



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD.

Doctorado en Biología Experimental.

“Efecto de la insulina en la regulación de la expresión génica y del ciclo celular en semillas
de maíz en germinación.”

T E S I S

para obtener el grado de Doctor en Biología Experimental

presenta:

B. E. Alma Xochil Avila Alejandro.

Cómite Tutorial

Directora: Dra. Laura J. Pérez Flores

Asesora: Dra. Estela Sánchez de Jiménez.

Asesora: Dra Tzvetanka Dimitrova Dinkova

México . D. F.

CÓMITE TUTORAL

DIRECTORA

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.

fdls@xanum.uam.mx

ASESORES

Dra. Estela Sánchez Quintanar

Profesor Titular "C" T. C. Lab 103.

Edif. E. Facultad de Química,

Depto. de Bioquímica, UNAM.

estelaservidor@unam.mx

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

Investigador asociado "C" T.C.

Lab 103. Edif. E. Facultad de Química.

Depto. de Bioquímica, UNAM.

cesyservidor@unam.mx

MIEMBROS DEL JURADO.

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 presente tesis titulada: "Efecto de la insulina en la regulación de la expresión génica y del ciclo celular en semillas de maíz en germinación."

Con fecha de examen 14 de Octubre de 2011

Dra. Estela Sánchez Quintanar _____

Profesor Titular "C" T. C. Lab 103.

Depto. de Bioquímica, UNAM.

estelaservidor@unam.mx

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova _____

Investigador asociado "C" T.C.

Depto. de Bioquímica, UNAM.

cesyservidor@unam.mx

Dra. Edith Corts Barberena _____

Profesor Titular "C" T. C.

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

cobe@xanum.uam.mx.

Dr. Fernando Díaz de León Sánchez _____

Profesor Titular "C" T. C.

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

fdls@xanum.uam.mx

AGRADECIMIENTOS

Agradezco:

A la Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. El posgrado se encuentra dentro del Padrón de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, con número de registro 309-0 y en el Padrón de Programas del PIFOP-CONACyT clave C/PFPN-2002-35-32.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca número 185590 otorgada para la realización de este trabajo.

El financiamiento de SEP-PROMEP Red de Cuerpos Académicos UAM-I-CA-26

Al laboratorio de Fisiología, Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, del Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud en la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa donde se realizó el presente trabajo.

TABLA DE CONTENIDOS.

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
1. INTRODUCCIÓN	9
2. ANTECEDENTES	10
2.1 Crecimiento.....	10
2.2 El Ciclo celular en plantas. Generalidades.....	11
2.3 Regulación del ciclo celular: los puntos de restricción (checkpoints)	16
2.4 La transición G1-S.....	17
2.4.1 Las ciclinas D y las cinasas dependientes de ciclinas (CDK's)	19
2.4.2 La proteína del retinoblastoma (pRB)	20
2.4.3 La familia de factores de transcripción E2F.....	21
2.5 Germinación de semillas y crecimiento de las plántulas	22
2.6 Regulación del crecimiento en plantas por insulina y los factores semejantes a insulina IGF's.....	24
2.7 Mecanismo de acción de la insulina/IGFs.....	26
2.8 Efecto de la insulina y los IGF's en la germinación y el crecimiento en maíz.....	29
3. JUSTIFICACIÓN	33
4. HIPÓTESIS	35
5. OBJETIVO GENERAL	35
5.1 Objetivos particulares	35
6. MATERIALES Y MÉTODOS	36
6.1 Material biológico y tratamientos	36
6.2 Efecto de un pulso de insulina en el crecimiento de ejes embrionarios en germinación.....	36
6.3 Determinación de la S6K-Tre 389	37
6.3.1 Obtención de proteínas.....	37
6.3.2 Western blot para S6K Treonina 389.....	37
6.4 Contenido de DNA por Citometría de Flujo	38
6.5 Aislamiento de ARN total	39
6.6 Aislamiento de ARN de la fracción polisomal.....	39
6.7 Análisis de la regulación de la expresión génica	40
6.7.1 PCR semicuantitativo.....	40
6.7.2 RT-qPCR	41

6.8 Análisis estadístico.....	42
7. RESULTADOS.....	43
7.1 Efecto de la insulina en el crecimiento de la radícula y el coleóptilo de ejes embrionarios de maíz en germinación.....	43
7.2 Efecto de un pulso de insulina en la fosforilación de S6K y el reclutamiento en polisomas de prS6 en las radículas y coleóptilos de ejes embrionarios de maíz en germinación.....	44
7.3 Análisis del ciclo celular en radículas de ejes embrionarios y su estimulación por insulina durante la germinación.....	48
7.4 Efecto de la insulina sobre los niveles de transcritos de proteínas que participan en la transición G1-S del ciclo celular.....	52
7.5 Estandarización de la RT- qPCR.....	52
7.6 Expresión de E2F y PCNA.....	55
8. DISCUSIÓN.....	58
9. CONCLUSIONES	62
10. PERSPECTIVAS	62
11.REFERENCIAS.....	63
ANEXO 1.....	69

RESUMEN

Durante la germinación de las semillas, se reactiva el metabolismo, se repara el DNA y se reinicia la división celular en los meristemos. Los mecanismos que coordinan el crecimiento y la división celular en los ejes embrionarios de maíz en germinación no se comprenden completamente. Sin embargo, se ha reportado la presencia de un factor semejante a la insulina ZmIGF que acelera la germinación. En el presente trabajo, se estudió la regulación del reinicio del ciclo celular por insulina en ejes embrionarios de maíz en germinación. Nuestros resultados muestran que la insulina estimula diferencialmente el crecimiento, la fosforilación de S6K y la acumulación de los transcritos de prS6 en la fracción polisomal en las radículas y los coleóptilos de ejes embrionarios. Se observó un efecto más temprano y mayor en las radículas comparadas con los coleóptilos, por lo que se estudió el efecto de la insulina en el ciclo celular en el meristemo radicular, mediante citometría de flujo, se encontró que la transición G1-S fue estimulada y que la proliferación fue inducida. Más aún, se determinó mediante qRT-PCR que la insulina incrementó la transcripción de E2F y de PCNA a las 15 horas de germinación. Estos resultados indican que la insulina estimula preferencialmente el crecimiento en las radículas de ejes embrionarios en germinación y sugieren que su efecto en la transición G1-S y en la activación de la proliferación celular es mediado por la inducción de la transcripción de E2F y PCNA.

ABSTRACT.

During seed germination, metabolism is reactivated, DNA is repaired and cell division is restarted in the meristems. The mechanisms that coordinate cell growth and division in maize embryonic axes during germination are not well understood. However, the presence of a factor similar to IGF (insulin-like growth factor) that accelerates germination has been reported. In the present work, regulation of the cell cycle restart by insulin was studied in germinating embryonic axes. Our results showed that insulin differentially stimulates growth, S6K phosphorylation, S6rp transcript accumulation on the polysomal fraction, in the radicles and the coleoptiles of the embryonic axis. A stronger and earlier effect was observed in radicles compared to coleoptiles; therefore, the effect of insulin on the cell cycle of the radicular meristem was studied by flow cytometry, finding that G1-S transition was stimulated and cell proliferation was induced. Furthermore, it was determined by qRT-PCR that insulin increased E2F and PCNA transcription after 15 hours of germination. These results show that insulin preferentially stimulates growth in the radicles of germinating embryonic axes and suggest that its effect in the G1-S transition and in the activation of cell proliferation is mediated by induction of E2F and PCNA transcription.

1 INTRODUCCIÓN.

Una semilla madura es una estructura de dispersión y resistencia para la planta progenitora. En el caso de las semillas ortodoxas, como los cereales, una vez que se ha completado la morfogénesis del embrión, se inicia la maduración de la semilla durante la cual, se llevan a cabo procesos de desecación y acumulación de reservas para sostener el crecimiento del embrión hasta el establecimiento de la plántula. Se ha demostrado que durante esta etapa las células del embrión detienen la división celular, es decir, se arrestan, principalmente en la transición G1-S.

El primer paso para el establecimiento de una planta es la germinación de la semilla. La maquinaria enzimática y molecular necesaria se encuentran en la misma semilla seca. En las primeras horas de imbibición se reactiva el metabolismo, se llevan a cabo diversos procesos de reparación celular (incluyendo DNA y organelos) y se sintetizan *de novo* proteínas a partir de ácidos ribonucleicos mensajeros (RNAm) almacenados durante la maduración. A tiempos posteriores, la síntesis de proteínas se basa en la transcripción de nuevos RNAm y su traducción. La germinación se completa cuando una parte del embrión, usualmente la radícula, se extiende para penetrar las estructuras que la circundan y emerge (protruye) de la semilla.

Diversos estudios parecen indicar que, aunque el proceso de división celular no es necesario para la protrusión de la radícula, el reinicio del ciclo celular es un evento esencial para el desarrollo y establecimiento posterior de la plántula. Por lo que, en los últimos años se han realizado experimentos que analizan los eventos moleculares que le permiten al embrión reiniciar el ciclo celular. Dichos estudios han demostrado que el proceso por el cual las células del embrión llevan a cabo la transición G1-S es muy similar al proceso descrito para otros eucariontes.

Sin embargo, se ha prestado poca atención al hecho de que el embrión de las semillas, no es una estructura uniforme sino que, contiene diferentes partes y meristemos (el meristemo radicular o radícula, el meristemo aéreo o del coleóptilo y los meristemos laterales) cuyo destino celular se encuentra comprometido desde la morfogénesis. Por lo tanto, es interesante estudiar cómo se reactivan estos meristemos y su respuesta a los estímulos hormonales y ambientales durante la germinación.

Por lo anterior, el propósito del presente trabajo fue contribuir al conocimiento de los mecanismos que regulan el reinicio del crecimiento en cada una de las partes que forman al embrión usando como modelo la semilla de maíz (*Zea mays* L) en germinación. Adicionalmente, se estudiaron las respuestas al crecimiento de los embriones de semillas de maíz en respuesta a insulina. En maíz se caracterizó recientemente un homólogo de los factores semejantes a insulina o IGFs (por sus siglas en inglés *insulin like growth factor*) denominado ZmIGF. El ZmIGF ha mostrado tener actividad miogénica en callos de maíz y acelerar la germinación de semillas de maíz, la insulina mostró efectos similares en los mismos tejidos, por lo que se consideró relevante probar sus efectos en la reactivación del ciclo celular durante la germinación.

2. ANTECEDENTES.

2.1 Crecimiento.

En general, se considera que el crecimiento de los organismos incluye dos procesos: la expansión y la proliferación (división) celular. El alargamiento o expansión celular se define sólo como un aumento de la masa celular, generalmente es previo a la división celular. La proliferación celular por su parte, se define como el aumento del número de células. Ambos son componentes del crecimiento y determinan, por ejemplo, el tamaño de un organismo (Baserga, 2007).

Diversos estudios han demostrado que el crecimiento y la división celular son procesos separados pero acoplados. La pregunta acerca de cómo se encuentran acoplados es importante para entender en conjunto como crecen los organismos. Se sabe que el aumento de biomasa es un requerimiento para la división celular. Esta conclusión proviene de estudios donde se ha demostrado que en general, las células deben duplicar su tamaño antes de duplicar su DNA (Baserga, 2007) y que las condiciones que detienen el alargamiento, como la carencia de nutrientes, arrestan el ciclo celular, mientras que mutaciones que bloquean la progresión del ciclo celular no inhiben el aumento de biomasa (Kozma y Thomas, 2002).

Lo anterior plantea la cuestión de cuáles son las vías que regulan ambos procesos y si se encuentran unidas o separadas. En general los estudios realizados en *Drosophila*, levaduras y cultivos celulares, muestran que hay dos vías de transducción de señales que

se encuentran involucradas en la respuesta del crecimiento ante señales externas como los nutrientes o los mitógenos. La vía Ras/MAPcinasa que actúa dirigiendo la expresión del factor de transcripción *myc* y la vía de la fosfatidil inositol 3-OH cinasa (PI3K) que responde entre otros, a los factores de crecimiento como los IGF's (por sus siglas en inglés *insulin-like growth factors*) (Kozma y Thomas, 2002).

A diferencia de los animales las plantas muestran una organogénesis continua, en las que se conservan zonas de crecimiento donde las células mantienen su capacidad de proliferación; los meristemos. Las células más alejadas de los meristemos, muestran expansión y crecimiento celular, estos procesos las llevan a la diferenciación (de Jager y cols., 2005) (Figura 1).

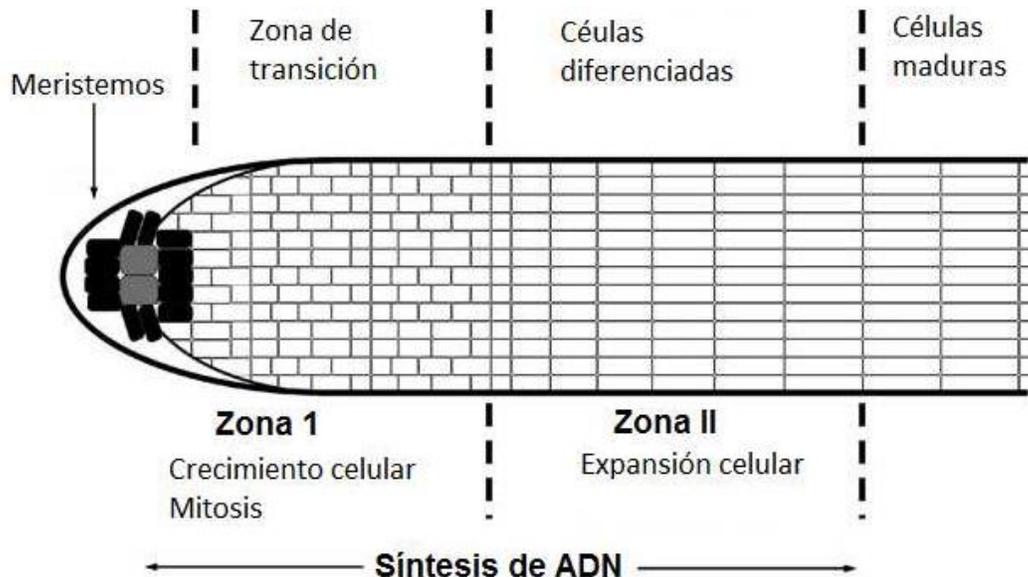


Figura 1. Representación esquemática del meristemo apical de la raíz. Se ilustran las diferentes zonas de crecimiento (Tomado de Doerner, 2007)

2.2 El ciclo celular en plantas. Generalidades.

Para estudiar la división celular en las plantas se han utilizado sus homólogos en animales. Aunque substancialmente la estructura y los elementos que participan en la división celular son muy similares entre animales y plantas, estas últimas tienen algunos rasgos particulares.

En los eucariontes, el ciclo celular es un grupo de eventos que culminan con la duplicación de la célula. Está dividido en cuatro fases: en la fase G1, la célula se prepara para duplicar el DNA y se decide si continua la división o sale del ciclo celular. En presencia de condiciones desfavorables de crecimiento (como la disminución de nutrientes) se extiende el periodo de G1. A este primer punto se le denomina *checkpoint* o punto de restricción G1-S. Cuando el primer punto de restricción es superado se entra a la fase S, donde el DNA se duplica. Este proceso comienza en sitios específicos denominados orígenes de replicación. En estos sitios, se abre la doble hélice, exponiendo el DNA a las enzimas que llevan a cabo la replicación, las cuales se mueven en ambas direcciones desde el origen de replicación. El proceso completo de duplicación incluye la síntesis de proteínas, entre ellas las histonas que participan en el empaquetamiento del DNA en los cromosomas (Inzé y de Veylder, 2006).

En la fase G2 se acumulan moléculas que serán necesarias durante la fase M (mitosis). Aunque se ha considerado como un estado de tránsito entre las fases S y M en esta etapa, se comprueba si ha habido errores durante la replicación del DNA y si se ha producido su duplicación completa. Este punto se denomina *checkpoint* o punto de restricción G2-M. Si estos defectos son detectados la célula no entrará en la fase M y el ciclo celular se detendrá hasta que los daños sean reparados o hasta que el DNA sea completamente copiado. El límite entre las fases G2 y M no está totalmente claro y algunos autores consideran este cambio en la mitad de la profase mitótica G2 un periodo en el que se realizan los preparativos para la división celular propiamente dicha y M, la fase mitótica (Suryadinata y cols., 2010).

La fase M supone la división de una célula en dos células hijas. La fase M se divide en varias etapas: profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis. Las tres primeras están relacionadas con las modificaciones que se producen en el DNA: compactación, formación y movimiento de los cromosomas y descondensación. La citocinesis es el proceso de división del citoplasma en dos partes por estrangulamiento celular, lo que provoca la fusión y fisión de la membrana plasmática, dando como resultado dos células independientes (Suryadinata y cols., 2010).

En las células vegetales la citocinesis es diferente a causa de la presencia de la pared celular; las células hijas se separan, no por la formación de un anillo contráctil, sino por la formación de una nueva pared celular en el interior de la célula que se va a dividir. Esta

pared nace rodeada de membrana y es perpendicular y central al huso mitótico. Su posición determina la localización de las dos células hijas y por lo tanto también la dirección de crecimiento de la planta. La formación de esta nueva pared celular está mediada por lo que se denomina el fragmoplasto, que posee como componentes a los restos de los microtúbulos polares del huso mitótico y a vesículas procedentes del aparato de Golgi. Estas vesículas se transportan hasta esta zona por proteínas motoras y se fusionan entre sí y con la pared en crecimiento (Figura 2).

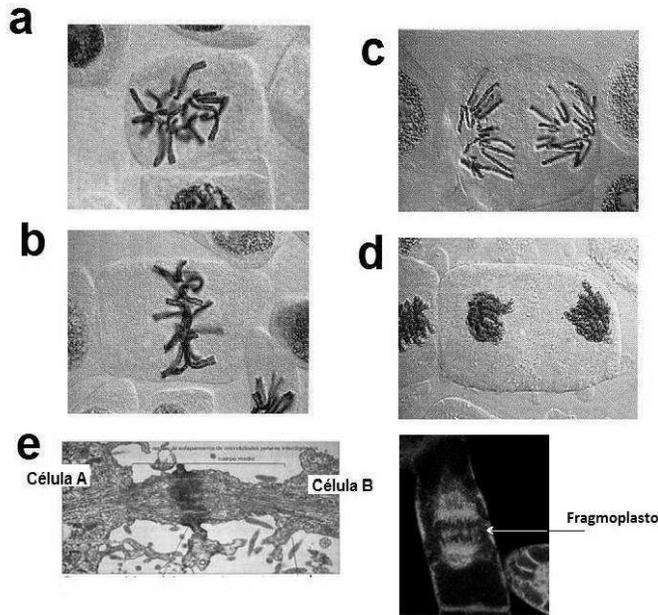


Figura 2. Fases de la mitosis. a) Profase; b) Metafase; c) Anafase; c) Telofase; e) Citocinesis (Tomado de Karp, 1996).

Se sabe también que la progresión a través de las fases del ciclo celular en plantas, al igual que en otros eucariontes, está controlada por la actividad de los complejos de las ciclinas (CYC) con las cinasas dependientes de ciclinas (CDK's) (Dewitte y Murray, 2003). Muchos de los elementos ya descritos en animales se encuentran presentes en las plantas (Tabla 1) (De Jager y cols., 2005).

Las CDK's de plantas son distintas a las reportadas para otros eucariontes, en animales hay 7 CDK's (de CDK1 a CDK7) en plantas se usa un sufijo alfabético de CDKA (homóloga a CDK1 de animales) a CDKE. Las CDKA's, contienen un dominio con la secuencia consenso PSTAIRE, las CDKB's tienen una secuencia consenso PPTTLRE en las secuencias consenso se encuentra el sitio de unión a CYC (de Jager y cols., 2007).

Hay 13 clases de CYC en los animales (A-L y T) y sólo cinco en las plantas: A, B, C, D, H (Francis 2007). Las CYC en plantas son proteínas de baja homología entre sí, aunque muestran una región conservada en el sitio de unión con las CDK's, en este sitio de aproximadamente 100 aminoácidos, se encuentra la caja, que se requiere para la unión a las CDK's hay además una caja de degradación, que es susceptible de ubiquitinación la cual conduce a una destrucción proteolítica rápida en el C-terminal. Las CYC de la fase G1 contienen la secuencia (PEST) rica en prolina, glutamato/aspartato y serina/treonina (Dewitte y Murray, 2003; Inzé y De Veylder, 2006). La unión de las CYC-CDK's requiere de la activación de la CDK mediante la fosforilación de un residuo de treonina (usualmente tre 160) que es llevado a cabo por la proteína CAK (por sus siglas en inglés *CDK-activating kinase*). La fosforilación induce un cambio conformacional que permite la unión de la CYC. (Dewitte y Murray, 2003; Francis, 2007). La inactivación del complejo ocurre por fosforilación inhibitoria en los residuos treonina14 y tirosina 15, que son catalizadas por la cinasa WEE1, que ha sido ya reportada en maíz y *Arabidopsis* o bien por otras proteínas inhibitoras como las KRP (por sus siglas en inglés *Kip-related proteins*), éstas proteínas impiden la interacción ciclina-CDK (Dewitte y Murray, 2003).

Tabla 1. Lista de proteínas clave del ciclo celular y sus homólogos en *Arabidopsis*
(Tomado de De Jager y cols., 2005).

HOMOLOGOS	FASE DEL CICLO CELULAR EN QUE PARTICIPAN	PROTEÍNA EN ARABIDOPSIS
		CYCD1;1 CYCD2;1 CYCD3;1; -3;2; -3;3 CYCD4;1; -4;2 CYCD5;1 CYCD6;1 CYCD7;1
<i>Ciclinas tipo D</i>	<i>Transición G1-S y G2-M</i>	
<i>Ciclinas tipo A</i>	<i>G1-S y Fase S</i>	CYCA1;1; -1;2 CYCA2;1; -2;2; -2;3; -2;4 CYCA3;1; -3;2; -3;3; -3;4
<i>Ciclinas tipo B</i>	<i>Transición G2-M</i>	CYCB1;1; -1;2; -1;3; -1;4 CYCB2;1; -2;2; -2;3; -2;4 CYCB3;1
<i>CDK's</i>	<i>Transición G1-S y Fase G2</i>	CDKA;1
<i>CDK's específicas de plantas</i>	<i>Transición G2-M, mitosis, Fase G2</i>	CDKB1;1; -1;2 CDKB2;1; -2;2
<i>CAK's</i>	---	CYCH;1/CDKD;1; -2; -3; CDKF;1
<i>KRPs</i>	<i>G1/S transición</i>	KRP1; -2; -3; -4; -5; -6; -7
<i>RB's</i>	<i>G1-S</i>	RBR
<i>Familia E2F</i>	<i>Transición G1-S</i>	E2Fa; -b; -c DPa; -b DEL1; -2; -3
<i>WEE1</i>	<i>Transición G2-M</i>	WEE1

Estos complejos actúan como activadores o inhibidores mediante un mecanismo de regulación que involucra la fosforilación de diversos sustratos. La subunidad catalítica de la CDK reconoce un motivo en la proteína blanco (usualmente una serina o treonina seguida de una prolina) y las CYC permiten discriminar entre los diferentes sustratos (Francis, 2007). Entre los mecanismos de regulación del ciclo celular conocidos se incluyen la regulación transcripcional y traduccional de las moléculas que participan en él; incluyendo las mismas CDK's, las ciclinas y los factores involucrados en la síntesis de proteínas (Dewitte y Murray, 2003).

2.3 Regulación del ciclo celular: los puntos de restricción (*checkpoints*).

Como se mencionó previamente, la transición adecuada entre cada una de las fases del ciclo celular es esencial para concluir el proceso de división. Las transiciones se encuentran reguladas por señales ambientales hormonas o factores ambientales como la luz o la disponibilidad de nutrientes (Doerner, 2007). En plantas se sabe que durante el proceso de maduración de la semilla los meristemas apicales y radicales son arrestados en la transición G1-S. En tejidos adultos la limitación de nutrientes como la sacarosa arresta el crecimiento de los meristemas en la misma fase (Inzé y de Veylder, 2006).

El proceso de división celular implica un gasto muy grande para la célula, por lo que, una vez iniciada la duplicación del DNA, la división deberá completarse. Es por esto que en los puntos de restricción o *checkpoints* se llevan a cabo procesos de revisión para determinar la eficiencia del proceso. Hay dos puntos principales de regulación del ciclo celular, el que se encuentra en la transición G1-S, previo a la duplicación del DNA y el de la transición G2-M.

Los estudios han mostrado que la transición G1-S involucra a la vía E2F-PRB, que se encuentra conservada entre los eucariontes, incluyendo plantas y animales. La familia de factores de transcripción E2F y las proteínas RB desempeñan funciones clave en el control del ciclo celular, la diferenciación, el desarrollo y la apoptosis. En particular, se ha estudiado el efecto de los factores E2F sobre proteínas de la maquinaria de duplicación del DNA entre las que se encuentran PCNA, polimerasas etc (Ramírez-Parra y cols., 2003).

2.4 La transición G1-S.

En plantas se ha propuesto un modelo para el control de la transición de G1-S en el cual las ciclinas tipo D son los mediadores primarios (Hochegger y cols., 2008) Como se mencionó previamente uno de los puntos clave en el control del ciclo celular eucariótico es la transición de G1-S (Meijer y Murria, 2000) (Figura 3).

La transcripción de las ciclinas D es activada por señales extracelulares y lleva a la formación de un complejo activo CDKA-CYCD (CDK1-cdc2, en animales) que inactiva por fosforilación a la proteína RBR (por sus siglas en inglés *RB-related protein*) y debilita el bloqueo sobre el dímero E2F-DP permitiendo la transcripción y la traducción de genes involucrados en la fase S (Vázquez-Ramos y Sánchez, 2003; Inzé y De Veylder, 2006).

En *Arabidopsis* se ha demostrado que la activación del ciclo celular dentro de los meristemos de la raíz precede a la protrusión; además se ha observado que en distintos tiempos de germinación el tipo de ciclinas expresadas varía. Las ciclinas CYCD1;1 y la CYCD4;1, se definieron como “tempranas” y al parecer participan en la activación de los meristemos de la raíz. Por otro lado la CYCD3;1 se empieza a expresar durante los eventos post-germinativos (Masubelele y cols., 2005).

