



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
Unidad Iztapalapa

*DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD*

**“EFECTO DE LAS AUXINAS E INSULINA EN LA SÍNTESIS Y FOSFORILACIÓN  
DE PROTEÍNAS DE LA PARTE ÁEREA DE EJES EMBRIONARIOS DE MAÍZ (*Zea  
Mays L.*)”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO EN  
DOCTOR EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

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

M. en Biol. Exp. BEATRIZ BUENTELLO VOLANTE

**TUTOR:**

Dra. LAURA J. PÉREZ FLORES

**ASESORES:**

Dra. ESTELA SÁNCHEZ DE JIMÉNEZ

DR. JOSÉ LUIS GÓMEZ OLIVARES.

DR. HUMBERTO GONZÁLEZ MÁRQUEZ.

México, D. F.

Octubre de 2011

El Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa está evaluada como posgrado de Alto Nivel en el Programa Nacional de Posgrado del CONACyT con número de registro UAMI 309-0 y con la clave C/PFPN-2002-35-32.

Este trabajo fue realizado en:

**Laboratorio Bioquímica, Fisiología y Biología Molecular de Plantas.**

Edif. S-253 UAM Iztapalapa.

Durante el transcurso de mis estudios de Doctorado se me otorgó una beca por parte del CONACyT con número 153010.

## **Comité Tutorial:**

Dra. Laura Josefina Pérez Flores. Directora  
Departamento de Ciencias de la Salud UAM-Iztapalapa.

Dra. Estela Sánchez de Jiménez. Asesora.  
Departamento de Bioquímica Facultad de Química UNAM.

Dr. José Luis Gómez Olivares. Asesor.  
Departamento de Ciencias de la Salud UAM-Iztapalapa.

Dr. Humberto González Márquez. Asesor.  
Departamento de Ciencias de la Salud UAM-Iztapalapa.

Los miembros del jurado, designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: “EFECTO DE LAS AUXINAS E INSULINA EN LA SÍNTESIS Y FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS DE LA PARTE ÁEREA DE EJES EMBRIONARIOS DE MAÍZ (Zea Mays L.)” con fecha de examen 31 de Octubre 2011.

#### MIEMBROS DEL JURADO

Dr. José Luis Gómez Olivares  
Departamento de Ciencias de la Salud UAM-Iztapalapa.  
PRESIDENTE

Dra. Estela Sánchez de Jiménez.  
Departamento de Bioquímica Facultad de Química UNAM.  
SECRETARIO

Dr. Fernando Díaz de León Sánchez  
Departamento de Ciencias de la Salud UAM-Iztapalapa.  
VOCAL

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova  
Departamento de Bioquímica Facultad de Química UNAM.  
VOCAL

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi tutora la Dra. Laura por estar siempre al pendiente de la realización de esta tesis, por todas sus enseñanzas y por la confianza que siempre me ha tenido. Gracias Dra.

A mis asesores: Dra. Estela, Dr. José Luis y Dr. Humberto por su valiosa asesoría y comentarios que enriquecieron este trabajo, por todos sus consejos y recomendaciones para que esta tesis llegara a su fin, gracias por el apoyo que siempre me brindaron.

Al Dr. Fernando Díaz de León Sánchez por sus comentarios y por todo el apoyo brindado durante la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Bioquímica y Fisiología Vegetal y anexos que siempre me apoyaron y compartieron conmigo valiosas experiencias, Gracias Chicos por su amistad.

## DEDICATORIAS

*Con todo mi amor para **Higinio**,  
gracias por estar a mi lado,  
porque eres mi apoyo, mi ayuda y mi fortaleza,  
en cada momento,  
porque sin tí no hubiera sido posible.  
Tu amor me ha dado el aliento para seguir adelante.  
Lo logramos!!!! Te Amo*

*A mis Papas **Saló y Tete**,  
por haberme animado a seguir adelante,  
por siempre apoyarme en todo,  
por su amor incondicional.*

*A mi hermano **Quique** por tener siempre  
una sonrisa para compartir.*

*A mis Suegros, **Higinio y Lupita**,  
por el cariño que me han dado,  
gracias por estar siempre presentes.*

*A mis cuñadas **Mony y Monse**  
que se han convertido en amigas  
y hasta confidentes.*

*A mi abuelita **Lupita** por todo su cariño y  
A mis demás abuelitos... donde quiera que estén.*

*A mis sobrinas **Alexa y Regina**  
que con sus risas han llenado mis días de alegría.*

# Índice

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCIÓN .....	3
ANTECEDENTES .....	6
1. Germinación de maíz .....	6
1.1 Semilla de maíz .....	6
1.2 Proceso de germinación: Crecimiento diferencial de parte aérea y radícula .....	7
1.3 Eventos moleculares durante la germinación .....	10
2. Síntesis de proteínas en eucariontes .....	14
2.1 Estructura de los ribosomas.....	14
2.2 Fases de la síntesis de proteínas .....	15
2.3 Mecanismos de regulación de la síntesis de proteínas.....	19
2.4 Síntesis de proteínas en plantas y su regulación.....	20
2.5 Regulación de la síntesis y fosforilación de los componentes del sistema traduccional .....	21
3. Efectores de la vía de señalización que regula la traducción .....	24
3.1 Vía de transducción de señales inducida por insulina en animales y plantas	24
3.1.1. Efectos generales de la insulina en animales.....	24
3.1.2. Receptores de insulina .....	25
3.1.3. Vía de señalización PI3K-TOR, segundos mensajeros y otros	

intermediarios.....	25
3.1.4. Genes regulados por Insulina.....	33
3.1.5. Proteínas similares a insulina en plantas.....	34
3.2 Vía de Transducción de señales inducida por auxinas en plantas .....	35
3.2.1. Efectos generales de la auxina.....	35
3.2.2. Genes regulados por auxinas.....	37
3.2.3. Receptores de auxinas .....	39
3.2.4. Segundos mensajeros y otros intermediarios de la(s) vía(s) de señalización de auxinas. ....	41
4. Participación de la auxina e insulina (ZmIGF) durante la germinación.....	49
JUSTIFICACIÓN .....	52
HIPÓTESIS .....	53
OBJETIVOS .....	54
Objetivo General.....	54
Objetivos Particulares.....	54
METODOLOGÍA.....	55
1. Obtención del material biológico.....	55
2. Obtención de membranas microsomales .....	56
3. Extracción de los derivados fosforilados de fosfatidil inositol y separación de PA.....	56
4. Obtención de proteínas ribosomales y citoplásmicas .....	57
5. Inmunoprecipitación de prS6 .....	58



6. Preparación de los extractos crudos de maíz para determinación de formas fosforiladas de la ZmS6K.....	59
7. Inmunoprecipitación de ZmS6K.....	59
8. Separación de formas fosforiladas de la PRS6 y de ZmS6K .....	60
9. Análisis Estadístico .....	60
RESULTADOS y DISCUSIÓN .....	61
1. Participación de PA en la vía de señalización de auxinas o insulina.....	61
2. Patrones de fosforilación de proteínas citosólicas y ribosomales.....	64
3. Activación por fosforilación de la ZmS6K y fosforilación de S6pr.....	69
4. Patrones de síntesis de proteínas citosólicas.....	73
CONCLUSIONES.....	77
PERSPECTIVAS.....	79
BIBLIOGRAFÍA .....	80

