Pollard HB., Burns AL. (1989). Cloning and sequencing of the human nucleolin cDNA. *FEBS Letters.* **250**: 99-105

Tajrishi M., Tuteja R., Tuteja N. (2011). Nucleolin. The most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus. *Communicative & Integrative Biology.* **43**: 267-275.

Tsang HK., Liu H., Steven Zheng XF. (2010). mTOR binds to the promoters of RNA polymerase I- and III-transcribed genes. *Cell Cycle.* **5**: 953-957.

Tschochner H., Hurt E. (2003). Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends in Cell Biology*. **13**: 255-263.

Turck F., Zilbermann F., Kozma S., Thomas G., Nagy F. (2004). Phytohormones participate in an S6 kinase signal transduction pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. **134**: 1527-1535.

Vázquez-Ramos JM., Sánchez MP. (2003). The cell cycle and seed germination. *Seed Science Research*. **13**: 113-130.

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

Verschoor A., Srivastava S., Grassucci R., Frank J. (1996). Native 3D structure of eukaryotic 80S ribosome: morphological homology with *E. coli* 70S ribosome. *Journal Cell Biology*. **133**: 495-505.

Warner J., Rudra D., Zhao Y. (2003). New players in the regulation of ribosome biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. In *Ribosome Synthesis 2003*. 6th International Conference on Ribosome Synthesis, Toulouse Francia. p 53.

Williams A., Werner-Fraczek J., Ing-Feng Chang., Bailey-Serres J. (2003). Regulated Phosphorylation of 40S ribosomal protein S6 in Root Tips of maize. *Plant Physiology*. **132**: 2086-2097.

Wilson DN., Nierhaus KH. (2005). Ribosomal proteins in th spotling. Critical Reviewis in Biochemistry and Molecular Biology. **40**: 243-267.

Wu A., Tu X., Prisco M., Baserga R. (2005). Regulation of Upstream Binding Factor 1 activity by insulin-like growth factor I receptor signaling. The Journal of Biological Chemistry. **280**: 2863-2872

Xiong Y., McCormach M., Li L., Hall Q, Xiang C., Sheen J. (2013). Glucose-TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. Nature. **496**: 181-186.

Xue S. Barna M. (2012). Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. Natural Review Molecular Cell Biology. 13: 355-369.

Anexo 1

AGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTGCAAGTATGAACTAATTGAACTGTGAACTGCGAATGGCTCATT
AAATCAGTTATAGTTTGTGGTATGGTACGTGCTACTCGGATAACCGTAGTAATTCAGAGCTAATACGTGCAACAAACCCCG
ACTTCCGGGAGGGGGCGCATTATAGATAAAAGCTGACGCGGGCTCTGCCCGCCGATCCGATGATTCATGATAACTTGA
CGGATCGCACGGCCCTTCGTGCCGGCGACGCATCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGGGGCTA
CCATGGTGGTGACGGGTGACGGGAGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGG
AAGGCAGCAGGGCGCAAAATTACCCAATCCTGACACGGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACCGGGCGCGTTAGTGT
CTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAATCCTTAACGAGGATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTCCAGCAGCCGCGGTA
ATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGACCTTGGCCCGGGCCGGCCGGTCC
GCCTCACGGCGAGAACCAGCCGGCTCGACCCTTCTGCCGGCGATGCGCTCCTGGCCTTAACCTGGCCGGGCTCGTGCCTC
CGGCCCGCTTACTTTGAAGAAATAGAGTGCTCAAAGCAAGCCATCGCTCTGGATACATAGCATGGGATAACATCATAGG
ATTCCGGTCTATTGTTGGCCCTTCGGGATCGGAGTAATGATTAATAGGGACAGTCCGGGGCATTCTGATTTTCATAGTCA
GAGGTGAAATCTTGGATTATGAAAGACGAACAACCTGCCAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTATTATCAAGAACGAA
GTTGGGGCTCGAAGCAGATCAGATACCCTAGTCTCAACATAAACGATGCCGACCAGGGATCAGCGGGTACTACTA
ATAGGACCCCGCTGGACCTTATGAGAAATCAAAGTCTTTGGTTCGGGGGGGAGTATGGTCCGCAAGGCTGAAACTTAAA
GGAATTGACGGAAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCCGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTTACCAGGTCCAG
ACATAGGAGGATTTGACAGACTGAGAGCTCTTTCTTATTGATTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTAGTTGGAGG
GATTTGCTGGTAAATTCGTTAACGAACGAGACCTCAGCCTGCTAATAGCTATGCCGAGCCATCCCTCCGATGTTAGCT
TCTTAGAGGGACTATGGCCGTTTAGGCCACGGAAAGTTTAGGGCAATAACAGGCTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCC
GCACGGCGCTACACTGATGTATCAAACGAGTATATAGCCTTGGCCGACAGGCCCGGGTAACTTTGGGAAATTTTCATCGT
GATGGGGATAGATCATTGCAATTGTTGGTCTTCAACGAGGAATGCCCTAGTAAGCCGAGTCAATCGCGTTGACTC
GGCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCCGCTCCTACCAGTGAATGGTCCGGTGAAGTGTTCGGATCCGGCGGACGATC
GGCCGTTCCCGCCCGCCGACCTCGCGAGAAGTCCATTGAACCTTATCATTAGAGGAAGGAGAAGTCCGTAACAGGTTT
CCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGCCGTGACCTTAAACAAACACAGCCGCGAACGAGTCAACCCGTGCCCGC
GGCTCCGGCCCGGACGCTGCCCGCCGAACCTCCCGCGGGGAAGGGGGTGCCTCGAAAAAGAACCCACGGCCCGC
CCGGCCCAAGGAACCCAGTACTACTCTCCCGCCGCGGAGCGGTCCGGCCCGCTTCCGCTCCAGGGGACGGT
TACACCTTAATCGACACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAATGCGATACCTG
GTGTAATTGCAGAAATCCCGCAACATCGAGTTTGAACGCAAGTTGCCCGCAAGCCTTGGCGGAGGGCAGCTC
TGCCTGGGCGTACGCGCAAAAGACACTCCCAACACCCCGCCCGGGGGCGAGGGGACGTGGCGTCTGGCCCGCCCGCC
GCACGGCGAGGTGGGGCGAAGCAGGGGCTGCCGGCGAACCAGCCGCGGGCGCAGCACGTGGTGGGGACATCAAGTT
GTTGTTCTCGGTGAGCGTCCCGCCGCGCGGGCCGATTCGGCCCTAAGGACCCATCGAGCGACCGAGCTTGGCCCTC
GGACCGCGACCCAGGTCACTCGGGACTACCCGCTGAGTTAAGCATATAAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTACGAGG
ATTCCCCTAGTAACGGCGAGCGAACCGGGAGCAGCCAGCTTGAAGAATCGGGCGGCCCTCGCCCGCCGAATTTAGTCT
GGAGAGGCGTCTCAGCGACGGACCGGGCCAAAGTTCTCTGAAAGGGACGCTGGGAGGGTGAAGCCCGCCCG
GCCCGGACCTGTGCGACACGAGGCGCCGTCAACGAGTCCGGTGTGTTGGGAATGCAGCCAAATCGGGCGGTAAC
TCCGTCAAAGGCTAAATCAGGGCGAGACCCGATAGCGAACAAGTACCAGCGAGGGAAAGATGAAAAGGACTTTGAAAAG
AGAGTCAAAGAGTGTGAAATTCGGGGAGGGGAAGCTGGATGGGGCTGGCGACGCGCACCCGGCCGATGCGGAACG
GCTCCTGTGGTCCGCCGATCGGCTCGGGGCGTGGACCGTTGTCCCGCCGCGCCGGCGGCAAGCCCGGGGGCCCT
AGGGCCCGCCGAGCCGTCGTCCGGCGGGACGGTATCCGGCGCCCTCTGGCGCGCCCTCGGGGCGCTCGCCTGC
AACGGCCTGCGAGCTCCCCATCCGACCCGCTTGAACACGGACCAAGGAGTCTGACATGCGTGCAGTGCAGCGGTT
CAGAAACCTGAGATGCGCAAGGAAGCTGACGAGCGGGAGGCCCTCACGGGCCGACCCGCTGGCCGACCTGATCTTCT
GTGAAGGGTTCGAGTTGGAGCACGCCCTGTCCGGACCCGAAAGATGGTGAACATGCTGAGCGGGGCGAAGCCAGAG
GAAACTCTGGTGGAGGCTCGAAGCGATACTGACGTGCAAAATCGTTCTGACTTGGGTATAGGGGCGAAGACTAATCG
AACCATCTAGTAGCTGGTCCCTCCGAAGTTCCCTCAGGATAGCTGGAGCCACACGAGTCTATCGGGTAAAGCCAAAT
GATTAGGCGATCGGGGCGCAACGCCCTCGACTATTCTCAAACCTTAAATAGGTAGGACGGCGCGCTGCTCGGTG
AGCCGTGCCACGGAATCGGGAGCTCAAAGTGGGCCATTTTTGGTAAGCAGAAGTGGCGATCGGGATGAACCGGAAGC
CGGGTTACGGTSCCAAACCTGCGCGCTAACCTAGAACCACAAAGGGTGTGGTTCGATTAAAGACAGCAGGACGGTGGTCA
TGGAAAGTCAAATCCGCTAAGGAGTGTGTAACAACCTCACCTGCCGAATCAACTAGCCCGAAAATGGATGGCGCTGAAAGC
GGCGACCCACACCCCGCCATCTGGGCGAGCGACATGCCCGGATGAGTAGGAGGGCGCGGGCGCCGCGCAAAACCC
GGGGCGCGAGCCCGGGCGGAGCGGGCGTCCGGTGCAGATCTTGGTGGTAGTAGCAAATATTCAAATGAGAACTTTGAAG
GCCGAAGAGGAGAAAGGTTCCATGTGAACGGCACTTGCACATGGGTAAAGCCGATCCTAAGGGACGGGGGAAACCCGGC
AGATAGCGGATCACGCGCGTCAACCGAAAGGGAATCGGGTTAAGATTTCCCGAGCCGGGACGTGGCGGACAGACGGCG
ACGTAGGAAGTCCGGAGACGCCGGCGGGGGCCTCGGGAAAGATTATCTTTCTGCTTAAACGGCCCGCAACCCCTGGA
ATCGGTTACGCCGAGGTAGGTTCCAGCGGGCGGAAGAGCACCGCACATCGCGCGGTGTCGGTGCAGCCCGGGCG
CCCTTGAATCCGGAGGACCGAATCCGTCCACGCGCGTCTGACTATAACCGCATCAGGTCTCCAAGGTGAACGAG
CTCTGGCCAATGSAACAATTGAGGCAAGGGAAGTCCGCAAAACGATCCGTAACCTTCCGGAAAGGATTGGCTGAGG
GTTGGCTCGGGGGTCCCGGCCCGAACCCGCTCGGCTGCTGGCGGAATGCTCGAGCTGCTCGCGCGGCGAGAGCGG
GCCCGCGTCCCGGCCCGGGGACCGACCGGAAACGGCCCTCGGGGGCTTCCCGGGCGTCAACAACCGACT
CAGAATCGTACGCAAGGGAAATCCGACTGTTTAAATAAACAAAGCATTGCG