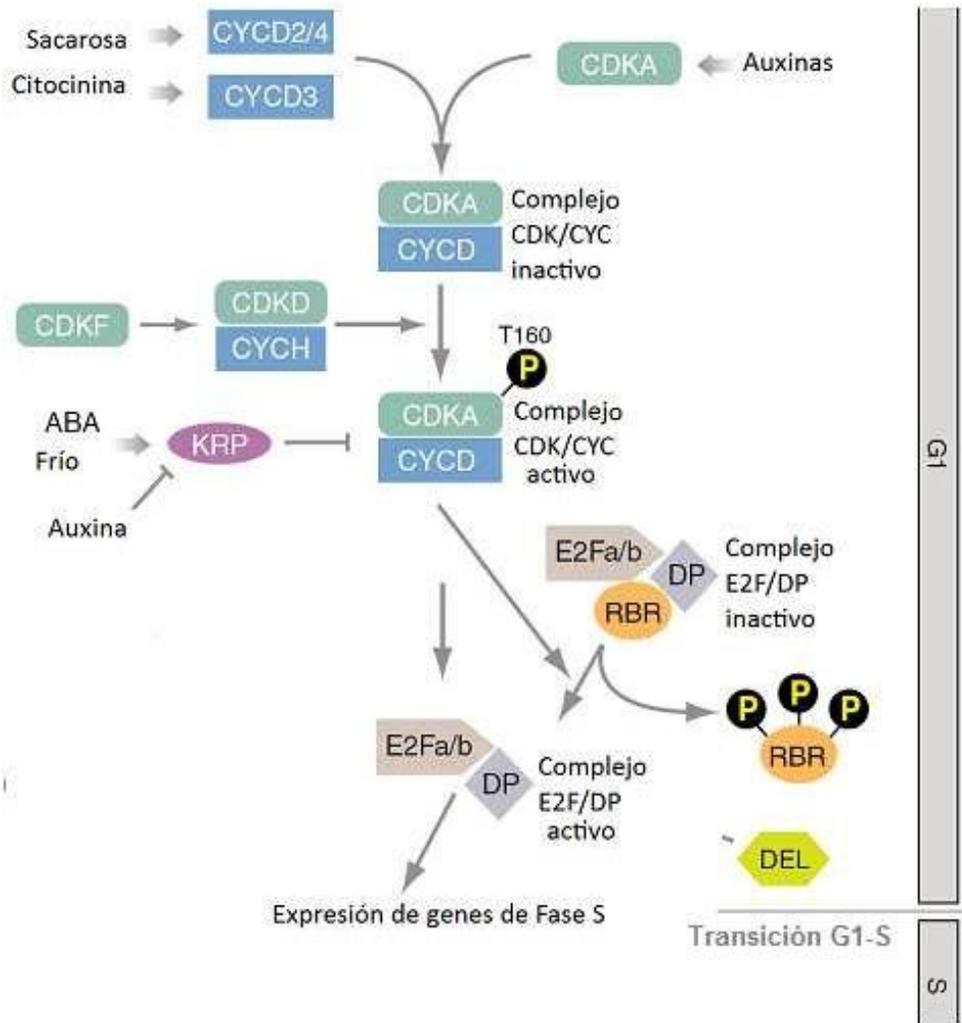


Figura 3. Representación esquemática de la regulación de la transición G1-S en plantas
 (Tomado de Inzé y De Veylder, 2006)

2.4.1. Las ciclinas D y las cinasas dependientes de ciclinas (CDK's).

Las ciclinas D (CYCD) controlan la progresión G1-S y a diferencia de las ciclinas A y B no parecen mostrar una expresión cíclica, su presencia depende de señales extracelulares que estimulan o mantienen la división (Dewitte y Murray, 2003). Se han identificado en una gran variedad de plantas. Las ciclinas D fueron definidas como tales, debido a la presencia de un motivo conservado: LxCxE; el cual es responsable de su interacción con las proteínas RBR y una cierta homología en sus secuencias de aminoácidos con las ciclinas animales (Dewitte y Murray, 2003). En *Arabidopsis* se han descrito 10 tipos de ciclinas y han sido clasificadas en 7 subclases, las CYCD3 tienen tres miembros, las CYCD4, dos, y el resto sólo un miembro. La expresión de las CYCD se ha visto asociada con tejidos en proliferación y se encuentra excluida de tejidos diferenciados aunque recientemente Buendía y colaboradores (2011) mostraron que en maíz hay una gran cantidad de transcritos de CYCD probablemente asociados con procesos de diferenciación. Por otro lado, se sabe que las ciclinas D de la misma clase se expresan diferencialmente en tejidos en división durante el desarrollo. Por ejemplo, la CYCD4;1 se asocia al desarrollo de raíces laterales, embriogénesis y tejidos vasculares (De Veylder y cols., 1999). La CYCD3;1 se acumula en tejidos en proliferación como los meristemos, las hojas jóvenes y los tejidos vasculares (Riou-Khamlichi y cols., 1999; Dewitte y Murray, 2003, Inzé y de Veylder 2006). La CYCD1, se expresa en las inflorescencias (Gaudin y cols., 2000). Se ha demostrado que la expresión de algunas de estas ciclinas, como la CYCD2;1 y la CYCD3;1 responden a señales extracelulares como la disponibilidad de azúcares y hormonas como las auxinas, las citocininas y los brasinosteroides (Buendía y cols, 2011).

Como ya se mencionó, las CDKA y CDKB controlan las transiciones durante el ciclo celular. Sin embargo, la CDKA se asocia con todos los tipos de ciclinas. Sus niveles de transcrito y proteína son constantes a través del ciclo celular (Inzé y De Veylder, 2006). Sin embargo, su actividad se incrementa durante la transición G1-S, continua siendo alta en la fase S, y muestra un pico en G2-M, en células en cultivo de tabaco y *Arabidopsis* (Oakenfull y cols., 2002)

En maíz, hay dos genes prácticamente idénticos que codifican para CDKA han sido clonados, difiriendo sólo en las 3' y 5' UTRs (regiones no traducidas), (Vázquez-Ramos y Sánchez, 2003). Adicionalmente se ha determinado que el inicio de la diferenciación del endospermo se realiza inhibiendo la actividad de CDKA (Coelho y cols., 2005) y se ha

determinado que las hormonas tales como auxinas o benciladenina, estimulan la actividad del complejo CDKA-Ciclina D durante la germinación (Sánchez y col, 2005). Por otra parte se determinó que en maíz, anticuerpos anti-PCNA co-inmunoprecipitan por un lado con una proteína tipo CYCD (ésta asociación termina cuando la presunta CYCD desaparece durante la germinación) y también con una proteína identificada como CDKA durante las primeras 6 h de germinación (Sánchez y cols., 2002). Esta cinasa puede fosforilar eficientemente a la proteína, ZmRBR, *in vitro*. Estos resultados demuestran que las semillas de maíz activan el ciclo celular con un mecanismo similar al descrito en animales y que lo tienen disponible durante la germinación temprana

2.4.2 La proteína de la retinoblastoma (pRB).

En plantas a la proteína del retinoblastoma (pRB) se le denomina proteína relacionada a RB (pRBR), igual que en otros eucariontes se encuentran en el núcleo y están caracterizadas por presentar varios dominios, el dominio A y B altamente conservados entre humanos y plantas (Harbour y Dean, 2011). La proteína muestra varios sitios disponibles para ser fosforilados. Hasta el momento se ha reportado un sólo gen para la pRBR en *Arabidopsis*. Pero en maíz hay dos genes (RBR1 y RBR2) que muestran niveles de expresión diferenciales entre sí; aunque el significado funcional de esta diferencia es aún desconocido (Ach y cols., 1997). En maíz, los genes pRBR son expresados en todos los tejidos, pero la mayor expresión está asociada con el ápice del tallo (Francis, 2007).

Cuando se examinó la abundancia de la pRBR durante el desarrollo de las hojas de maíz se encontró un gradiente a lo largo de la lámina de la hoja, con altos niveles asociados a tejidos ya diferenciados y bajos niveles en la zona proliferativa en la base de la hoja (Huntley y cols., 1998). De la misma manera que en animales, las pRBR de plantas interactúan con varias proteínas incluyendo a la familia de factores transcripción E2F, las CYCD, etc., a través de la región carboxilo terminal. Estudios en animales han demostrado que actúa principalmente como supresor de la transcripción mediante dos mecanismos, el primero involucra su unión a factores tales como E2F inhibiendo su actividad, en el segundo, el complejo pRBR-E2F actúa como promotor que activa a represores de la transcripción (Harbour y Dean, 2011). En plantas el mecanismo principal es el primero (Vázquez-Ramos y De la Paz, 2003). Estos resultados apoyan la relación entre pRBR y el control del ciclo celular y la diferenciación.

2.4.3 La familia de factores de transcripción E2F.

Los factores E2F representan una familia de proteínas relacionadas, en los humanos, comprende seis tipos (E2F1-E2F6) y dos relacionadas lejanamente (DP1 y DP2). Ambos, tanto las proteínas DP como los factores E2F han sido identificados en varias especies incluyendo trigo, tabaco, zanahoria, arroz y *Arabidopsis*. En *Arabidopsis*, se han descrito ocho proteínas que por homología en sus secuencias pueden ser clasificadas como E2F, DP y DEL (DP y E2F-like). En las diversas especies de plantas las proteínas clasificadas como E2F muestran una organización de dominios similar a las proteínas animales: un dominio de unión al DNA altamente conservado del tipo cierre de leucinas y un C-terminal donde se encuentra el sitio de unión a pRBR (Figura 3) En general se sabe que los genes de la familia E2F participan en la regulación del ciclo mitótico y la endoreplicación durante el desarrollo vegetal. Mediante análisis de hibridación *in situ* se ha demostrado que AtE2Fa y AtDEL-3 se expresan en regiones que se encuentran en división activa (por ejemplo, el ápice de la raíz, el meristemo apical del tallo y los primordios foliares (Francis, 2007).

Entre las proteínas que son reguladas por E2F se encuentran algunas polimerasas (Dewitte y Murray, 2003) y la proteína PCNA (por sus siglas en inglés *proliferating cell nuclear antigen*). La proteína PCNA ha sido descrita en *Arabidopsis*, chícharo, frijol y zanahoria. Dicha molécula juega un papel fundamental en la replicación y reparación del DNA. Recientemente se ha clonado en maíz y se le ha encontrado asociada a proteínas que participan en el control de la fase G1 del ciclo celular, tales como las CYCD (Strzalka y Ziemienowicz, 2010). Se ha observado además que esta proteína se encuentra en niveles constantes durante el desarrollo del embrión y disminuye hasta niveles muy bajos en la semilla madura. Durante la germinación se ha observado que la proteína se acumula lentamente, llegando a un pico alrededor de las 20 h de imbibición. La benciladenina, un inductor de la proliferación en plantas acelera este proceso y la proteína es detectable entre 3-6 h después de iniciada la imbibición (Herrera y cols., 2000).

2.5 Germinación de semillas y crecimiento de las plántulas.

El ciclo de vida de las plantas con semilla comienza con un evento de doble fertilización, característico para las angiospermas. Un espermatozoide se fusiona con la célula del óvulo, mientras que el segundo espermatozoide se fusiona con la célula binucleada central del saco embrionario para dar lugar al endospermo. Alrededor de 7-9 días después de la polinización (DAP) comienza la embriogénesis con una división asimétrica del cigoto que resulta en una célula apical pequeña y una basal grande. Eventualmente estas células desarrollarán dos zonas de crecimiento bien diferenciadas, el meristemo apical y el radicular (Figura 4) (Nardmann y Werr, 2009).

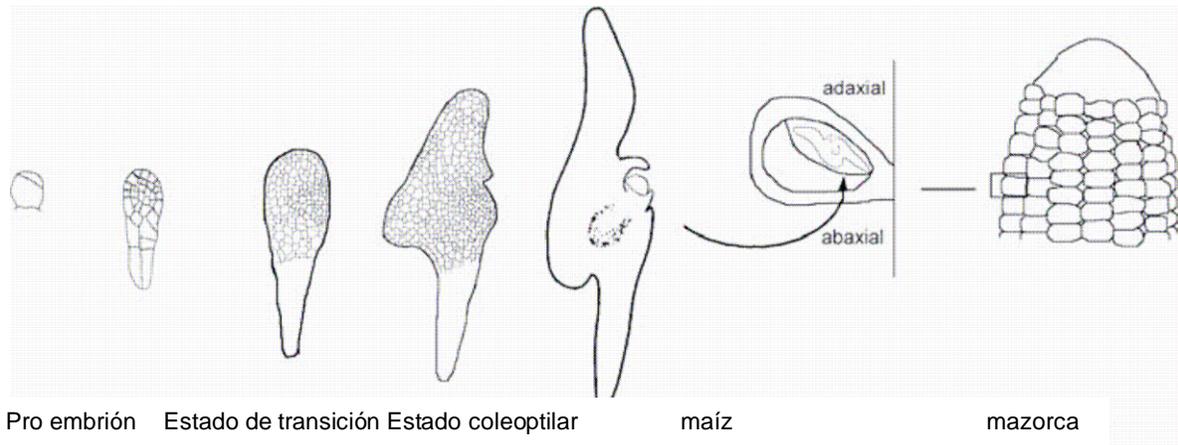


Figura 4. Embriogénesis de maíz (Tomado de Nardmann y Wer, 2009).

En el caso específico del maíz, el cariopse es en realidad un fruto, ya que una gran parte de su estructura es de origen materno. Para fines de este trabajo se utilizará el término *semilla* para referirse a ella. Los granos de cereales o (cariopses) pueden dividirse en tres partes: el embrión diploide (plantúla en miniatura), el endospermo triploide (reserva de nutrientes) y la testa (cubierta protectora). La testa generalmente es dura, formada por una capa interna y una externa de cutícula y una o más capas de tejido grueso que sirven de protección. Estas características les confieren a las semillas cierto grado de impermeabilidad al agua y a los gases que les permiten ejercer una influencia reguladora sobre el metabolismo de la semilla (germinación y crecimiento) (Moreno, 1996).

Una vez terminado el proceso de organogénesis, la semilla madura acumula reservas y ocurre un proceso de desecación, durante este proceso se sintetizan una familia de

proteínas denominada MAT (por sus siglas en inglés *maturation genes*), entre los genes de esta familia se encuentran los que codifican para enzimas que participan en la producción de azúcares, los de proteínas que participan en la adquisición a la tolerancia a la desecación y también son reprimidos los genes que participan en la síntesis de DNA y en la remodelación de las histonas (Angelovici y cols., 2010). Estos procesos dan lugar al arresto en la fase G1 del embrión y éste detiene su crecimiento.

Durante la germinación las células de la semilla reactivan su metabolismo. El reinicio de la actividad metabólica en las semillas está relacionado con la rehidratación. Las semillas absorben agua en una curva trifásica (Figura 5). A lo largo de estas fases las células realizan diversos procesos de reparación en organelos como las mitocondrias, en el DNA y se reactiva la síntesis de proteínas (Nonogaki y cols., 2010).

Se han llevado a cabo distintos experimentos para entender los eventos bioquímicos y moleculares que ocurren durante la germinación de las semillas. Entre ellos se ha establecido que los ejes embrionarios de semillas de cereales reinician la síntesis de proteínas temprana durante las primeras etapas de la imbibición, basándose en la traducción de ácidos ribonucleicos mensajeros (RNAm) que quedaron almacenados en los ejes embrionarios durante su maduración (Sánchez de Jiménez y cols., 1981). Con base en estos antecedentes se ha demostrado que en las primeras fases de la imbibición de las semillas la síntesis de proteínas está basada principalmente en la traducción de RNAm almacenados, mientras que a tiempos posteriores se basa en la transcripción de nuevos RNAm y su traducción. Entre los mensajes almacenados se encuentran proteínas ribosomales y polimerasas (Rincón-Guzmán y cols., 1998; Sánchez de Jiménez, 2000; Gómez y Vázquez-Ramos, 2003).

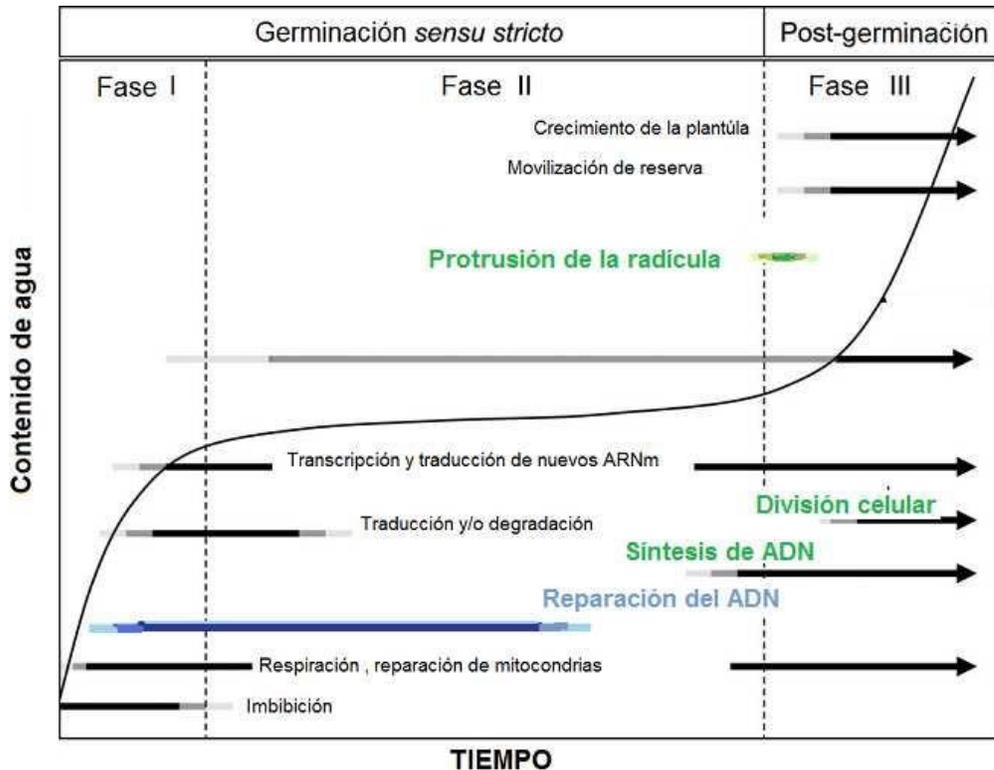


Figura 5. Eventos metabólicos durante la germinación (Tomado de Nonogaki y cols., 2010).

Se ha demostrado que la CYCD3 de maíz, no existe como mensaje almacenado en la semilla seca y que comienza su transcripción alrededor de las 6 h (Gutiérrez y col.; 2005).

Finalmente, las células meristemáticas son estimuladas a reiniciar el ciclo celular, este proceso ocurre alrededor del momento de protrusión de la radícula (Grendreau y cols., 2008; Vázquez- Ramos y Sánchez, 2003). Estos eventos están regulados en forma muy precisa para que las células del eje embrionario sean competentes para pasar de la fase G0 ó G1 a S del ciclo celular (Sánchez de Jiménez, 2000). En este momento, la decisión de reentrar al ciclo celular o permanecer arrestado es crucial para determinar la formación de la plántula (Barroco y cols., 2005).

2.6 Regulación del crecimiento en plantas por Insulina y los factores semejantes a insulina IGF's.

La insulina madura es un polipéptido de 6K Da constituido por dos cadenas A y B las cuales cuentan con 21 y 30 aminoácidos, respectivamente; las cadenas están unidas por

puentes disulfuro (Mathews y cols., 2002). En células animales las respuestas inmediatas de esta hormona incluyen el transporte de glucosa y la activación o inhibición de la actividad de algunas enzimas. En períodos más largos, la insulina estimula la síntesis de ácidos nucleicos, de proteínas y promueve el crecimiento celular (Proud y Denton, 1997; Mounier y Posner, 2006). Los IGF's regulan el crecimiento, en particular, se ha determinado que los IGF1 incrementan la expresión de CYCD1 en células de la tiroides y también incrementan la actividad de NF-kB, lo que podría acelerar la transición G1-S, por una vía mediada por PI3K (Ren y cols., 2009).

Los vegetales no producen insulina, pero sí se ha podido demostrar la existencia de factores semejantes a insulina. En espinaca se reportó un péptido reconocido por anticuerpos contra insulina y en soya un péptido de 4KDa que es reconocido por los receptores de insulina bovinos (Collier y cols., 1987; Hanada y Hirano, 2004). También se han realizado estudios en semillas de frijol, donde se caracterizó un IGF que participa en el transporte de azúcares en la semilla durante la germinación (Olivieria y cols., 2004).

Recientemente se ha descrito en maíz un péptido de 5.7 KDa que ha sido caracterizado como un IGF, el denominado ZmIGF (por siglas en inglés *Zea mays insulin-like growth factor*) (Rodríguez-López y cols., 2011), que se encuentra ubicado principalmente en las zonas meristemáticas, lo que sugiere que participa en el crecimiento y la división celular. En semillas de maíz la insulina y el ZmIGF aceleran la germinación y el crecimiento de las plántulas (García Flores y cols., 2001) y promueve el paso de la fase G₁ a S en cultivos de células de maíz (Sotelo y cols., 2010). Este efecto está acompañado de la estimulación de la síntesis de proteínas (Paz Lemus, 2005). Como se mencionó previamente, los ejes embrionarios quiescentes de maíz contienen una gran cantidad de RNAm almacenados. Se ha observado que dichos RNAm y una poza abundante de subunidades ribosomales, se encuentran en el eje embrionario de la semilla seca y que cuando la imbibición comienza son utilizados directamente en la síntesis de proteínas (Rincón Guzmán y cols., 1998).

Por lo que resulta relevante investigar cuál es el patrón de expresión de proteínas que participan en la transición G1-S, durante la germinación ya que se sabe además que un porcentaje importante de las células de la semilla de maíz se encuentran arrestadas precisamente en la fase G1 (Baiza y cols., 1989, Vázquez-Ramos y Sánchez 2003).

2.7 Mecanismo de acción de la insulina/IGFs.

Se han encontrado varias secuencias de elementos de respuesta a insulina (IRE's por sus siglas en inglés *insulin response elements*), aunque no existe una secuencia consenso universal. Al parecer la insulina regula la transcripción afectando el nivel, la localización y la actividad de los factores de transcripción (Mounier y Posner, 2006). La inhibición de la expresión génica en respuesta a insulina, es mediada por la vía de la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K) y AKT (Nakae y cols., 2001). Los principales factores de transcripción involucrados en la regulación transcripcional en respuesta a insulina son las proteínas Foxo, las SREBP y las Sp1 (Mounier y Posner, 2006). Las proteínas Foxo, son una familia de factores de transcripción que muestran un efecto de represión de la transcripción en presencia de insulina (Mckinnon y cols., 2006).

Las SREBP, son una familia de factores de transcripción con tres isoformas, que contienen un motivo del tipo cierre de leucina, en el hígado SREBP-1c regula la síntesis de lípidos, mientras SREBP-2, regula la síntesis de colesterol. La expresión del gen SREBP1 está regulada por insulina en el hígado y los adipocitos, vía la activación de PI3K y AKT (Eberle y cols., 2004).

Finalmente, las proteínas Sp1, son activadores ubicuos que contienen tres regiones de tipo dedos de zinc en el extremo carboxilo terminal, y se unen a motivos ricos en GC en los promotores de los genes involucrados en la respuesta a insulina. Su efecto sobre la transcripción depende del carácter de cada gen (Barroso y Santisteban, 1999; Chakravarty y cols., 2004).

Los resultados de estudios de la señalización de insulina y de los IGF's revelan que la interacción de estos efectores con sus receptores (del tipo tirosin-cinasa) activan a la cinasa del fosfatidil-3-inositol (PI3K).

En la Figura 6 se muestran algunos de los componentes más importantes de la vía PI3K-TOR, esta vía se ha estudiado intensamente porque como se observa participa en la biogénesis de ribosomas. Las proteínas constituyen la mayoría de la masa seca de una célula y la cantidad de proteína por célula está influenciada por el número de ribosomas,

por lo tanto, el tamaño celular está determinado por la biogénesis de ribosomas (Baserga, 2007)

La biogénesis de ribosomas, es esencial para la transición G1-S ya que se requiere incrementar la síntesis de proteínas para el crecimiento, además se ha observado que la alteración de la expresión o función de los componentes de la vía PI3K como TSC1, TSC2, S6K, 4EBP, TOR, Rhan o los factores de transcripción Foxo derivan en cambios células de tamaño anormal, las mutaciones en la vía llevan al arresto de las células en G1, la sobreexpresión de los mismos elementos promueven la transición G1-S (Jorghensen y Tyers, 2004)

La activación de PI3K genera PIP3 que une a PKB y la recluta a la membrana celular donde se activa por fosforilación por las cinasas PDK1 y TOR. La fosfatasa PTEN revierte este paso transformando PIP3 a PIP2. A su vez, la PKB/Akt activada tiene varios sustratos, incluyendo la glucógeno sintasa, factores de transcripción y la proteína 2 de esclerosis tuberosa (TSC2) del complejo TSC1-TSC2, que actúa como un complejo supresor de tumor, inhibidor del crecimiento celular. La fosforilación de TSC2 resulta en la disociación y degradación del complejo TSC1-TSC2, liberando la GTPasa homóloga de RAS (denominada Rheb), y permitiéndole alcanzar el estado activo (unión a GTP), lo que activa TOR y facilita a su vez la transmisión de la señal a sus sustratos (Dann y col, 2007). Entre los sustratos de TOR se encuentran 4E-BP1 y S6K, mTOR fosforila e inhibe a 4E-BP1, liberando de la represión al factor eIF4E y activando la síntesis de proteínas y la progresión del ciclo celular. mTOR también activa a la cinasa S6K1, que se propone está involucrada en la regulación de la síntesis de proteínas, tamaño celular, progresión del ciclo celular y homeostasis de la glucosa. La vía de señalización PI3K también es activada por otros factores de crecimiento, tales como el epidérmico (EGF), los semejantes a insulina (IGFs) y el derivado de plaquetas (PDGF). Una vez activada PKB a través de estas vías, puede mediar la fosforilación de varios sustratos específicos, como los descritos anteriormente, además de la caspasa 9 y la proteína antagonista de muerte celular BCL-2, culminando en la respuesta de sobrevivencia. La regulación de la actividad de TOR también está mediada por nutrientes y la energía celular (Harrington y cols., 2005; Dann y cols., 2007; Patursky-Polischuk y cols., 2009).

La cinasa TOR pertenece a una familia de cinasas de serina/treonina denominada PIKK's (cinasas relacionadas con la cinasa de fosfatidil inositol) (Raught y cols., 2001). Como ya se mencionó, es conocida por tener un papel central en la regulación del crecimiento celular y la proliferación. Su actividad ha sido relacionada con varios fenómenos celulares incluyendo la transición G0- G1-S (Yoonseok y Exton, 2004). La vía de señalización de la cinasa TOR integra varias señales como las de los niveles de nutrientes, de energía y de factores de crecimiento que regulan procesos como la autofagia, la biogénesis de ribosomas y es una molécula clave de la vía de señalización de insulina. Para determinar la participación de la cinasa TOR en una vía de señalización se utiliza la rapamicina, un antibiótico producido por la bacteria *Streptomyces hygroscopicus*. La rapamicina tiene un receptor intracelular específico llamado FKBP12. El complejo rapamicina-FKBP12 interactúa inhibiendo a la proteína cinasa TOR (Raught y cols., 2001).

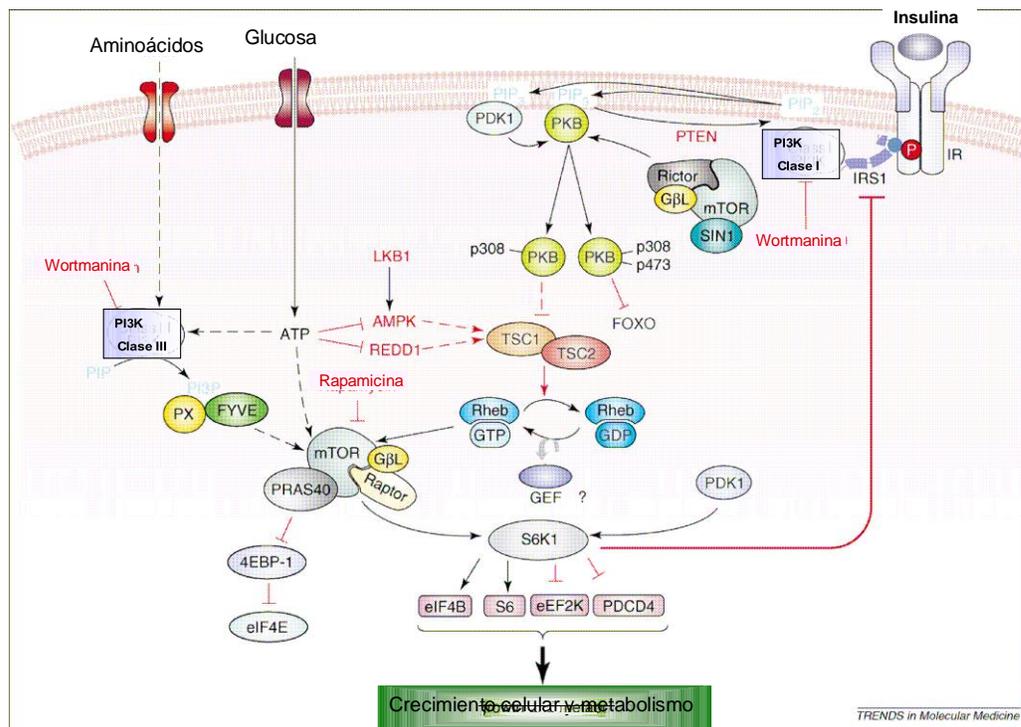


Figura 6 Vía de señalización PI3K-TOR (Tomado de Dann y cols., 2007)

La TOR de mamíferos (mTOR) está constituida de varios dominios que forman complejos con otras proteínas, algunas de las cuales al parecer regulan su actividad (como la proteína G Rheb), mientras otras como raptor o rictor están involucradas en la señalización río abajo mediando su interacción con los sustratos que fosforila. Las

interacciones de mTOR con raptor y rictor son mutuamente excluyentes. Los complejos en los cuales participa son llamados complejo 1 de mTOR (TOR C1) y complejo 2 de mTOR (m TORC2), respectivamente (Sarbasov y cols., 2005). Raptor participa en la respuesta de señalización cuyo control es sensible a rapamicina, como la de la proteína S6K y el factor de unión al eIF4E (eIF4E-BP1). Los motivos que participan en la unión Raptor-TOR son denominados TOS (motivos de señalización de TOR). TOS1 participa en la vía sensible a rapamicina, mientras que TOS 2 es insensible a éste antibiótico (Averous y Proud, 2006).

En el caso de la regulación traduccional mediada por insulina, aparentemente están involucradas distintas vías de señalización (Proud, 1997). Una vía de señalización regula la iniciación mediante la fosforilación del factor eEIF2. Además, la insulina regula la formación del complejo 43S, al fosforilar a la proteína 4E-BP1 permitiendo la liberación del factor eIF4E que forma parte del complejo de iniciación. Otro mecanismo es a través de la fosforilación de prS6 que se sugiere regula la traducción selectiva de algunos mensajes entre los que se encuentran los que codifican para proteínas ribosomales y factores de elongación. En todos estos efectos participa la proteína TOR (Proud, 1997; Averous y Proud, 2006; Ruvinski y Meyuhas, 2006).