## RESUMEN

Las auxinas y la insulina promueven el crecimiento de embriones de maíz (*Zea mays L.*), inducen la fosforilación de la proteína ribosomal S6 (prS6) y promueven la síntesis de proteínas específicas. El objetivo de esta investigación fue probar el posible entrecruzamiento entre las vías de transducción de insulina y auxinas en coleótilos de maíz, tejidos blanco típico de auxinas. Las auxinas y la insulina produjeron una estimulación diferencial cuantitativa y cualitativa de la fosforilación de proteínas citoplásmicas y ribosomales, así como patrones específicos de proteínas citoplásmicas sintetizadas *de novo*. Además la inducción de la fosforilación de prS6 por insulina fue inhibida fuertemente por rapamicina, indicando la participación de la cinasa blanco de rapamicina (TOR), mientras que la fosforilación de prS6 inducida por auxinas fue insensible a este inhibidor. Se probó también ácido fosfatídico (PA), un segundo mensajero de TOR en metazoarios. Este compuesto produjo resultados similares a los obtenidos con insulina y la sensibilidad a rapamicina también fue semejante, apoyando la existencia de la vía TOR en plantas y la participación de PA como un intermediario de acción de insulina. Estos datos parecen implicar que las auxinas y la insulina inducen el crecimiento de coleótilos de maíz a través de dos vías de transducción de señales independientes.

## ABSTRACT

Auxin and insulin promote maize (*Zea mays*) embryo growth, induce S6 ribosomal protein (S6rp) phosphorylation, and promote specific protein synthesis. The objective of this research was to test a possible cross-talk between insulin and auxin transduction pathway in maize coleoptiles, typical auxin target tissue. Auxin and insulin produced differential quantitative and qualitative stimulation of cytoplasmic and ribosomal protein phosphorylation, and specific patterns of *de novo* synthesized cytoplasmic proteins. In addition, insulin induced S6rp phosphorylation was strongly inhibited by rapamycin, indicating target of rapamycin (TOR) kinase participation, auxin-induced S6rp phosphorylation was insensitive to this inhibitor. Phosphatidic acid (PA), as second Messenger of TOR in metazoan, was also tested. It produced similar results to insulin and rapamycin sensitiveness, supporting the existence of TOR pathway in plants and the participation of PA as an intermediate of insulin action. These results seem to imply that auxin and insulin induce maize coleoptile growth through two independent signal transduction pathways.

## INTRODUCCIÓN

Las auxinas tienen un papel central en el crecimiento y desarrollo vegetal. Estos procesos requieren la regulación coordinada de la división, expansión y diferenciación celular. El crecimiento vegetal corresponde al incremento en tamaño de órganos preexistentes y es resultado del alargamiento celular también referido como expansión celular. El desarrollo vegetal es un proceso continuo que inicia durante la embriogénesis y continúa en el desarrollo postembrionario con la producción de órganos nuevos (raíces, hojas, ramas y flores). La organogénesis requiere de la producción controlada de nuevas células en zonas especializadas denominadas meristemos (Perrot-Rechenman, 2010). Debido a que los meristemos formados por células desdiferenciadas pueden modular su actividad, proveen una flexibilidad al desarrollo que permite a las plantas adaptar su desarrollo en respuesta al ambiente (Vernoux y col., 2010). En las células las auxinas regulan muchas respuestas bioquímicas y fisiológicas; entre las que se encuentran la estimulación de la síntesis de proteínas (Gantt y Key, 1985). Todas las respuestas parecen ser eventos dependientes de tejidos y etapas de desarrollo específicos. En este sentido, está el concepto de los contextos de respuesta a auxinas, la idea de que en diferentes espacios y en distintos tiempos durante el desarrollo, las auxinas disparan respuestas de desarrollo distintas y muy específicas. Estos contextos pueden pensarse como la sobreposición de la concentración de las auxinas (biosíntesis, transporte, almacenamiento y degradación) y de la capacidad de respuesta a auxinas (mecanismos de acción, con los factores de transcripción y efectores río abajo)

(Kieffer y col., 2010). Sin embargo, el (los) mecanismo(s) de acción involucrados en las respuestas a auxinas, aún no se conoce(n) con precisión. La búsqueda de receptores de auxinas ha llevado al aislamiento de proteínas de unión a auxinas y a la caracterización del receptor ABP1 y su participación en la expansión celular inducida por auxinas, así como del receptor TIR1, un miembro del complejo SCF del proteasoma y su participación en la regulación de la expresión génica por auxinas.

Por otra parte, el crecimiento y proliferación celular están regulados por insulina/IGFs (factores de crecimiento semejantes a insulina) en metazoarios (Meyuhas y Hornstein, 2000; Hannan y col., 2003; Oldham y Hafen, 2003). Estos efectores inducen la vía de señalización PI3K-TOR que regula selectivamente la síntesis de proteínas (principalmente de proteínas del aparato traduccional), (Ruvinsky y Meyuhas, 2006; Patursky y col., 2009). Se ha demostrado que el ácido fosfatídico (PA) es un intermediario crítico de esta vía de señalización. En este sentido, la estimulación por mitógenos de células de mamíferos produce la acumulación de PA dependiente de fosfolipasa, el cual se requiere en pasos posteriores de dicha vía (Fang y col., 2001). En maíz se ha aislado y caracterizado un factor de crecimiento semejante a insulina (ZmIGF), (García y col., 2001), el cual se ha probado que estimula a TOR y a la cinasa de la proteína ribosomal S6 (S6K), fosforilando a la proteína ribosomal S6 (prS6) (Dinkova et al., 2007). Esta vía también responde a insulina en maíz (García y col., 2001; Beltrán y col., 2002).

Asimismo, se ha reportado que las auxinas inducen la fosforilación de S6 en maíz, así como en Arabidopsis (Turck y col., 2004). Esto sugiere que la fosforilación de prS6 en maíz y probablemente en otras plantas, podría estar regulada por ambos efectores auxinas e insulina/ZmIGF. Lo anterior abre la interrogación de un posible entrecruzamiento entre estas dos vías de señalización del crecimiento.

El principal objetivo de este trabajo fue probar si las auxinas y la insulina inducen vías de señalización que se entrecruzan en pasos comunes, para contribuir a la comprensión que este fenómeno pudiera tener en la regulación del crecimiento celular. También se analizó la participación de PA como un intermediario de la vía TOR en plantas. Debido a que los coleótilos de maíz son tejidos blanco típicos de auxinas, se escogieron como modelo de estudio para este trabajo.

## ANTECEDENTES

### 1. Germinación de maíz

#### 1.1 Semilla de maíz

Una semilla madura es una estructura de dispersión y resistencia para la planta adulta; su formación es producto de la reproducción sexual, por lo tanto es una fuente de variación genética (Moreno, 1996). Las semillas están estructural y fisiológicamente equipadas para funcionar como unidades de dispersión y contienen reservas alimenticias para sostener a las plántulas en desarrollo hasta que se establecen como organismos autótrofos (Bewley, 1997). La semilla es la estructura en la que un embrión de una planta por lo general completamente desarrollado se dispersa, permitiendo que éste sobreviva el período entre la maduración de semillas y establecimiento de la plántula, asegurando así el inicio de la próxima generación (Koorneef y col., 2002).