Figura suplementaria. Secuencia parcial de ADNr de maíz localizada en el cromosoma 6.

Anexo 2

Soluciones para aislamiento de ARN de la fracción polisomal.

- 1) Buffer de extracción: Tris-HCl 200 mM pH 9, KCl 200 mM, MgCl₂, EGTA 25 mM, sacarosa 200 mM. Se esteriliza y se almacena a 4 °C.
- 2) Buffer TEN: Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM, cloruro de sodio 1 M.

Soluciones utilizadas para el análisis por Northern blot.

- 1) MAE 10X: 0.2 M MOPS, 50 mM acetato sódico y 10 mM EDTA pH 7.0, se esteriliza por filtración y se almacena a 4 °C protegido de la luz.
- 2) Buffer de carga para ARN 1.25X: para 4 ml se mezclan 2.2 ml de formamida, 0.8 ml de formaldehído, 0.5 ml de MAE 10 X, 0.4 ml de glicerol al 80% , 0.1 ml de azul de bromofenol al 2% y 20 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml). Se almacena a -20 °C
- 3) Agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC): se añadió 1 µl/ml de DEPC, se agitó durante 12 horas a temperatura ambiente y se esterilizó en autoclave.
- 4) SSC 10X estéril: NaCl 1.5 M, citrato de sodio 0.15 M pH 7.0
- 5) PSE: fosfato sódico 1 M pH 7.2, SDS 10%, EDTA 0.5 M
- 6) Solución de lavado: fosfato sódico 1 M pH 7.2, SDS 10%

Soluciones utilizadas para precipitación de proteínas ribosomales

- 1) Buffer de extracción: Tri-ácido acético 50 mM pH 8.2, KCl 50 mM, (CH₃COO)₂Mg 5 mM, β-mercaptoetanol 5 mM, sacarosa 250 mM

- 2) Colchón de sacarosa: sacarosa 0.5 M, KCl 0.8 M disuelto en buffer de extracción
- 3) Buffer A3: Hepes 200 mM, KOH 20 mM, $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ 5 mM, CH_3COOK 125 mM, β -mercaptoetanol 6 mM.

Soluciones utilizadas para análisis de proteínas por Western blot

- 1) PBS 1X y Tween 20 al 0.05%: fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM pH 7.8, Tween 20 al 0.05%.

Soluciones para purificación de núcleos

- 1) Buffer de extracción de núcleos: Tris-HCl 10 mM pH 7.2, sacarosa 1 M, MgCl_2 5 mM, β -mercaptoetanol 2 mM. Se añadió la mitad de una tableta de inhibidores de proteasas de Roche® por cada 100 ml de buffer.
- 2) Buffer de lavado de núcleos: Tris-HCl 10 mM pH 7.2, sacarosa 1 M, MgCl_2 5 mM, β -mercaptoetanol 2 mM, Tritón X-100 al 0.5%. Se añadió la mitad de una tableta de inhibidores de proteasas de Roche® por cada 100 ml de buffer.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi

Research paper

Regulation of ribosome biogenesis in maize embryonic axes during germination



J.M. Villa-Hernández^a, T.D. Dinkova^b, R. Aguilar-Caballero^b, F. Rivera-Cabrera^a,
E. Sánchez de Jiménez^b, L.J. Pérez-Flores^{a,*}

^aDepartamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, CP 09340 D. F. México, Mexico

^bDepartamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 D. F. México, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 January 2013

Accepted 14 June 2013

Available online 25 June 2013

Keywords:

Pre-rRNA (precursor of ribosomal RNA)

rRNA (ribosomal RNA)

RP's (ribosomal proteins)

Processing

Cell growth

ABSTRACT

Ribosome biogenesis is a pre-requisite for cell growth and proliferation; it is however, a highly regulated process that consumes a great quantity of energy. It requires the coordinated production of rRNA, ribosomal proteins and non-ribosomal factors which participate in the processing and mobilization of the new ribosomes. Ribosome biogenesis has been studied in yeast and animals; however, there is little information about this process in plants. The objective of the present work was to study ribosome biogenesis in maize seeds during germination, a stage characterized for its fast growth, and the effect of insulin in this process. Insulin has been reported to accelerate germination and to induce seedling growth. It was observed that among the first events reactivated just after 3 h of imbibition are the rDNA transcription and the pre-rRNA processing and that insulin stimulates both of them (40–230%). The transcript of nucleolin, a protein which regulates rDNA transcription and pre-rRNA processing, is among the messages stored in quiescent dry seeds and it is mobilized into the polysomal fraction during the first hours of imbibition (6 h). In contrast, *de novo* ribosomal protein synthesis was low during the first hours of imbibition (3 and 6 h) increasing by 60 times in later stages (24 h). Insulin increased this synthesis (75%) at 24 h of imbibition; however, not all ribosomal proteins were similarly regulated. In this regard, an increase in RPS6 and RPL7 protein levels was observed, whereas RPL3 protein levels did not change even though its transcription was induced. Results show that ribosome biogenesis in the first stages of imbibition is carried out with newly synthesized rRNA and ribosomal proteins translated from stored mRNA.

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Growth of an organism can be the result of an increase in cell size and/or cell proliferation. In both cases, proteins constitute the main component of the dry cell mass [1]. The amount of proteins that can be synthesized depends on the number of ribosomes; therefore, ribosome biogenesis is a determinant process for organism growth [2,3]. Ribosome synthesis requires the coordinated production of rRNA and ribosomal proteins (RPs) [4]. Cell growth in eukaryotes is regulated by the PI3K-TOR signaling pathway in

response to nutrient levels, environmental stress as well as insulin and insulin-like growth factors (IGF's) [5–7]. In this regard, it has been reported that insulin and IGF's show mytogenic activity in animals [8]. In animals and yeast, this pathway is coupled to nutrient availability that regulates ribosome biogenesis by two simultaneous mechanisms: by controlling the 5S rRNA transcription [9], the transcription and processing of the pre-rRNA (which includes the 25S, 18S and 5.8S rRNAs) and by promoting the mobilization of mRNA encoding for ribosomal proteins to the polysomes for translation [10]. Also, it has been shown that insulin increases the rDNA transcription and the number of ribosomes in primary mouse fibroblasts cultures. This increase was not associated with an increase of the RNA polymerase I, but with an increase in the levels of the UBF and PAF53 transcription factors, as well as by the activation of UBF by phosphorylation. These transcription factors participate in the formation of the initiation complex during rDNA transcription and in the regulation of RNA Pol I activity [11–13]. In addition, it has been observed that insulin increases the

Abbreviations: RP, ribosomal protein; IGF's, insulin-like growth factor; ZmIGF, insulin-like growth factor of *Zea mays*; MS, Murashige and Skoog medium; ETS, external transcribed spacer; ITS1, internal transcribed spacer 1; ITS2, internal transcribed spacer 2.

* Corresponding author. Tel.: +52 55 58046481; fax: +52 55 58044727.

E-mail addresses: ljpf@xanum.uam.mx, laujper@yahoo.com.mx (L.J. Pérez-Flores).

synthesis of ribosomal proteins in mouse myoblasts [14] by increasing the number of ribosomes [15] while rapamycin, a TOR-kinase inhibitor, blocks the rRNA precursors processing in HeLa cells [16].

There is still little knowledge about the regulation of ribosome synthesis in plants. It has been reported that there is an increase in pre-rRNA levels whereas rDNA transcription is reactivated sequentially in different tissues, going from the cortex to the exterior [17]. Recently, it has been shown that the TOR kinase domain works as a transcription factor regulating the 45S pre-rRNA synthesis in *Arabidopsis thaliana* [18]. Also, the existence of ribosomal proteins with a dual role, that is proteins that have other functions besides participating in the ribosome structure, has been reported. RPL3 is a protein with dual function which according to previous results participates in ribosome biogenesis [19]. During maize seed germination, there is active translation of stored mRNAs among which some ribosomal proteins are present [20].