Algunos de los elementos descritos para la vía de PI3K se encuentran ya descritos en plantas donde se ha podido demostrar también la participación de dicha vía en la regulación del crecimiento y la biogénesis de ribosomas.

2.8 Efecto de la insulina y los IGF's en la germinación y el crecimiento en maíz.

El maíz es una planta de gran importancia económica, originaria del Continente Americano. Es una herbácea monocotiledónea pertenece a la clase *Liliopsida*, y la subclase *Commelinidae*, la orden *Cyperales*, y la familia *Poaceae* (o Gramíneas). Los tres géneros americanos son: el *Zea*, de alta importancia económica y alimenticia, representado la especie *Zea mays*, el *Tripsacum*, de cierto valor como cultivo forrajero, pero escaso o ninguno como grano para consumo humano y *Euchlaena* (teosintle), el pariente silvestre más cercano al maíz (Jugengheimer, 1988).

La semilla de maíz, contiene un solo embrión rodeado por el tejido de reserva, el endospermo (Figura 7). el endospermo de maíz contiene cuatro tipos de tejidos, el endospermo almidonoso la capa de aleurona exterior, la capa de transferencia basal del endospermo (BETL). El eje embrionario como en otras monocotiledóneas está precozmente desarrollado y se pueden observar meristemas bien definidos. Contienen un meristemo radicular, que dará origen a la raíz, un meristemo aéreo donde hay varios primordios foliares pequeños dentro en una cubierta protectora, en conjunto a esta estructura se le llama coleóptilo. Además se encuentra unido mediante el mesocotilo a una estructura denominada escutelo que lo rodea completamente. El escutelo se divide en coleóptilo (parte aérea), radícula (raíz) y unido al escutelo está el mesocótilo (éste término se refiere al primer internodo, entre el nudo del coleóptilo y el nudo escutelar) es una característica única de las gramíneas (Jugengheimer, 1988).

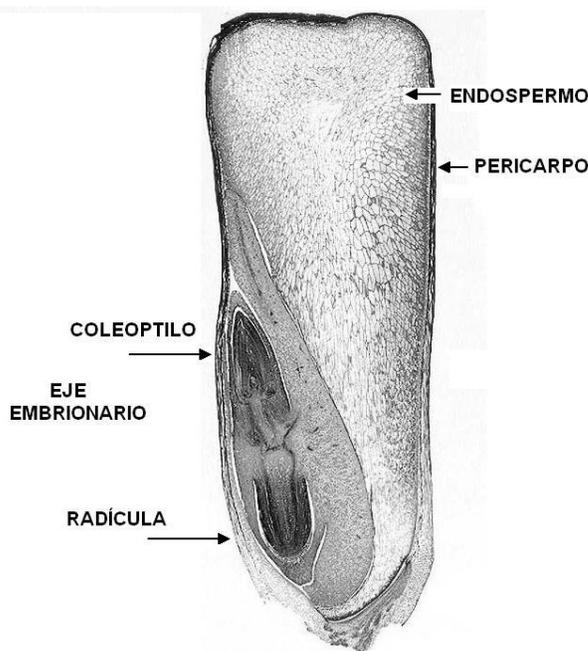


Figura 7. Estructura del grano maduro de maíz. Sección longitudinal. 40X .

En maíz, como en otras semillas la germinación es el proceso por el cual la semilla reinicia el crecimiento, este proceso está bajo el control de señales ambientales complejas, y hormonas vegetales que afectan a la expresión de una gran variedad de genes a nivel transcripcional y traduccional (Holdsworth y cols., 2008). En el maíz, la expresión génica *de novo* en las primeras etapas de la germinación se debe exclusivamente al grupo de

mRNAs almacenados en los ejes embrionarios (Sánchez de Jiménez y cols., 1981). En etapas posteriores de la germinación nuevos mRNA son sintetizados para completar la protrusión de la radícula. Los dos tipos de RNAm (los almacenados o los recién sintetizados) son selectivamente traducidos a diferentes tiempos durante la germinación y en esta regulación participan los factores de inicio de la traducción eIF4E y eIF(iso)4E (Dinkova y cols., 2011).

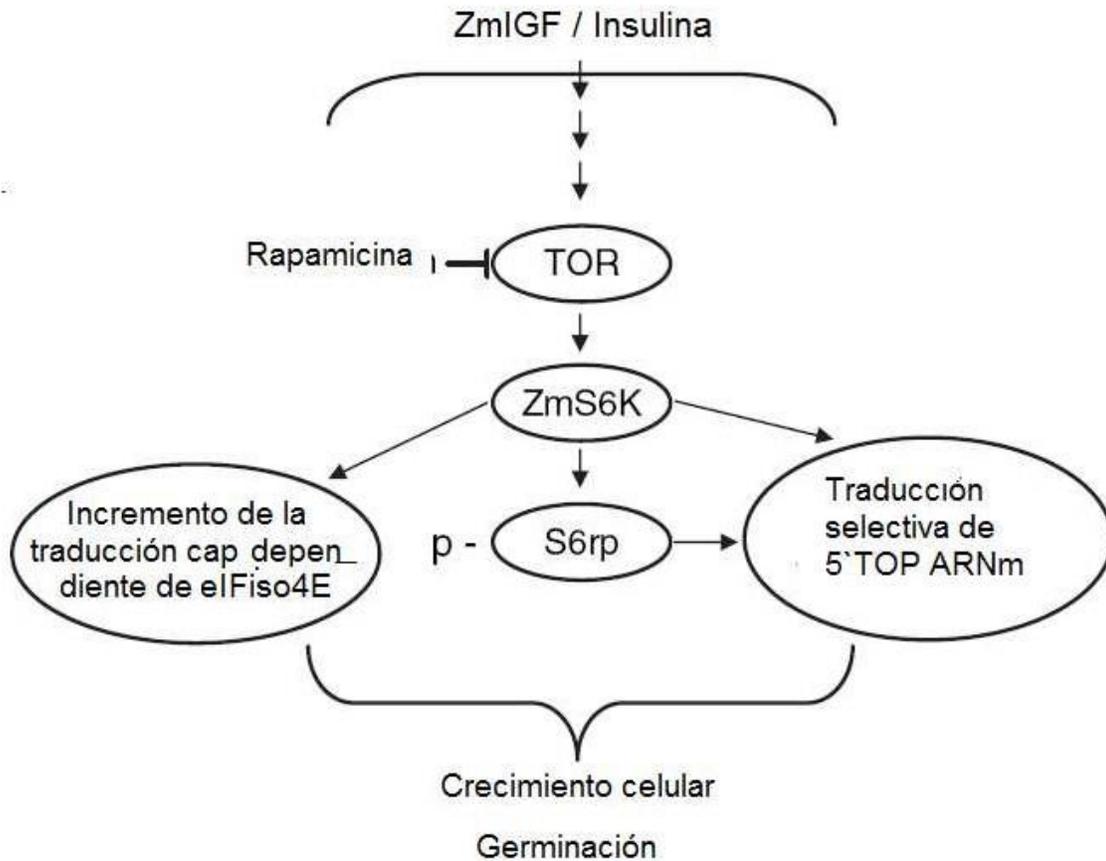


Figura. 8. Vía de transducción de señales para TOR-S6K en semillas en germinación (Tomado de Dinkova y cols., 2007).

Como se mencionó anteriormente, en maíz, se han identificado varios elementos que participan en el ciclo celular y en particular en la transición G1- S. En estudios previos se demostró que la mayoría de las células del eje embrionario se encuentran arrestadas en G1-S (Baíza y cols., 1981). Aunque en dichos estudios no profundizó en el mecanismo de

reactivación del ciclo celular en cada parte del eje embrionario de maíz durante la germinación.

Entre las proteínas involucradas en la transición G1-S se han descrito las ciclinas, las CDK's y dos isoformas de las proteínas RBR. Se sabe que la ciclina D2 es estimulada por citocininas en la imbibición temprana (Gutiérrez y cols., 2005). Sin embargo, no existen datos suficientes acerca de la regulación de otros componentes importantes en la transición G1-S, por ejemplo otros tipos de ciclinas D y las proteínas E2F. Los datos disponibles mencionan que las ciclinas D son inducidas por señales extracelulares, sin embargo, no se ha determinado si la inducción se refiere a transcripción *de novo* o a la traducción de mensajes almacenados durante el desarrollo.

Como ya se mencionó se ha descubierto también un factor endógeno semejante a insulina en maíz, el ZmIGF (Rodríguez y cols., 2011) ubicado en los tejidos meristemáticos del eje embrionario (García-Flores, 2001). Dicho péptido estimula la germinación, el crecimiento e induce la fosforilación de S6 de manera similar ala reportada para insulina.

Recientemente se ha estudiado el efecto de la insulina en cultivos de células de maíz. En este sistema la insulina y el Zm IGF, incrementaron la síntesis de DNA y aumentaron el reclutamiento preferente en los polisomas de los mensajes de CYCD, PCNA y E2F, además de los mensajes que codifican proteínas de la maquinaria de traducción. Todos estos efectos fueron revertidos por rapamicina (Sotelo y cols., 2010).

No se conoce en detalle el mecanismo por el que la insulina regula el crecimiento en los ejes embrionarios de maíz, sin embargo se sabe que incrementa la síntesis de DNA y de proteínas en particular, proteínas ribosomales (Paz-Lemus, 2005), por lo que es posible que regule la biogénesis de ribosomas que como se mencionó previamente es un prerequisite para la duplicación del DNA y la división celular.

Como se mencionó anteriormente, la vía de transducción de señales mediante la cual actúa la insulina en animales incluye a la proteína cinasa TOR, recientemente se ha reportado en maíz el homólogo ZmTOR (Agredano y cols., 2004), así como otros componentes de la vía y también se ha demostrado la activación de S6K y la fosforilación de prS6, estos efectos son revertidos por rapamicina, el inhibidor de TOR. Por lo que se

ha propuesto que la vía PI3K-TOR está conservada en plantas y es la responsable de la acción de insulina/ZmIGF en semillas de maíz en germinación (Figura 8) (García Flores y cols., 2001; Dinkova y cols, 2007).

Resultan interesantes los antecedentes que muestran que existe un patrón de respuesta diferencial entre los meristemas apical y radicular. En este sentido, se reportó que los patrones de fosforilación de la prS6 en respuesta a insulina o auxinas, son diferentes dependiendo del efector y de la parte del eje embrionario analizado (Buentello y cols., 2010); asimismo en estudios previos se encontró que en la radícula hay un incremento diferencial en respuesta a insulina comparando con el coleóptilo en la síntesis de proteínas ribosomales y de DNA (Paz Lemus, 2005).

En este trabajo, se estudió la regulación del reinicio del ciclo celular en ejes embrionarios de maíz en germinación en presencia del efector insulina. Como se mencionó previamente, la mayoría de las células de ejes embrionarios de las semillas de maíz, se encuentran arrestadas en G1-S, por lo que también se consideró relevante estudiar el efecto de la insulina en la expresión de algunos de los genes involucrados en la transición G1-S como PCNA y E2FB que forman parte del principal mecanismo de regulación de dicha transición.

3. JUSTIFICACIÓN.

Las semillas maduras, las células se encuentran deshidratadas y con actividad metabólica muy baja. El proceso de imbibición reactiva el metabolismo e induce la germinación que culmina con la protrusión de la radícula. Entre los principales eventos metabólicos que se reactivan está el ciclo celular. La mayoría de las células de los ejes embrionarios de semillas de maíz quiescentes se encuentran mayoritariamente arrestadas en G1

El mecanismo de arresto es muy similar al descrito para animales e involucra a la proteína del retinoblastoma RB, la cual inhibe la activación del complejo de transcripción E2F-DP, e impide la activación de los genes que permiten la duplicación del ADN, como PCNA. Entre los elementos que participan en dicha transición y que se han caracterizado en semillas de maíz, se encuentran las ciclinas D; las proteínas RBR homólogos de la proteína RB de animales, así como PCNA, varias CDK's y se han determinado a través de EST's la presencia de secuencias homólogas a la familia de proteínas E2F.

Los mitógenos como la insulina o los IGF's, inducen la fosforilación de las ciclinas por las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK's), dando lugar a la formación de los complejos CDK-ciclina lo que activa a la CDK, que a su vez fosforila secuencialmente a la pRBR, disociándola de los factores de transcripción E2F, activando así la transcripción de los genes regulados por estos factores, lo cual lleva a la transición hacia la fase S

En maíz, se ha purificado y caracterizado un péptido de 5.7 kD con una estructura semejante a la reportada para insulina y para el IGF-1; al que se ha denominado factor semejante a insulina de maíz, ZmIGF. Se ha demostrado que tanto la insulina, como el ZmIGF, tienen actividad mitogénica e incrementan la síntesis de DNA en cultivos de tejidos de maíz, movilizándolo a polisomas los ARNm de las proteínas de ciclo celular que participan en la transición G1-S como PCNA y Ciclina D1. En ejes embrionarios inducen la germinación y el crecimiento, así como patrones diferenciales de síntesis de proteínas (citósolicas y ribosomales), de ADN y de inducción de genes de la maquinaria traduccional en la radícula y el coleóptilo de ejes embrionarios de maíz. Sin embargo no se ha determinado cual es el mecanismo exacto por el cual realiza estos efectos.

Por lo anterior en el presente trabajo se decidió estudiar los mecanismos de coordinación del crecimiento y la división celular en los coleóptilos y radículas de ejes embrionarios de maíz, con el propósito de profundizar en el mecanismo por el cual la insulina realiza su efecto durante la germinación. Se trabajó con las partes separadas del eje embrionario de maíz para identificar los tejidos que tienen respuesta temprana a este efector. También se consideró relevante estudiar el efecto de la insulina en la expresión de algunos de los genes involucrados en la transición G1-S como PCNA y E2F ya que como se mencionó previamente la mayoría de las células de ejes embrionarios de las semillas de maíz, se encuentran arrestadas dicha transición.

4. HIPÓTESIS.

Si la insulina en animales promueve el crecimiento regulando la progresión del ciclo celular (transición G1-S) es posible que este mismo mecanismo sea utilizado para regular la reactivación del ciclo celular y el crecimiento de semillas de maíz en germinación.

5. OBJETIVO GENERAL:

Determinar el efecto de la insulina en la reactivación del ciclo celular de las radículas y los coleóptilos de ejes embrionarios de maíz en germinación.

5.1 Objetivos Particulares:

1. Determinar el efecto de la insulina en el crecimiento de las radículas y los coleóptilos de ejes embrionarios en germinación.
2. Determinar el efecto de la insulina en las fases del ciclo celular en las radículas y los coleóptilos de ejes embrionarios en distintas etapas de germinación (0, 15, 18, 24 y 36 h).
3. Determinar si los RNAm de proteínas que participan en la transición G1/S (E2F y PCNA) se encuentran almacenados en las semillas quiescentes y en que parte de eje embrionario se encuentran.
4. Determinar los niveles de transcritos de los RNAm de proteínas involucradas en la transición G1/S (E2F y PCNA) en el RNA total de las radículas y los coleóptilos de ejes embrionarios sin tratar o tratados con insulina en distintas etapas de germinación (15 y 24 h).
5. Determinar los niveles de transcritos de los RNAm de proteínas involucradas en la transición G1/S (E2F y PCNA) en el RNA de la fracción polisomal de las radículas y los coleóptilos de ejes embrionarios sin tratar o tratados con insulina en distintas etapas de germinación (15 y 24 h).
6. Determinar en su caso, el nivel al que se encuentra la regulación de la expresión génica por insulina (transcripcional o traduccional) de mensajes involucrados en la transición G1/S (E2F y PCNA).

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1 Material biológico y tratamientos.

En todos los experimentos se utilizaron semillas de maíz (*Zea mays* L.) var. Chalqueño. Todos los reactivos utilizados fueron de Sigma-Aldrich, (St Louis MO USA) excepto en los casos donde se indique lo contrario. Las semillas se desinfectaron, se imbibieron y se trataron con un pulso con insulina bovina 200 mU mL⁻¹ por 2 h, siguiendo la metodología descrita por Buentello y colaboradores, (2010). Los tiempos de imbibición se describen en cada experimento. Las muestras usadas en la Citometría de Flujo para los estudios del efecto de la insulina en las fases del ciclo celular, se procesaron inmediatamente. Las muestras para los estudios del efecto de la insulina en la regulación de la expresión génica, se congelaron y pulverizaron con N₂ líquido y se almacenaron a -70 °C hasta su uso. En todos los casos, los experimentos se realizaron por triplicado.

6.2 Efecto de un pulso de insulina en el crecimiento de ejes embrionarios en germinación.

El efecto de la insulina en el crecimiento de ejes embrionarios de maíz se determinó usando lotes de 50 semillas imbibidas por 22 h en algodón húmedo. Los ejes se disectaron y se incubaron sin o con insulina 200 µU mL⁻¹ en medio Murashige y Skoog (MS). Finalizado el tiempo de imbibición, los ejes embrionarios se enjuagaron con agua destilada estéril y se midió la longitud de la radícula y el coleóptilo usando un vernier. Posteriormente, se colocaron en cajas de Petri de 100 mm con papel filtro humedecido con 5 mL de medio MS y se incubaron a 25 ± 2 °C por 96 h más en obscuridad. Cada 24 h se midió la longitud de la radícula y el coleóptilo y se cambiaron los ejes a cajas Petri con medio MS nuevo.

6.3 Determinación de la S6K-Tre 389.

6.3.1 Obtención de proteínas.

Se utilizaron lotes de 100 semillas de maíz imbibidos por 22h en algodón húmedo, al término del tiempo los ejes se disectaron manualmente y se incubaron sin o con insulina $200\mu\text{U mL}^{-1}$ en medio MS. Después de la incubación se separaron las radículas y los coleóptilos, el tejido correspondiente se congeló con N_2 y se almacenó a -70°C hasta su uso. Se obtuvo el extracto de proteínas totales usando la técnica descrita por Reyes de la Cruz y colaboradores (2004) con las siguientes modificaciones: 1g de radículas o coleóptilos tratados como se mencionó anteriormente, se pulverizaron con N_2 líquido y se homogeneizaron con 3 mL de amortiguador de extracción frío (HEPES 50mM, pH 7.6, pirofosfato de sodio 50 mM, vanadato de sodio 1mM, molibdato de sodio 1mM, EDTA 4mM EGTA 20mM, benzamidina 1mM, fluoruro de sodio 20mM, β -glicerofosfato 80mM, manitol 200mM, PMSF 0.2mM, DTT 2mM y PVPP 0.7%p/v, este último se agregó al momento de la extracción. El homogenado se centrifugó a 20,500xg durante 45 min. Posteriormente se recuperó el sobrenadante. Las proteínas se cuantificaron con el ensayo comercial de Bradford con una alícuota de $10\mu\text{L}$, usando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar. La fosforilación de S6K se determinó por Western blot. Se usaron 25mg de proteínas totales, las cuales se separaron en un gel SDS-PAGE al 12% p/v de acrilamida, por 2 h a 120 v. Posteriormente, se transfirieron a una membrana de Nylon, Hybond-P (Amersham CA USA) por transferencia semi-seca a 8mA cm^{-2} . La membrana se dejó secar completamente y se utilizó inmediatamente o se guardó un máximo de 48 h a -20°C .

6.3.2 Western blot para S6K Tre 389.

Las membranas se descongelaron o no y se hidrataron por 10 min con buffer salino de fosfatos (PBS) 1X, posteriormente se realizó un bloqueo por 45 min usando leche al 8% p/v en PBS 1X-Tween 0.5% v/v la solución se cambió cada por 15 min,. Se incubó en agitación por una noche a 4°C usando una dilución 1:20 del anticuerpo primario para la $p70^{\text{S6K}}$ humana fosforilada en la Treonina 389 (Sc-11759. Santacruz Biotechnology Inc. CA. USA) en PBS 1X, Tween 0.5% v/v y albúmina 1% p/v. Posteriormente, la membrana se lavó dos veces con PB 1X, Tween 0.5 % v/v 20 min cada vez a temperatura ambiente

y se incubó en agitación constante por 1 h con una dilución 1:5000 del anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa (Sc-2769 Santacruz Biotechnology Inc. CA. USA) en PBS 1X, Tween 0.5% v/v y albúmina bovina fracción V 0.2% p/v. La membrana se lavó dos veces por 10 min con PBS 1X, Tween 0.5% v/v, en agitación y se mantuvo en PBS 1X. La reacción se detectó por método de quimioluminiscencia con una mezcla 1:1 v/v de Western Lighthing Plus-ECL (Perkin Elmer, Inc., MA USA), usando una película KODAK, Blue x-Omat.

6.4 Contenido de DNA por Citometría de Flujo.

Se imbibieron lotes de 100 semillas de maíz por 13, 16, 22 y 34 h. Para el tiempo 0 h se usaron ejes embrionarios aislados de semillas sin imbibir. Los ejes embrionarios completos se disectaron y se trataron sin o con insulina 200 μ U mL⁻¹. Al final del tratamiento, se separaron las radículas. Los núcleos se aislaron a partir de 0.5g de ápices de radículas de 3-4mm de largo; los cuáles se fijaron en acetona por 2h, se pulverizaron con N₂ líquido y se homogeneizaron en 5mL de amortiguador de aislamiento, Tris-HCl 10mM, pH. 7.2, sacarosa 1M, MgCl₂ 5mM, β -mercaptoetanol 2mM y media tableta de inhibidores de proteasas COMPLETE (Roche®) por cada 100mL de amortiguador. Posteriormente, el homogenado se filtró a través de una capa de malla Miracloth (Calbiochem CA. USA) con un tamaño de poro de 22-25 μ m. El filtrado se centrifugó por 10min a 5,000xg a 4 °C, la pastilla se resuspendió en 1.5mL de amortiguador Tris-HCl 10mM pH 7.2, sacarosa 1M, MgCl₂ 5mM, β -mercaptoetanol 2mM, Tritón X-100 0.5% v/v y media tableta del inhibidor de proteasas COMPLETE (Roche®) por cada 100mL de amortiguador. Posteriormente, los núcleos se purificaron en un gradiente discontinuo 80, 40 y 20 %v/v de Percoll®, de acuerdo a Luthe y Quatrano (1980). Los núcleos se obtuvieron entre la fracción 40 y 80 y se diluyeron hasta 1 mL con el amortiguador de aislamiento y se centrifugaron por 20min a 10,000xg a 4 °C. La pastilla con los núcleos se resuspendió cuidadosamente en 360 μ L de amortiguador salino de fosfatos con NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, pH 7.4, en PBS 1X. Los núcleos se incubaron con Ribonucleasa A de Promega, 50mg mL⁻¹ 30 min a temperatura ambiente; los últimos 10 min se les agregó Yoduro de propidio a una concentración final de 50 mg mL⁻¹ y se mantuvieron en oscuridad. El contenido de DNA de los núcleos en un volumen total de 500 μ L se determinó por Citometría de Flujo usando un citómetro FACScan (Beckman CA USA) equipado con un láser de ión argón a 488 nm; la fluorescencia se

detecto en un rango de 605 a 635 nm. Como control interno se utilizaron leucocitos de pollo del kit BD™ DNA QC Particles (BD USA) y núcleos de hoja de maíz, obtenidos mediante la técnica descrita por Sliwiska y colaboradores (2005). Las muestras de núcleos de radículas se leyeron en el citómetro de flujo por duplicado con 30,000 eventos en cada determinación. Los datos se analizaron usando el programa MODFIT- LT Ô para Mac 3.0. La cantidad de DNA es proporcional a la señal de fluorescencia, el valor 1C representa la cantidad de DNA en el cromosoma haploide sin replicar. La frecuencia de núcleos en 2C y 4C se calculó como $[\text{núcleos } 2C / (\text{núcleos } 2C + \text{núcleos } 4C)] \times 100$ y $[\text{núcleos } 4C / (\text{núcleos } 2C + \text{núcleos } 4C)] \times 100$ respectivamente, según Gendreau y colaboradores (2008). Asimismo, la cantidad de DNA se expresó como porcentaje de núcleos en cada fase del ciclo celular.

6.5 Aislamiento de RNA total.

La extracción de RNA total se realizó usando el reactivo de Trizol (Invitrogen® CA USA) modificada para tejidos vegetales de acuerdo a las instrucciones del fabricante (ver Anexo 1).

Una muestra de 0.2g de cada tejido se pulverizó con N₂ líquido hasta obtener un polvo fino. La modificación realizada consistió en agregar un paso extra en la extracción usando isopropanol y una mezcla de citrato de sodio 0.8M/cloruro de sodio 1.2M p/v con la finalidad de precipitar los carbohidratos presentes en las muestras, debido a que las células vegetales tienen altos contenidos de estos compuestos.

La pastilla se resuspendió con 50 µL de agua tratada con DEPC y se almacenó a -70 °C. Todas las centrifugaciones se realizaron en una centrífuga refrigerada Beckmann GS-100 y un rotor F2402

6.6 Aislamiento de RNA de la fracción polisomal.

Para el RNA polisomal, se separaron los polisomas de acuerdo a la técnica de Beltrán y colaboradores (1995) y posteriormente se aisló el RNA como se indica en el Anexo 1.

Para separar los polisomas, se utilizó 1.0g de cada parte del eje embrionario. Todos los pasos se realizaron en frío.

Para aislar el RNA polisomal, se usaron 500µL de la resuspensión de polisomas obtenida previamente, se siguió la técnica descrita por Dinkova y col. (2007). Para el RNA total y el

RNA de la fracción polisomal, el rendimiento expresado como μg de RNA por g de peso fresco se calculó con una alícuota de $1\mu\text{L}$ a partir de la determinación de la absorbancia a 260 nm usando un Nanodrop 2000c (Thermo scientific Texas USA). La pureza del RNA se calculó usando la relación $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ considerando un valor de 2 para el RNA puro mediante espectrofotometría (Beckman 605). La integridad de las muestras se verificó usando 2 mg de RNA total o polisomal en geles de agarosa al 1.5% p/v en amortiguador TAE 1X (Tris- ácido acético 1mM, EDTA 0.5 M, pH 8.5) y tiñendo los geles con bromuro de etidio 0.1mM.

6.7 Análisis de la regulación de la expresión génica.

Una vez que se verificó la integridad de las muestras a partir del RNA total y polisomal se realizó la estandarización de las condiciones de PCR para cada gen.

6.7.1 PCR semicuantitativo.

Para verificar el efecto de insulina sobre el reclutamiento de ARNm en polisomas; se amplificó la prS6 por RT-PCR semi-cuantitativo a partir de RNA total y de la fracción polisomal aislado como se describió anteriormente.

Los cebadores utilizados se diseñaron a partir de secuencias de maíz, para prS6 y para el gen de referencia 18S (ver Tabla 1, Anexo 1).

Para verificar que la amplificación se encontraba dentro de un rango lineal, se estandarizó el número de ciclos de amplificación y la concentración óptima de RNA mediante RT-PCR en un solo paso usando RT-PCR-one step® (Invitrogen™ CA USA). La síntesis de la primera cadena de DNAc se llevó a cabo a 55 °C durante una hora, usando oligos específicos para los genes de interés (Tabla 1 del Anexo 1). La amplificación por PCR se realizó en las siguientes condiciones: 94 °C por 5 min y 26 ciclos de 94 °C por 30 s, 58 °C ó 60 °C por 60 s y 72 °C por 60s. Las muestras se almacenaron a -70 °C .

La expresión se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.0%p/v, para separar el RNA. El gel fue teñido con bromuro de etidio 0.1mM y se corrió en amortiguador TAE (Tris- ácido acético 1mM, EDTA 0.5M, pH 8.5), por 1.5h a 95 volts. En cada caso se realizó una densitometría utilizando el programa ImageJ.

6.7.2 RT-qPCR

Las reacciones de RT-qPCR para E2F y PCNA de las muestras experimentales se realizaron como se indica a continuación.

Previo a los ensayos de retrotranscripción 2µg de RNA total o de la fracción polisomal, fueron tratados con 1.5U DNAsa (Promega CA USA) por 60 min a 37 °C de acuerdo a las instrucciones del fabricante La reacción se detuvo usando 1µL de EDTA 250mM el volumen final de la reacción fue de 11µL. La reacción de retrotranscripción, RT, se realizó usando 1µg de las muestras de RNA tratadas con DNAsa. Se utilizó 1U de la enzima MMLV-RT (Promega CA USA) en la mezcla de reacción recomendada por el fabricante, la mezcla se incubó a 37 °C por 60 min, el volumen final de la reacción fue de 20 µL. A continuación, las muestras se almacenaron a –20 °C hasta su uso.

Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo usando 1 µL de la RT obtenida anteriormente, las amplificaciones se realizaron con el kit One step qPCR (Invitrogen™ CA USA) en un Rotor gene 3000 (Corbett Research Quiagen, CA USA). Los cebadores utilizados en la amplificación se diseñaron a partir de secuencias de maíz. Las secuencias usadas se muestran en la Tabla 1 del Anexo. Como gen de referencia se utilizó prS13. Previo a los ensayos de regulación de la expresión génica por insulina, se revisó que la eficiencia de amplificación para cada uno de los genes estudiados (E2F, PCNA) y el gen de referencia (prS13) tuviera valores entre 95 y 100 %, (Bustin y cols., 2009). Asimismo, se verificó que el tratamiento con insulina y el tiempo de imbibición no alteran la expresión del gen de referencia usando el programa GeNorm versión 3.5 (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>).

Las condiciones de amplificación fueron en el caso del E2F 5 min a 94 °C, 30 ciclos 94 °C por 30 seg, 58 °C por 30 seg, 72 °C por 50 seg y 7 min a 72 °C para la extensión final; para PCNA, 5 min a 94 °C, 30 ciclos 94 °C por 20 seg, 58 °C por 20 seg, 72 °C por 20 seg y 7 min a 72 °C para la extensión final. El gen prS13 se amplificó simultáneamente usando las condiciones indicadas para cada uno de los genes estudiados sin que se afectara su eficiencia. Los resultados de la amplificación por RT-qPCR fueron estandarizados según Willems y cols., (2008).

6.8 Análisis estadístico

Se utilizó el programa NCSS (Utah, USA) para obtener los parámetros de estadística descriptiva (promedio y DS), así como para determinar las diferencias entre los tratamientos, mediante la prueba de comparación de medias contra testigo de Dunnett, con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 Efecto de la insulina en el crecimiento de la radícula y el coleóptilo de ejes embrionarios de maíz en germinación.

Para determinar si la insulina ejercía un efecto específico en el crecimiento de las partes del eje embrionario se usaron ejes disectados de semillas imbibidas por 22h y tratados por 2h sin o con insulina $200\mu\text{U mL}^{-1}$. Se midió la longitud tanto de los ejes completos, como de las radículas y los coleóptilos cada 24h hasta las 96h como se describió en Materiales y Métodos.

Los ejes completos tratados con un pulso de insulina mostraron un incremento significativo de aproximadamente 20% en el crecimiento después de 24 h de tratamiento, el cual se mantuvo durante todo el período de tiempo estudiado (Figura 9).

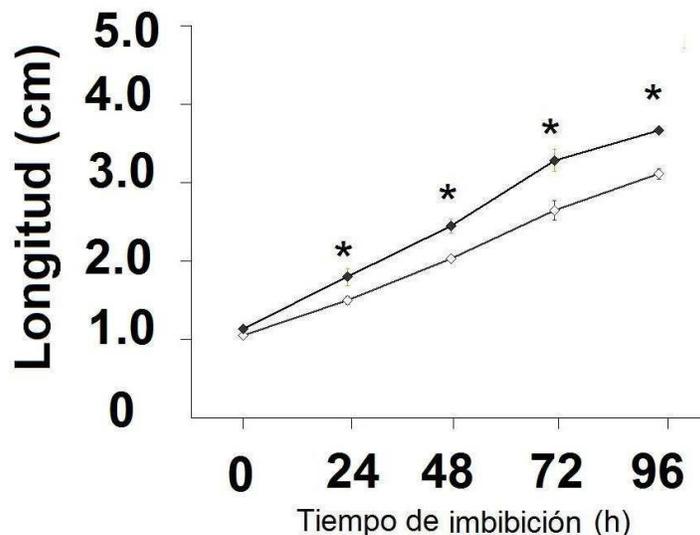


Figura 9. Efecto de la insulina en el crecimiento de ejes embrionarios. Se imbibieron lotes de 50 semillas por 22 h se disectaron los ejes embrionarios y se incubaron por 2 h en medio MS (O) o MS + insulina $200\mu\text{U mL}^{-1}$ (●). Posteriormente, se incubaron en MS a $26 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ en la oscuridad y se midió la longitud del eje completo cada 24 h. Los valores son promedio de tres experimentos independientes se expresan como longitud \pm DS. El * indica diferencias significativas entre tratamientos ($\alpha=0.05$).

Para determinar si la insulina afectaba de manera diferencial al eje embrionario, se midieron las partes por separado. En las radículas se observó un incremento promedio del 25% en el crecimiento, a partir de las 24 h; mientras que el coleóptilo respondió hasta las

48 h de tratamiento con un incremento promedio en el crecimiento del 12% con respecto al testigo (Figura 10).

Estos resultados muestran que las diferentes partes del eje embrionario responden de manera distinta a la insulina y que en particular la radícula mostró una respuesta más temprana y ligeramente mayor que el coleóptilo. Debido a lo anterior, en los siguientes experimentos se analizó el efecto de la insulina tanto en las radículas como en los coleóptilos de ejes embrionarios.

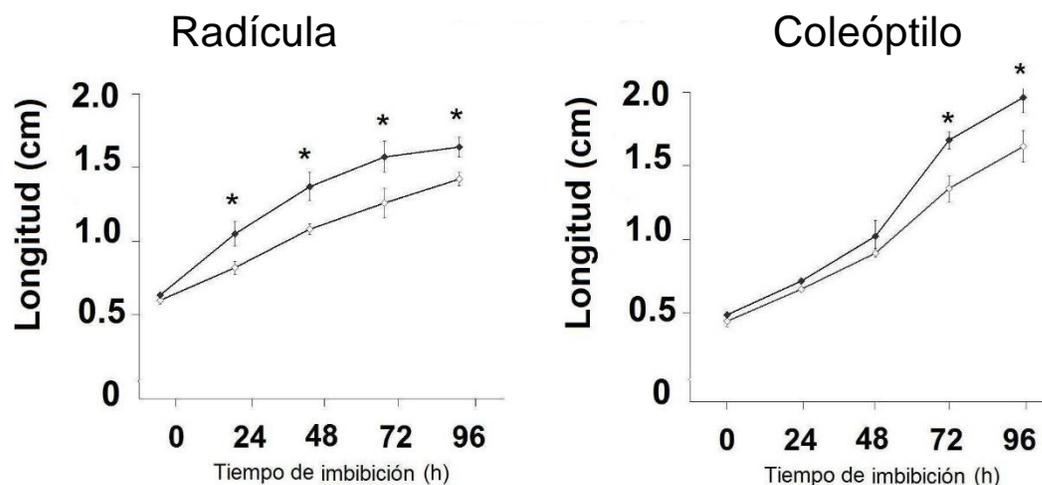


Figura 10. Efecto de la insulina en el crecimiento de ejes embrionarios. Se imbibieron lotes de 50 semillas por 22 h se disectaron los ejes embrionarios y se incubaron por 2 h en medio MS (O) o MS + insulina $200 \mu\text{U mL}^{-1}$ (●). Posteriormente, se incubaron en MS a $26 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ en la oscuridad y se midió la longitud de coleóptilos y radículas cada 24 h. Los valores son promedio de tres experimentos independientes se expresan como longitud \pm DS. El * indica diferencias significativas entre tratamientos ($\alpha=0.05$).

7.2 Efecto de un pulso de insulina en la fosforilación de S6K y el reclutamiento en polisomas de prS6 en las radículas y coleóptilos de ejes embrionarios de maíz en germinación.

La vía de transducción de señales mediada por insulina ó ZmIGF en maíz, es muy similar a la reportada en animales. Como parte de la activación por insulina se induce la vía PI3K-TOR y se fosforila la proteína S6K en la treonina-389 (Meyuhas y Dreazen, 2009). Como se mencionó previamente, en este trabajo se encontró que las radículas de ejes embrionarios, responden al tratamiento con insulina creciendo más rápido y en mayor proporción que los coleóptilos. Por lo anterior, se decidió comparar el efecto de la insulina

en la fosforilación de la S6K, tanto en los coleóptilos como en las radículas. Para lo cual se realizó un western blot usando un anticuerpo específico que detecta la forma fosforilada de la treonina-389 en S6K (Reyes de la Cruz y cols., 2004).

Se utilizaron semillas de maíz imbibidas por 22 h, se disectaron los ejes embrionarios completos y se incubaron 2 h más en medio MS con y sin insulina como se describió en Materiales y Métodos. Posteriormente, se disectaron el coleóptilo, el nodo y la radícula del eje embrionario como se muestra en la Figura 11. El corte se realizó hasta terminada la incubación para evitar que respuestas de daño por herida interfirieran con los efectores. Se obtuvieron tres muestras independientes de cada tratamiento.

Se observó que la insulina indujo un incremento significativo de 30% en la fosforilación de la treonina 389 de la S6K en las radículas de maíz, dicho efecto no se observó en los coleóptilos (Figura 12a).

Por otro lado, se ha reportado que la insulina regula la síntesis de proteínas en ejes embrionarios de maíz mediante un mecanismo que incluye la acumulación de mensajes específicos en la fracción polisomal. Entre los mensajes reportados que se acumulan, se encuentran el de prS6 (Dinkova y cols., 2007). Debido a lo anterior, se analizó la acumulación en la fracción polisomal de los RNAm de prS6 en las radículas y los coleóptilos de maíz tratados con insulina y se compararon con el eje embrionario completo.

La expresión de prS6 se verificó usando PCR semicuantitativo. Para estudios de RT-PCR semicuantitativo es necesario estandarizar la temperatura de alineamiento, el número de ciclos de amplificación y la cantidad de ARN. En el caso de los genes estudiados (prS6 y GADPH como sonda de normalización), estudios previos del grupo de trabajo en maíz, se había establecido la temperatura óptima de alineamiento y el número de ciclos (Dinkova y cols., 2007). Por lo que solamente se estandarizó la cantidad de RNA para la mezcla de reacción utilizada.

En “Materiales y Métodos” se presentan las condiciones de temperatura, de alineamiento, número de ciclos y cantidad de RNA utilizadas para cada gen. A continuación se presentan la estandarización para el gen de normalización GADPH y prS6 como ejemplo

de los experimentos realizados para este fin. Para determinar la temperatura de alineamiento óptima, se utilizó un termociclador de gradiente donde se probaron 3 diferentes temperaturas: 55, 58 y 60°C. En todas las temperaturas se observó una sola banda bien definida (datos no mostrados). Se eligió la temperatura de 58°C para las pruebas de concentración debido a que varios de los genes de interés, tenían esa temperatura óptima de alineamiento. Posteriormente, se realizó una curva de concentración de RNA contra número de ciclos. En el caso de los coleóptilos, no se observó ningún cambio en la expresión de esta proteína mediada por insulina, mientras que en la radícula se observó un incremento en el reclutamiento de este mensaje de 30% (Fig 12b).

Estos resultados demuestran que la insulina tiene un efecto tejido específico ubicado en las radículas, por lo que los siguientes experimentos se realizaron únicamente en esta parte del eje embrionario.

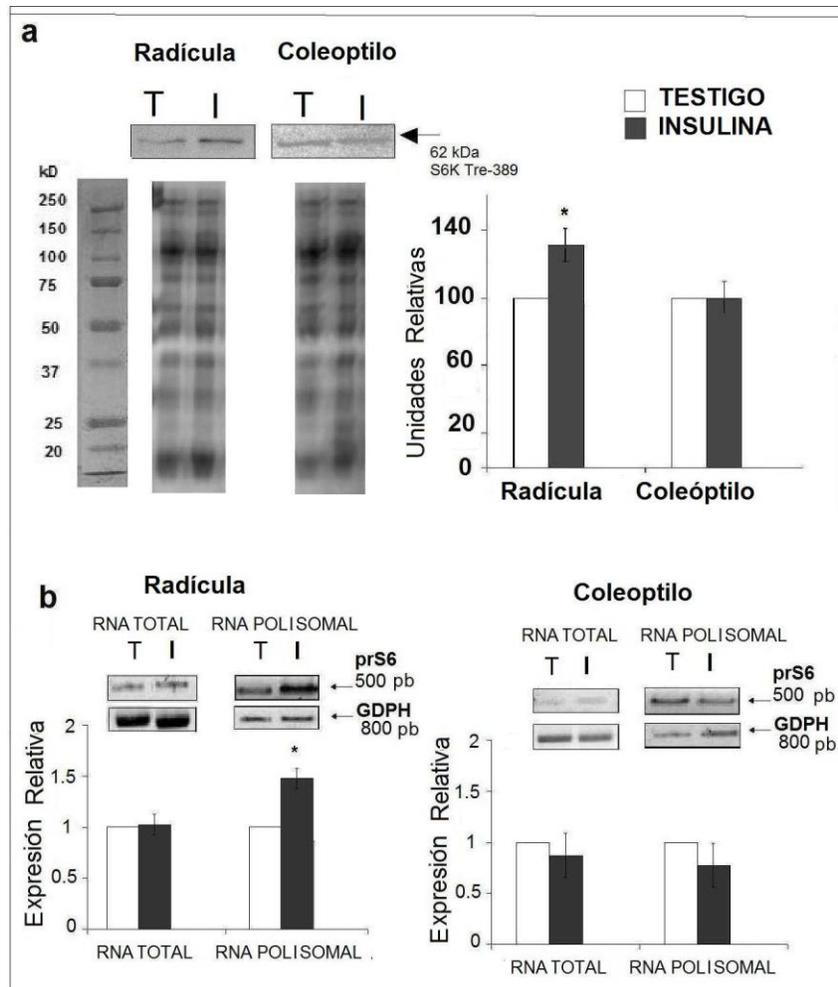


Figura 12. Efecto de la insulina en la fosforilación de la proteína S6K y la acumulación en la fracción polisomal de la prS6 en las radículas y coleóptilos de ejes embrionarios de maíz en germinación.

Las semillas se imbibieron por 22 h se disectaron los ejes y se incubaron por 2 h sin o con insulina 200 mUmL^{-1} y se separaron las radículas y los coleóptilos.

a) Determinación por western blot de la forma fosforilada de S6K tre-389 a partir de las proteínas totales (20 mg) aisladas de las radículas o los coleóptilos y separadas mediante SDS-PAGE; b) Expresión de la prS6 en radículas o coleóptilos determinada mediante RT-PCR semicuantitativo. Los valores son promedio de tres experimentos independientes, se expresan como Unidades relativas \pm SD. El * indica diferencias significativas entre tratamientos ($\alpha=0.05$).

7.3 Análisis del ciclo celular en radículas de ejes embrionarios y su estimulación por insulina durante la germinación.

El análisis del porcentaje de células en cada fase del ciclo celular se realizó mediante Citometría de flujo en el meristemo radicular que como se mencionó, es el primero en responder a insulina y en reiniciar el ciclo celular. Se disectaron los ápices de las radículas de ejes embrionarios sin imbibir (0 h) e imbibidos por 15, 18, 24 y 36 h, sin tratar o tratados con un pulso de 2 h de insulina, y se separaron los núcleos como se describió en Materiales y Métodos. Se usaron exclusivamente ápices de radículas para garantizar que se utilizaran solo la zona meristemática. En la Figura 13 se muestra el sitio de corte de los ápices y una muestra al microscopio de los núcleos obtenidos del gradiente de Percoll y teñidos con yoduro de propidio (PI por sus siglas en inglés propidium iodide).

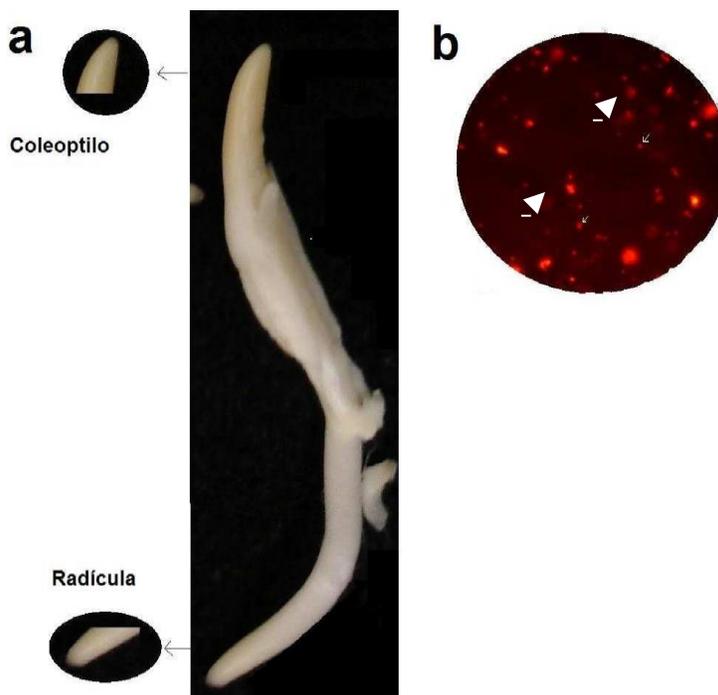


Figura 13. Ejes embrionarios usados en la Citometría de Flujo a) se muestra un eje embrionario de 36 h y los sitios de corte de radículas y coleóptilos, el tamaño aproximado de las puntas fue de 3-5 mm; b) Muestra de núcleos teñidos con IP, las flechas señalan los núcleos. 40X.

El análisis de Citometría de flujo se realizó en un FACScan, usando cada vez 500 μ L de núcleos. No existe un estándar universal para el análisis por Citometría de flujo en plantas, por lo que previo a los ensayos con las muestras el citómetro se realizó la calibración absoluta del Citómetro usando el kit BD™ DNA QC Particles (BD USA) y núcleos de hojas jóvenes de maíz (8 días germinación), obtenidos mediante la técnica descrita por Sliwinska y cols., (2005).

En la Figura 14 se muestra el histograma de hojas de maíz, la línea negra indica los núcleos, la línea roja muestra el ajuste con respecto al modelo propuesto por el equipo. Se ubicaron los puntos correspondientes a las células diploides (2C) y las células en replicación (4C). Los parámetros usados para determinar si las muestras experimentales se ajustaban al control de núcleos de hoja fueron el coeficiente de variación (%CV) y el valor de RCS.

El coeficiente de variación se refiere a la dispersión relativa de la población de núcleos y refleja la imprecisión del aislamiento, la tinción y la medición (Marie y Brown, 1992) y no deben ser mayores a 10, para el control de hojas fue de 6.27. El RCS, es el valor de ajuste entre el modelo proporcionado por el programa del citómetro y la muestra en este caso se verificó que tuviera un valor menor a 5. Todas las muestras utilizadas en el estudio, tuvieron en promedio un $\%CV \geq 10$ y un promedio de $RCS \geq 3.8$.

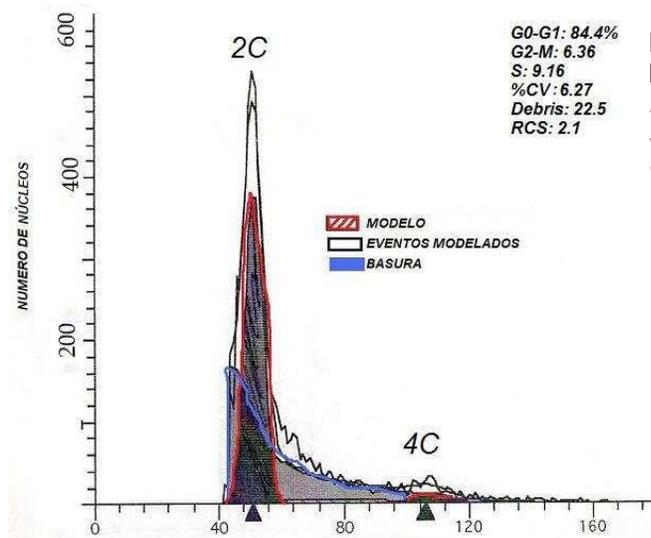


Figura 14. Histograma de núcleos de hoja de maíz. Se muestran con línea negra los núcleos (eventos) detectados y en rojo se destaca el modelo de comparación del equipo, en azul se muestra los desechos.

Una vez realizada la calibración se determinó el contenido de DNA en las semillas quiescentes (0 h de imbibición). El 88% de las células presentes en el ápice radicular se encontraron arrestadas en la transición G1-S (núcleos 2C) y el 12% de células restantes en la transición G2-M (núcleos 4C) (Figura 15). La relación 4C/2C fue de 0.14 (Tabla 1).

Durante la imbibición, en el tratamiento testigo, se observó un incremento de la relación 4C/2C a 0.38 a las 15 h, disminuyendo a tiempos posteriores (24 h) e incrementándose

nuevamente a 0.74 a las 36 h de germinación. En presencia de insulina, la relación 4C/2C se incrementó progresivamente durante el tiempo de tratamiento, presentando valores superiores a los del testigo. A las 18 h el incremento fue de 55%, a las 24 h de 228 % y de 122 % a las 36 h, con respecto al testigo correspondiente. Estos resultados indican que el incremento en el crecimiento de las radículas por efecto de la insulina se puede atribuir al menos en parte a su inducción de la proliferación celular en los ápices de las radículas de maíz en germinación (Tabla 1).

Con el objetivo de identificar como afecta la insulina al ciclo celular se determinó el porcentaje de núcleos en cada fase del ciclo (Figura 15). Se observó que el porcentaje de núcleos en G1 disminuyó durante la imbibición con respecto a las semillas sin imbibir, esta disminución fue significativamente mayor en presencia de insulina, a partir de las 24 h de imbibición, con un incremento paralelo en el porcentaje de núcleos en G2. La insulina también indujo un incremento en la fase S aparente a las 18 h de imbibición (Figura 15b). Estos resultados indican que la insulina estimuló a las células de las radículas arrestadas en la transición G1-S a continuar el ciclo celular.

Tabla 1.- Porcentaje de núcleos en 2C, 4C y relación 4C/2C en radículas de maíz.

Tiempo de germinación (h)	Porcentaje de núcleos		
	2C	4C	4C/2C
0	88	12	0.14
Testigo 15	72	28	0.38
18	85	15	0.18
24	85	15	0.17
36	59	41	0.70
Insulina 15	77	23	0.30
18	78	22	0.28
24	68	32	0.46
36	38	62	1.65

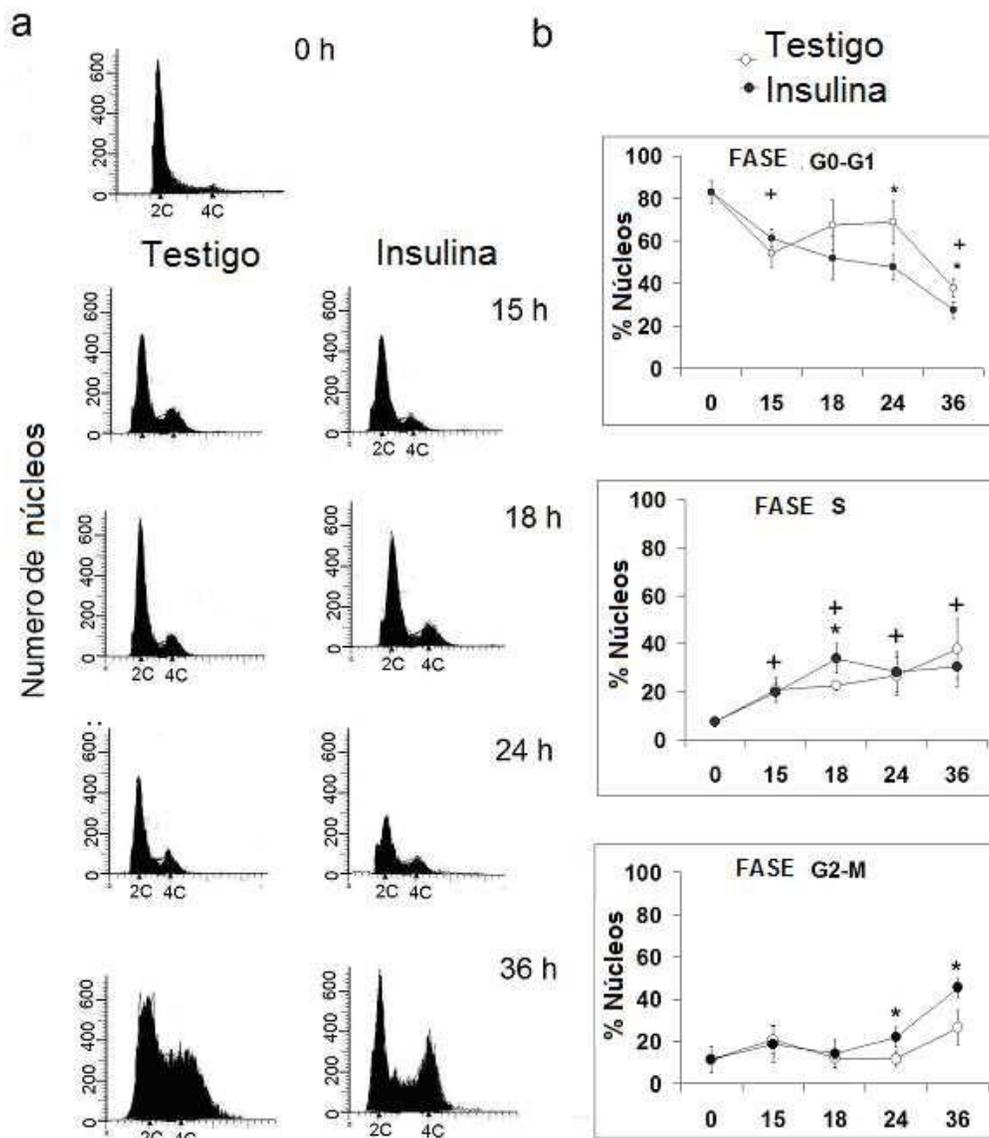


Figura 15. Citometría de flujo. Se muestra el contenido relativo de DNA en los núcleos provenientes de los ápices de radículas de semillas de maíz sin imbibir (0 h) o imbibidas por 15, 18, 24 y 36 h, tratados sin o con insulina $200 \mu\text{U mL}^{-1}$ durante las últimas 2 h de imbibición. a) Histograma representativo del contenido de DNA. El primer pico indica los núcleos 2C (G1) y el segundo pico los núcleos 4C (G2). Los resultados se obtuvieron con el Programa ModFit-L usando 30 000 eventos en cada determinación. b) Se muestran los cambios en el porcentaje de núcleos para cada fase del ciclo celular. Los valores son promedio de tres experimentos independientes se expresan como porcentaje de núcleos en cada fase \pm DS. El + representa diferencias significativas entre tiempos de imbibición y * representa diferencias significativas entre tratamientos ($\alpha=0.05$).

7.4 Efecto de la insulina sobre los niveles de transcritos de proteínas que participan en la transición G1-S del ciclo celular.

Los resultados anteriores mostraron que el efecto de la insulina en el crecimiento se localizó preferencialmente en las radículas. Por lo que se consideró relevante estudiar el efecto de la insulina en la expresión de los marcadores de la transición G1-S: E2F y PCNA mediante RT qPCR, esta última proteína depende su expresión del factor E2F,. Para lo cual, se obtuvo el RNA total y el RNA de la fracción polisomal de ápices de radículas de ejes embrionarios imbibidos por 15 y 24 h e incubados con insulina las dos últimas horas como se describió en Materiales y Métodos. Asimismo, se aisló el RNA de radículas de ejes embrionarios secos (0 h).

7.5 Estandarización de la RT- qPCR.

La estandarización de la amplificación mediante RT qPCR se realizó en varias etapas. Inicialmente se probaron los oligos usando amplificación semicuantitativa para determinar la temperatura óptima de alineamiento, el número de ciclos, y descartar alineaciones inespecíficas.

En la Figura 16 se muestran las curvas de expresión para E2F. Para determinar la temperatura de alineamiento óptima, se utilizó un termociclador de gradiente Corbett Research (Corbett Aust) donde se probaron 3 diferentes temperaturas: 50, 55 y 60 °C. En todas las temperaturas se observó una sola banda bien definida. Se eligió la temperatura de 58 °C para las pruebas de concentración debido a que se encontraba dentro del rango que se probó previamente y además coincidía con la temperatura óptima de alineamiento de los genes de interés.

Posteriormente, se realizó un ensayo para determinar el número de ciclos usando 300 ng de cDNA y a continuación se realizó una curva de concentración de cDNA usando 150, 350 y 600 ng en un volumen final de 25 μ L.

Los resultados muestran que hay un incremento lineal de la banda de amplificación con respecto al número de ciclos. Sin embargo, la pendiente de la recta es menor de 350 a 600 ng indicando que ésta concentración se encuentra cercana a la saturación, por lo que

se seleccionó la concentración de 250 ng y 28 ciclos para la amplificación de este gen. Se realizó el mismo procedimiento para los genes de PCNA y prS13. Los resultados fueron similares.