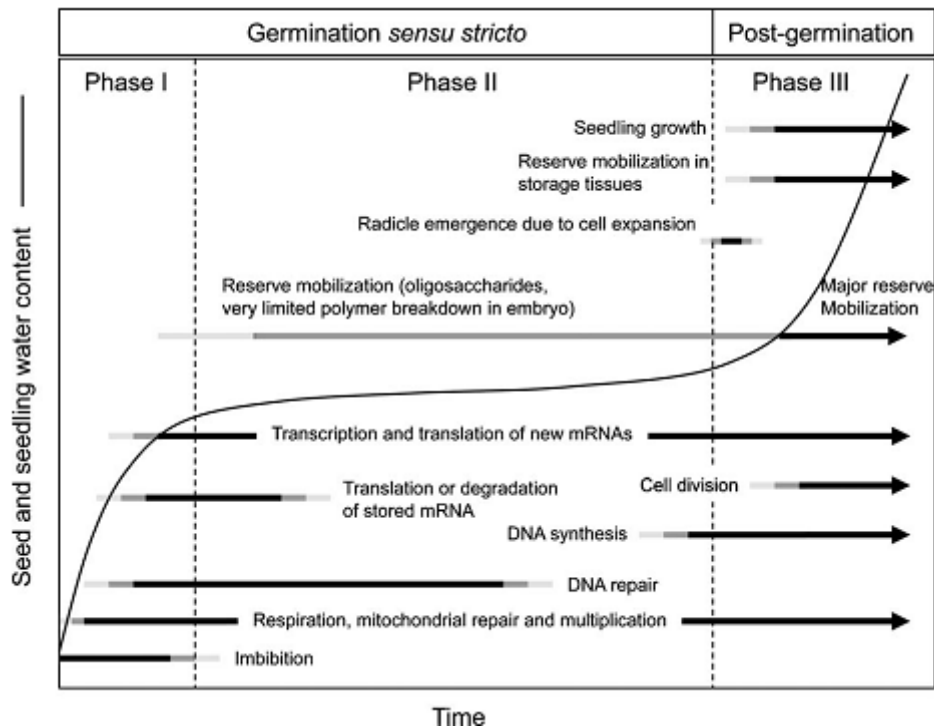
El maíz (*Zea mays* L.) es una planta monocotiledónea que pertenece a la familia de las gramíneas. La semilla de esta planta realmente es un fruto llamado cariósipide. En la semilla de maíz existe un único embrión rodeado por un tejido de reserva, denominado endospermo; el embrión está formado por el eje embrionario y el escutelo que lo rodea. El eje embrionario se divide en coleóptilo, mesocótilo y radícula (Bewley y Black, 1994).

## ***1.2 Proceso de germinación: Crecimiento diferencial de parte aérea y radícula***

El proceso de germinación comienza con la imbibición de la semilla madura deshidratada quiescente y termina con el alargamiento del eje embrionario, generalmente la radícula y la protrusión de ésta a través de las estructuras que rodean al embrión (Bewley, 1997; Nonogaki y col., 2010).

Durante la germinación ocurre un proceso trifásico de toma de agua que coincide con el inicio de diversos eventos a nivel molecular (Figura 1). La fase inicial es la imbibición de la semilla y está caracterizada por una rápida entrada de agua (Fase I), seguida de una fase estable, en donde se re-inician los procesos metabólicos (Fase II). Las semillas no viables o latentes presentan solamente la Fase I de toma de agua. Finalmente, hay una segunda entrada rápida de agua asociada con el crecimiento del eje embrionario, después de la protrusión de la radícula a través de la testa (Fase III). Los eventos celulares y bioquímicos relacionados con el reinicio del metabolismo se realizan principalmente en las primeras dos fases (Bewley, 1997; Finch y Leubner, 2006; Catusse y col., 2008; Nonogaki y col., 2010).





**Figura 1.** Eventos moleculares que ocurren durante la germinación de las semillas (Tomado de Nonogaki y col., 2010)

El crecimiento en las plantas puede ocurrir a través de dos mecanismos: El primero es el crecimiento proliferativo, es decir el número de células aumenta a través del ciclo mitótico y el crecimiento en masa es mediado por el aumento en el volumen del citoplasma que requiere de la síntesis de proteínas y del metabolismo. Muy probablemente, este crecimiento es el blanco primario de las señales de desarrollo y ambientales que coordinan la morfogénesis de los órganos en las plantas. El segundo es post-mitótico e involucra principalmente la expansión o alargamiento celular, el cual es ocasionado por la entrada de agua a la vacuola y por las modificaciones controladas de la pared celular (Anastasiou y Lenhard, 2007; Ingram y Waites, 2006).

En éste último crecimiento hay un incremento en masa asociado con la endoreduplicación y diferenciación de las células especializadas. La expansión celular parece estar relacionada con las señales globales de desarrollo (Ingram y Waites, 2006).

Aunque durante la imbibición hay un incremento en el contenido del ADN en el eje embrionario previo a que se complete la germinación, se considera que la división celular es un evento postgerminativo. ¿Cuáles células son responsables de la emergencia inicial del embrión? En Arabidopsis, la única semilla para la que se tiene información disponible, no es la radícula en sí misma la que presenta alargamiento para atravesar las estructuras que la rodean (endospermo y testa). Más bien es una región cercana a ésta, una región del hipocótilo y la zona de transición entre éste y la radícula, en que unas pocas células (menos de diez en longitud) se alargan y empujan hacia afuera a la radícula (Nonogaki y col., 2010).

La extensión de la raíz puede o no estar acompañada de una división celular. Sin embargo, se presentan dos fases de síntesis de ADN en las células de la raíz; la primera ocurre poco tiempo después de la imbibición y probablemente involucra la reparación del ADN dañado durante la desecación de la semilla y la segunda etapa ocurre como un evento post-germinativo (Bewley, 1997).

### ***1.3 Eventos moleculares durante la germinación***

Las semillas maduras poseen un mínimo de agua y se encuentran en un estado metabólico prácticamente inactivo, denominado estado quiescente. Durante la imbibición, la semilla se rehidrata rápidamente y se activa el metabolismo celular que permitirá la protrusión de la radícula y el posterior establecimiento de la planta (Bradford, 1995).

Las enzimas y estructuras celulares necesarias para reiniciar la actividad metabólica se encuentran almacenadas en la semilla seca y se conservan relativamente intactas. Durante la imbibición temprana hay una lixiviación de solutos indicativo de daño membranal temporal. Por lo que simultáneamente con el incremento del metabolismo se activa la síntesis de enzimas y compuestos que limitan y reparan el daño celular (Bewley y Black, 1994; Bewley, 1997; Nonogaki y col., 2010). El reinicio de la respiración sigue un patrón muy similar al de la entrada de agua y simultáneamente se reactivan las tres rutas respiratorias: la glucólisis, la ruta de las pentosas fosfato y el ciclo de los ácidos tricarbónicos (Botha y col., 1992; Bewley y Black, 1994; Nonogaki y col., 2010).