The presence of IGF's has been reported in spinach, *Lemna gibba* G3 and *Canavalia ensiformis*; some of them stimulate glucose uptake in animals [21,22]. A 5.7 kDa insulin-like peptide named ZmIGF, which accelerates germination and promotes maize seedlings growth has been isolated from maize [23,24]. Even though insulin has not been found in plants, it has been reported that this hormone and IGFs accelerate germination and activity of enzymes of the glyoxysome of several seed species [25]. In this regard, Oliveira et al. [26] reported that the treatment with insulin significantly increases radicles and coleoptiles length and weight of *C. ensiformis* seeds. In addition, these authors isolated insulin-binding proteins, which are probable components of the signaling pathway (receptor, phosphoserine kinases and other associated proteins). Also, orthologues of TOR and S6K proteins have been identified in maize seeds and there are evidences that support the existence of the PI3K-TOR signaling pathway which regulates cell growth in response to insulin in a similar way to what is reported for mammals [27–30].

In previous studies it was observed that ZmIGF induces ribosomal protein synthesis in germinating maize seeds [24,28]. However, not all ribosomal proteins are regulated in the same way by this factor [31]. This differential effect might be explained by the dual function that some of the RPs have besides participating in the ribosomal structure; for example, S6RP [32,33], the acidic proteins [34] and RACK1, which also regulate translation [35,36]. Another RP with dual function is the RPL3; when this protein was silenced in *Nicotiana tabacum*, the accumulation of pre-rRNA and number of cells decreased, supporting its participation in the ribosome biogenesis [19].

Several proteins that participate in rDNA transcription and pre-rRNA processing have been identified in plants. In this regard, Harscoët et al. [37] characterized a nucleolar protein in *Arabidopsis*, NOF1, which regulates rRNA expression. On another study, a nuclear phosphoprotein, MA16, which interacts with rRNA and with other proteins that participate in the rRNA metabolism was characterized in embryos from maize seeds [38,39]. Also, an enzymatic complex named NF D formed by almost 30 proteins, which participates in the processing of pre-rRNA, was identified in *A. thaliana* [40]. Nucleolin, a non-ribosomal protein, widely distributed from yeast to plants and mammals, which regulates several aspects of the DNA and RNA metabolism, such as chromatin relaxation, rDNA transcription, pre-rRNA processing, ribosomes assembly and nucleus–cytoplasm transportation of pre-ribosomal particles, is part of the NF D complex [41,42].

Since ribosome biogenesis is a pre-requisite for cells to grow and proliferate and it has been demonstrated that ZmIGF/insulin induce selective translation of ribosomal protein mRNAs and regulates growth during maize germination by similar mechanisms; in the

present work, insulin was used as an effector for studying ribosome biogenesis in maize seeds during germination.

2. Materials and methods

2.1. Biological material and treatments

Embryonic axes dissected from maize (*Zea mays* L. cv. Chalqueño) seeds were imbibed in Murashige and Skoog (MS) medium during 3, 6, 12, 18 and 24 h. The last 2 h of imbibition, axes were incubated in MS medium with a pulse of 200 $\mu\text{U ml}^{-1}$ of insulin according to the methodology described by Buentello et al. [43]. Then, axes were rinsed with sterile water, frozen with liquid N_2 and stored at -70°C until they were used. All experiments were performed in triplicate. Insulin concentration and time of treatments have been previously demonstrated to be effective in inducing maize seedling growth [28,44]. Due to its availability, insulin was used instead of ZmIGF to stimulate the maize embryonic axes.

2.2. Isolation of total RNA and RNA from the polysomal fraction

Embryonic axes were incubated for 3 and 6 h with or without insulin as described in Section 2.1. Total RNA was isolated from 0.1 g of embryonic axes pulverized with liquid N_2 using the Trizol reagent (BRL, Life Technologies, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with the modifications recommended for plant tissues. Polysomes were isolated from 0.5 g of embryonic axes by differential centrifugation according to the methodology reported by Dinkova et al. [28]; RNA was isolated from the obtained polysomes. Both, total and polysomal RNA were resuspended in 50 μL of RNase free water. Purity of the RNA was determined by the relation $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ and its concentration was quantified using a Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Integrity of all samples was verified using 2 μg of total RNA or RNA from the polysomal fraction following the methodology of Sambrook et al. [45].

2.3. De novo synthesis of ribosomal RNA

Maize seeds were imbibed for 24 h; during the last 2 h they were treated with or without insulin in the presence of 300 μCi of $[^{32}\text{P}]$ -orthophosphate. RNA from the polysomal fraction was obtained as described in Section 2.2 [28]. Twenty micrograms of RNA were separated by electrophoresis under denaturing conditions (MOPS/formaldehyde); afterward, the bands corresponding to 18S and 25S rRNA were excised and the $[^{32}\text{P}]$ incorporated was determined in a Beckman scintillation counter using 5 ml of scintillation liquid ACS® (Amersham Biosciences). Results were reported as cpm μg^{-1} of polysomal RNA.

2.4. Northern blot analysis of the rRNA precursors

Total RNA (10 μg from each sample) was separated by electrophoresis under denaturing conditions (MOPS/formaldehyde) and then transferred to a nylon Hybond N^+ membrane in $10\times$ SSC buffer. The membrane was cross-linked and prehybridized with PSE buffer (1 M sodium phosphate, 10% (w/v) SDS, 0.5 M EDTA, pH 7.2) for 10 min. Fragments were amplified from pre-rRNA (including ITS1, 5.8S and ITS2 sequences) or mature 18S and 25S ribosomal RNAs based on the published maize sequences (Accession numbers AF019817, AF168884 and AY097330, respectively). For amplifying the pre-rRNA, the following primers were used: Fwd: 5'-TGACCCTTAAACAAAACAGACC-3' and Rv: 5'-CACCGAGAACAACAACACTTG-3'. For 18S rRNA the following primers were used: Fwd: 5'-GTGGCCTAAACGGCCATAGTCCCTC-3' and Rv: 5'-GGAACTTACCAGTCCAGAGATAG-3' and for the 25S rRNA:

Fwd: 5'-AACACGGACCAAGGAGTCTG-3' and Rv: 5'-CCCAAGTCA-GACGAACGATT-3'. The amplified fragments were used to generate the probes by labeling with the Ready-To-Go DNA Labeling Beads kit (GE Healthcare, UK) adding 5 µl of [³²P]-dCTP (Sp. Act. 29.6 TBq/mmol, Perkin–Elmer, Boston, MA, USA) following the manufacturers instructions. Membranes were hybridized with the labeled probes with 10 ml of PSE buffer at 65 °C for 24 h. Afterward, the membranes were washed twice with SL buffer (1 M sodium phosphate, 10% (w/v) SDS, pH 7.2) and then they were exposed to radiographic films (Kodak Medical X-ray General Purpose Blue) at –70 °C for different periods of time. Films were developed and the image was analyzed with the Molecular Imagen System (Carestream Health, INC).

2.5. De novo ribosomal proteins synthesis

Ribosomal proteins synthesis was evaluated after 3, 6, 12, 18 and 24 h of imbibition. Axes were incubated in 3 ml of MS medium with 300 µCi of [³⁵S]-methionine (Sp. Act. 43.475 TBq/mmol, Perkin–Elmer, Boston, MA, USA), with or without 200 µU of insulin during the last 2 h. At 24 h of imbibition an extra treatment was applied, adding a mixture of 200 µU of insulin and 0.1 µM of rapamycin during the last 2 h of imbibition. Embryonic axes were homogenized with four volumes of extraction buffer for ribosomal proteins (50 mM Tris–acetic acid, pH 8.2, 50 mM KCl, 5 mM (CH₃COO)₂Mg, 250 mM sucrose, 5 mM β-mercaptoethanol) per gram of tissue. The homogenized tissue was centrifuged at 27 000 × g for 30 min at 4 °C; the pellet was discharged and the supernatant laid over a sucrose cushion (extraction buffer with 0.5 M sucrose and 0.8 M KCl) and centrifuged again at 100 000 × g during 4 h at 4 °C for obtaining the ribosomal pellet which was resuspended in 500 µl of A3 buffer (200 mM Hepes, 20 mM KOH, 5 mM (CH₃COO)₂Mg, 125 mM CH₃COOK, 6 mM β-mercaptoethanol). Ribosomal proteins were extracted with glacial acetic acid and 1 M (CH₃COO)₂Mg, precipitated with five volumes of cold acetone and incubated at –20 °C for 18 h and then centrifuged at 8000 × g during 15 min at 4 °C. Supernatant was discharged and ribosomal proteins resuspended in 0.1 mM Tris–HCl, pH 7.2. [³⁵S]-Methionine incorporation was determined in a Beckman scintillation counter using 20 µl of the sample in 5 ml of scintillation liquid ACS[®] (Amersham Biosciences). Protein concentration was determined by the Bradford [46] method using a 10 µl aliquot of the sample and bovine serum albumin (BSA) as standard. Results were reported as cpm µg^{–1} of proteins. Proteins were separated by SDS–PAGE in 12% (w/v) gels and transferred to a PVDF membrane. Membranes were exposed for 7 days to radiographic films at –70 °C. The films were developed and the image analyzed with the Molecular Imagen System (Carestream Health, INC).