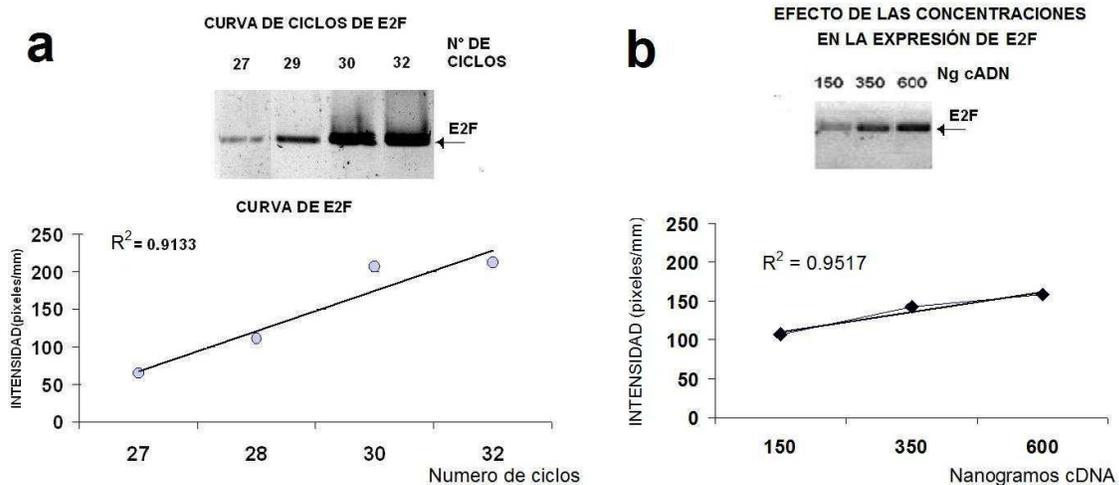


Figura 16. Estandarización de la expresión de E2FB por RT-PCR semicuantitativo. Se muestran en a) los cambios en la amplificación dependiendo del número de ciclos. En b) se muestra la expresión a diferentes concentraciones de cDNA en una PCR con 28 ciclos de amplificación.

Se pudo determinar a partir de los ensayos previos que E2F, PCNA y el gen de referencia prS13 mostraban un rango de amplificación lineal a una temperatura de 58 °C, con 250 ng cDNA, después de 28 ciclos de amplificación.

Para estandarizar la amplificación por qPCR a partir de las condiciones anteriores se realizaron curvas de eficiencia usando un purificado de cada uno de los genes estudiados. Dichas curvas permitieron determinar el comportamiento de los oligos durante la amplificación a diferentes concentraciones. La especificidad de los oligos se estableció mediante el análisis de la curva *melting*. La curva *melting* permite identificar la T_m (por sus siglas en inglés *melting temperature*) de los fragmentos amplificados de DNA, considerando a que la T_m es específica para cada fragmento amplificado, ya que es resultado del porcentaje G-C y el tamaño del amplicón. Se pueden distinguir dentro de un mismo PCR cada uno de los productos, los dímeros se observan a temperaturas menores a 70 °C del lado izquierdo de la curva. En la Figura I del Anexo se muestran las curvas *melting* (o desnaturalización) para E2F, PCNA y S13. Se observó un solo pico bien

definido, esto permitió demostrar que el diseño de oligos se realizó correctamente y que no había amplificaciones inespecíficas ni dímeros. La T_m de los productos fue de 82 °C para E2F, 79 °C para PCNA y 82 °C para prS13. En cada uno de los ensayos posteriores con las muestras experimentales se verificó que la *melting* del producto de amplificación coincidiera en temperatura con el observado para el purificado.

Finalmente, para determinar que ni el tratamiento con insulina, ni el tiempo afectarían la expresión del gen de normalización se realizaron curvas de amplificación para tres genes de referencia, el 18S, la ubiquitina y la prS13 y se compararon entre sí usando el programa geNorm. El software de geNorm es un algoritmo basado en las fórmulas descritas por Vandesompele y cols., (2002) para determinar el gen de referencia (*housekeeping*) más estable de entre un conjunto de genes candidatos. Para esto se calcula el factor de normalización de expresión del gen en cada muestra basada en la media geométrica de un número definido por el usuario de los genes de referencia. En cada caso el GeNorm proporcionó una gráfica en la que se observó cuál de los genes de referencia probados es más estable en las condiciones propuestas (tiempo o tratamiento con insulina).

Para validar los genes de referencia, se utilizó el RNA total de radículas de 0, 15, 18 y 24 h testigo y tratados con insulina. Se calcularon los valores de $\Delta\Delta Ct$ para las muestras y se evaluaron usando el GeNorm. Los resultados mostraron que 18S y prS13 tienen la misma estabilidad y el menos estable es ubiquitina. En la Tabla 2 se muestran los resultados de la comparación Ct y los valores de $\Delta\Delta Ct$ para cada gen. Los valores de Ct corresponden a ensayos que se realizaron por duplicado en muestras independientes con tres repeticiones para cada tiempo. Se observa que para 18S y prS13 los promedios de Ct tienen una desviación estándar de menos de un ciclo entre las muestras testigo e insulina, es decir la insulina no induce cambios en los niveles del mensajero. Los valores de $\Delta\Delta Ct$ de los genes de 18S y prS13 no varían ni a lo largo del tiempo ni con el tratamiento con insulina. Por el contrario, la expresión de ubiquitina sí varió con el tratamiento y durante el tiempo de imbibición, por lo que se descartó como gen de normalización. Al comparar los valores de expresión de los genes experimentales con 18S o prS13 se observó que los niveles de expresión obtenidos eran similares, por lo que para los experimentos finales se utilizó únicamente prS13 como gen de referencia.

Tabla 2. Validación de los genes de referencia.

H DE IMBIBICION	VALORES DE Ct						
	TESTIGO	INSULINA	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	PROMEDIO Ct*	DS*
18S							
0	3.82	3.80	-0.02	0.00	1.00	3.80	0.05
15	3.81	3.84	0.03	0.04	0.97		
18	3.72	3.86	0.14	0.16	0.90		
24	3.76	3.77	0.01	0.03	0.98		
UBIQUITINA							
0	20.30	20.45	0.15	0.00	1.00	20.69	0.83
15	20.41	20.37	-0.05	-0.19	1.14		
18	20.41	21.40	0.99	0.84	0.56		
24	19.79	22.43	2.64	2.50	0.18		
prS13							
0	18.37	19.50	1.13	0.00	1.00	19.36	0.41
15	19.43	19.51	0.08	-1.06	2.08		
18	19.43	19.47	0.03	-1.10	2.14		
24	19.67	19.53	-0.13	-1.27	2.41		

* Los valores corresponden al promedio de los Ct de las muestras testigo y tratadas con insulina

7.6 Expresión de E2F y PCNA.

Uno de los efectos mejor estudiados de la insulina en el eje completo es la acumulación del ARNm de prS6 en la fracción polisomal, estudios previos en nuestro grupo de trabajo indican que este efecto se ubica en la radícula, por lo que previo a los ensayos de qPCR, se determinó por PCR semicuantitativo dicha acumulación en las radículas de 24 h, en las muestras que posteriormente se analizaron por qPCR a manera de control positivo del tratamiento.

Los resultados se muestran en la Figura II del Anexo.

Para determinar si los mensajes de E2F y PCNA se encuentran almacenados en la semilla seca quiescente (0 h) se aisló el RNA total de radículas de semilla seca como se describió previamente. En este caso no se utilizó RNA polisomal debido a que en la semilla seca no existen ribosomas ensamblados (Bewley, 1997). Es importante comentar que en este caso la expresión era de tipo cualitativo (si está presente o no) ya que no se comparó contra ninguna otra condición o tejido.

En ensayos previos usando PCR semicuantitativo estos mensajes no pudieron ser detectados. En este trabajo usando PCR cuantitativo, se detectó amplificación para PCNA

en el ciclo 21 y para E2FB a partir del ciclo 22 (Figura 17). Estos resultados indican que ambos mensajes se encuentran en una proporción similar entre ellos en los ARNm almacenados en las semillas quiescentes.

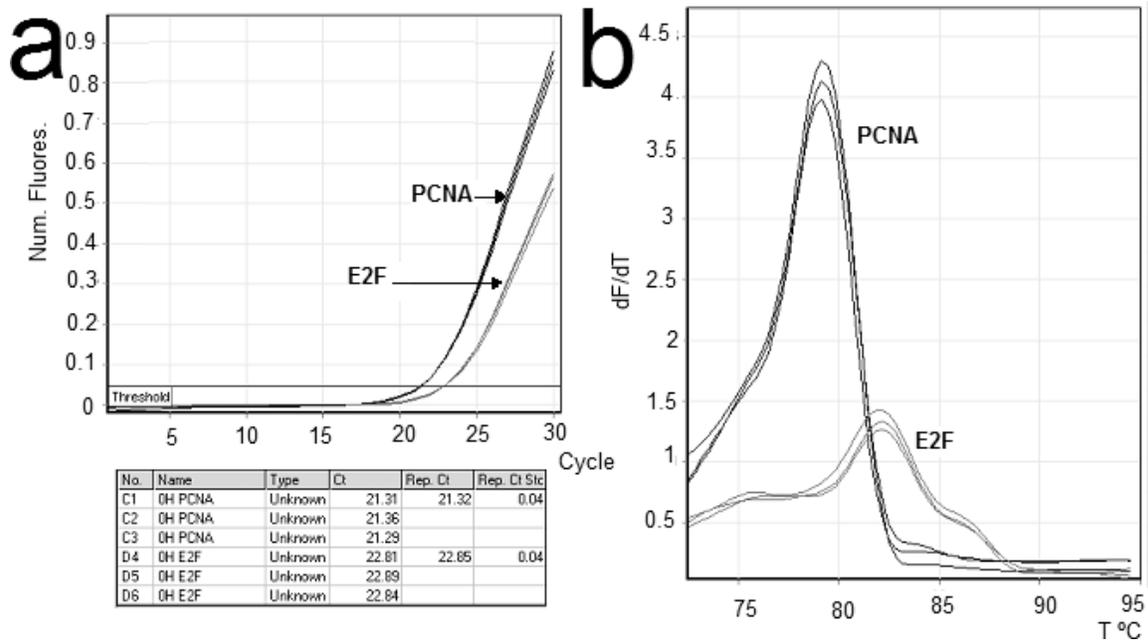


Figura 17. Estandarización de la expresión de E2F por RT-PCR cuantitativo. Se muestra en a) una amplificación representativa de E2F y PCNA en radículas de ejes embrionarios secos y en la parte inferior el Ct de cada uno. En b) se muestra la melting (desnaturalización) del producto de amplificación.

Los datos de Citometría de flujo indicaron que hay un incremento en la síntesis de DNA alrededor de las 18 h; por lo que se decidió observar el efecto de la insulina sobre la transcripción de los mensajes de E2F y PCNA, ya que como se mencionó previamente ambas proteínas participan en la transición G1-S. Se utilizaron radículas con 15 h y 24 h de imbibición. Se observó que el tratamiento con insulina incrementó la transcripción de ambos mensajeros con respecto al testigo en los dos tiempos analizados (Figura 18).

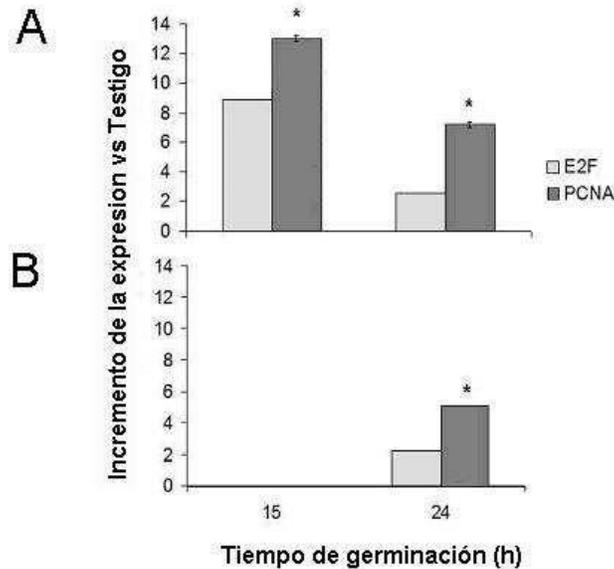


Figura 18. Efecto de insulina sobre los niveles de transcritos de E2FB y PCNA en radículas de maíz con 15 y 24 h de germinación.

Se muestra la expresión de los ARNm de E2FB y PCNA determinada mediante qRT-PCR usando a) ARN total y b) RNA acumulado en la fracción polisomal de los ápices de radículas de ejes embrionarios germinados por 15 y 24 h y tratados sin o con insulina $200 \mu\text{U mL}^{-1}$ durante las últimas 2h de imbibición. Los valores son promedio de tres experimentos independientes. Se expresan como número de veces de incremento en la expresión con respecto al testigo que se consideró como $1 \pm \text{DS}$. El * indica diferencias significativas entre tratamientos ($\alpha=0.05$).

A las 15 h de imbibición se observó un incremento de 8.8 veces en la transcripción de E2F y de 13 veces para PCNA. Sin embargo, en este tiempo de imbibición no se observó un incremento en la acumulación de ninguno de los dos mensajes estudiados en la fracción polisomal, lo que implica que el efecto de insulina fue a nivel transcripcional. A las 24 h el incremento en la transcripción por insulina fue de 2.6 veces para E2F y de 7.2 veces para PCNA, lo que explica el aumento observado de estos mensajes en la fracción polisomal (2.2 veces para E2F y de 5 veces para PCNA). Es interesante mencionar que el efecto de la insulina fue mayor en ambos casos para PCNA.

Estos resultados demuestran que la insulina regula la expresión de los genes E2F y PCNA a nivel transcripcional a partir de las 15 h de imbibición y de esa manera ejerce el control en la transición G1-S observada mediante Citometría de Flujo a las 18 h de tratamiento.

8. DISCUSIÓN.

La imbibición de la semilla reactiva el metabolismo e inicia la germinación que termina con la protrusión de la radícula. Entre los eventos más relevantes de la germinación se encuentra la reactivación del ciclo celular (Barroco y cols., 2005; Nonogaki y cols., 2010). Dicho proceso es requerido para el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Las semillas de maíz deshidratadas se encuentran en estado quiescente y sus células arrestadas en la transición G1-S (Vázquez-Ramos y Sánchez, 2003). Asimismo, el crecimiento y la división celular son estimulados por fitoreguladores como las auxinas y la benciladenina (Herrera y cols., 2000). Recientemente, se ha reportado en semillas de maíz, un factor semejante a insulina, denominado ZmIGF (Rodríguez-López y cols., 2010). En estudios previos, se reportó que la insulina produjo efectos similares al factor endógeno ZmIGF, estimulando la germinación y el crecimiento de ejes embrionarios de maíz, en la concentración utilizada en el presente trabajo (García Flores y cols., 2001; Sotelo y cols., 2010, Rodríguez-López y cols., 2010). Debido a su disponibilidad, en este trabajo se usó insulina como efector.

El tratamiento con un pulso de insulina usado en este trabajo, fue suficiente para inducir el crecimiento de los ejes embrionarios de maíz durante la germinación, en forma similar a la reportada previamente en tratamientos continuos con este efector (García-Flores y cols., 2001; Dinkova y cols., 2007). Nuestros resultados mostraron que la radícula tiene una respuesta mayor y más temprana que el coleóptilo. En estudios previos de dosis- respuesta con el factor endógeno ZmIGF, se observó también que las raíces tuvieron en todas las concentraciones probadas un crecimiento mayor al de los coleóptilos (Dinkova y cols., 2007).

En reportes previos se demostró que la insulina y el ZmIGF activan la vía de señalización PI3K-TOR en ejes embrionarios de maíz (Dinkova y cols., 2007). En este trabajo la activación de esta vía medida a través del incremento en S6K-tre 389 (Reyes de la Cruz y cols., 2004) y de la acumulación preferencial del mensaje de prS6 en la fracción polisomal se observó únicamente en las radículas y no en los coleóptilos. En este trabajo se demuestra por primera vez que la respuesta a insulina es diferencial en los partes del eje

embrionario, siendo las radículas las que presentan mayor capacidad de respuesta y más temprana a este efector (Figura 10a y 10b).

El crecimiento en las plantas está dado por incremento del tamaño y/o proliferación celular. El tamaño celular tiene un papel indirecto en la proliferación celular, ya que las células deben duplicar su tamaño antes de dividirse. La cantidad de proteínas que determinan en gran medida la biomasa celular, está influenciada por el número de ribosomas (Baserga, 2007) y en consecuencia la biogénesis de ribosomas esta fuertemente acoplada al crecimiento (Urban y cols., 2007). En estudios previos se demostró que la insulina indujo de manera preferencial en las radículas la síntesis *de novo* de proteínas ribosomales y de DNA; confirmando reportes previos en los que se encontró que los IGF's estimulan la proliferación, regulando la síntesis de DNA y proteínas reguladoras del ciclo celular como la ciclina D1 (Mairet-Coello y cols., 2009). Sotelo y colaboradores (2010) también han reportado que la insulina y el ZmIGF inducen la división celular en callos de maíz. En este sentido, los resultados de este trabajo corroboran reportes previos acerca del papel de la insulina en la coordinación del crecimiento y división celular mediante la vía S6K-TOR y además demuestran que las células responden al efecto inductor en forma selectiva como se muestra en este caso al observar los efectos en la radícula y los coleóptilos (Fig. 1 y 2)

Debido a lo anterior, se analizó mediante Citometría de flujo, el efecto de la insulina en las fases del ciclo celular en los meristemos radiculares, de 0 a 36 h de imbibición. Los resultados revelaron que la mayoría de las células estaban arrestadas en la transición G1-S, confirmando reportes previos en semillas de maíz (Sánchez y cols., 2005), *Arabidopsis* (Barroco y cols., 2005) y cebada (Gendreau y cols., 2008). En animales, también se ha reportado que esta transición es la única parte del ciclo celular que depende de factores de crecimiento (Blagosklonny y Pardee, 2002). Los resultados de este trabajo mostraron que a las 24 h de imbibición, la insulina indujo en los meristemos de las radículas de semillas de maíz en germinación, una disminución en el porcentaje de núcleos en G1 de 68.7 a 47.8 % (aproximadamente 30%) y un aumento en el porcentaje de núcleos en G2 de 11.8 a 22.1% (aproximadamente 87%), con respecto al testigo (Tabla 1, Fig. 7). Estos resultados confirman reportes previos en maíz en los que se encontró que la reactivación del ciclo celular durante la imbibición de ejes embrionarios, está asociada a una disminución del porcentaje de células en G1 y a un aumento en el porcentaje de núcleos

en G2, (Sánchez y cols., 2005). La inducción por insulina de la transición G1-S observada en este trabajo, es superior a la reportada previamente en maíz, para la hormona mitogénica sintética benciladenina, con la que se observó una disminución en el porcentaje de núcleos en G1 de 68.4 a 58.3 % (aproximadamente 14.7%) y un incremento en el porcentaje de núcleos en G2 de 19.9 a 29.7% (aproximadamente 67%) con respecto al testigo (Figura 16) (Sánchez y cols., 2005). Estos resultados demuestran que la insulina actuó como mitógeno en los meristemas de radículas de ejes embrionarios de maíz en germinación y son consistentes con reportes anteriores, en cultivos de células de maíz en suspensión, en los que se encontró que tanto la insulina como el ZmIGF, incrementan considerablemente el índice mitótico de las células (Sotelo y cols., 2010).

La inducción por insulina en la expresión de genes que regulan la transición G1-S por insulina, tales como E2F y PCNA se confirmó mediante RT-qPCR en las radículas de maíz. Se encontró que tanto a las 15 h como a las 24 h de imbibición, la insulina incrementó la transcripción de los mensajes de E2F y PCNA. Como resultado de lo anterior, a las 24 h de imbibición se observó un efecto de la insulina en la movilización de estos mensajes a los polisomas (Figura 18). En los últimos años se ha investigado intensamente el ciclo celular de plantas (Vázquez-Ramos y Sánchez, 2003; Barroco y cols., 2005). Se han estudiado los genes que participan en el reinicio y la progresión del ciclo celular. Los factores de transcripción E2F forman parte de la vía RBR-E2F, que participa en la apoptosis, la diferenciación celular y el desarrollo y tiene un papel crucial en la regulación de la expresión de genes que participan en la transición G1-S y en la replicación del DNA (Lammens y cols., 2009), acortando los tiempos de replicación y la división celular (Magyar y cols., 2005). Los factores E2F promueven la transcripción de un número de genes entre ellos PCNA (Sozzani y cols., 2010). El gen PCNA se ha correlacionado con la replicación de DNA, y en años recientes con la reparación del DNA y la remodelación de la cromatina, (Strzalka y Ziemienowicz, 2011). La mayor expresión de PCNA observada en este trabajo podría deberse a las distintas funciones propuestas para esta proteína en la célula. En este sentido, en reportes previos se encontró en semillas de maíz imbibidas por 15 h, incorporación de timidina que se asoció a eventos reparativos (Baíza y cols., 1989) y también se encontró que la hormona mitogénica benciladenina induce la acumulación de la proteína PCNA (Herrera y cols., 2000).

En este trabajo si se detectaron mediante RTqPCR los RNA mensajeros para PCNA y para E2F entre los mensajeros almacenados en la semilla quiescente a pesar de que en estudios previos de Sánchez y colaboradores (2005) no se encontraron los RNAm para PCNA entre los mensajes almacenados en la semilla, esto puede deberse a la sensibilidad de la técnica utilizada.

Este trabajo aporta una mayor comprensión del mecanismo por el que la Insulina/IGFs inducen el crecimiento en ejes embrionarios de maíz en germinación. Asimismo, indica que la respuesta a este efector es tejido específico siendo las radículas las que presentan una respuesta más temprana y mayor a la insulina. Los resultados obtenidos también apoyan que el crecimiento se debe al menos en parte, a la reactivación del ciclo celular, en particular acelerando la transición G1-S y esto al parecer ocurre al menos en parte por la inducción de los genes del factor de transcripción E2F y de la proteína PCNA, marcadores de dicha transición.

9. CONCLUSIONES.

Las conclusiones obtenidas de este trabajo son:

- El efecto de la insulina es tejido específico, localizándose en las radículas,
- El efecto de la insulina en la división celular se debe a que acelera la transición G1-S como se ha reportado en células eucariontes animales.
- El mecanismo que acelera el ciclo celular se debe en parte a la inducción de la expresión del factor de transcripción E2F y de genes de ciclo celular dependientes de E2F, tales como PCNA.

10. PERSPECTIVAS.

Considerando que la insulina acelera el crecimiento de manera tejida específica en la radícula sería interesante estudiar cuál es su efecto en las otras partes del eje embrionario (coleóptilo y el internodo) y determinar si la diferencia en la respuesta mantiene durante y después de la germinación. Para lo cual se propone

Determinar el efecto de insulina sobre la transcripción y traducción de las proteínas E2F y PCNA durante la germinación en el coleóptilo para determinar si su comportamiento es similar.

Asimismo, determinar los niveles de fosforilación de pRBR en coleóptilos y radículas de maíz imbibidas tratadas sin y con un pulso de insulina en diferentes estadios de germinación (15 y 24 h) para determinar las diferencias en la transición G1-S entre las dos partes.

11. REFERENCIAS.

- Angelovici R, Galili G, Fernie AR, Fait A.** 2010. Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. *Trends Plant Sci.* **15**:211-218.
- Ach RA, Durfee T, Miller AB, Zambryski PC, Hanley-Bowdoin L, Gouissem W.** 1997. RRB1 and RRB2 encode maize retinoblastoma-related proteins that interact with a plant D-type cyclin and geminivirus replication protein. *Mol. Cell. Biol.* **17**:5077–5086.
- Agredano-Moreno LT, Reyes de la Cruz H, Martínez-Castilla LP & Sánchez de Jiménez.** 2007. Distinctive expression and functional regulation of the maize (*Zea mays* L.) TOR kinase ortholog. *Mol. Biosys.***3**: 794-802.
- Averous J, & Proud CG.** 2006. When translation meets transformation: the mTOR story. *Oncogene.* **25**: 6423–6435.
- Baíza MA, Sánchez de Jiménez E.** 1989. Effect of auxin, 2,2 methyl-4-chloro-phenoxy. propionic acid on cell cycle regulation in maize embryonic tissues. *Physiol. Plant.* **75**: 261-266.
- Barroco R, Vanpoucke K, Bergervoet J, Deveylter L, Groot S, Inzé D, Englen G.** 2005. The role of the cell cycle machinery in resumption of postembryonic development. *Plant Physiol.* **137**: 127-140.
- Barroso I, Santisteban P.** 1999. Insulin induces early growth response gene (Egr-1) mediates a short term repression of rat malic enzyme gene transcription. *J. Biol. Chem.* **274**:17997-18004.
- Baserga R.** 2007. Is cell size important?. *Cell Cycle.* **7**: 814-816.
- Beltrán-Peña E, Ortíz-López A, Sánchez de Jiménez E.** 1995. Synthesis of ribosomal proteins from stored mRNAs early in seed germination. *Plant Mol. Biol.* **28**: 327-336.
- Bewley DJ.** 1997. Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell.* **9**: 1055-1066.
- Blagosklonny MV, Pardee AB.** 2002. The restriction point of the cell cycle. *Cell Cycle.* **1**:103-110.
- Buendía-Monreal M, Rentería-Canett I, Guerrero-Andrade O, Bravo-Alberto CE, Martínez-Castilla LP, García E, Vázquez-Ramos JM.** 2011. The family of maize D-type cyclins: genomic organization, phylogeny and expression patterns. *Physiol Plant.* doi: 10.1111/j.1399-3054.2011.01498.x.
- 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, Huggett 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. *Clin. Chem. Lab. Med.* **55**: 611-622.
- Chakravarty K, Wu SY, Chiang CM, Samols D, Hanson RW.** 2004. SREBP-1c and Sp1 interact to regulate transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in the liver. *J. Biol. Chem.* **279**: 15385-15395.
- Coelho CM, Dante RA, Sabelli PA, Sun Y, Dilkes BP, Gordon-Kamm WJ, Larkins BA.** 2005. Cyclin-dependent kinase inhibitors in maize endosperm and their potential role in endoreduplication. *Plant Physiol.* **138**:2323-2336.
- Collier E, Watkinson A, Cleland CF, Roth Jess.** 1987. Partial purification and characterization of an insulin-like material from spinach and *Lemna gibba* G3. *J. Biol. Chem.* **262**: 6238-6247.
- Dann SG, Selvaraj A, Thomas, G.** 2007. mTOR Complex1-S6K1 signaling: at the crossroads of obesity, diabetes and cancer. *Trend. Mol. Med.* **13**: 252-259.
- Dewitte W, Murray JAH.** 2003. The plant cell cycle. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **54**: 235-264.
- De Jager SM, Maughan S, Dewitte W, Scofield S, Murray JA.** 2005. The developmental context of cell-cycle control in plants. *Semin Cell Dev Biol.* **16**:385-396.
- De Veylder L, de Almeida Engler J, Burssens S, Manevski A, Lescure B.** 1999. A new D-type cyclin of *Arabidopsis thaliana* expressed during lateral root primordia formation. *Planta.* **208**:453–62.
- Dinkova TD, Reyes de la Cruz H, García-Flores C, Aguilar R, Jiménez-García LF, Sánchez de Jiménez E.** 2007. Dissecting the TOR–S6K signal transduction pathway in maize seedlings: relevance on cell growth regulation. *Physiol. Plant.* **130**: 1-10.
- Dinkova TD, Márquez-Velázquez N, Aguilar R, Lázaro-Mixteco PE & Sánchez de Jiménez E.** 2011. Tight translational control by the initiation factors eIF4E and eIF(iso)4E is required for maize seed germination. *Seed Sci. Res.* **21**: 85–93.
- Doerner, P.** 2007. Signal and mechanisms in the control of plant growth. *In* Plant Growth Signaling, Plant Cell Monogr. BogreL & Beemster G, ed. Springer –Verlag. Berlin. DOI 10.1007/7089_2007_142.
- Eberle D, Hegarty B, Bossard P, Ferre P & Fougelle F.** 2004. SREBP transcription factors: master regulators of lipids homeostasis. *Biochimie.* **86**: 839-948.
- Francis D.** 2007. The plant cell cycle 15 years on. *New Phytol.* **174**: 261-78.
- García Flores C, Aguilar R, Reyes de la Cruz H, Albores M, & Sánchez de Jiménez E.** 2001. A maize insulin-like growth factor signals to a transduction pathway that regulates protein synthesis in maize. *Biochem. J.* **358**: 95-100.

Gaudin V, Lunness PA, Fobert PR, Towers M, Riou-Khamlichi C. 2000. The expression of D cyclin genes defines distinct developmental zones in snapdragon apical meristems and is locally regulated by the Cycloidea gene. *Plant Physiol.* **122**:1137–1148.

Gendreau E, Romaniello S, Barad S, Leymarie J, Benech-Arnold R, Corbineau F. 2008. Regulation of cell cycle activity in the embryo of barley seeds during germination as related to grain hydration. *J. Exp. Bot.* **52**: 203–212.