La síntesis de proteínas es uno de los eventos más importantes y de ocurrencia temprana durante la germinación de las semillas, aún antes de la síntesis de ácidos ribonucleicos mensajeros (ARNm), (Bewley y Marcus, 1990; Bewley, 1997). Diversos estudios indican que en los ejes embrionarios de semillas de cereales, la síntesis de proteínas se reinicia basándose en la traducción de ARNm que quedaron

almacenados en los ejes embrionarios desde su maduración mientras que a tiempos posteriores se basa en la transcripción y traducción de nuevos ARNm (Sánchez de Jiménez y col., 1981; Sánchez de Jiménez y col., 1997). En Arabidopsis hay más de 12000 tipos de ARNm presentes en las semillas secas, mientras que las semillas secas de cebada y arroz contienen alrededor de 17000 ARNm. La localización de estos mensajes en la semilla seca se desconoce pero podrían estar secuestrados en RNPsm (complejos ribonucleoproteicos mensajeros) en el citoplasma como ocurre durante la embriogénesis de alfalfa. Muchos de los genes que codifican ARNm residuales o almacenados contienen elementos de respuesta a ácido abscísico (ABREs) con el motivo ACGT en sus regiones promotoras y se activan durante la maduración de las semillas (Nonogaki y col., 2010)

La maquinaria enzimática necesaria para reiniciar la síntesis de proteínas se encuentra en la semilla seca; excepto los polisomas que se ensamblan durante la imbibición con ARNm almacenados. En los primeros minutos de rehidratación los ribosomas se reclutan en los complejos polisomales sintetizadores de proteínas usando los ARNm preexistentes. La participación de los ARNm almacenados durante la germinación se ha demostrado con el uso de inhibidores de la transcripción y la traducción. El uso de  $\alpha$ -amanitina un inhibidor de la polimerasa II no inhibe la germinación, mientras que la cicloheximida un inhibidor de la síntesis de proteínas previene la emergencia de las radículas.

Aunque los ARNm almacenados son utilizados durante la imbibición temprana, se desconoce cuáles de ellos son esenciales para completar la germinación (Nonogaki y

col., 2010). En las primeras etapas de imbibición, la traducción de proteínas depende de los ribosomas existentes, pero la síntesis de nuevos ribosomas se inicia pocas horas después de la formación de polisomas (Dommes y Van de Walle; 1990). Los niveles de los transcritos de los genes de las proteínas ribosomales (PR), se incrementan rápidamente en los tejidos de semillas no latentes sugiriendo que la biogénesis de ribosomas es un paso necesario para que se complete la germinación. Así el establecimiento de los componentes clave de la maquinaria de la síntesis de proteínas parece ser un evento clave durante la germinación (Nonogaki y col., 2010). En estudios con ejes embrionarios de semillas de maíz en etapas tempranas de la imbibición (hasta 21 h) se demostró que hay síntesis de factores de iniciación de la traducción (eIF). Asimismo, se determinó que los factores de iniciación eIF4E y su isoforma eIFiso4E se expresan particularmente en tejidos en desarrollo (Dinkova y col., 2000). En estudios recientes en este sentido se encontró que el factor eIFiso4E se requiere para la traducción de los ARNm almacenados en semillas secas y que la relación eIFiso4E/eIF4E en el complejo eIF4F es crítica para los mecanismos de control traduccional durante la germinación de maíz (Dinkova y col., 2011). Por lo anterior, la regulación de la germinación puede requerir tanto la remoción selectiva de algunos transcritos como la síntesis *de novo* de otros (Nonogaki y col., 2010).

En el maíz, conforme la semilla se acerca a la madurez fisiológica, el ciclo celular se detiene y permanece así hasta el momento de la imbibición. El reinicio de la proliferación celular se presenta únicamente en las zonas meristemáticas del embrión y este proceso es un evento que ocurre normalmente después del

crecimiento por alargamiento celular y de la protrusión de la radícula (Baiza y col., 1989). Gran parte de las células del embrión de las semillas se encuentran “arrestadas” en la fase G1 del ciclo celular y durante las cuatro primeras horas de germinación ocurre una sincronización de todas las células en la fase G1, pero sólo una parte de éstas células entra a la fase S entre las 12 y 15 horas después del inicio de la imbibición (Georgieva y col., 1994).

Por otro lado, cuando el embrión comienza a crecer sus procesos metabólicos se ven afectados por fitorreguladores que controlan los procesos de crecimiento, diferenciación y movilización de reservas. No sólo las hormonas vegetales promueven el crecimiento de las plantas; sino que también puede ser estimulado por diferentes efectores y condiciones ambientales (Sánchez de Jiménez, 2000; García Flores, 2001).

En resumen, en las primeras etapas de imbibición de la fase I hay una salida de solutos y metabolitos de bajo peso molecular. Posteriormente, se presenta la reestructuración de las membranas adquiriendo una configuración más estable con lo que la salida de solutos se detiene (Bewley, 1997). Asimismo, se reanuda rápidamente la actividad metabólica y todos los componentes para el restablecimiento de la síntesis de proteínas durante la imbibición están presentes en las semillas secas, aunque los polisomas están ausentes. Sin embargo, durante los primeros minutos de la rehidratación existe una disminución en el número de ribosomas libres ya que son reclutados en los complejos de polisomas, sintetizadores de proteínas. La síntesis inicial de proteínas depende de los ribosomas y ARNm

almacenados, aunque nuevos ribosomas y ARNm se sintetizan en etapas posteriores (Bewley y Black, 1994; Bewley, 1997).

## **2. Síntesis de proteínas en eucariontes**

La síntesis de proteínas es uno de los procesos celulares que requiere gran consumo de energía, por lo que su regulación está acoplada al estado metabólico de las células (Warner, 1999; Pestova y Hellen, 2000; Rutter y col., 2002). Por lo tanto, la velocidad de la síntesis de proteínas se regula integrando el proceso de traducción con otras vías metabólicas y procesos del desarrollo. En este sentido, se han observado cambios rápidos en la regulación de la velocidad de traducción durante la mitosis, en respuesta a diferentes tipos de estrés y al tratamiento con hormonas y factores de crecimiento (Hershey, 1989).

### ***2.1 Estructura de los ribosomas***

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

Los ribosomas son complejos ribonucleoproteicos con un coeficiente de sedimentación (CS) de aproximadamente 80S, en el caso de los organismos eucariontes. Están compuestos por dos subunidades con CS de aproximadamente 40S y 60S. Cada subunidad consta de dos tipos de moléculas: fragmentos de ácido

ribonucleico ribosomal (ARNr) y proteínas ribosomales (PR), (Lewin, 1997; Mathews y col., 2007).

La subunidad grande (60S) tiene un peso aproximado de 2.45-2.5 MDa y contiene aproximadamente 50 proteínas diferentes y tres moléculas de ARNr con un CS de 5S, 5.8S y 28S respectivamente y la pequeña (40S) pesa alrededor de 1.5 MDa y consta de un ARNr de 18S y aproximadamente 30 proteínas ribosomales (Lewin, 1997; Verschoor y col., 1996).