2.6. Insulin effect in de novo RPS6, RPL7 and RPL3 synthesis determined by western blot analysis

Ribosomal proteins were separated by SDS–PAGE in 12% (w/v) acrylamide gels and transferred to a Nylon, Hybond-P membrane (Amersham CA, USA) by semi-dry transfer using 8 mA cm^{–2}. Membrane was blocked with 5% (w/v) nonfat milk in 1× PBS–5% (v/v) Tween 20 for 60 min at 25 °C and then washed three times for 10 min with 1× PBS–5% (v/v) Tween 20. Afterward, membrane was incubated with antibody against RPL3 (1:1000 dilution) or RPS6 (1:2000 dilution) or RPL7 (1:1000 dilution) in 1× PBS–5% (v/v) Tween 20 and 1% (w/v) albumin overnight at 4 °C. Then, membrane was washed twice with 1× PBS–5% (v/v) Tween 20 for 10 min at room temperature; next, membrane was incubated with the secondary anti-rabbit antibody conjugated to horseradish peroxidase (1:5000 dilution) for detecting RPL3 or secondary anti-

goat antibody conjugated to horseradish peroxidase (1:5000 dilution) for detecting RPS6 and RPL7 in 5% (w/v) nonfat milk in 1× PBS–5% (v/v) Tween 20 for 60 min. All antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology Inc. Ca. USA. Membrane was washed three times with 1× PBS–5% (v/v) Tween 20 for 10 min at room temperature. Reaction was detected by quimioluminescence using a 1:1 (v/v) of Immobilon Western Chemilum: Hrp Substrate (Millipore Inc, USA) and developed in a KODAD Blue X-Omax film.

2.7. Regulation of nucleolin and RPL3 transcript levels by insulin

Total RNA or RNA from the polysomal fraction (2 µg) was treated with 1 U of DNase (Promega, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. qRT-PCR reactions were carried out in a Rotor Gene 3000 (Corbet Research Quiagen, CA, USA), using 1 µL of RNA treated with DNase. Amplifications were performed using the One step qPCR kit from Invitrogen[®]. Primers were designed based on the reported maize sequences. The primers for nucleolin (Accession No. EU960380) were Fwd: 5'-GCAAGCGTACCACAAGTGAA-3' and Rv: 5'-GGTGGTCTGGGTTTAGCGTA-3'; the amplification product was 210 bp long. For RPL3 (Accession No. EC379972) the primers used were Fwd: 5'-CCGCACTGAGATGAACAAGA-3' and Rv: 5'-ATCAGG-TAGTCACCCCTCAGC-3'; the amplification product was 153 bp long. RPS13 (Accession No. NM_001112238) was used as reference gene; the primers used for its amplification were Fwd: 5'-AAA-GAAGCTCCACCCACCT-3' and Rv: 5'-GATGAGGTCCGTGTCCATT-3' and the product was of 151 bp. The identity of the amplification products was verified before performing the qRT-PCR reactions. The amplification efficiency was corroborated to be between 95 and 100% for all the studied genes [47]. Also, it was verified that the insulin treatment did not affect the expression of the reference gene using the genNorm software (version 3.5, <http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>). Annealing temperature was 60 °C for nucleolin and 58 °C for RPL3. The reference gene RPS13 was amplified simultaneously using the same conditions indicated for each of the analyzed genes without affecting its amplification efficiency. Relative gene expression was determined by the 2^{–ΔΔCT} method; to determine insulin induction comparison was made to the control to which the value of 1 was assigned; to determine the effect of time of imbibition it was compared to 3 h to which the value of 1 was assigned.

2.8. Statistical analysis

Parameters of descriptive statistics (means and standard deviations) as well as differences among treatments determined by two-way ANOVA with a significance level of $\alpha \leq 0.05$ were obtained using the statistical software Prisma [48]. For the analysis of RPL3 gene expression data were transformed to limit the effect of the high variability among biological replicates as reported by Willems et al. (2008) [49].

3. Results

3.1. Effect of insulin on de novo synthesis of mature rRNA during germination

De novo synthesis of mature ribosomal RNA was determined by the incorporation of [³²P]-orthophosphate in the isolated rRNAs from embryonic axes imbibed during 24 h with or without insulin. The incorporation of radioactive labeling was significantly higher in ribosomal RNAs (25S and 18S) obtained from polysomes of embryonic axes treated with insulin than in the control (Fig. 1).

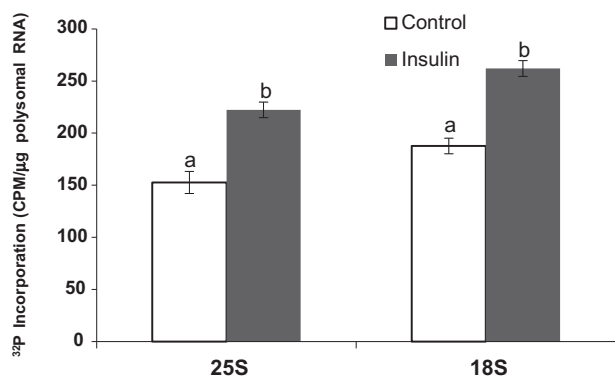


Fig. 1. Insulin effect on the *de novo* synthesis of mature rRNA during germination of maize seeds. [^{32}P] incorporation in mature 25S and 18S rRNA of polysomal fraction was determined at 24 h of imbibition. The experiment was reproduced independently at least three times with similar results. Mean values \pm SD are presented. Different letters indicate significant differences between treatments ($p \leq 0.05$).

3.2. Precursors of mature rRNA in maize during the early germination

In order to determine the effect of insulin on the synthesis of rRNA precursors, experiments using shorter periods of imbibition (3 and 6 h) were done. To determine the levels of rRNAs and their precursors, fragments spanning the pre-rRNA (including ITS1 5.8S and ITS2), 18S and 25S rRNA were used as probes. Total RNA was isolated from axes treated with or without insulin imbibed for 3 and 6 h. Fig. 2A shows the electrophoretic analysis of the total RNA samples dyed with ethidium bromide. Two main bands with molecular weights of 2.37 kb and 1.35 kb corresponding to the mature 25S and 18S rRNA, respectively, were observed. Also, faint bands with molecular weights higher than 2.37 kb which could correspond to the precursors can be observed. Fig. 2B shows the Northern blot analysis with the labeled probe for 25S rRNA and the densitometric analysis. Two bands of 4.9 and 3.2 kb (indicated with arrows) that could correspond to rRNA precursors were detected. Insulin induced the accumulation of these bands (50–80%) compared to the control samples after 3 h of imbibition, to which the value of 1 was assigned. As expected, the mature 18S ribosomal RNA was not detected by this probe. In order to confirm that these bands correspond to the rRNA precursors, Northern blot analysis was performed using an RNA fragment including ITS1, 5.8S and ITS2 as probe (Fig. 2C). Three bands of 7 kb, 4.9 kb and 0.17 kb indicated by arrows were detected in the fluorography. Their intensity increased (40–230%) in insulin-treated embryonic axes compared to the control at 3 h of imbibition (to which the value of 1 was assigned). Since in this case the probe would exclusively recognize the rRNA precursor and mature 5.8S rRNA corresponding to the lower band (0.17 kb) on the fluorography, we conclude that insulin is able to promote the expression of rDNA corresponding to 18S, 5.8S and 25S genes in the first hours of imbibition. Fig. 2D shows the Northern blot analysis using the labeled 18S fragments as probe and the densitometric analysis of the detected band compared to the control of 3 h of imbibition (to which the value of 1 was assigned). In this case, insulin induced the accumulation (40–50%) of a band of 2.1 kb (indicated with the arrow), which might correspond to the pre-20S rRNA, compared to the control at 3 h of imbibition. This effect was more pronounced at 6 h of imbibition. As expected, the mature 25S ribosomal RNA was not detected with this probe.

To our knowledge, it has not yet been reported neither the complete sequence for rDNA nor the ETS sequence for maize; however ITS1 and ITS2 sequences are reported (Accession No. AF019817). For obtaining the rDNA sequence, both ITS1 and 2 and

18S rRNA and 25S rRNA sequences were introduced in the Ensembl software (<http://www.ensembl.org>) for human genome and the obtained sequence was compared to the maize genome; a maize rDNA sequence of 4552 bases located in chromosome 6 was retrieved (Supplementary Fig. 1). This sequence contained mature 18S rRNA, 25S rRNA and 5.8 rRNA as well as ITS1 and 2 sequences and also an extra 48 bases sequence that has not been reported between the 18S rRNA and the ITS1.

3.3. Analysis of the transcripts of the nucleolin gene during early germination

Since our results showed that insulin could stimulate ribosome biogenesis accelerating the rDNA transcription of 18S, 5.8S and 25S, as well as the accumulation and processing of the rRNA precursors, we decided to study the effect of insulin in the transcription of the nucleolin gene, a non-ribosomal protein which participates in the pre-rRNA processing in yeast and which presence has been detected also in *Arabidopsis* [50,51], alfalfa [52], onion [53] and pea [54]. The nucleolin maize sequence [55] was aligned with *Arabidopsis*, (Accession No. NM_103785), pea (Accession No. L43510) and alfalfa (Accession No. X88845) reported sequences using the ClustalW software (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) finding a score of 68%, 71% and 73% of similarity, respectively. The nucleolin transcript was found among the stored mRNA in the dry embryonic axes. Non significant differences were detected in the levels of nucleolin transcript in total RNA between 3 and 6 h of imbibition; however, there is a significant increase in the nucleolin transcript recruitment to polysomes after 6 h of imbibition compared to 3 h of imbibition (Fig. 3A). Insulin did not have a significant effect on nucleolin transcript levels, neither in total RNA nor in the RNA from the polysomal fraction (Fig. 3B).