Gómez E, Vázquez-Ramos J. 2003. Maize cDNA polimerase alpha is fosforilated by a PCNA associated cyclin-CDK complexes: effect of bencyl-adenine. *J. Plant Physiol.* **160**: 983-990.

Gutiérrez R, Quiroz-Figueroa F, Vázquez-Ramos J. 2005. Maize cyclin D2 expression, associated kinase activity and effect of phytohormones during germination. *Plant Cell. Physiol.* **46**: 166-173.

Hanada, K. & Hisashi, H. 2004. Interaction of a 43-kDa receptor-like protein with a 4kDa hormone-like peptide in soybean. *Biochem. J.* **43**: **12105-12112**.

Harbour JW, Dean DC. 2011. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Gen. & Develop.* **14**: 2393-2409.

Harrington LS, Findlay GM, Lamb RF. 2005. Restaining PI3K: mTOR signalling goes back to the membrane. *Trends. Biochem. Sci.* **30**: 35-41.

Herrera I, de la Paz Sánchez M, Molina J, Plasencia J & Vázquez-Ramos JM. 2000. Proliferating cell nuclear antigen expression in maize seed development and germination: Regulation by phytohormones and its association with putative cell cycle proteins. *Plant Physiol.* **110**:1034:1399.

Holdsworth MJ, Bentsink L, Soppe WWJ. 2008. Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *NewPhytol.* **179**: 33–54.

Hochegger H, Takeda S & Hunt T. 2008. Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**: 910-916.

Huntley R, Healy S, Freeman D, Lavender P, de Jager S. 1998. The maize retinoblastoma protein homologue ZmRb-1 is regulated during leaf development and displays conserved interactions with G1/S regulators and plant cyclin D (CycD) proteins. *Plant Mol. Biol.* **37**:155–69.

Inzé D, De Veylder L. 2006. Cell cycle regulation in plant development. *Annu Rev Genet.* **40**:77-105.

Jorgensen P, Tyers M. 2004. How cells coordinate growth and division. *Curr. Biol.* **14**:1014-1027.

Jugenheimer RW. 1988. El maíz. Variedades mejoradas, métodos de cultivo y producción de semillas. Limusa. D.F. México. Pp 51- 72.

Karp, G. 2000. Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos. McGraw-Hill Interamericana, México.

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

Lammens T, Li J, Leone G, De Veylder L. 2009. A typical E2Fs: new players in the E2F transcription factor family. *Trends. Cell Biol.* **19**: 111-118.

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

Magyar Z, De Veylder L, Atanassova A, Bakó L, Inzé D, Bogre L. 2005. The role of the Arabidopsis E2FB transcription factor in regulating auxin cell division. *Plant Cell.* **17**: 2527-2541.

Marie D, Brown S. 1993. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biol Cell.* **78**: 41-51.

Masubelele L, Dewitte W, Mengues M, Maughan S, Collins C, Huntley R, Nieuwland J, Scofield S, Murray J. 2005. D- Type cyclin activated division in the root apex to promote seed germination in Arabidopsis. *PNAS.* **103**: 15694-15699.

Mathews, H, Ahern & Sonenberg N. 2000 eds. Cold Spring Harbor. New York: Cold Spring Harbor Press. Pp. 31-69.

Meijer M, Murray JAH. 2000. The role and regulation of D-type cyclins in the plant cell cycle. *Plant Mol. Biol.* **43**: 621–633.

Meyuhas O & Drazan A. 2009. Ribosomal protein S6 kinase: from TOP mRNAs to cell size. *Prog Mol Biol Transl Sci.* **90**: 109-153.

McKinnon CM, Ravier MA, Rutter GA. 2006. FoxO1 is required for the regulation of preproglucagon gene expression by insulin in pancreatic α -(TC1-9)cells. *J. Biol. Chem.* **281**: 39358-393369.

Moreno CP. 1996. Vida y obra de granos y semillas. Col. La ciencia desde México 146. Fondo de cultura económica. México.

Mounier C, Posner BI. 2006. Transcriptional regulation by insulin: from the receptor to the gene. *Can J Physiol Pharmacol.* **84**: 713-724.

Nakae J, Kitamura T, Ogawa W, Kasuga M, Accili D. 2001. Insulin regulation of gene expresión through the forkhead transcription factor foxo (Fkhr) requires kinases distinct from AKT. *Biochem. J.* **40**: 11768-11776.

Nardmann J & Werr W. 2009. Patterning of the Maize Embryo and the Perspective of Evolutionary Developmental Biology. *In Handbook of Maize: Its Biology*, J.L. Bennetzen and S.C. Hake (eds.) Springer Science and Business Media. CA. USA pp 105-118.

Nonogaki H, Bassel GW, Bewley JD. 2010. Germination, Still a mystery. *Plant Sci.* **179**: 574-581.

Oakenfull EA, Riou-Khamlichi C & Murray JAH. 2002. Plant D-type cyclins and the control of G1 progression. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **357**: 749–760.

Patursky-Polischuk I, Stolovich-Rain M, Hausner-Hanochi M, Kasir J, Cybulski N, Avruch J, Rüegg MA, Hall MN, Meyuhas O. 2009. The TSC-mTOR pathway mediates translational activation of TOP mRNAs by insulin largely in a raptor- or rictor-independent manner. *Mol. Cell Biol.* **29**: 640-649.

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. UNAM. D.F. México.

Proud CG. & Denton RM. 1997. Molecular mechanism for the control of translation by insulin. *J. Biochem.* **328**: 329-341.

Ramírez-Parra E, Fründt C, Gutiérrez C. 2003. A genome-wide identification of E2F-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant J.* **33**:801-811.

Raught B, Gingras A, Sonenberg N. 2001. The target of rapamycin (TOR) proteins. *PNAS.* **98**: 7037-7043.

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). *Biochem J.* **43**:533-539.

Rincón–Guzmán A, Beltrán Peña E, Ortiz López A, Sánchez de Jiménez E. 1998. Ribonucleoprotein particles of quiescent maize embryonic axes. *Plant. Mol. Biol.* **38**: 357-364.

Riou-Khamlichi C, Huntley R, Jacqmard A, Murray JAH. 1999. Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science.* **283**: 1541–1544.

Rodríguez-López CD, Rodríguez-Romero A, Aguilar R, Sánchez de Jiménez E. 2011. Biochemical characterization of a new maize *Zea mays* L. peptide growth factor. *Prot. Pep. Lett.* **18**: 84-91.

Ruvinsky I. & Meyuhas O. 2006. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends. Bioch. Sci.* **31**: 342-348.

Sánchez de Jiménez E. 2000. Protein synthesis in seed germination: connecting External cell signals with the ribosome. *In Seed Biology: Advances and Applications.* Eds. M. Black, K.J. Bradford and J. Vázquez –Ramos. CAB International. USA.

Sarbassov D, Ali S, Sabatini DM. 2005. Growing roles for the mTOR pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**: 596–603

Sánchez de Jiménez E, Aguilar R, López, S. 1981. Distinctive characteristics of protein síntesis in maize embryos during early stages of germination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **99**: 445-450.

Sánchez MP, Gurusinghe SH, Bradford KJ, Vázquez-Ramos JM. 2005. Differential response of PCNA and Cdk-A proteins and associated kinase activities to benzyladenine and abscisic acid during maize seed germination. *J. Exp. Bot.* **56**: 515-523.

Sánchez, M.D.P., Torres, A., Boniotti, M.B., Gutierrez, C & Vázquez-Ramos, J.M. 2002. PCNA protein associates to Cdk-A type protein kinases in germinating maize. *Plant Mol. Biol.* **50**: 167-175.

Sotelo R, Garrocho-Villegas V, Aguilar R, Calderón ME, Sánchez de Jiménez E. 2010. 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**: 578-586.

Sozzani R, Maggio C, Giordo R, Umana E, Ascencio-Ibañez JT, Hanley-Bowdoin L, Bergouïoux C, Cella R, Albani D. 2010. The E2F/DEL2 factor is a component of a regulatory and development in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.* **72**: 381-395.

Sliwinska E, Zielinska E, Jedrzejczyk I. 2005. Are seeds suitable for flow cytometric estimation of plant genome size?. *Cytometry.* **64**: 72-79.

Strzalka W & Ziemienowickz A. 2011. Proliferating cell nuclear antigen PCNA: a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Ann. Bot.* **107**: 1127-1140.

Suryadinata R, Sadowski M, Sarcevic B. 2010. Control of cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinase (CDK) substrates. *Biosci. Rep.* **4**: 243-255.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**: RESEARCH0034.1-11.

Vázquez-Ramos J, De la Paz SM. 2003. The cell cycle and seed germination. *Seed Sci. Res.* **13**: 113-130.

Willems E, Leyns L, Vandesompele J. 2008. Standardization of real-time PCR gene expression data from independent biological replicates. *Anal. Biochem.* **379**: 127-129.

Yoonseok K, Exton JH. 2004. Role of phospholipase D1 in the regulation of mTOR activity by lysophosphatidic acid. *J. FASEB.* **18**: 311-319.

Urban J, Soulard A, Huber A, Lippman S, Mukhopadhyay D, Deloche O, Wanke V, Anrather D, Ammerer G, Riezman H, Broach JR, De Virgilio C, Hall MN, Loewith R. 2007. Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell.* **5**: 663-674.

ANEXO 1

Tabla 1. Secuencias de oligos utilizados. Se muestra también el número de pares de bases del amplicón, así como el número de acceso reportado para el GenBank*

Gen	Secuencia	Número de pares de bases	Numero de acceso
PrS6	Fw: 5'-TGATGCTCTGGGTGAGGAGTTAAA-3' Rv: 5'-TTCCTTCAG CCTCTGGGCAAGAAG-3'	550	U92045
GA3PDH	Fw: 5'-CCTTGACCGCAGCCTTGATCCTACATC-3' Rv: 5' ACCCATCCTCGTTTCCTCCGTCTAG-3'.	800	X07156
E2FB	Fw: 5'-TCTCCTCAAATTGACTAACTA-3' Rv: 5'-ATAGGAGTTTAACTGATTGAT-3'	535	EU-973980
PCNA	Fw 5'-TGCCGACTTTTTCTCCTCTT-3' Rv: 5'-AAATCCATGGACACACAGCA-3'	146	NM_0011199 1.1
PrS13	Fw: 5'-AAAGAAGCTTCCACCCACCT-3' Rv: 5'-GATGAGGTCCGTTGTCCATT-3',	151	NM_0011122. 38
18S	Fw: 5' -GGAACTTACCAGGTCCAGAGATAG -3` Rv: 3' -GTGGGCCTAAACGGCCATA GTCCCTC	300	AF168884

* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Fosforilación de S6K tre-389.

1. Aislamiento de proteínas totales (Reyes de la Cruz y cols., 2004).

- a) Agregar al Buffer de extracción (HEPES 50 mM, pH 7.6, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 50 mM, Na_2VO_4 1 mM, Na_2MoO_4 1 mM, EDTA 4 mM, EGTA 20 mM, NaF 20 mM, β -glicerofosfato 80 mM, manitol 200 mM, DTT 2 mM, PMSF 0.2 mM y benzamidina 1 mM.) PVP al 0.7% p/v. Mantener en hielo
- b) Pulverizar el tejido con N_2 líquido y homogeneizar con 3mL de buffer de extracción por gramo de peso fresco.
- c) Centrifugar en un rotor de ángulo fijo a 19 000xg por 45 min. a 4 °C.
- d) Separar el sobrenadante (éste se considero el extracto crudo).
- e) Cuantificar las proteínas totales por el método de Bradford usando 10 μ L de muestra.
- f) Separar por SDS-PAGE 25 μ g de proteínas totales por 2 h a 120 v.
- g) Transferir las proteínas a una membrana de nylon usando la técnica de transferencia semiseca.
- h) Dejar secar la membrana y almacenar a -20°C .

2. Western blot para la S6K-tre 389.

- a) Descongelar la membrana a temperatura ambiente.
- b) Humedecer la membrana con PBS 1X en agitación por 10 min.
- c) Incubar con leche al 8% en PBS 1X-Tween 0.5 % (suficiente para cubrir la membrana) en agitación suave por 15 min. a temperatura ambiente.
- d) Lavar la solución anterior incubando con PBS 1X-Tween 0.5% (suficiente para cubrir la membrana) en agitación por 10 min. a temperatura ambiente.
- e) Repetir el paso anterior dos veces.
- f) Incubar por 3 h o una noche con el anticuerpo primario (20 ml/ 40 cm²) diluido 1:2000 en una solución de albúmina 1% p/v , PBS 1X-Tween 0.5% en agitación suave a 4°C.
- g) Lavar la solución anterior incubando con PBS 1X-Tween 0.5% (suficiente para cubrir la membrana) en agitación rápida por 10 min. a temperatura ambiente.
- h) Repetir el paso anterior.
- i) Lavar la solución anterior incubando con PBS 1X-Tween 0.5% (suficiente para cubrir la membrana) en agitación rápida por 5 min. a temperatura ambiente.

- j) Incubar 1 h con el anticuerpo secundario (20 ml/ 40 cm²) diluido 1:5000 en una solución de leche al 8% p/v, PBS 1X-Tween 0.5% en agitación suave a temperatura ambiente.
- k) Decantar la solución anterior y lavar dos veces manualmente con PBS 1X-Tween 0.5% (suficiente para cubrir la membrana) a temperatura ambiente.
- l) Incubando con PBS 1X-Tween 0.5% (suficiente para cubrir la membrana) en agitación rápida por 5 min. a temperatura ambiente.
- m) Lavar la solución anterior incubando con PBS 1X (suficiente para cubrir la membrana) en agitación suave por 5 min. a temperatura ambiente.

3. Revelado.

- a) El reactivo de quimioluminiscencia se almacena a 4°C antes de usar se deja llegar a temperatura ambiente.
- b) Mezclar volúmenes iguales (1.5 mL) de reactivo de quimioluminiscencia y del reactivo oxidante.
- c) Mantener a temperatura ambiente protegido de la luz.
- d) Decantar el PBS 1X y agregar la mezcla anterior por un costado. **NO AGREGAR DIRECTO A LA MEMBRANA.**
- e) Distribuir uniformemente en la membrana con una pipeta varias veces.
- f) Decantar y colocar la membrana entre dos micas de acetato.
- g) Revelar exponiendo 40 s a una película fotográfica en un *casette* para quimioluminiscencia Kodak BioMax Ms o por 2 min. en un fotodocumentador.

Aislamiento de RNA total con el reactivo de Trizol¹

1. Pulverizar el tejido con N₂ líquido en un mortero frío.
2. Añadir el reactivo de TRIZOL² (1 ml por cada 50-100 mg de tejido) y homogeneizar.
3. Incubar el homogenado 5 min. a temperatura ambiente o bien hasta que esté líquido³.
4. Centrifugar a 12 000xg por 10 min. a 4°C.
5. Separar el sobrenadante en un tubo nuevo añadir 200µL de cloroformo por ml de Trizol. Agitar 30 s e incubar 3 minutos a temperatura ambiente y centrifugar a 12 000xg por 15 min. a 4°C
6. Repetir paso anterior.
7. Separar el sobrenadante transparente en un tubo nuevo, añadir 250µL de isopropanol y 250µL de la mezcla de Citrato de sodio .8M/Cloruro de sodio 1.2M⁴ . Mezclar por inversión suave e incubar 10 minutos a temperatura ambiente
8. Centrifugar a 12 000xg por 10 min. a 4°C.
9. Desechar el sobrenadante.
10. La pastilla de RNA se lava con 1 ml de etanol al 75% v/v recién preparado y frío. Agitar con un vórtex hasta ver volar la pastilla⁵.
11. Centrifugar a 10 000xg por 10 min. a 4°C.
12. Desechar el sobrenadante.
13. La pastilla de RNA obtenida⁶ se seca al aire con una lámpara durante 20-30 min.
14. Agregar 50 µL de agua libre de RNA asas y resuspender. Almacenar a -70 °C

Aislamiento de RNA de la fracción polisomal.

- 1. Aislamiento de la fracción polisomal (Beltrán, y cols., 1995)¹.**

1 Todo el procedimiento se realiza usando material estéril y/o nuevo. Los morteros deben estar previamente enfriados a -20 °C.

2 Precaución, el fenol es corrosivo, no aspirar, ni tener contacto con la piel

3 Se puede parar aquí almacenando a -70° por un mes o varios días.

4 Todas las soluciones deberán prepararse con agua libre de RNAsas

5 Se puede parar y dejar la pastilla de RNA sin quitar el etanol a 4°C 1 semana o a -20 por un año

6 La pastilla es blanca, debe verse semitransparente, si se dejó secar demasiado es totalmente transparente, y muy difícil de resuspender en ese caso hay que agregar el agua y poner durante 5 min en un baño a 65 °Cy resuspender

- a) Pulverizar con N₂ líquido 0.75 -1g² de ejes embrionarios hasta obtener un polvo fino.
- b) Homogeneizar con 5 mL de buffer de extracción hasta obtener una pasta homogénea (*Tris HCl 200mM, pH9, KCl 200mM, MgCl₂ 35mM, EGTA 25mM, sacarosa 200 MM, PTE 2%^{*3} Heparina 0.5mg/mL* y β- Mercaptoetanol 100mM**). Incubar a temperatura ambiente hasta que se vuelva líquido.
- c) Centrifugar el homogeneizado a 12 000 xg por 15 minutos a 4°C (para eliminar núcleos y restos de tejido. Retirar cuidadosamente la capa de lípidos superior con un cotonete o pipeta pasteur estéril.
- d) Colocar el sobrenadante en un tubo de policarbonato de 10 mL con 5 mL de colchón de sacarosa 1.5M ⁴ deslizándolo por las paredes del tubo (si el colchón se rompe se deberá desechar el tubo).
- e) Pesar cada tubo hasta equilibrar los pesos. De ser necesario agregar más sobrenadante o buffer de aislamiento.
- f) Centrifugar en una ultracentrífuga refrigerada por vacío usando un rotor de ángulo fijo Ti 80 o Ti 75 y ≥300 micrones para centrifugas Beckmann a 50 000 xg por 3:30 h a 4 °C.
- g) Desechar completamente el sobrenadante⁵ y resuspender el pellet con la fracción polisomal en aprox. 500mL agua libre de RNAsas. Procesar inmediatamente o almacenar a -20 °C hasta su uso.

¹ NOTAS IMPORTANTES: Todo el material utilizado deberá ser esterilizado. Los reactivos prepararlos siempre con agua DEPC, excepto aquellos con Tris que se preparan con agua libre de RNAsas (miliQ).

Enfriar previamente las centrifugas. Todos los pasos se realizan en frío (hielo).

² El material mínimo es 0.5g manteniendo una adecuada proporción de buffer de aislamiento.

³ *Se agregan el mismo día

⁴ El colchón se prepara usando un buffer Tris HCl 40 mM, pH 9, KCl 40 mM, MgCl₂ 20 mM debe estar preparado antes de moler, para evitar la difusión de lípidos en el sobrenadante

⁵ No desechar a la tarja manejar como residuo peligroso debido a que el β-mercapto y el PTE son tóxicos. Los tubos de policarbonato deben enjuagarse inmediatamente con agua destilada únicamente, no usar detergentes ni abrasivos.

2. Aislamiento de RNA de la fracción polisomal.

- a) A 500µL de la fracción polisomal previamente obtenida añadir 20µL de EDTA 0.5 M pH 8.5 para una concentración final de 20mM y 25µL de SDS 10 % para una concentración final de 0.5%. Agitar en el vórtex 30 s.
- b) Añadir 500 µL de Fenol para ARN¹ y 100 µl de alcohol isoamílico (49:1 v/v) y agitar en el vórtex 30 s. Centrifugar a 10 000 rpm por 15 minutos a 4 °C.
- c) Recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo (aprox. 450 µl). Añadir 450 µL de Acetato de potasio 2M pH 4.8.
- d) Incubar en hielo por 45 minutos y centrifugar a 44 000 xg² por 20 min. a 4°C.
- e) Recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo, añadir 650 µL de Isopropanol helado, dar un pulso en el vórtex e incubar a -20 °C por 45 minutos y centrifugar a 10 000 xg por 20 minutos a 4°C.
- f) Lavar el pellet con 1 ml de etanol al 70% v/v y centrifugar a 10 000 rpm por 5 minutos a 4°C.
- g) Resuspender el pellet en aprox. 80 µl de agua libre de RNAsas y añadir 20 µL de cloruro de litio 10M. Agitar en un pulso en el vórtex. Incubar a 4°C por 2 horas³. Centrifugar a 13 000xg por 20 minutos a 4°C.
- h) El pellet se lava con 1 ml de etanol al 70%.v/v y se centrifuga a 13 000 xg por 5 min a 4°C.
- i) Repetir el paso anterior.
- j) Resuspender el pellet en 100 µl de buffer TEN (Tris 10 mM, EDTA 1mM-Cloruro de Sodio .1M, pH 8).
- k) Añadir 300 µL de Etanol absoluto Incubar a -20 °C por 15 min., mínimo y centrifugar a 13 000 xg por 15 minutos a 4°C.

¹ El fenol para RNA es fenol saturado con agua libre de RNAsas o TAE 1X en proporción 1:1 p/v . Una vez disuelto se agrega Hidroxiquinoleína 40 mM, para evitar la oxidación. Se alícuota la cantidad que se usara y se protege de la luz y se refrigera a 4°C y el resto se mantiene congelado a -20°C.

² Conversión rpm a xg: $\text{rpm} = (\sqrt{g/1.12 * r}) * 1000$ donde ,r= diámetro del rotor.En este caso se uso un Beckmann TA-10 con un r= 38.9 mm; por lo que se centrifuga a 31779 rpm.

³ Se pueden mantener las muestras a 4 °C por una noche

- l) El pellet se lava con 1 ml de Etanol al 70% y centrifugar a 13 000 xg por 5 min a 4 °C.
- m) El pellet se resuspende en 40-50 μ l de agua libre de RNAasas. Almacenar a -70 °C hasta su uso.

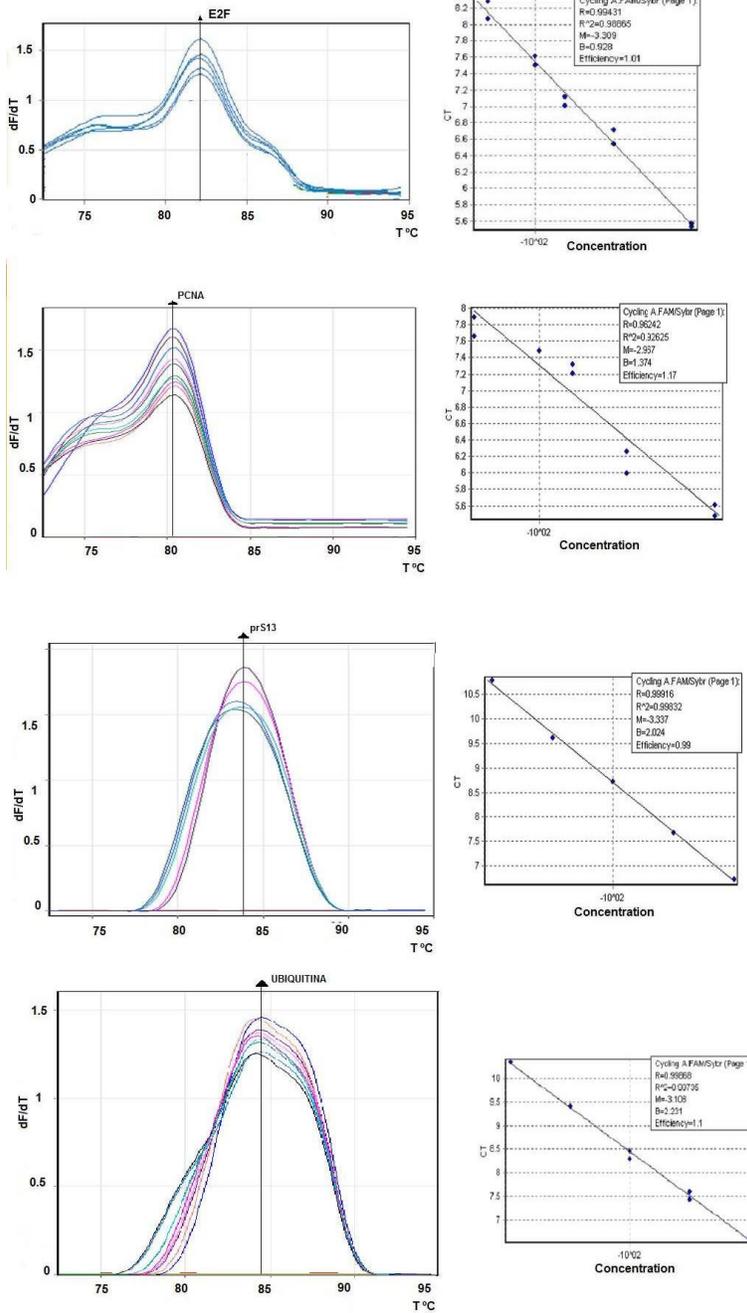


Figura I. Curvas de eficiencia de amplificación de E2F, PCNA, y los genes de referencia ubiquitina, 18S y prs13. Se muestra también la especificidad de los oligos mediante el análisis de la curva *melting* (o desnaturalización).

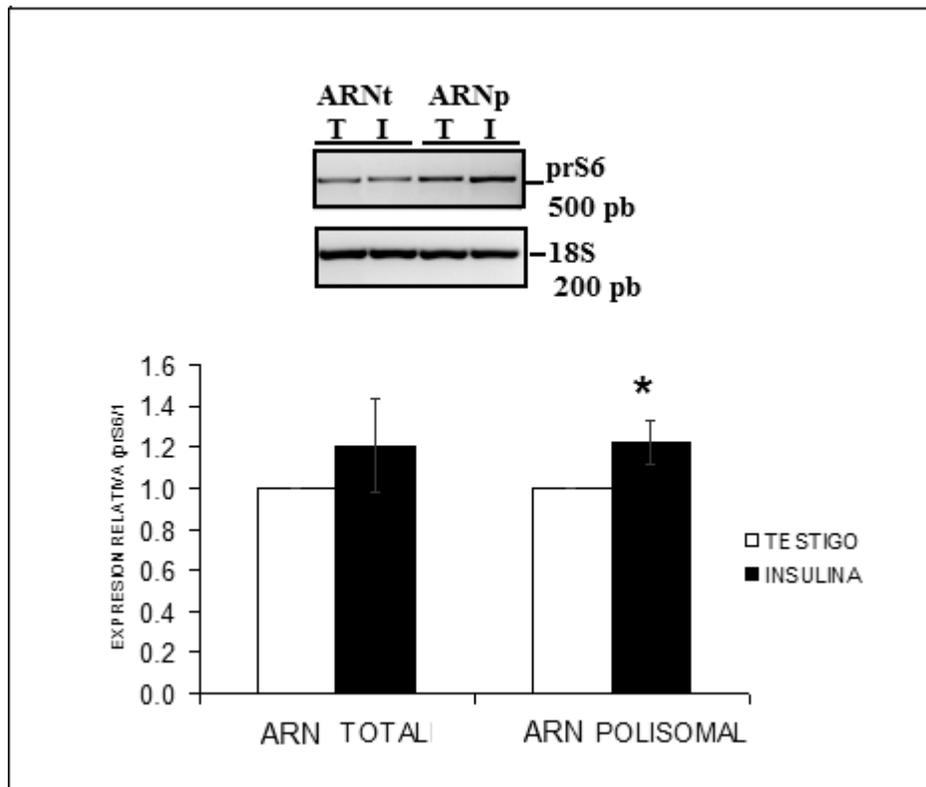


Figura II. **Expresión de prS6 en radículas.** Se muestra la expresión por RT-PCR semicuantitativo de la prS6 en radículas de maíz con 22 h de imbibición y las últimas 2 horas tratadas con insulina 200 μ U/mL. Se muestra una imagen representativa de las tres réplicas independientes y la gráfica de promedios y desviación estándar. El (*) indica diferencias significativas $\alpha=0.05$.

Effect of insulin on the cell cycle of germinating maize seeds (*Zea mays* L.)