## ***2.2 Fases de la síntesis de proteínas***

El proceso de traducción puede ser dividido en tres etapas:

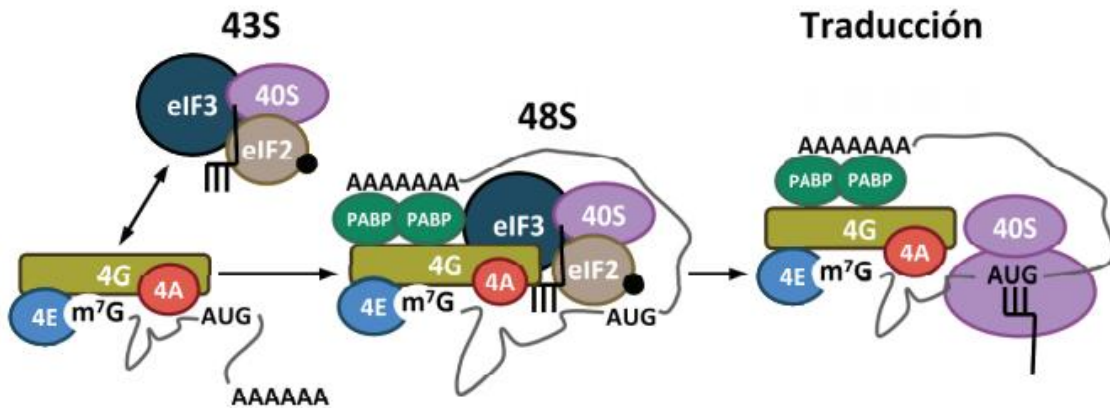
- a) La etapa de iniciación que comprende la formación del complejo activo de iniciación, compuesto por el ARNm sobre el ribosoma con la posición AUG sobre el sitio correcto y la molécula de ARNt de metionina, así como de factores de inicio.
- b) La etapa de alargamiento que involucra la formación de la unión peptídica entre un aminoácido y el siguiente. Esta etapa requiere de la participación de factores de elongación.
- c) La etapa de terminación involucra el reconocimiento del triplete de terminación del ARNm por los correspondientes factores de terminación (Lewin, 2000).

El primer y más importante punto para ser decidido en el inicio de la síntesis de proteínas es la selección entre muchos mensajes presentes en la célula, aquellos que serán incorporados en el ribosoma para su traducción.



Durante la etapa de iniciación se forma de un complejo de iniciación 43S constituido por la subunidad 40S, el ARNt met y varios factores de iniciación (eIF's). En esta etapa se requiere la formación de un complejo ternario eIF2•GTP•Met-tRNA que une a la subunidad ribosomal 40S para formar el complejo 43S. Posteriormente, se recluta el ARNm al complejo 43S para formar el complejo de iniciación 48S (Figura 2). Este paso es limitante para el inicio y es donde se establece la competencia entre los ARNm para ser traducidos. Los elementos *cis* del ARNm que estimulan este proceso incluyen el CAP (<sup>7</sup>mGpppN) 5'-terminal, la secuencia de poli(A) 3'-terminal, y elementos de entrada interna del ribosoma (IRES) en la región 5' no traducible (5' UTR) presentes en algunos casos de ARNs virales y celulares. Los factores "trans" incluyen a eIF3, la proteína que une poli(A) (PABP) y los factores eIF4. eIF3 es una proteína multimérica de 520 kDa requerida tanto para la unión de Met-tARN, como del ARNm. PABP es una proteína de aproximadamente 70kDa que se une a la cola de poli(A) y forma homo-oligómeros. Los factores eIF4 (Tabla 1) consisten de eIF4A, una helicasa ATP-dependiente de 46 kDa; eIF4B, de 70kDa que une ARN y estimula la actividad de eIF4A; eIF4E, de 25 kDa que reconoce el CAP, y el eIF4G de aproximadamente 200 kDa que forma complejos con el eIF4E (que en conjunto forman el eIF4F) y las demás proteínas fungiendo como punto de anclaje para la formación del complejo de iniciación 48S. El complejo 48S recorre la región 5'UTR hasta encontrar el primer AUG en contexto apropiado para iniciar la traducción. Este proceso requiere hidrólisis de ATP mediado por el eIF4A y por la presencia de los

factores eIF1 y el eIF1A. Una vez encontrado el AUG, eIF5, una proteína activadora de GTPasa, junto con el eIF5B, estimulan la hidrólisis de GTP por eIF2. Algunos de los factores de iniciación son separados del complejo por la subunidad ribosomal 60S para dar lugar al ribosoma 80S, y se produce la formación del primer enlace peptídico (Kozak, 1991; Pain, 1996; Martínez Silva y col., 2009).



**Figura 2.** Iniciación de la traducción CAP dependiente en eucariotes (Tomado de Martínez Silva y col., 2009).

**Tabla 1.** Factores de traducción y su función (Tomado de Martínez Silva y col., 2009).

FACTOR	TAMAÑO	FUNCIÓN	SITIOS DE UNIÓN
eIF1 (a)	~12 KDa	Forma complejo multi-factor con eIF2, eIF3, eIF5, Met-tRNA <sub>i</sub> <sup>Met</sup> . Reconocimiento codon-anticodon	Sitio de unión a eIF3
eIF1A (a)	~17 KDa	Análogo a IF1 de bacteria. Se asocia a 40S en sitio A. Retrasa la re-asociación con la subunidad 60S. Puen- te entre los factores de inicio y el ribosoma	Sitio de unión a 40S
eIF2 $\alpha$ eIF2 $\beta$ eIF2 $\gamma$		Recluta al tRNA <sup>Met</sup> Análogo IF2-tRNA <sub>i</sub> de bacteria. Une el Met-tRNA <sub>i</sub> <sup>Met</sup> , GTP y la subunidad 40S en sitio P. Forma parte del complejo ternario 43S. Subunidad reguladora: $\alpha$ ; actividad GTPasa: $\gamma$ ; unión a eIF5B: $\beta$	Sitio de unión a tRNA (no identificado) 3 elementos de unión a GTP
eIF2B (a,b,d)		Intercambia GDP/GTP para liberar a eIF2	Sitio de unión a eIF2
eIF3 (11)	~750 kDa	Análogo IF3 de bacteria. Une varios eIFs y a la subun- dad 40S. Estabiliza al complejo de pre-inicio 43S	Motivos de reconocimiento de RNA
eIF4B	~57 kDa	Helicasa que estimula eIF4A	Motivos de reconocimiento a RNA (RRM), dominio DRYG
eIF4A	~50 kDa	Helicasa RNA-dependiente	Motivo de unión a ATP, ATPa- sa A, motivos de unión a RNA. Motivos SAT requeridos para la actividad de helicasa
eIF4E	~24 kDa	Proteína que reconoce y se une 5'CAP (m <sup>7</sup> GpppN) del mRNA	Motivos de unión a 5' CAP y a eIF4G
eIF4G	~160 kDa	Puente de anclaje. Une varios factores	Sitio de unión a eIF4E, riboso- mas, eIF4A
eIF4H	~25kDa	Helicasa, junto con eIF4B estimula la actividad de eIF4A	
eIF5	~50 kDa	Parte del complejo multi-factor. Estimula la hidrólisis de GTP por eIF2 actuando como GTPasa	Sitio de unión a eIF3
eIF5B	~180 kDa	Análogo IF2-GTP. Une eIF1A. Actividad GTPasa conjunta con eIF2 durante recono- cimiento codon de inicio	Sitio de unión a eIF1A
eIF6		Se asocia con la subunidad ribosomal 60S previnien- do su asociación con la subunidad 40S, regula la traducción en respuesta a señales extracelulares Es esencial en la biogénesis de ribosomas	Sitio de unión a 60s

Recientemente se ha reportado que algunos factores de ensamblaje del ribosoma tardíos tienen la función de prevenir la iniciación prematura de la traducción con subunidades inmaduras, evitando que las partículas pre-40S se ensamblen en ribosomas, lo que resultaría en su rápida degradación. Para ello bloquean cada paso del inicio de la traducción (Strunk y col., 2011).