3.4. Insulin effect on the regulation of the RPL3 gene expression during late imbibition stages

The insulin effect on the RPL3 transcript levels in total RNA and in the polysomal fraction was analyzed by qRT-PCR at 24 h-imbibition stage of germinating maize embryonic axes. This analysis was performed since previously it was shown that insulin stimulates translation of several ribosomal proteins and translation factors at 24 h-imbibition [28]. It was observed that insulin induced an increase in the RPL3 transcription, but did not have an effect on the recruitment of this transcript to the polysomes (Fig. 4).

3.5. Effect of insulin on the *de novo* synthesis of ribosomal proteins during germination

A significant increase (60 times) of the [^{35}S]-methionine incorporation on the *de novo* synthesis of RPs was observed at 24 h of imbibition compared to axes imbibed for 3, 6, 12 and 18 h (Fig. 5A). This is in accordance with previous reports for maize indicating that re-initiation of cell division occurs around 18 h of imbibition [56] and it should be accompanied by intense protein synthesis activity. Hence, new ribosome biogenesis should also occur at high rate. In addition, insulin increased the *de novo* RPs synthesis by approximately 75% at 24 h of imbibition compared to the control, but did not have an effect on the methionine incorporation on the first 18 h of imbibition (Fig. 5A). When rapamycin was applied with insulin at 24 h of imbibition, induction of RPs synthesis by insulin was reverted.

Labeled ribosomal proteins obtained from the 24 h-imbibed axes in the previous experiment were separated by SDS-PAGE and then analyzed by fluorography. Even though insulin increased the general synthesis of RPs, not all of them were stimulated by this

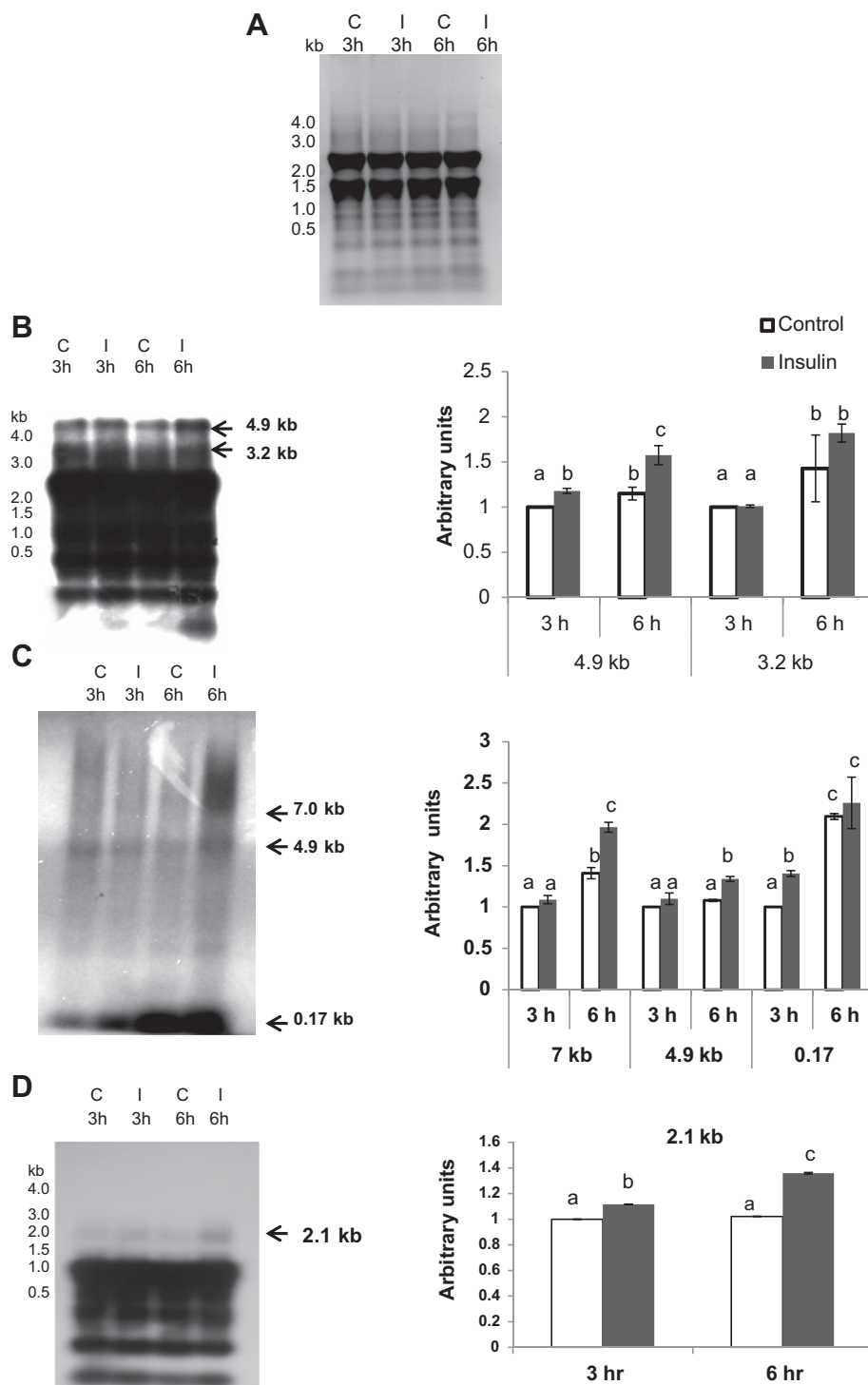


Fig. 2. Accumulation of the precursors of mature 25S and 18S rRNAs during early germination of maize seeds with or without insulin. A. Total RNA resolved by electrophoresis in 1.5% (w/v) agarose gels and stained with ethidium bromide. B. Fluorography of the 25S rRNA precursors (arrows indicate molecular weight of 4.9 and 3.2 kb rRNA precursors). C. Fluorography of the 5.8S and 25S rRNA precursors (with a probe that includes ITS1, 5.8S and ITS2, arrows indicate molecular weights of 7, 4.9 kb rRNA precursors and 0.17 kb (corresponding to the 5.8S rRNA). D. Fluorography of the 18S rRNA precursor (arrow indicate the 20S rRNA precursor of 2.1 kb). Densitometric analysis of rRNA precursor bands intensity is presented on the right side of figure (mean values \pm SD); results are expressed as the times fold increase compared to the values of the 3 h control, to which the value of 1 was assigned. The experiment was reproduced independently at least three times with similar results. Different letters indicate significant differences between treatments ($p \leq 0.05$).

effector in the same manner. In the fluorography of the gel loaded with the same amount of proteins (Fig. 5B), only some of the bands corresponding to *de novo* synthesized RPs (indicated with arrows) showed a stimulation by insulin (Fig. 5C).

In order to verify the insulin effect on the regulation of ribosomal proteins synthesis observed in Fig. 5C, Western blot analysis was performed to determine insulin effect on RPS6, RPL7 and RPL3 *de novo* synthesis. RPS6 and RPL7 levels increased 300% and 70%,

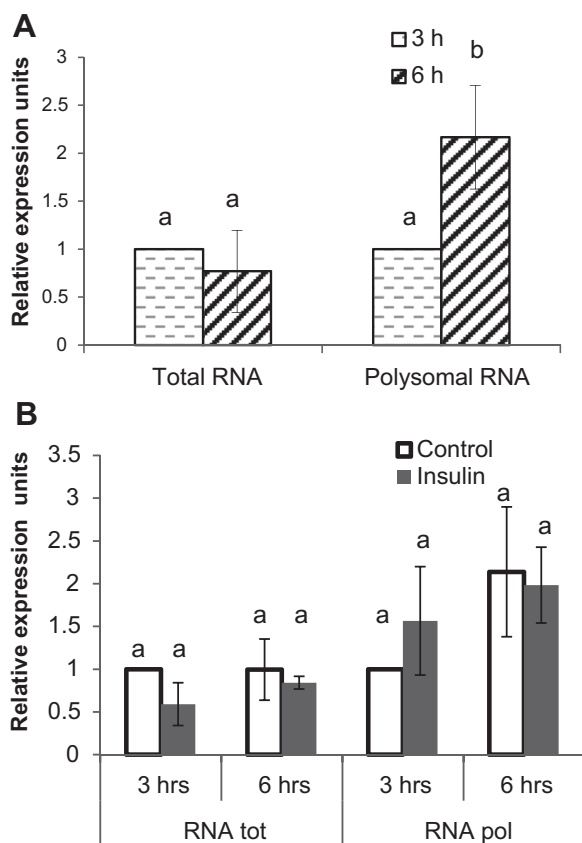


Fig. 3. Nucleolin transcript levels determined by qRT-PCR. A. Nucleolin transcript levels in total RNA and in RNA from the polysomal fraction during maize germination. Results are normalized with the reference gene and expressed as the times fold increase in the transcription levels with respect to the values obtained at 3 h of imbibition to which the value of 1 was assigned. B. Effect of insulin on nucleolin transcript levels on total RNA and RNA from the polysomal fraction. Results are normalized with the reference gene and expressed as the times fold increase in the transcription levels with respect to the values of the 3 h control to which the value of 1 was assigned. The experiment was reproduced independently at least three times with similar results. Mean values \pm SD are presented. Different letters indicate significant differences between treatments ($p \leq 0.05$).

respectively, in presence of the effector. In contrast, RPL3 levels were not affected by insulin (Fig. 6).