Alma X. Avila-Alejandre¹, Fulgencio Espejel¹, Esmeralda Paz-Lemus², Edith Cortés-Barberena¹, Fernando Díaz de León-Sánchez¹, Tzvetanka D. Dinkova², Estela Sánchez de Jiménez² and Laura J. Pérez-Flores^{1*}

¹Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Av. San Rafael Atlixco 186, Col., Vicentina CP 09340, D.F. México; ²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, CP 04510, D.F. México

(Received 9 August 2012; accepted after revision 15 November 2012; first published online 11 January 2013)

Abstract

During seed germination, metabolism is reactivated, DNA is repaired and cell division is restarted in the meristems. The mechanisms that co-ordinate cell growth and division in maize embryonic axes during germination are not well understood. However, the presence of a factor similar to IGF (insulin-like growth factor) that accelerates germination has been reported. In the present work, the regulation of the cell-cycle restart by bovine insulin [which has been demonstrated to produce similar effects as insulin-like growth factor of maize (ZmIGF) in maize seeds] was studied in germinating embryonic axes. Our results showed that bovine insulin differentially stimulates growth, S6K phosphorylation, *S6rp* transcript accumulation on the polysomal fraction, as well as *de novo* DNA synthesis in the radicles and the coleoptiles of the embryonic axis. A stronger and earlier effect was observed in radicles compared to coleoptiles; therefore, the effect of insulin on the cell cycle of the root meristem was studied by flow cytometry. The G1–S transition was stimulated and cell proliferation was induced. Furthermore, it was determined by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) that bovine insulin increased E2F and PCNA (proliferating cell nuclear antigen) transcription after 15 h of germination and PCNA *de novo* synthesis at 15 h of germination. These results show that bovine insulin preferentially stimulates growth in the radicles of germinating embryonic axes and suggest that its effect on the G1–S transition and the activation of cell proliferation is mediated by the induction of E2F and PCNA transcription.

Keywords: E2F transcription factor, insulin-like growth factor in *Zea mays* (ZmIGF), proliferating cell nuclear antigen (PCNA), *Zea mays*

Introduction

The cell cycle in eukaryotic organisms is a very well-regulated process, divided in four phases: G1 (cell enlargement), S (DNA replication), G2 and M (cytokinesis) (Suryadinata *et al.*, 2010). In general, cells from differentiated animal tissues, such as hepatocytes, are arrested in the G1–S transition (Nelsen *et al.*, 2003). The mechanism of arrest involves the retinoblastoma proteins (Rb) which inhibit the activation of the E2F-DP transcription complex. This pathway is conserved in mammals and plants (Lammens *et al.*, 2009). E2F proteins are a family of transcription factors which regulate expression of genes that participate in the G1–S transition. Cyclin D and E (Nelsen *et al.*, 2003), cyclin-dependent kinases (CDKs), DNA polymerases, the proliferating cell nuclear antigen (PCNA, part of the replisome complex) (Strzalka and Ziemienowicz, 2011) and many other proteins related to DNA replication are among the proteins that participate in this transition and are regulated by E2F (Lydeard *et al.*, 2010).

Cyclin phosphorylation by mitogen-activated protein kinases (MAPKs) is induced in response to mitogens. This leads to the formation of CDK–cyclin complexes activating a CDK which, in turn, sequentially phosphorylates Rb, dissociating it from the E2F transcription factors. As a consequence, the transcription of genes regulated by E2F is stimulated, and transition to the S phase with DNA replication occurs (Lammens *et al.*, 2009).

In recent years, it has been reported that insulin and insulin-like growth factors (IGFs) show mitogenic

*Correspondence
Email: ljpf@xanum.uam.mx



activity in animals. In studies using primary cell cultures and hepatic cell lines, it was observed that insulin not only induced the transcription of genes related to lipid synthesis, transport and carbohydrate metabolism (Mounier and Posner, 2006; Chakravarty and Hanson, 2007), but also regulated transcription and translation of genes participating in the cell cycle, in particular cyclin D1 (Nelsen *et al.*, 2003; Frederick *et al.*, 2007), and had a mitogenic role during corticogenesis in rats (Mairet-Coello *et al.*, 2009). In addition, there are reports of hepatocyte cell cultures showing that IGFs play a role in homeostasis control, cell growth and development in a similar way as insulin (Sun *et al.*, 2007). One of the most studied effects of insulin/IGFs is the regulation of protein synthesis by activation of translational apparatus components through the PI3K-TOR pathway (Patursky-Polischuk *et al.*, 2009), including the translation of specific mRNAs such as those coding for ribosomal proteins, such as S6rp, and translation factors, such as eEF1 α (Meyuhas and Drazan, 2009). Furthermore, it has been reported that insulin-like growth factor I (IGF-I) increases ribosomal DNA transcription and ribosome biogenesis (Wu *et al.*, 2005).

Several studies in maize, *Arabidopsis thaliana* and other species suggest that the general mechanism for cell-cycle regulation is very similar to that described for animals (Vázquez-Ramos and Sánchez, 2003; Barroco *et al.*, 2005). However, recent studies in *Arabidopsis* have pointed at some differences, such as the absence of cyclin E in plants (Harashima and Schnittger, 2010) and the control of mitosis entry in plants (Dissmeyer *et al.*, 2010).

In the particular case of mature seeds, cells are dehydrated and acquire a quiescent state with very low metabolic activity. The imbibition process reactivates the metabolism and induces seed germination. The cell cycle is among the metabolic events that are reactivated during seed germination (Barroco *et al.*, 2005). In maize embryonic axes, cells are mainly arrested in the G1-S transition (Baiza and Sánchez de Jiménez, 1989). Among the elements participating in this transition, four kinds of cyclin D (Vázquez-Ramos and Sánchez, 2003), RBR protein homologues to the animal RBP (Sabelli *et al.*, 2005), as well as PCNA and several CDKs (Sánchez *et al.*, 2005) have been characterized. Additionally, the presence of E2F family protein homologue sequences has been identified through expressed sequence tag (EST) analysis (Alexandrov *et al.*, 2009).

The existence of insulin-like factors has been reported in spinach (Collier *et al.*, 1987) and bean (Oliveira *et al.*, 2004). In maize, a 5.7 kDa peptide with a structure similar to that reported for insulin and IGF-I has been purified, characterized and named insulin-like growth factor of maize (ZmIGF) (Rodríguez-López *et al.*, 2011). Even though insulin has not been found in

plants, it has been reported that this hormone and IGFs induce similar responses in plants; both effectors induce germination and growth of maize seeds (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1999; García-Flores *et al.*, 2001) and accelerate growth of sunflower (Goodman and Davis, 1993) and *Canavalia ensiformis* seedlings (Oliveira *et al.*, 2004); and in maize both ZmIGF and insulin enhance, by TOR pathway activation, the specific mobilization to polysomes and selective translation of mRNA related to protein synthesis, like S6rp, the translation initiation factor eIFiso4E (Dinkova *et al.*, 2007) and ribosomal proteins (as has been demonstrated recently by microarray analysis; Jiménez-López *et al.*, 2011). Also, it has been reported recently that ZmIGF/insulin induce mitogenic activation by increasing DNA synthesis in maize tissue cultures, as well as the mobilization into polysomes of mRNA coding for the proteins associated with the cell cycle, like PCNA and cyclin D1 (Sotelo *et al.*, 2010) which participate in the G1-S transition, as mentioned earlier.

The co-ordinating mechanisms for growth and cell division during maize embryonic axis germination are not known with precision, but several reports support the presence of a conserved signal transduction pathway, TOR-S6K, that co-ordinates growth and cell proliferation in eukaryotes (Garrocho-Villegas and Sánchez de Jiménez, 2012). Also, it is unknown if all the tissues of the embryonic axis respond in the same way to growth regulators. In this work, regulation of cell-cycle restart in germinating maize embryonic axes in the presence of insulin was studied. As previously mentioned, most of the cells in the embryonic axes of maize seeds are arrested in G1-S; therefore, it was considered relevant to study the effect of insulin on the expression of some of the genes involved in the G1-S transition, such as PCNA and E2F.

Materials and methods

Plant material and treatments

Maize (*Zea mays* L.) var. Chalqueño seeds were used in all experiments. All reagents were from Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri, USA) unless otherwise stated in the text. Seeds were disinfected, imbibed and treated with a pulse of 200 $\mu\text{U ml}^{-1}$ of bovine insulin for 2 h, as described by Buentello-Volante *et al.* (2010). This insulin concentration and time of treatment has been demonstrated previously to be effective in inducing maize seedling growth (Reyes de la Cruz *et al.*, 2004; Dinkova *et al.*, 2007; Buentello-Volante *et al.*, 2010). Due to its ready availability, insulin was used instead of ZmIGF to stimulate the maize embryonic axes. Germination times are specified for each experiment. Samples used to determine the insulin effect by flow cytometry were processed immediately. Samples to

analyse the insulin effect in the regulation of gene expression were frozen with liquid N₂ and stored at -70°C until their analysis. All experiments were done in triplicate.

Effect of insulin on radicle and coleoptile growth of growing maize embryonic axes

To determine the effect of insulin on growth of the embryonic axis, sets of 50 seeds were imbibed for 22 h in moisturized cotton. The embryonic axes were dissected and incubated with or without insulin for 2 h. At the end of the incubation period the axes were rinsed with distilled water and the length of the radicle and coleoptile was measured. Subsequently, embryonic axes were placed in 100-mm Petri dishes with filter paper moisturized with 5 ml of Murashige and Skoog medium (MS) and were incubated at 25 ± 2°C for 72 h, to reach a total incubation period of 96 h. Radicle and coleoptile lengths were measured every 24 h and the embryonic axes were transferred to a Petri dish with fresh MS medium.

Determination of S6K-Thr 389

Embryonic axes imbibed for 22 h and treated as previously described with or without insulin were used for this experiment. At the end of the incubation time, radicles and coleoptiles were separated. Total proteins from each part were extracted according to Reyes de la Cruz *et al.* (2004). The phosphorylation of ribosomal protein S6 kinase (S6K) was determined by Western blotting. Proteins (25 µg) were separated by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in a 12% w/v acrylamide gel and transferred to a Nylon membrane, Hybond-P (Amersham, California, USA), using a semi-dry transfer system at 8 mA cm⁻². The membranes were incubated with agitation overnight at 4°C using a primary antibody against human p70^{S6K} phosphorylated at threonine 389 (Sc-11 759, Santacruz Biotechnology Inc., California, USA) at a 1:20 dilution in 1 × phosphate-buffered saline (PBS), 0.5% v/v Tween and 8% w/v powdered milk. Subsequently, the membrane was washed twice with 1 × PBS, 0.5% v/v Tween and 8% w/v powdered milk at room temperature for 20 min each time and incubated for 1 h with peroxidase-conjugated anti-rabbit secondary antibody (Sc-2769, Santacruz Biotechnology Inc.) at 1:5000 dilution in 1 × PBS, 0.5% v/v Tween and 0.2% w/v bovine albumin fraction V.

Thereafter the membrane was washed twice with 1 × PBS, 5% v/v Tween and placed in 1 × PBS. The reaction was detected by chemiluminescence with Western Lighting® Plus-ECL (Perkin Elmer Inc., Massachusetts, USA) using a Blue x-Omat Kodak film.

De novo synthesis of DNA

Sets of maize seeds were imbibed for 36 h in moisturized cotton at 25 ± 2°C. Embryonic axes (2.5 g) were dissected and incubated for 12 h in 3 ml of MS media in the presence of 15 µCi ml⁻¹ of [³H]thymidine, with or without insulin as previously described. At the end of the treatment, axes were washed and the radicles and coleoptiles were separated for the subsequent determinations.

DNA was extracted from coleoptiles and radicles. The tissue was pulverized in liquid N₂ and homogenized in 5 ml of hot (65°C) extraction buffer [10% w/v cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB), 100 mM Tris, pH 8, 20 mM EDTA, 0.7 M NaCl]. The homogenate was incubated at 65°C for 1 h, an equal volume of chlorophorm:isoamylalcohol (24:1 v/v) was added and then it was centrifuged at 7500 g (Sorvall RC 5C Plus centrifuge with SS34 rotor type) for 5 min at 4°C. The aqueous phase was obtained and the volume was measured; 10% w/v CTAB in 0.7 M NaCl was added to the supernatant in a 1:10 ratio, mixed and centrifuged in the same conditions. The supernatant was recovered and the DNA was precipitated with 1% w/v CTAB in 50 mM Tris, 10 mM EDTA and incubated overnight at 37°C. The precipitate was centrifuged at 500 g for 5 min at 4°C. The supernatant was decanted and the pellet was resuspended in TE buffer (100 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 8). The DNA was re-precipitated with 0.6 volumes of cold isopropanol and incubated overnight at -20°C. The precipitate was centrifuged at 7500 g for 15 min at 4°C, the pellet was washed with 70% v/v ethanol and centrifuged again in the same conditions, the supernatant was decanted and the remaining ethanol was evaporated. Finally, the pellet was resuspended in 100 µl of TE buffer. DNA was quantified by absorbance at 260 nm and [³H]thymidine incorporation was determined in a Beckman scintillation counter using 50 µl of sample in 5 ml of Bray's solution (dioxane-methanol-ethylene glycol-naphthalene). Results are reported as cpm µg⁻¹ of DNA.

DNA content by flow cytometry

Sets of 100 maize seeds were imbibed for 13, 16, 22 and 34 h. For 0 h, embryonic axes dissected from the seed without imbibition were used. Entire embryonic axes were dissected and treated with or without insulin as described previously. At the end of the treatment, the radicles were separated. Nuclei were isolated from 0.5 g of 3-4 mm radicle apices which were fixed in acetone for 2 h, pulverized in liquid N₂ and homogenized in 5 ml of isolation buffer [10 mM Tris-HCl, pH. 7.2, 1 M sucrose, 5 mM MgCl₂, 2 mM β-mercaptoethanol and half a tablet of protease inhibitors COMPLETE® (Roche Diagnostics Deutschland GMBH, Mannheim, Germany) for 100 ml

of buffer]. The homogenate was filtered through Miracloth[®] (Calbiochem, California, USA) with a pore size of 22–25 μm , and subsequently centrifuged at 5000g for 10 min at 4°C. The pellet was resuspended in 1.5 ml of buffer [10 mM Tris-HCl, pH 7.2, 1 M sucrose, 5 mM MgCl₂, 2 mM β -mercaptoethanol, 0.5% v/v Triton X-100 and half a tablet of protease inhibitors COMPLETE[®] (Roche) for 100 ml of buffer]. Nuclei were purified in a discontinuous Percoll[®] gradient according to Luthe and Quatrano (1980). Nuclei were diluted in 1 ml of the isolation buffer and centrifuged at 10,000g for 20 min at 4°C. The pellet containing the nuclei was carefully resuspended in 360 μl of phosphate saline buffer composed of 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4, 1 \times PBS. Nuclei were incubated with 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ribonuclease A (Promega, Madison, Wisconsin, USA) for 30 min at room temperature; propidium iodide at a final concentration of 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ was added in the last 10 min and they were maintained in darkness. Nuclear DNA content was determined in a total volume of 500 μl by flow cytometry using a FACScan cytometer (Beckman, California, USA) equipped with an argon ion laser at 488 nm; fluorescence was detected in a range from 605 to 635 nm. Chicken leucocytes from the kit BD[™] DNA QC Particles (BD, Biosciences, San Jose, California, USA) and nuclei from maize leaf obtained as described by Sliwinski *et al.* (2005) were used as internal controls. Nuclear samples from radicles were read in the flow cytometer in duplicate with 30,000 events in each determination. The data were analysed with the MODFIT-LT[™] software for Mac 3.0. (Verity Software House, Topsham, Maine, USA) The amount of DNA is proportional to the fluorescence signal; 1C value represents the amount of DNA in the haploid chromosome without replication. The frequencies of nuclei in 2C and 4C were calculated with the following formulae: $[\text{nuclei } 2\text{C}/(\text{nuclei } 2\text{C} + \text{nuclei } 4\text{C})] \times 100$ and $[\text{nuclei } 4\text{C}/(\text{nuclei } 2\text{C} + \text{nuclei } 4\text{C})] \times 100$, respectively, according to Gendreau *et al.* (2008). The amount of DNA was expressed as the percentage of nuclei in each phase of the cell cycle.

Extraction of total RNA and polysomal fraction RNA from maize radicles and coleoptiles

Maize seeds were imbibed for 13 or 22 h and treated with or without insulin as described previously. After the treatment the radicles and coleoptiles were separated. Total RNA was isolated from 0.1 g of 2–4 mm long radicle or coleoptile apices pulverized in liquid N₂, using the Trizol reagent (BRL, Life Technologies, Invitrogen, Carlsbad, California, USA) with the modifications recommended for plant tissues. RNA from the polysomal fraction was obtained from 0.5 g of 2–4 mm long radicle or coleoptile apices. Polysomes and RNA were obtained by differential centrifugation following the

technique reported by Dinkova *et al.* (2007). Both total RNA and RNA from the polysomal fraction were resuspended in 50 μl of RNase-free water. RNA purity was determined by the A_{260nm}/A_{280nm} ratio and its concentration was quantified using a Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, USA). Sample integrity was verified using 2 μg of total RNA or RNA from the polysomal fraction according to the methodology described by Sambrook *et al.* (1989).

Analysis of the regulation of the transcript levels by RT-PCR and qRT-PCR

To verify the effect of insulin on mRNA accumulation in the polysomal fraction, *S6rp* was amplified by semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) from total RNA and RNA obtained from the polysomal fraction. The primers used for amplifying *S6rp* were FW: 5'-TGATGCTCTGGGTGAGGAGTAAA-3' and RV: 5'-TTCCTTCAGCCTCTGGCAAGAAG-3', obtaining an amplification product of 550 bp. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *G3PDH*, was used as reference gene; the primers for its amplification were FW: 5'-CCTTGACCGCAGCCTTGATCCTACATC-3' and RV: 5'-ACCCATCCTCGTTCTCCGCTCTAG-3', obtaining an amplification product of 800 bp. For each pair of primers the cycle number was adjusted for a linear range.

For the quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) reactions of *E2F* and *PCNA*, 2 μg of total or polysomal RNA were used. The retrotranscription reaction (RT) was performed with 1 U of the M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase; Promega, California, USA) enzyme and 1 μg of the RNA samples treated with 1.5 U of DNase (Promega) according to the manufacturer's instructions. After this, samples were stored at -20°C until further use.

Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was performed in a Rotor Gene 3000 (Corbett Research Quiagen, California, USA), using 1 μl of the RT reaction obtained earlier. The amplifications were performed with the One Step qPCR kit[®] (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). The primers used for the amplification were designed based on the following maize sequences: for *E2F* (Accession Number EU-973980), FW: 5'-TCTCCTCAAATTGACTAACTA-3', RV: 5'-ATAGGAGTTAACTGATTGAT-3', obtaining an amplification product of 535 bp; for *PCNA* (Accession Number NM_00111991.1), FW: 5'-TGCCGACTTTTCTCCTCTT-3', RV: 5'-AAATCCATGGACACACAGCA-3' and the amplification product was 146 bp long. *S13rp* (Accession number NM_0011122.38) was used as the reference gene, the primers for amplifying this sequence were FW: 5'-AAAGAAGCTTCCACCCACCT-3', RV: 5'-GATGAGGTCGTTGTCATT-3' and the amplifica-

tion product was 151 bp long. Amplification conditions were for *E2F*, 5 min at 94°C, 30 cycles 94°C for 30 s, 58°C for 30 s and 72°C for 50 s for *PCNA*, 5 min at 94°C, 30 cycles 94°C for 20 s, 58°C for 20 s and 72°C for 20 s. Before performing the assays for analysing the regulation of gene expression by insulin, it was checked that the amplification reaction efficiency for each of the analysed genes was between 95 and 100% according to Bustin *et al.* (2009). Also, it was verified that treatment with insulin and germination time did not affect the reference gene expression using the genNorm software version 3.5 (jvdesomp/genorm/">http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/). The reference gene, *S13rp*, was amplified in the same run using the mentioned conditions for each of the studied genes, without affecting its amplification efficiency. Results were standardized according to Willems *et al.* (2008).

De novo synthesis of PCNA protein

Sets of maize seeds were imbibed for 13 h on moisturized cotton at $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Embryonic axes (2.0 g) were dissected and incubated for 2 h in 3.5 ml of MS media with or without insulin $200 \mu\text{U ml}^{-1}$ in the presence of $450 \mu\text{Ci ml}^{-1}$ of [^{35}S]methionine. At the end of the treatment, axes were washed and radicles were separated. PCNA protein was isolated from radicles with $35 \mu\text{g}$ of maize PCNA antibody (Sc-7907, Santacruz Biotechnology Inc.) bonded to magnetic beads (Dynabeads[®], Invitrogen Life Technologies) following the kit instructions. [^{35}S]Methionine incorporation was quantified in a Beckman scintillation counter using $25 \mu\text{l}$ of sample in 5 ml of ACS[®] (Amersham Biosciences). The protein concentration was determined by the method of Bradford (1976) using a $15 \mu\text{l}$ aliquot of the sample and bovine serum albumin (BSA) as a standard. Results are reported as percentage of incorporation in relation to control tissue.

Statistical analysis

To obtain the parameters of descriptive statistics (mean and standard deviation), as well as to determine significant differences among treatments, the Dunnett test of mean comparison against a control, with a significance level of $\alpha \leq 0.05$, was used in the NCSS software (NCSS, Utah, USA).

Results

Effect of insulin on the growth of radicles and coleoptiles of germinating maize embryonic axes

It has been reported previously that treatment with bovine insulin or maize insulin-like growth factor

(ZmIGF) accelerates maize seed germination and growth (García Flores *et al.*, 2001). To determine the specific effect of insulin on different parts of the embryonic axis, an insulin pulse was applied. Axes were dissected from seeds imbibed for 22 h and treated with or without insulin for 2 h. The length of both the entire embryonic axis and the radicles and coleoptiles was measured every 24 h until 96 h. Embryonic axes treated with a pulse of insulin showed a significant increase of approximately 20% in growth after 24 h of treatment compared to the control, which was maintained during the entire period of the study (Fig. 1A). In radicles, the average effect of insulin treatment was about a 25% increase in growth from 24 h onward, while the coleoptile showed a significant effect in response to the treatment after 48 h, with an average of 12% increase compared to the control (Fig. 1B and C). These results suggest that the different parts of the embryonic axis respond in a different way to insulin and, in particular, the radicle showed an earlier and slightly higher response than the coleoptile. Based on these results, in subsequent experiments the insulin effects on both radicle and coleoptiles were analysed.

Effect of insulin on S6K phosphorylation and S6rp mRNA expression and accumulation in the polysomal fraction from radicles and coleoptiles

The signal transduction pathway activated by insulin or ZmIGF in maize is very similar to that reported for animals. As part of the activation by insulin, the PI3K-TOR pathway is induced and S6K is phosphorylated at threonine 389 (S6K-Thr 389) (Meyuhas and Dreazen, 2009). In the present work it was shown that radicles of embryonic axes respond to insulin treatment faster and in a higher proportion than coleoptiles. Therefore, the insulin effect on S6K phosphorylation was evaluated in radicles and coleoptiles by Western blotting using a specific antibody against the S6K phosphorylated at threonine 389 (Reyes de la Cruz, *et al.*, 2004). Insulin induced a significant increase of 30% in the S6K-Thr 389 phosphorylation in maize radicles, but this effect was not observed in coleoptiles (Fig. 2A). Also, in the maize radicles treated with insulin, accumulation of *S6rp* mRNA in the polysomal fraction was observed (Fig. 2B). In coleoptiles, no change was detected in the expression of the *S6rp* mRNA when treated with insulin.

Effect of insulin on de novo DNA synthesis in radicles and coleoptiles of germinating maize embryonic axes

Tissue growth can be the result of an increase of cell size and/or cell proliferation. However, in both cases proteins constitute the main component of the cell dry mass (Baserga, 2007). *De novo* DNA synthesis in

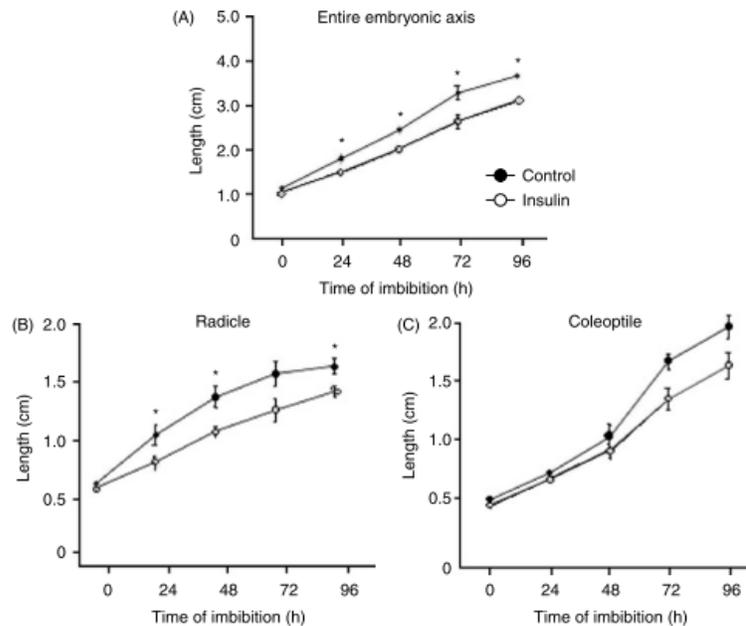


Figure 1. Effect of insulin on growth of maize embryonic axes during germination (A) length of the entire embryonic axis; (B) length of the radicle and (C) length of the coleoptile. Values are the averages of three independent experiments and are expressed as the length \pm SD. * Indicates significant differences among treatments ($\alpha = 0.05$).

radicles and coleoptiles of maize embryonic axes germinated for 36 h was measured using the radioactive precursor [^3H]thymidine. In control samples, the values of [^3H]thymidine incorporation were higher in radicle ($1536 \text{ cpm } \mu\text{g}^{-1} \text{ DNA}$) than in coleoptiles ($325.5 \text{ cpm } \mu\text{g}^{-1} \text{ DNA}$), showing that *de novo* DNA synthesis was 4.7-fold higher in the radicles during the studied period. Incubation with insulin increased [^3H]thymidine incorporation in the radicles ($2446 \text{ cpm } \mu\text{g}^{-1} \text{ DNA}$) by 60% as compared to the control ($1536 \text{ cpm } \mu\text{g}^{-1} \text{ DNA}$). In coleoptiles no significant differences in the incorporation of the radioactive precursor were observed in the insulin-treated axes compared to the control (Fig. 2C).

These results suggest that insulin has a tissue-specific effect since it preferentially induced *de novo* DNA synthesis in radicles. Therefore, subsequent experiments were only performed in this part of the embryonic axis.

Analysis of the cell cycle in radicles of maize embryonic axes and its stimulation by insulin during germination

The analysis to determine the percentage of cells in each phase of the cell cycle was performed by flow

cytometry in the root meristem which, as mentioned earlier, is the first to restart the cell cycle. Apices from radicles were dissected from embryonic axes without imbibition (0 h) and imbibed for 15, 18, 24 and 36 h and treated or non-treated (control) with a 2 h pulse of insulin. In quiescent seeds, at 0 h of germination, 88% of the cells present in the radicular apex were arrested in the G1-S transition (nuclei 2C) and the 12% of cells remaining were found to be in the G2-M transition (nuclei 4C). The 4C/2C ratio was 0.14 (Table 1). In the control samples, an increase in the 4C/2C ratio to 0.38 was observed after 15 h of germination, followed by a decrease after 24 h to 0.17 and increasing again to 0.70 after 36 h of germination. In the insulin-treated samples, the 4C/2C ratio followed the same pattern, increasing with time of germination. However, in general they presented higher values than the control samples. After 18 h, the increase was 55%, after 24 h 170% and 135% after 36 h, as compared to the corresponding control. These results show that the increase in radicle growth in response to insulin can be attributed, at least in part, to the induction of cell proliferation in radicular apices of germinating maize seeds (Table 1).

The percentage of nuclei in each phase of the cell cycle was determined with the purpose of identifying

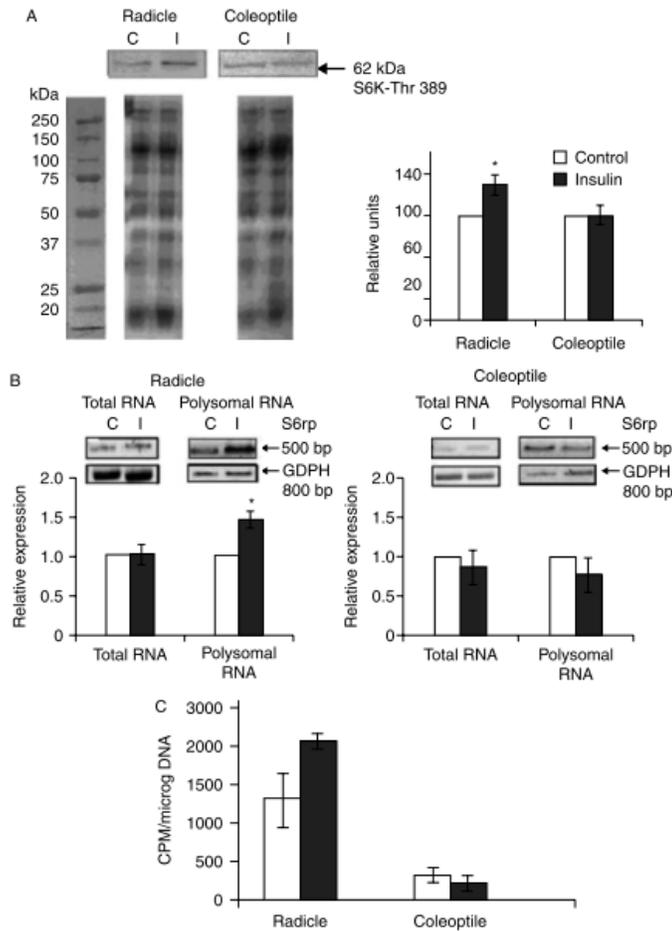


Figure 2. Effect of insulin on S6K phosphorylation, on *S6rp* mRNA accumulation in the polysomal fraction from radicles and coleoptiles and on *de novo* synthesis of DNA in radicles and coleoptiles of germinating maize embryonic axes. (A) Western blot of the phosphorylated S6K-Thr 389 form in total proteins (20 μ g) isolated from radicles and coleoptiles and separated by SDS-PAGE; (B) *S6rp* gene expression in radicles and coleoptiles as determined by semi-quantitative RT-PCR. Values are the average of three independent experiments and are expressed in relative units \pm SD. (C) *De novo* synthesis of DNA in radicles and coleoptiles. Values are the average of three independent experiments and are expressed as incorporation in cpm μ g⁻¹ of DNA \pm SD. * Indicates significant differences among treatments ($\alpha = 0.05$).

how insulin affects the cell cycle (Fig. 3). The percentage of nuclei in G1 decreased during germination, compared to the nuclei in this phase observed in non-germinating seeds. This decrease was significantly higher in the presence of insulin at 24 and 36 h of germination and there was a concomitant and significant increase of the percentage of nuclei in G2. Insulin also induced an increase in the nuclei in the S phase after 18 h of germination (Fig. 3B). These results suggest that insulin stimulates the radicular

cells arrested in the G1-S transition to continue the cell cycle.