La fase de alargamiento requiere de la participación de los factores de elongación eEF1A y 1B y el eEF2 (Merrick, 1992). Esta fase involucra la adición secuencial de aminoácidos con la formación de enlaces peptídicos (Remacha y col., 1995).

La fase de terminación ocurre cuando el codón de terminación (UAA, UAG o UGA) se posiciona en el sitio A del ribosoma y no puede ser reconocido por ningún ARNt. El factor de liberación eRF promueve la ruptura del peptidil-ARNt, liberando la proteína (Browning y col., 1990; Kapp y Lorsch, 2004).

### ***2.3 Mecanismos de regulación de la síntesis de proteínas***

Dentro del complicado esquema de la síntesis de proteínas hay muchos sitios posibles sobre los cuales se puede ejercer el control traduccional (Sánchez de Jiménez, 2000). La mayor parte de la regulación traduccional opera durante la fase de iniciación de la síntesis de proteínas (Hershey, 1989). Hay mecanismos que activan o bloquean la traducción y otros diseñados para introducir selectividad al proceso (Jefferies y Thomas, 1996; Sánchez de Jiménez, 2000).

El control de la expresión genética a nivel traduccional es un control de respuesta rápida, reversible, que permite un ajuste fino en la cantidad y tipo de proteínas, la regulación coordinada de familias de proteínas y la eficacia en sistemas que carecen de un mecanismo de control transcripcional, especialmente en el caso de células animales sin núcleo, como los eritrocitos y las plaquetas o trombocitos (Mathews y col., 2000; Gingras y col., 2001).

La eficiencia de traducción de un ARNm depende de los elementos estructurales propios de sus regiones 5' y 3' no traducibles (5'UTR y 3'UTR), así como de la disponibilidad y la actividad de los factores que reconocen estas estructuras (Gingras y col., 1999).

La síntesis de las proteínas de la maquinaria traduccional (proteínas ribosomales, factores de traducción, etc.), depende tanto de la maquinaria de traducción como de la cantidad y la estructura de los ARNm. Los ARNm que codifican para la gran mayoría de las proteínas ribosomales y factores de traducción, exhiben una característica estructural definida: una secuencia rica en pirimidinas, ubicada en seguida de la estructura 5' CAP, designada TOP (del inglés, tract of oligopyrimidine) (Meyuhas y Horstein, 2000), que se ha propuesto puede conferir selectividad traduccional a los mensajes, en respuesta a diversos estímulos como mitogénos (Shah y col., 2000) y/o factores nutricionales (Meyuhas y Horstein, 2000; Proud, 2002).

#### ***2.4 Síntesis de proteínas en plantas y su regulación***

Los ribosomas de las plantas poseen cuatro ARNr, el 18S, 25S, 5.8S y 5S, estos presentan un número muy alto de copias por genoma (Bailey-Serres, 1998).

Los factores de traducción ya mencionados para animales, se han descrito también en plantas. Todas las proteínas mencionadas en el complejo 43S han sido descritas en varios cereales como trigo, maíz y arroz (Bailey Serres, 1998, Dinkova, 2000).

Un punto importante en la regulación de la traducción en plantas es el reconocimiento del codón iniciador que requiere de la unión de GTP dentro del complejo eIF2-GDP. Este intercambio cíclico GDP-GTP es el ciclo del eIF2 y requiere la presencia del factor eIF2B (Jayachandran y Bailey-Serres, 1995; Mathews y col., 2000).

En plantas existen dos tipos de factores de iniciación, el eIF4E y el eIFiso4E, unidos a su respectivo factor eIF4G ó eIFiso4G. Todos los factores unidos forman el complejo eIF4F (Mathews y col., 2000).

### ***2.5 Regulación de la síntesis y fosforilación de los componentes del sistema traduccional***

Durante la fase de iniciación de la síntesis proteica se han identificado proteínas ribosomales fosforiladas sugiriendo que la fosforilación puede ser un mecanismo que regula la traducción (Vidales y col., 1984; Hershey, 1989). La fosforilación de las proteínas ribosomales es un fenómeno generalizado en células animales y vegetales. Existen reportes de que la fosforilación tanto de las proteínas ribosomales, como de los factores de iniciación y elongación, participan en el control de la traducción de los ARNm en diferentes tipos celulares eucariontes (Pérez y col., 1993).

Los factores de iniciación (eIF's) son otro punto de regulación de la síntesis de proteínas. La fosforilación de diversos eIF es alterada por la presencia de mitógenos, factores de crecimiento y en respuesta a estrés. Un factor importante en la regulación de la traducción es el eIF2B que se ha encontrado fosforilado en diversos sitios. El

factor eIF4B está involucrado en la unión a cap y en la selección de ARNm, su grado de fosforilación correlaciona con la activación de la síntesis de proteínas. Otro factor que puede ser fosforilado es el eIF4F y se considera un factor limitante de la síntesis de proteínas ya que selecciona los ARNm a traducir. El factor de iniciación eIF4E, es otra proteína que reconoce la estructura Cap de los ARNm. En mamíferos se ha encontrado que la cantidad de eIF4E libre está fuertemente regulada por la unión del 4E en un complejo inactivo con la proteína de unión 4E (PHAS). La liberación de 4E requiere de la fosforilación del complejo 4E-BP por una cinasa activada por insulina y factores de crecimiento. En plantas se han detectado dos isoformas del factor 4E, sin embargo no se ha encontrado la proteína de unión a 4E. Existe una regulación en la expresión de las isoformas eIF4E, eIF(iso)4E, eIF4G y eIF(iso)4G durante la germinación de maíz (Kleijn y col., 1998; Hershey, 1989; Dinkova y Sánchez de Jiménez, 1999; Sánchez de Jiménez, 2000). Asimismo, se ha reportado que la expresión del factor eIF(iso)4E se regula a nivel traduccional (Dinkova y col., 2000). Recientemente se demostró mediante estudios de traducción *in vitro* con mensajes aislados de ejes embrionarios de maíz sin imbibir o imbibidos por 24 h que la relación de los factores eIF(iso)4E a eIF4E en el correspondiente complejo eIF4F es crítico para el control traduccional durante la germinación de maíz. En particular se encontró que se requiere el factor eIF(iso)4E para la traducción de los mensajeros almacenados en las semillas secas (Dinkova y col., 2011).

La fase de alargamiento de la síntesis de proteínas es promovida por factores como el eEF-1 y el eEF-2 usando como sustrato aa-ARNt. Estos factores pueden ser fosforilados, en la subunidad  $\alpha$  o  $\beta$ . La fosforilación del factor eEF-2 es específica por una cinasa denominada proteína-cinasa III dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  / CaM (Hershey, 1989).