4. Discussion

The presence of a peptidic insulin-like factor named ZmIGF in maize seeds and seedling has been recently demonstrated [24]. Also, it has been reported that both insulin and ZmIGF accelerate germination and induce growth in maize seedlings [23,28,31]. In animals, the synthesis of new ribosomes is a requirement for cell growth and division [1]; therefore, in the present work we decided to use insulin as an effector to study the regulation of ribosome synthesis in maize seeds during germination. Insulin induced the accumulation of newly synthesized mature rRNA (50%) at 24 h of germination. This indicates that insulin promotes either transcription of rDNA or the renewal of ribosomal particles involved in translation (Fig. 1).

Cells in maize desiccated seeds during maturation are arrested in the transition G1/S and when seeds are imbibed the cell cycle is reactivated [57]. Also, our research group has previously shown that insulin stimulates the aforementioned transition and reactivates the cell cycle after 15 h of imbibition in presence of this

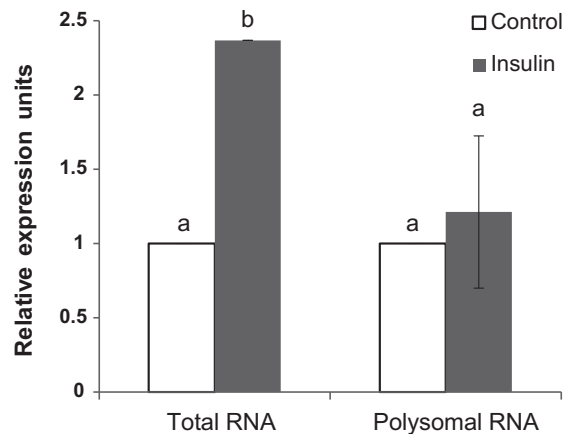


Fig. 4. RPL3 transcript levels determined by qRT-PCR at 24 h of germination in total RNA and in RNA from the polysomal fraction with or without insulin. Results are normalized with the reference gene and expressed as the times fold increase in the transcription levels with respect to the values of the control to which the value of 1 was assigned. The experiment was reproduced independently at least three times with similar results. Mean values \pm SD are presented. Different letters indicate significant differences between treatments ($p \leq 0.05$).

effector [56]; therefore, we decided to look for the presence of the rRNA precursors in maize seeds imbibed in presence of insulin for periods shorter than 15 h (3 and 6 h) by using labeled probes against the mature rRNA and against the pre-rRNA (including ITS1, 5.8S and ITS2) according to the methodology described by Cevallos et al. [58]. Results show that insulin induces rRNA precursors as well as 5.8 rRNA accumulation in maize seeds imbibed for 3 and 6 h (Fig. 2). However, these precursors are not detectable in longer periods of imbibition (24 h of imbibition). These results are in agreement with those reported for radish seeds in which rDNA transcription is reactivated in the first hours of imbibition when the incorporation of radioactive label was detected in high weight rRNA molecules (higher than the mature rRNA molecular weights, possibly corresponding to the rRNA precursors), while later in the germination the labeling was not found in the possible precursors, but only in the mature rRNA [17].

A partial sequence of maize rDNA is presented in the Supplementary Fig. 1 For obtaining the rDNA sequence, both ITS1 and 2 and 18S rRNA and 25S rRNA sequences were introduced in the Ensembl software for human genome and the obtained sequence was compared to the maize genome; a maize rDNA sequence of 4552 bases located in chromosome 6 was retrieved. This sequence contained mature 18S rRNA, 25S rRNA and 5.8 rRNA as well as ITS1 and 2 sequences and also an extra 48 bases sequence that has not been reported between the 18S rRNA and the ITS1. This sequence was aligned with 45S rDNA sequences from human and mouse using the ClustalW software (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) finding a homology of 80% and 75%, respectively. Regions with the highest homology among the compared sequences were 18S, 5.8S and 25S rRNA. In contrast, regions presenting the lowest homology were found in the ITS1 and 2. These results are in agreement with reports in the literature indicating that 5' and 3' ETS as well as ITS1 and 2 are the regions with the highest variability [9]. It is important to mention that in Fig. 2C where an RNA fragment containing ITS1, 5.8S and ITS2 was used as probe, a smear above the 7 kb band, more clearly observed in the sample treated with insulin at 6 h of imbibition, was detected. This smear could correspond to not yet characterized higher molecular weight rRNA precursors and to the primary rDNA transcript. In this regard, it has been reported that there are specific precursors for some organisms, for example for human and mouse [59].

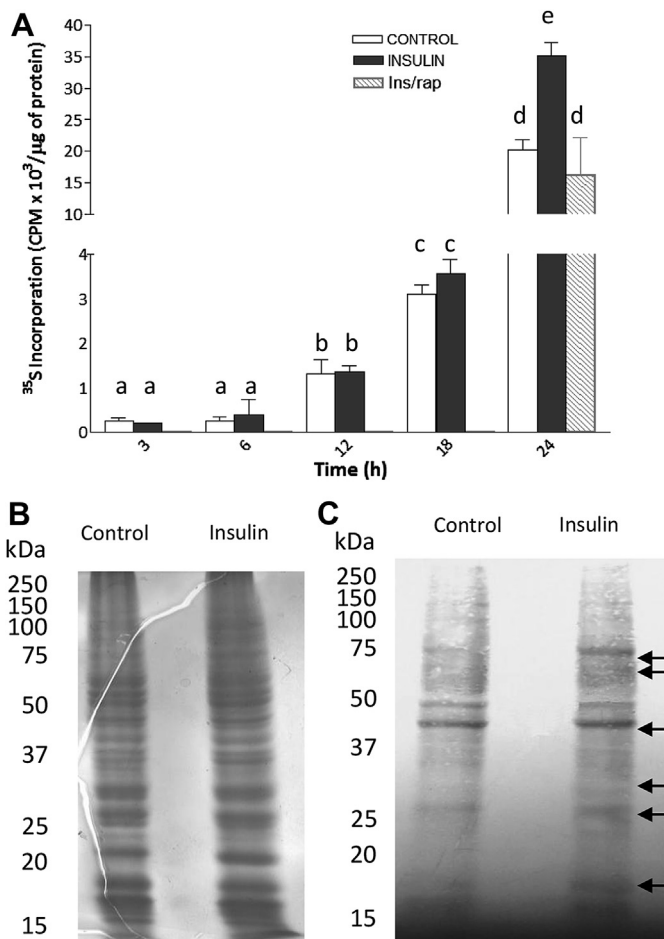


Fig. 5. Insulin effect on the *de novo* ribosomal proteins synthesis. A. [³⁵S]-methionine incorporation in RPs in maize seeds during germination (3, 6, 12, 18 and 24 h of imbibition). At 24 h an extra treatment with insulin and rapamycin was added. The presented values are the mean of three independent experiments and the vertical lines represent the standard deviation. Different letters indicate significant differences among treatments ($p \leq 0.05$). B. RP resolved by SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. C. Fluorography of the *de novo* synthesized ribosomal proteins at 24 h of imbibition. Arrows indicate the RPs which *de novo* synthesis is stimulated by insulin.

In the present work, it was found that nucleolin transcripts are among the mRNA stored in maize seed. The transcript levels of this gene in total RNA did not change during germination; however, there is an increase (of approximately twofold) in the transcript recruitment into the polysomal fraction after 6 h compared to 3 h of imbibition (Fig. 3A). The nucleolin message mobilization to the polysomal fraction after 6 h of imbibition is similar to the mobilization kinetics observed for some RPs messages in germinating maize seeds (E. Sánchez de Jiménez, unpublished results) suggesting that both the nucleolin and the RPs messages are subject to a common regulation mechanism which guarantees the availability of all the components needed for ribosome biogenesis.

Regarding the insulin effect, there were not significant changes in the levels of nucleolin transcripts neither in the total RNA nor in the polysomal fraction (Fig. 3B). These results indicate that the effect of insulin in the pre-rRNA processing is not mediated by enhancement of nucleolin expression. It is still open the possibility that insulin regulates the activation of nucleolin by phosphorylation as reported previously in preadipocyte cells [60].

Ribosome biogenesis is a highly coordinated process that requires not only the rDNA transcription and the pre-rRNA processing, but also the *de novo* synthesis of ribosomal proteins of the two