Effect of insulin on the transcript levels of proteins that participate in the G1-S transition of the cell cycle

The results described in the previous sections show that the effect of insulin on growth of the embryonic

Table 1. Percentage of 2C, 4C nuclei and 4C/2C ratio. Radicle tips of embryonic axes isolated from dry seeds and germinated for 15, 18, 24 and 36 h of which the last 2 h consisted of incubation with or without $200 \mu\text{U ml}^{-1}$ of insulin. Frequencies of 2C and 4C nuclei were calculated with the following formulae: $[\text{2C nuclei}/(\text{2C nuclei} + \text{4C nuclei})] \times 100$ and $[\text{4C nuclei}/(\text{2C nuclei} + \text{4C nuclei})] \times 100$, respectively. Populations of 2C and 4C nuclei were measured in 30,000 nuclei

Time of germination (h)	Percentage of nuclei			
	2C	4C	4C/2C	
Control	0	88	12	0.14
	15	72	28	0.38
	18	85	15	0.18
	24	85	15	0.17
Insulin	36	59	41	0.70
	15	77	23	0.30
	18	78	22	0.28
	24	68	32	0.46
	36	38	62	1.65

axis was localized in the radicles. For that reason, it was relevant to study the effect of insulin on the gene expression of markers of the G1–S transition: *E2F* and *PCNA*, this last one dependent on *E2F*. For this purpose, total RNA was obtained from the radicular apices of embryonic axes imbibed for 15 and 24 h and incubated with insulin for the last 2 h. It was confirmed by qRT-PCR that the messages for *E2F* and *PCNA* are stored in the radicle of the dry quiescent seed. For *PCNA*, amplification was detected in the twenty-first cycle and for *E2F* it was detected in the twenty-second cycle. These results show that both transcripts are found in a similar proportion among the mRNA stored in quiescent seeds (data not shown). The presence of insulin increased the overall level of both mRNAs with respect to the control at 15 and 24 h upon seed germination (Fig. 4A). At 15 h, *E2F* increased 8.8-fold, while the increase in *PCNA* was 13-fold, indicating that the effect of insulin was probably at the transcriptional and/or stability levels. At 24 h, the increase in the overall mRNA level in response to insulin was 2.6-fold for *E2F* and 7.2-fold for *PCNA*. It is interesting to mention that the effect of insulin was greater for *PCNA* than for *E2F* at 15 and 24 h. To corroborate that the stimulation of *PCNA* mRNA levels by insulin results in an increase of this protein, *de novo* synthesis of *PCNA* protein was measured using a maize *PCNA* antibody. Insulin induced a stimulation of approximately 50% in *de novo* *PCNA* synthesis in germinating maize radicles at 15 h (Fig. 4B).

These results show that insulin regulates *E2F* and *PCNA* gene expression at the transcriptional level since 15 h of germination resulted in an increase of

PCNA protein levels (Fig. 4B), thus accelerating the G1–S transition as observed by flow cytometry after 18 h of germination.

Discussion

Dehydrated maize seeds are in a quiescent state and their cells are arrested in the G1–S transition (Vázquez-Ramos and Sánchez, 2003). Seed imbibition reactivates metabolism and initiates germination, which ends in radicle protrusion. Cell-cycle reactivation is among the most relevant events that occur during germination (Barroco *et al.*, 2005). This process is required for plant growth and development. Likewise, cell growth and division are stimulated by phytohormones such as auxins and benzyladenine (Herrera *et al.*, 2000). Recently, an insulin-like growth factor named *ZmIGF* was reported in maize seeds. This peptide exhibits a well-defined α -helical structure by circular dichroism analysis, similar to that reported for insulin or for insulin-like growth factor I (IGF-I) (Rodríguez-López *et al.*, 2011). Previous studies reported that insulin, at the concentration used in the present study, had similar effects as the endogenous factor *ZmIGF*, by accelerating germination and stimulating growth of maize embryonic axes (García-Flores *et al.*, 2001; Buentello-Volante *et al.*, 2010; Sotelo *et al.*, 2010; Rodríguez-López *et al.*, 2011).

The treatment with a pulse of insulin used in this work was sufficient to induce growth of maize embryonic axes during germination, in a similar way to that previously reported for continuous treatments with this effector (García-Flores *et al.*, 2001; Dinkova *et al.*, 2007). Our results show that the radicle presents an earlier and higher response than the coleoptile (Fig. 1). In previous dose–response studies with the endogenous factor *ZmIGF*, radicles also showed a higher growth than coleoptiles at all the tested concentrations (Dinkova *et al.*, 2007). It has been demonstrated that insulin and *ZmIGF* activate the TOR-S6K signalling pathway in maize embryonic axes (Dinkova *et al.*, 2007; Garrocho-Villegas and Sánchez de Jiménez, 2012). In the present work, the activation of this pathway was determined by phosphorylation of S6K-Thr 389 and the preferential accumulation of the *S6rp* transcript in the polysomal fraction, observed only in radicles but not in coleoptiles. In this work, it is shown for the first time that the maize seed response to insulin is differential, depending on the region of the embryonic axis, with the radicle as the target tissue with a higher capacity of response to the effector (Figs 1, 2A and B). Another possible explanation for these results is that insulin uptake and/or metabolism (degradation) are different for each region analysed. Future work is needed to clarify these possibilities. These results correlate with previous reports in which

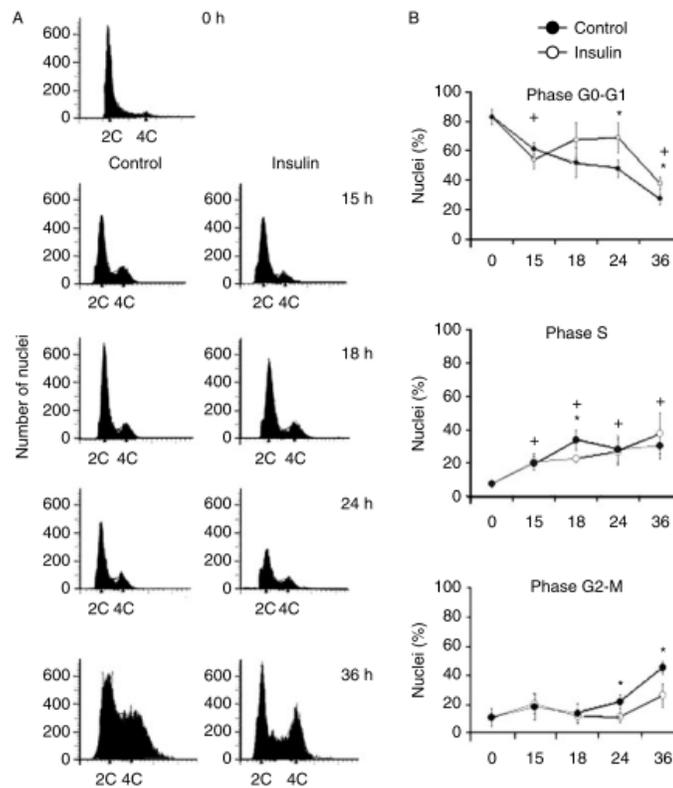


Figure 3. Flow cytometry. The relative content of DNA in the nuclei from the radicular apices of maize seed without imbibition (0 h) or imbibed for 15, 18, 24 and 36 h, treated with or without $200 \mu\text{U ml}^{-1}$ of insulin during the last 2 h of germination. (A) Representative histogram of the DNA content. The first peak indicates the 2C nuclei (G1) and the second peak the 4C nuclei (G2). The results were obtained with the MODFIT-L software using 30,000 events in each determination. (B) Changes in the percentage of nuclei in each phase of the cell cycle are shown. Values are the average of three independent experiments and are expressed as the percentage of nuclei in each phase \pm SD. $^+$ Indicates significant differences among germination times and * indicates significant differences among treatments ($\alpha = 0.05$).

a large body of physiological experiments has pointed at the root tip as the site for perception and integration of many of the signals, including detection of gravity, water and nutrients, during seed germination (Santisree *et al.*, 2011).

Plant growth is the result of an increase of cell size and/or cell proliferation. Cell size plays an indirect role in cell proliferation, since cells duplicate their size before dividing. The amount of proteins, which determines to a large extent the cell biomass, is influenced by the number of ribosomes (Baserga, 2007) and, as a consequence, ribosomal biogenesis is tightly coupled to growth (Urban *et al.*, 2007). Our results show that insulin induced DNA synthesis in a preferential manner (Fig. 2C), supporting previous observations that IGFs stimulated cell proliferation by

regulating synthesis of DNA and regulatory proteins of the cell cycle, such as cyclin D1 and G1-S transition (Mairet-Coello *et al.*, 2009). Sotelo *et al.* (2010) also reported that insulin or ZmIGF induces cell division in maize callus. In this regard, the results of the present work corroborate previous reports about the role of insulin in the co-ordination of cell growth and division by the TOR-S6K pathway (Dinkova *et al.*, 2007; Garrocho-Villegas and Sánchez de Jiménez, 2012) and, besides, they demonstrate that cells respond to the inducer effect in a selective manner, as shown when the effects were compared in radicles and coleoptiles (Figs 1 and 2).

Because of the previous observations, the effect of insulin on the cell-cycle phases in root meristems was analysed between 0 and 36 h of germination by flow

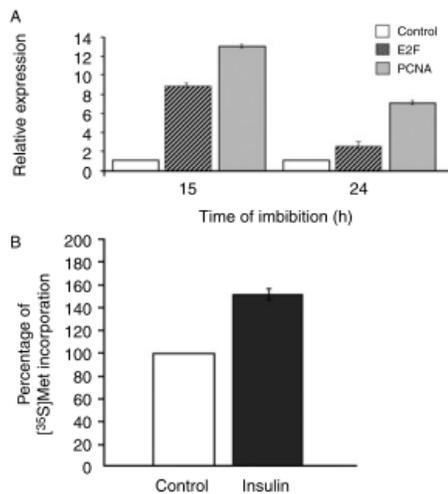


Figure 4. Effect of insulin on *E2F* and *PCNA* in maize radicles. (A) *E2F* and *PCNA* mRNA relative expression determined by qRT-PCR. Values are the average of three independent experiments and are expressed as the number of times the expression increased in with regard to the control, which was considered as 1. (B) *PCNA* *de novo* synthesis in radicles at 15 h of germination. Values are the average of three independent experiments and are expressed as percentage of incorporation in cpm mg^{-1} of protein \pm SD.

cytometry. The results revealed that most of the cells were arrested in the G1–S transition before imbibition, confirming previous reports in maize (Sánchez *et al.*, 2005), *Arabidopsis* (Barroco *et al.*, 2005) and barley seed (Gendreau *et al.*, 2008). In animals, it has been reported that this transition is the only part of the cell cycle that depends on growth factors (Blagosklonny and Pardee, 2002). The results of the present work showed that after 24 h of germination, insulin induced a decrease in the percentage of nuclei in G1 from 68.7 to 47.8% (approximately 30%) and an increase in the percentage of nuclei in G2 from 11.8 to 22.1% (approximately 87%) in the root meristems of germinating maize seeds, as compared to the control (Table 1, Fig. 3B). These results are consistent with previous studies showing that cell-cycle reactivation during germination of maize embryonic axes is associated with a decrease in the percentage of cells in G1 and an increase in the percentage of nuclei in G2 (Sánchez *et al.*, 2005). The induction of the G1–S transition by insulin observed in the present work was higher than the one reported for maize in response to the mitogenic synthetic hormone benzyladenine where a decrease in the percentage of nuclei in G1 from 68.4 to 58.3% (approximately 14.7%) and an increase in the percentage of the nuclei in G2 from 19.9% to 29.7%

(approximately 67%) was observed compared to the control (Sánchez *et al.*, 2005). These results show that insulin acts as a mitogen in the meristem of maize embryonic axis radicles during germination. This is consistent with previous observations in maize cells in suspension cultures, in which both insulin and ZmIGF considerably increased the cell mitotic index (Sotelo *et al.*, 2010), and in rat cells in which IGF-I promotes G1/S cell-cycle progression (Mairet-Coello *et al.*, 2009).

The induction by insulin of the expression of genes that regulate the G1–S transition, such as *E2F* and *PCNA*, was confirmed by qRT-PCR in maize radicles. Insulin increased *E2F* and *PCNA* transcription both after 15 and 24 h of germination (Fig. 4A). As a result, after 15 h of germination insulin had an effect on the *de novo* protein synthesis of *PCNA* (Fig. 4B). Over the past years, the cell cycle in plants has been intensively investigated (Vázquez-Ramos and Sánchez, 2003; Barroco *et al.*, 2005). Genes that participate in restarting and progression of the cell cycle have been studied. *E2F* transcription factors are part of the RBR–*E2F* pathway which participates in apoptosis, cell differentiation and development, and plays a crucial role in the regulation of the expression of genes involved in the G1–S transition and in DNA replication (Lammens *et al.*, 2009), shortening replication and cell division times (Magyar *et al.*, 2005). *E2F* proteins promote the transcription of several genes, including *PCNA* (Sozzani *et al.*, 2010). The *PCNA* gene has been correlated with DNA replication, and in recent years with DNA repair and chromatin remodelling (Strzalka and Ziemienowicz, 2011). The higher expression of *PCNA* compared with *E2F* (Fig. 4A), observed in this work, might be associated with the different functions in the cell suggested for this protein. In this regard, previous studies reported that in maize seeds imbibed for 15 h, thymidine incorporation was associated with repair events (Baíza and Sánchez de Jiménez, 1989); it was also found that the mitogenic hormone benzyadenine induced *PCNA* protein accumulation (Herrera *et al.*, 2000). In the present study, *PCNA* and *E2F* mRNAs were detected by qRT-PCR among the messengers stored in the quiescent seeds (data not shown), although in previous studies (Sánchez *et al.*, 2005) *PCNA* mRNA was not found among the transcripts stored in the seed, which might be due to the sensitivity of the technique used.

In conclusion, the results of the present work, using insulin as an effector, generate knowledge that can contribute to description of the possible mechanism by which endogenous ZmIGF induces growth in germinating maize embryonic axes. The insulin effect is tissue specific, with the radicle particularly sensitive to growth induction, DNA synthesis and cell proliferation. The results show that growth was due, at least in part, to reactivation of the cell cycle. The insulin effect on cell division is due to the acceleration of the G1–S

transition, as in eukaryotic animal cells (Thomas, 2002; Mairet-Coello *et al.*, 2009). In the present study we demonstrated that in maize this occurs, at least partially, through the induction of the E2F transcription factor and the E2F-dependent PCNA gene expression, as well as *de novo* protein synthesis.

Acknowledgements

This work forms part of the PhD dissertation by A.X.A.A. The research was supported by Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT; 61424), Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP; 34775) and partially by Dirección General Asuntos del Personal Académico PNP Programa Nacional de Posgrados (DGAPA-212910). We also thank CONACyT (18554) for their financial support to A.X.A.-A. for her PhD studies (185590, Programa Nacional de Posgrados (PNP) Experimental Biology Program). We thank Dr V. Garrocho-Villegas for her help in the establishment of methodologies; MSc R. Aguilar and B.E.A. Hernández-López for their technical assistance, and Dr Mónica Ponce for critical reading of this manuscript.

References

- Alexandrov, N.N., Brover, V.V., Freidin, S., Troukhan, M.E., Tatarinova, T.V., Zhang, H., Swaller, T.J., Lu, Y.P., Bouck, J., Flavell, R.B. and Feldmann, K.A. (2009) Insights into corn genes derived from large-scale cDNA sequencing. *Plant Molecular Biology* **69**, 179–194.
- Baiza, M.A. and Sánchez de Jiménez, E. (1989) Effect of auxin, 2-(2 methyl-4-chloro-phenoxy) propionic acid on cell cycle regulation in maize embryonic tissues. *Physiologia Plantarum* **75**, 261–266.
- Barroco, R.M., Van Poucke, K., Bergervoet, J.H., De Veylder, L., Groot, S.P., Inzé, D. and Engler, G. (2005) The role of the cell cycle machinery in resumption of post-embryonic development. *Plant Physiology* **137**, 127–140.
- Baserga, R. (2007) Is cell size important? *Cell Cycle* **7**, 814–816.
- Blagosklonny, M.V. and Pardee, A.B. (2002) The restriction point of the cell cycle. *Cell Cycle* **2**, 103–110.
- Bradford, M.M. (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.
- Buentello-Volante, B., Díaz de León-Sánchez, F., Rivera-Cabrera, E., Aguilar Caballero, R., Ponce-Valadez, M., Sánchez de Jiménez, E. and Pérez-Flores, L.J. (2010) Apparent cross-talk of two signaling pathways that regulate *Zea mays* coleoptile growth. *Phyton* **79**, 101–108.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J. and Wittwer, C.T. (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* **55**, 611–622.
- Chakravarty, K. and Hanson, R.W. (2007) Insulin regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase-C gene transcription: the role of sterol regulatory element-binding protein 1c. *Nutrition Reviews* **65**, S47–S56.
- Collier, E., Watkinson, A., Cleland, C.F. and Roth, J. (1987) Partial purification and characterization of an insulin-like material from spinach and *Lemna gibba* G3. *Journal of Biological Chemistry* **262**, 6238–6247.
- Dinkova, T.D., Reyes de la Cruz, H., García-Flores, C., Aguilar, R., Jiménez-García, L.F. and Sánchez de Jiménez, E. (2007) Dissecting the TOR–S6K signal transduction pathway in maize seedlings: relevance on cell growth regulation. *Physiologia Plantarum* **130**, 1–10.
- Dissmeyer, N., Weimer, A.K., Veylder, L.D., Novak, B. and Schnittger, A. (2010) The regulatory network of cell cycle progression is fundamentally different in plants versus yeast or metazoans. *Plant Signaling & Behavior* **5**, 1613–1618.
- Frederick, T.J., Min, J., Altieri, S.C., Mitchell, N.E. and Wood, T.L. (2007) Synergistic induction of cyclin D1 in oligodendrocyte progenitor cells by IGF-I and FGF-2 requires differential stimulation of multiple signaling pathways. *Glia* **55**, 1011–1022.
- García-Flores, C., Aguilar, R., Reyes de la Cruz, H., Albores, M. and Sánchez de Jiménez, E. (2001) A maize insulin-like growth factor signals to a transduction pathway that regulates protein synthesis in maize. *Biochemical Journal* **358**, 95–100.
- Garrocho-Villegas, V. and Sánchez de Jiménez, E. (2012) TOR pathway activation in *Zea mays* L. tissues: Conserved function between animal and plant kingdoms. *Plant Signaling & Behavior* **7**, 1–3.
- Gendreau, E., Romaniello, S., Barad, S., Leymarie, J., Benech-Arnold, R. and Corbineau, F. (2008) Regulation of cell cycle activity in the embryo of barley seeds during germination as related to grain hydration. *Journal of Experimental Botany* **52**, 203–212.
- Goodman, D.B.P. and Davis, W.L. (1993) Insulin accelerates the post germinative development of several fat-storing seeds. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **190**, 440–446.
- Harashima, H. and Schnittger, A. (2010) The integration of cell division, growth and differentiation. *Current Opinion in Plant Biology* **13**, 66–74.
- Herrera, I., Sánchez-de la Paz, M., Molinab, J., Plasencia, J. and Vázquez-Ramos, J. (2000) Proliferating cell nuclear antigen expression in maize seed development and germination: Regulation by phytohormones and its association with putative cell cycle proteins. *Physiologia Plantarum* **110**, 127–134.
- Jiménez-López, S., Mancera-Martínez, E., Donayre-Torres, A., Rangel, C., Uribe, L., March, S., Jiménez-Sánchez, G. and Sánchez de Jiménez, E. (2011) Expression profile of maize (*Zea mays* L.) embryonic axes during germination: translational regulation of ribosomal protein mRNAs. *Plant & Cell Physiology* **52**, 1719–1733.
- Lammens, T., Li, J., Leone, G. and De Veylder, L. (2009) A typical E2Fs: new players in the E2F transcription factor family. *Trends in Cell Biology* **19**, 111–118.
- Luthe, D.S. and Quatrano, R.S. (1980) Transcription in isolated wheat nuclei: I. Isolation of nuclei and

- elimination of endogenous ribonuclease activity. *Plant Physiology* **65**, 305–308.
- Lydeard, J.R., Lipkin-Moore, Z., Sheu, Y.J., Stillman, B., Burgers, P.M. and Haber, J.E.** (2010) Break-induced replication requires all essential DNA replication factors except those specific for pre-RC assembly. *Genes & Development* **24**, 1133–1144.
- Magyar, Z., De Veylder, L., Atanassova, A., Bakó, L., Inzé, D. and Bogre, L.** (2005) The role of the *Arabidopsis* E2FB transcription factor in regulating auxin cell division. *Plant Cell* **17**, 2527–2541.
- Mairet-Coello, G., Tury, A. and DiCicco-Bloom, E.** (2009) Insulin-like growth factor-1 promotes G(1)/S cell cycle progression through bidirectional regulation of cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in developing rat cerebral cortex. *Journal of Neuroscience* **29**, 775–788.
- Meyuhas, O. and Dreazen, A.** (2009) Ribosomal protein S6 kinase: from TOP mRNAs to cell size. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* **90**, 109–153.
- Mounier, C. and Posner, B.I.** (2006) Transcriptional regulation by insulin: from the receptor to the gene. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **84**, 713–724.
- Nelsen, C.J., Rickheims, D.G., Tucker, M.M., Hansen, L.K. and Albrecht, J.H.** (2003) Evidence that cyclin D1 mediates both growth and proliferation downstream of TOR in hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 3656–3663.
- Oliveira, A., Ribeiro, E.S., da Cunha, M., Gomes, V.M., Fernández, K. and Xavier-Filho, J.** (2004) Insulin accelerates seedling growth of *Canavalia ensiformis* (Jack bean). *Plant Growth Regulation* **43**, 57–62.
- Patursky-Polischuk, I., Stolovich-Rain, M., Hausner-Hanochi, M., Kasir, J., Cybulski, N., Avruch, J., Rüegg, M.A., Hall, M.N. and Meyuhas, O.** (2009) The TSC-mTOR pathway mediates translational activation of TOP mRNAs by insulin largely in a raptor- or rictor-independent manner. *Molecular and Cellular Biology* **29**, 640–649.
- Reyes de la Cruz, H., Aguilar, R. and Sánchez de Jiménez, E.** (2004) Functional characterization of a maize ribosomal S6 protein kinase (ZmS6K), a plant ortholog of metazoan p70 (S6K). *Biochemistry* **43**, 533–539.
- Rodríguez-López, C.D., Rodríguez-Romero, A., Aguilar, R. and Sánchez de Jiménez, E.** (2011) Biochemical characterization of a new maize (*Zea mays* L.) peptide growth factor. *Protein and Peptide Letters* **18**, 84–91.
- Sabelli, P.A., Dante, R.A., Leiva-Neto, J.T., Jung, R., Gordon-Kamm, W.J. and Larkins, B.A.** (2005) RBR3, a member of the retinoblastoma-related family from maize, is regulated by the RBR1/E2F pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **102**, 13005–13012.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual* (2nd edition). New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez, M.P., Gurusinge, S.H., Bradford, K.J. and Vázquez-Ramos, J.M.** (2005) Differential response of PCNA and Cdk-A proteins and associated kinase activities to benzyladenine and abscisic acid during maize seed germination. *Journal of Experimental Botany* **56**, 515–523.
- Sánchez de Jiménez, E., Beltrán-Peña, E. and Ortiz-López, A.** (1999) Insulin-stimulated ribosomal protein synthesis in maize embryonic axes during germination. *Physiologia Plantarum* **105**, 148–154.
- Santisree, P., Nongmaithem, S., Vasuki, H., Sreelakshmi, Y., Ivanchenko, M. and Sharma, R.** (2011) Tomato root penetration in soil requires a co-action between ethylene and auxin signaling. *Plant Physiology* **156**, 1424–1438.
- Sliwinska, E., Zielinska, E. and Jedrzejczyk, I.** (2005) Are seeds suitable for flow cytometric estimation of plant genome size? *Cytometry* **64**, 72–79.
- Sotelo, R., Garrocho-Villegas, V., Aguilar, R., Calderón, M.E. and Sánchez de Jiménez, E.** (2010) Coordination of cell growth and cell division in maize (*Zea mays*): Relevance of the conserved TOR signal transduction pathway. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* **46**, 578–586.
- Sozzani, R., Maggio, C., Giordo, R., Umana, E., Ascencio-Ibañez, J.T., Hanley-Bowdoin, L., Bergouiou, C., Cella, R. and Albani, D.** (2010) The E2F/DEL2 factor is a component of a regulatory and development in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **72**, 381–395.
- Strzalka, W. and Ziemienowicz, A.** (2011) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Annals of Botany* **107**, 1127–1140.
- Sun, H., Tu, X. and Baserga, R.** (2007) A mechanism for cell size regulation by insulin and insulin like growth factor-I receptors. *Cancer Research* **66**, 11106–11109.
- Suryadinata, R., Sadowski, M. and Sarcevic, B.** (2010) Control of cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinase (CDK) substrates. *Bioscience Reports* **4**, 243–255.
- Thomas, G.** (2002) The S6 kinase signaling pathway in the control of development and growth. *Biological Research* **35**, 305–313.
- Urban, J., Souldard, A., Huber, A., Lippman, S., Mukhopadhyay, D., Deloche, O., Wanke, V., Anrather, D., Ammerer, G., Riezman, H., Broach, J.R., De Virgilio, C., Hall, M.N. and Loewith, R.** (2007) Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell* **5**, 663–674.
- Vázquez-Ramos, J.M. and Sánchez, M.P.** (2003) The cell cycle and seed germination. *Seed Science Research* **13**, 113–130.
- Willems, E., Leyns, L. and Vandesompele, J.** (2008) Standardization or real-time PCR gene expression data from independent biological replicates. *Analytical Biochemistry* **379**, 127–129.
- Wu, A., Tu, X., Prisco, M. and Baserga, R.** (2005) Regulation of upstream binding factor 1 activity by insulin-like growth factor I receptor signaling. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 2863–2872.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00041

Matrícula: 204180139

EPECTO DE LA INSULINA EN LA REGULACION DE LA EXPRESION GENICA Y DEL CICLO CELULAR EN SEMILLAS DE MAIZ EN GERMINACION

En México, D.F., se presentaron a las 11:00 horas del día 26 del mes de febrero del año 2013 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. FERNANDO DIAZ DE LEON SANCHEZ
- DRA. EDITH CORTES BARBERENA
- DRA. TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA
- DRA. ESTELA SANCHEZ QUINTANAR



ALMA XOCHIL AVILA ALEJANDRE
ALUMNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: ALMA XOCHIL AVILA ALEJANDRE

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

REVISOR

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISION DE CBS

Ruben Roman Ramos
DR. RUBEN ROMAN RAMOS

PRESIDENTE

Fernando Diaz de Leon Sanchez
DR. FERNANDO DIAZ DE LEON SANCHEZ

VOCAI

Edith Cortes Barberena
DRA. EDITH CORTES BARBERENA

VOCAI

Tzvetanka Dimitrova Dinkova
DRA. TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA

SECRETARIA

Estela Sanchez Quintanar
DRA. ESTELA SANCHEZ QUINTANAR