Otro factor que se ha sugerido puede contribuir a la regulación traduccional es la heterogeneidad de los ribosomas, la cual puede atribuirse a diferencias en la composición de proteínas o a modificaciones posttraduccionales. En plantas se han descrito cambios en la composición de proteínas ribosomales durante el enverdecimiento (Koyama y col., 1996, Szick-Miranda y Bailey Serres, 2001) también reportaron heterogeneidad de ribosomas en distintos órganos de maíz y a nivel subcelular durante el desarrollo y en respuesta a condiciones ambientales. Estos resultados sugieren que la composición de ribosomas en distintos tejidos o en determinadas etapas de desarrollo puede contribuir a una regulación fina a nivel traduccional en respuesta a estímulos específicos o a señales del desarrollo. Metodologías como la inmunopurificación de polisomas permiten el análisis de la expresión génica y el significado funcional de la heterogeneidad de los ribosomas (Zanetti y col., 2005).



### **3. Efectores de la vía de señalización que regula la traducción**

#### ***3.1 Vía de transducción de señales inducida por insulina en animales y plantas***

##### **3.1.1. Efectos generales de la insulina en animales**

La insulina es una hormona peptídica de aproximadamente 6KDa, compuesta de 51 aminoácidos que secretada por las células  $\beta$  del páncreas que regula principalmente el metabolismo anabólico en tejidos como el hígado, el músculo y el tejido adiposo, así como también estimula la síntesis de proteínas (Saltiel y Kahn, 2001). La expresión del gen de la insulina está regulada por las concentraciones de AMPc y/o glucosa (Rutter, 2002). Entre las respuestas a esta hormona se encuentran el transporte de glucosa y la activación o inhibición de algunas enzimas. En periodos más largos, esta hormona estimula la síntesis de ácidos nucleicos, de proteínas y promueve el crecimiento celular (Proud y Denton, 1997; Mathews y col., 2000; Mounier y Posner, 2006).

Los IGFs son proteínas semejantes a la insulina, estos factores regulan el crecimiento, el tamaño corporal e inducen la síntesis de proteínas (Efstratiadis, 1998). Se conocen hasta el momento dos tipos de IGFs (IGF-I, IGF-II) que son 50% similares a la insulina, en términos generales, estos factores se consideran mitógenos debido a su importancia en la proliferación celular, sobre todo en la etapa fetal de los mamíferos (Erwin y col., 2000; Quevedo y col., 2000).

### **3.1.2. Receptores de insulina**

Los receptores de insulina e IGFs son miembros de una familia de cinasas de tirosina (Ulrich y Schlessinger, 1990). La unión de los efectores a dichos receptores inicia una cascada de señalización que involucra la activación de cinasas como la fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K), las cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y la cinasa dependiente de fosfoinositidos (PDK), además de la activación de enzimas importantes como la cinasa TOR (por sus siglas en inglés, target of rapamycin) y la S6K1 (Proud y Denton, 1997; White, 1998; Nijhout, 2003). Recientemente se ha demostrado que la cinasa mTOR y su efector S6K1 se encuentran en la encrucijada de la señalización nutrientes-hormonas, que está involucrada en respuestas patológicas como la obesidad, la diabetes y el cáncer (Dann y cols., 2007).

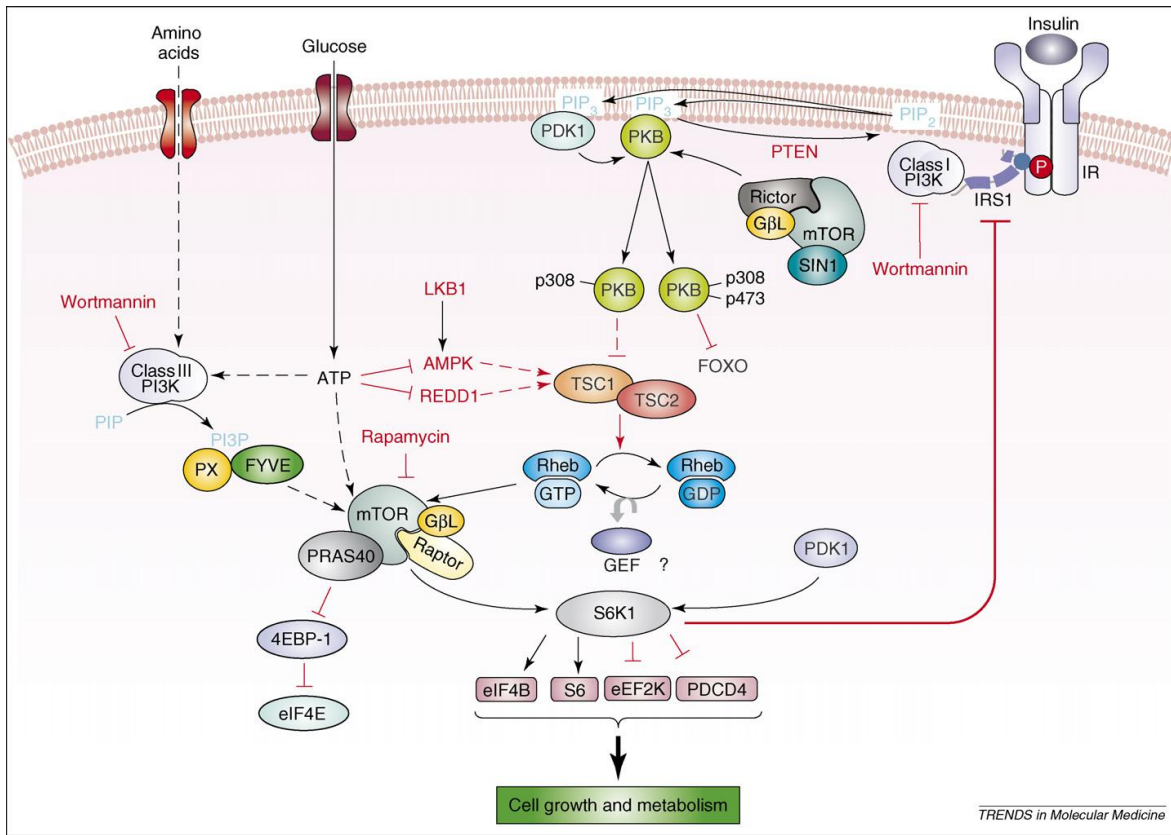
### **3.1.3. Vía de señalización PI3K-TOR, segundos mensajeros y otros intermediarios**

Se ha reportado que la insulina, los factores semejantes a insulina (IGF - I e IGF - II), la interleucina y los factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), así como varios compuestos con acción mitogénica pueden ser efectores de esta vía de transducción (Thomas y col., 1982; Proud, 1994; Burgering y col., 1994; Brown y col., 1995).

Los receptores para insulina y para los IGFs son miembros de una superfamilia de receptores tipo cinasa de tirosina, al unir a sus efectores, se induce su actividad intrínseca de cinasa de tirosina e inician la transducción de la señal. La señal

originada por la interacción hormona/factor de crecimiento-receptor es internalizada a la célula, a través de una cascada de reacciones de fosforilación que involucran diferentes cinasas y la producción de metabolitos específicos que funcionan como segundos mensajeros. Entre las cinasas involucradas se encuentran la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), la proteína cinasa B (PKB), cinasa 1 dependiente de fosfoinosítidos (PDK1) y las cinasas activadas por mitógenos (MAPKs), la activación de estas cinasas se relaciona con diversos efectos en el crecimiento, tales como el incremento en la división celular, en el tamaño celular, en la síntesis de proteínas, en la migración celular y en la inhibición de la apoptosis (Peruzzi y col., 1999; Harrington y col., 2005).