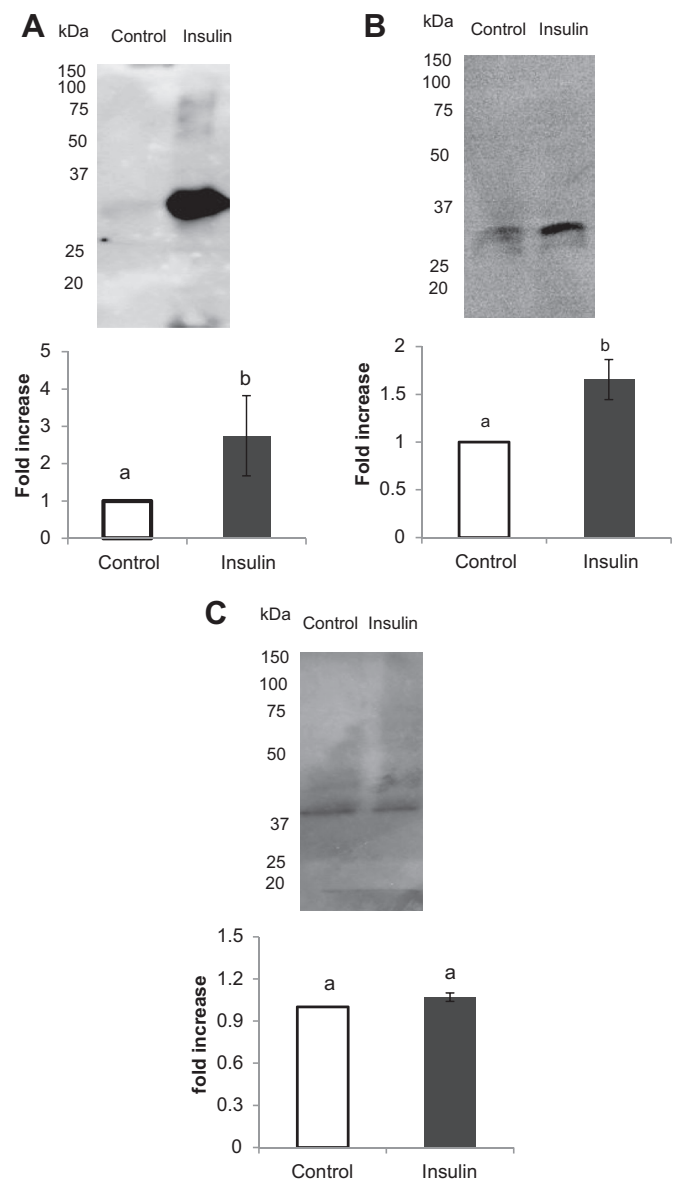


Fig. 6. Western blot analysis of the insulin effect on *de novo* protein synthesis of (A) RPS6, (B) RPL7 and (C) RPL3 at 24 h of imbibition. Densitometric analysis of protein bands intensity is presented (mean values \pm SD), results are expressed as the times fold increase compared to the values of the control, to which the value of 1 was assigned. The experiment was reproduced independently at least three times with similar results. Different letters indicate significant differences between treatments ($p \leq 0.05$).

subunits [4]. Therefore, the insulin effect on the *de novo* synthesis of ribosomal proteins was studied during germination. The results show a significant increase on the *de novo* synthesis of RPs from 12 h onward, reaching 600% induction at 24 h of imbibition. On another hand, insulin stimulates by approximately 75% the [³⁵S]-methionine incorporation on RPs in maize embryonic axes at 24 h of germination with respect to the control (Fig. 5A).

Rapamycin, a TOR-kinase inhibitor, reverted the inductor effect of insulin on RPs *de novo* synthesis, supporting the participation of the TOR signaling pathway in ribosome biogenesis induced by insulin in germinating maize seeds. In this regard, it has been shown that TOR-kinase binds to the rDNA promoter regulating the 45S rRNA transcription in Arabidopsis and animal cells [18,61]. Also, our group has shown that insulin and ZmIGF signal transduction takes

place by the TOR pathway and that maize TOR-kinase contains the rapamycin binding site and its inhibited by this compound [27,28].

As shown in Fig. 5C, not all the RPs are stimulated in the same way. These results are in agreement with previous results showing that insulin and ZmIGF stimulate the synthesis of ribosomal proteins in maize [24,28], although this induction is not equal for all the RPs [31]. In the present work, it was shown that while insulin induced RPS6 and RPL7 *de novo* synthesis, it did not have an effect on RPL3 synthesis (Fig. 6). In agreement with these results, it was observed that although insulin stimulated RPL3 gene (a ribosomal protein with dual function) transcription, it did not affect the recruitment of this message to the polysomal fraction (Fig. 4). These results are in agreement with the results shown in the western blot with RPL3 antibody where the RPL3 synthesis was not affected by insulin (Fig. 6C).

In this regard, there are reports showing that insulin/IGFs do not induce the acidic RPs *de novo* synthesis in embryonic axes after 24 h of imbibition, but regulate their phosphorylation [34]. On another hand, in microarrays studies, it was shown that insulin stimulates the recruitment of some RPs messages to the polysomes while inhibits it for others [31].

5. Conclusion

In conclusion, the results of this work show that insulin stimulates the ribosome synthesis during germinating maize seeds. rDNA transcription and mature rRNA precursors processing are among the first events that are reactivated during early imbibition. In later stages of imbibition (24 h), insulin stimulates the *de novo* synthesis of some RPs. These results suggest that the ribosome biogenesis during the first hours of imbibition is carried out with newly synthesized rRNA and ribosomal proteins translated from stored mRNAs. On the other hand, it was shown that the nucleolin transcript is mobilized to the polysomal fraction after 6 h of imbibition which suggests that this protein is actively translated supporting its participation in the processing of the rRNA precursors.

Acknowledgments

This research was supported by UAM, CONACyT (61424), PROMEP (34775) and partially by DGAPA-212910. We also thank CONACyT (176202) and ICyT (BI-080529224744) for their financial support to Villa-Hernández for her PhD studies (185590 PNP Experimental Biology Program). This work is part of JMVH PhD dissertation. We also thank Dr. J. Sáez Vázquez and Dr. R. Hernández for their technical assistance and Dr. M. Ponce Valadez for her critical reading of the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2013.06.011>.

References

- [1] R. Baserga, Is cell size important? *Cell Cycle* 7 (2007) 814–816.
- [2] J. Urban, A. Souillard, A. Huber, S. Lippman, D. Mukhopadhyay, O. Deloche, V. Wanke, D. Anrather, G. Ammerer, H. Riezman, J.R. Broach, C. De Virgilio, M.N. Hall, R. Loewith, Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell* 26 (2007) 663–674.
- [3] H. Lempiäinen, D. Shore, Growth control and ribosome biogenesis, *Curr. Opin. Cell Biol.* 21 (2009) 855–863.
- [4] H. Tschochner, E. Hurt, Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm, *Trends Cell Biol.* 13 (2003) 255–263.
- [5] D.C. Fingar, J. Blenis, Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression, *Oncogene* 23 (2004) 3151–3171.
- [6] J. Avruch, Y. Lin, X. Long, S. Murthy, S. Ortiz-Vega, Recent advances in the regulation of the TOR pathway by insulin and nutrients, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 8 (2005) 67–72.
- [7] L. Xiao, A. Grove, Coordination of ribosomal protein and ribosomal RNA gene expression in response to TOR signaling, *Curr. Genomics* 10 (2009) 198–205.
- [8] H. Sun, X. Tu, R. Baserga, A mechanism for cell size regulation by the insulin and insulin-like growth factor-1 receptors, *Cancer Res.* 66 (2006) 11106–11109.
- [9] E. Layat, J. Sáez-Vázquez, S. Tourmente, Regulation of pol-I transcribed 45S rDNA and pol III-transcribed 5S rDNA in Arabidopsis, *Plant Cell Physiol.* 53 (2012) 267–276.
- [10] C. Mayer, I. Grummt, Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases, *Oncogene* 25 (2006) 6384–6391.
- [11] D.A. Antonetti, S.R. Kimball, R.L. Horetsky, L.S. Jefferson, Regulation of rDNA transcription by insulin in primary cultures of rat hepatocytes, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 25277–25284.
- [12] K.M. Hannan, L.I. Rothblum, L.S. Jefferson, Regulation of ribosomal DNA transcription by insulin, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 275 (1998) C130–C138.
- [13] A. Wu, X. Tu, M. Prisco, R. Baserga, Regulation of upstream binding factor 1 activity by insulin-like growth factor 1 receptor signaling, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 2863–2872.
- [14] M.L. Hammond, L.H. Bowman, Insulin stimulates the translation of ribosomal proteins and the transcription of rDNA in mouse myoblast, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 17785–17791.
- [15] C.G. Proud, Regulation of protein synthesis by insulin, *Biochem. Soc. Trans.* 34 (2006) 213–216.
- [16] V. Iadevaia, Z. Zhang, E. Jan, C.G. Proud, mTOR signaling regulates the processing of pre-rRNA in human cells, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) 2527–2539.
- [17] L. Aspart, R. Cooke, N. Michaux-Ferrière, M. Delseny, Ribosomal RNA synthesis in imbibing radish (*Raphanus sativus*) embryo axes, A biochemical and cytological study, *Planta* 148 (1980) 17–23.
- [18] M. Ren, S. Qiu, P. Venglat, D. Xiang, L. Feng, G. Selvaraj, R. Datla, Target of rapamycin regulates development and ribosomal RNA expression through kinase domain in Arabidopsis^{11WJ10A}, *Plant Physiol.* 155 (2011) 1367–1382.
- [19] S.C. Popescu, N.E. Tumer, Silencing of ribosomal protein L3 genes in *N. tabacum* reveals coordinate expression and significant alterations in plant growth, development and ribosome biogenesis, *Plant J.* 39 (2004) 29–44.
- [20] E. Beltrán-Peña, A. Ortíz-López, E. Sánchez de Jiménez, Synthesis of ribosomal proteins from stored mRNAs early in seed germination, *Plant Mol. Biol.* 28 (1995) 327–336.
- [21] E. Collier, A. Watkinson, C.F. Cleland, J. Roth, Partial purification and characterization of an insulin-like material from spinach and *Lemna gibba* G3, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 6238–6247.
- [22] A.E.A. Oliveira, O.L.T. Machado, V.M. Gomes, J. Xavier-Neto, A.C. Pereira, J.G.H. Vieira, K.V.S. Fernandes, J. Xavier-Filho, Jack bean seed coat contains a protein with complete sequence homology to bovine insulin, *Protein Pept. Lett.* 6 (1999) 15–21.
- [23] C. García-Flores, R. Aguilar, H. Reyes de la Cruz, M. Albores, E. Sánchez de Jiménez, A maize insulin-like growth factor signals to a transduction pathway that regulates protein synthesis in maize, *Biochem. J.* 358 (2001) 95–100.
- [24] C.D. Rodríguez-López, A. Rodríguez-Romero, R. Aguilar, E. Sánchez de Jiménez, Biochemical characterization of a new maize (*Zea mays* L.) peptide growth factor, *Protein Pept. Lett.* 18 (2011) 84–91.
- [25] D.B.P. Goodman, W.L. Davis, Insulin accelerates the post-germinative development of several fat-storing seeds, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190 (1993) 440–446.
- [26] A. Oliveira, E. Ribeiro, M. da Cunha, V. Gomes, K. Fernández, J. Xavier-Filho, Insulin accelerates seedling growth of *Canavalia ensiformis* (Jack bean), *Plant Growth Regul.* 43 (2004) 57–62.
- [27] L.T. Agredano-Moreno, H. Reyes de la Cruz, L.P. Martínez-Castilla, E. Sánchez de Jiménez, Distinctive expression and functional regulation of the maize (*Zea mays* L.) TOR kinase ortholog, *Mol. Biosyst.* 3 (2007) 794–802.
- [28] T. Dinkova-Dimitrova, H. Reyes de la Cruz, C. García-Flores, R. Aguilar-Caballero, L.F. Jiménez-García, E. Sánchez de Jiménez, Dissecting the TOR-S6K signal transduction pathway in maize seedlings: relevance on cell growth regulation, *Physiol. Plant* 130 (2007) 1–10.
- [29] R. Sotelo, V. Garrocho-Villegas, R. Aguilar, M.E. Calderón, E. Sánchez de Jiménez, Coordination of cell growth and cell division in maize (*Zea mays*). Relevance of the conserved TOR signal transduction pathway, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 46 (2010) 578–586.
- [30] V. Garrocho-Villegas, E. Sánchez de Jiménez, TOR pathway activation in *Zea mays* L. tissues. Conserved function between animal and plant kingdoms, *Plant Signal Behav.* 7 (2012) 675–677.
- [31] S. Jimenez-López, E. Mancera-Martínez, A. Donayre-Torres, C. Rangel, L. Uribe, S. March, G. Jimenez-Sánchez, E. Sánchez de Jiménez, Expression profile of maize (*Zea mays* L.) embryonic axes during germination: translational regulation of ribosomal protein mRNAs, *Plant Cell Physiol.* 52 (2011) 1719–1733.
- [32] E. Sánchez de Jiménez, R. Aguilar, T. Dinkova, S6 ribosomal protein phosphorylation and translation of stored mRNA in maize, *Biochimie* 79 (1997) 187–194.
- [33] A.J. Williams, J. Werner-Fraces, Ing-Feng Chang, J. Bailey-Serres, Regulated phosphorylation of 40S ribosomal protein S6 in root tips of maize, *Plant Physiol.* 132 (2003) 2086–2097.
- [34] L. Montoya-García, V. Muñoz-Ocotero, R. Aguilar, E. Sánchez de Jiménez, Regulation of acidic ribosomal protein expression and phosphorylation in maize, *Biochemistry* 41 (2002) 10166–10172.

- [35] G. Jannot, S. Bajan, N. Giguere, S. Bouasker, I.B. Banville, S. Piquet, G. Hutvagner, M. Simard, The ribosomal protein RACK1 is required for microRNA function in both *C. elegans* and humans, *EMBO Rep.* 12 (2011) 581–586.
- [36] S. Xue, M. Barna, Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13 (2012) 355–369.
- [37] E. Harscoët, B. Dubreucq, J.C. Palauqui, L. Lepiniec, *NOF1* encodes an Arabidopsis protein involved in the control of rRNA expression, *PLoS One* 5 (2010) 1–12.
- [38] E. Gendra, A. Moreno, M. Mar Albá, M. Pagés, Interaction of the plant glycine-rich RNA-binding protein MAR16 with a novel nucleolar DEAD box RNA helicase protein from *Zea mays*, *Plant J.* 38 (2004) 875–886.
- [39] M.A. Freire, M. Pagés, Functional characteristics of the maize RNA-binding protein MA16, *Plant Mol. Biol.* 29 (1995) 797–807.
- [40] J. Sáez-Vásquez, D. Caparros-Ruiz, F. Barneche, M.A. Echeverría, Plant snoRNP complex containing snoRNAs, fibrillarin, and nucleolin-like proteins is competent for both rRNA gene binding and pre-rRNA processing in vitro, *Mol. Cell Biol.* 24 (2004) 7284–7297.
- [41] F. Mongelard, P. Bouvet, Nucleolin: a multiFACeTed protein, *Trends Cell Biol.* 17 (2007) 80–86.
- [42] M.M. Tajrishi, R. Tuteja, N. Tuteja, Nucleolin: the most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus, *Commun. Integr. Biol.* 4 (2011) 267–275.
- [43] B. Buentello-Volante, F. Díaz de León Sánchez, F. Rivera-Cabrera, R. Aguilar Caballero, M. Ponce-Valadez, E. Sánchez de Jiménez, L.J. Pérez-Flores, Apparent cross-talk of two signaling pathways that regulate *Zea mays* coleoptile growth, *Phyton* 79 (2010) 101–108.
- [44] H. Reyes de la Cruz, R. Aguilar, E. Sánchez de Jiménez, Functional characterization of a maize ribosomal S6 protein kinase (Zm S6K), a plant ortholog of metazoan p70(S6K), *Biochemistry* 43 (2004) 533–539.
- [45] J. Sambrook, E.F. Fritscher, T. Manjatis, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, second ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1989.
- [46] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [47] S.A. Bustin, V. Benes, J.A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M.W. Pfaffl, G.L. Shipley, J. Vandesompele, C.T. Wittwer, The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments, *Clin. Chem.* 55 (2009) 611–622.
- [48] G. López-Frías, L.M. Martínez, G. Ponce, G.I. Cassab, J. Nieto-Sotelo, Role of HSP101 in the stimulation of nodal root development from the coleoptilar node by light and temperature in maize (*Zea mays* L.) seedlings, *J. Exp. Bot.* 62 (2011) 4661–4673.
- [49] E. Willems, L. Leyns, J. Vandesompele, Standardization of real-time PCR gene expression data from independent biological replicates, *Anal. Biochem.* 379 (2008) 127–129.
- [50] D.K. Didier, H.J. Klee, Identification of an Arabidopsis DNA-binding protein with homology to nucleolin, *Plant Mol. Biol.* 18 (1992) 977–979.
- [51] F. Pontvianne, I. Matía, J. Douet, S. Tourmente, F.J. Medina, M. Echeverría, J. Sáez-Vásquez, Characterization of *AtNUC-L1* reveals a central role of nucleolin in nucleolus organization and silencing of *AtNUC-L2* gene in Arabidopsis, *Mol. Biol. Cell* 18 (2007) 369–379.
- [52] L. Bögge, C. Jonak, M. Mink, I. Meskiene, J. Traas, D.T. Ha, I. Swoboda, C. Plank, E. Wagner, E. Herberle-Bors, H. Hirt, Developmental and cell cycle regulation of alfalfa nucM1, a plant homolog of the yeast Nsr1 and mammalian nucleolin, *Plant Cell* 8 (1996) 417–428.
- [53] G. de Carcer, A. Cerdido, F.J. Medina, Nop 64, a novel nucleolar phosphoprotein from proliferating onion cells, sharing immunological determinants with mammalian nucleolin, *Planta* 201 (1997) 487–495.
- [54] C.G. Tong, S. Reichler, S. Blumenthal, J. Balk, H.L. Hsieh, S.J. Roux, Light regulation of the abundance of mRNA encoding a nucleolin-like protein localized in the nucleoli of pea nuclei, *Plant Physiol.* 114 (1997) 643–652.
- [55] N.N. Alexandrov, V.V. Brover, S. Freidin, M.E. Troukhan, T.V. Tatarinova, H. Zhang, T.J. Swaller, Y.P. Lu, J. Bouck, R.B. Flavell, K.A. Feldmann, Insights into corn genes derived from large-scale cDNA sequencing, *Plant Mol. Biol.* 69 (2009) 179–194.
- [56] A.X. Ávila-Alejandre, F. Espejel, E. Paz-Lemus, E. Córtes-Barberena, F. Díaz de León, T.D. Dinkova, E. Sánchez de Jiménez, L.J. Pérez-Flores, Insulin effect in the cell cycle of germinating maize seeds (*Zea mays* L.), *Seed Sci. Res.* 23 (2013) 3–14.
- [57] J.M. Vázquez-Ramos, M.P. Sánchez, The cell cycle and seed germination, *Seed Sci. Res.* 13 (2003) 113–130.
- [58] A.M. Cevallos, M. Perez-escobar, N. Espinoza, J. Herrera, I. López-Villaseñor, R. Hernández, The stabilization of housekeeping transcripts in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes evidences a global regulation of RNA decay during stationary phase, *FEMS Microbiol. Lett.* 246 (2005) 259–264.
- [59] S.T. Mullineux, D.L.J. Lafontaine, Mapping the cleavage sites on mammalian pre-rRNAs: where do we stand? *Biochimie* 94 (2012) 1521–1532.
- [60] P. Csermely, T. Schnaider, B. Cheatham, M.O.J. Olson, C.R. Kahn, Insulin induces the phosphorylation of nucleolin. A possible mechanism of insulin-induced RNA efflux from nuclei, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 9747–9752.
- [61] H.K. Tsang, H. Liu, X.F. Steven Zheng, mTOR binds to the promoters of RNA polymerase I- and III-transcribed genes, *Cell Cycle* 5 (2010) 953–957.