La figura 3 muestra como la unión de la insulina a su receptor resulta en la autofosforilación del receptor en residuos de tirosina y en la fosforilación de tirosinas de los sustratos del receptor de insulina (IRS-1 e IRS-2) por la tirosina cinasa del receptor de insulina. Esto permite la asociación de los IRSs con la subunidad regulatoria de la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) (Bevan, 2001).



**Figura 3.** Vía PI3K-Complejo1 mTOR-S6K. La proteína cinasa blanco de rapamicina (mTOR) existe en dos complejos estructurales distintos. El complejo 1 mTOR, que contiene a Raptor, es regulado por efectores que incluyen aminoácidos, ATP e insulina, los cuales inician diversas cascadas de señalización (las flechas discontinuas indican incertidumbre en los mecanismos involucrados). Estudios recientes indican que el Complejo 2 mTOR no se encuentra río arriba del complejo 1 mTOR. La fosforilación de S6K1 por el complejo 1 mTOR permite a PDK1 fosforilar y activar a S6K1. (Tomado de Dann y col, 2007).

En la figura 3 se observa también como los factores de crecimiento y las hormonas como la insulina regulan al complejo 1 mTOR a través de la vía de señalización de PI3K clase I. En la membrana, la PI3K clase I produce el segundo mensajero fosfatidil inositol (3, 4, 5)- trifosfato [PtdIns (3, 4, 5)P<sub>3</sub>], el cual se une al dominio PH de las proteínas blanco PKB (también conocidas como Akt) y a la PDK1. La unión de [PtdIns (3, 4, 5)P<sub>3</sub>] al dominio PH de PKB/Akt recluta a esta cinasa a la membrana

celular, donde es activada a través de la fosforilación concertada por PDK1 en la posición Tre308 y por el complejo 2 mTOR en el residuo Ser473. El principal regulador negativo de este paso parece ser la fosfatasa PTEN. PTEN convierte [PtdIns (3, 4, 5)P<sub>3</sub>] en [PtdIns (4, 5)P<sub>2</sub>]. 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. 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 facilita a su vez la transmisión de la señal del complejo 1 mTOR a sus sustratos, ya sea a través de la activación directa del complejo 1 mTOR o de su movilización a un compartimento celular (Dann y col, 2007). Entre los sustratos de este complejo se encuentran 4E-BP1 y S6K. El complejo 1 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. En paralelo, el complejo 1 mTOR y PDK1 activan a la cinasa S6K1, que está involucrada en la regulación de la síntesis de proteínas, tamaño celular, progresión del ciclo celular y homeostasis de la glucosa (Long y col., 2005; Ruvinsky y Meyuhas, 2006). La vía de señalización PI3K clase I-PKB también es activada por otros factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factores de crecimiento semejantes a insulina (IGFs) y factor de crecimiento 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. Aunque la activación del complejo 1 mTOR está involucrada en esta respuesta, la actividad cinasa de este complejo no puede ser disparada por la PI3K clase I en ausencia de nutrientes o energía celular (Dann y col., 2007; Patursky-Polischuk y col., 2009).

El estudio del papel de los nutrientes, específicamente los aminoácidos, reveló la existencia de una nueva cascada de señalización que activa el complejo 1 mTOR. En estudios previos se encontró que la inducción de la fosforilación de S6K1 y 4EBP1 por aminoácidos, especialmente el aminoácido ramificado leucina, depende del complejo 1 mTOR. Estudios recientes indican que la transducción de la señal de aminoácidos al complejo 1 mTOR no requiere del complejo TSC1-TSC2, ya que se observó una fosforilación elevada de S6K1 en células carentes de TSC1 y TSC2. Al parecer, se requiere de Rheb-GTP para esta respuesta, pero este complejo es insuficiente para activar al complejo 1 mTOR en ausencia de aminoácidos. Estos resultados indican que la activación del complejo 1 mTOR por aminoácidos puede ocurrir a través de una vía de señalización paralela (Figura 3). En estudios previos, se ha descrito que la estimulación por aminoácidos del complejo 1 mTOR es sensible a wortmanina, a pesar de que los aminoácidos no inducen la activación de PKB. A través de estudios farmacológicos, bioquímicos y moleculares, se ha demostrado que los aminoácidos regulan la actividad de una PI3K clase III y que la activación de S6K1 y del complejo 1 mTOR por aminoácidos requiere de esta PI3K clase III (Dann y col., 2007).

En animales la fosforilación de PRS6 requiere de la activación de la cinasa S6K de 70 kDa, (S6K1 o S6K2) (Fumagalli et al., 2000, Kozma y Thomas, 2002). S6K es activada por mitógenos, por insulina y por una gran cantidad de aminoácidos, los cuales disparan una cascada de transducción de señales que activan a S6K1 por medio de una serie de eventos jerárquicos de remodelación de la conformación de la proteína. (Kozma y Thomas, 2002). La concentración intracelular de ATP controla directamente la actividad de la cinasa S6K a través de la regulación de la actividad de TOR (Dennis y col., 2001). La activación de S6K se requiere para completar la fase G1 y la progresión a la fase S del ciclo celular y tiene un papel importante en la regulación del tamaño celular en mamíferos y la mosca de la fruta (Peterson y Schreiber, 1998).

En mamíferos, las cinasas p70 (se han reportado dos isoformas) de la proteína ribosomal S6 de la subunidad 40S, colectivamente denominadas S6K1, tienen un papel importante en el control del crecimiento celular. Esta cinasa tiene un dominio N-terminal altamente ácido, seguido por el dominio catalítico con función de cinasa Ser/Thr y por el dominio regulatorio C-terminal (Hou y col., 2007). En *Drosophila* y mamíferos, las cinasas S6Ks son activadas por estímulos mitogénicos, por la insulina y por aminoácidos (Williams y col., 2003).

La activación de la S6K1, involucra una serie compleja y secuencial de fosforilaciones múltiples de las serinas y treoninas (Rebholz y col., 2006). Esta fosforilación involucra al menos ocho residuos de Ser/Thr, que incluyen a la Tre229, Ser371, Tre389, Ser404, Ser411, Ser418, Tre421, y Ser424, las cuales están

localizadas en el dominio catalítico y en el dominio C-terminal (Hou y col., 2007).

La fosforilación comienza en los sitios Ser/Tre-Pro (Ser411, Ser418, Tre421, y Ser424), localizados dentro del dominio autoinhibitorio adyacente al dominio C-terminal. Este suceso facilita la fosforilación de la Tre389 en la región de unión, eliminando la autoinhibición. La fosforilación de la Tre389, la cual es sensible a la rapamicina y mediada por mTOR/RAPTOR, parece ser crítica y un paso limitante en la activación de la S6K1. Subsecuentemente, gracias a esta última fosforilación, S6K1 se une y es fosforilada por la cinasa dependiente de fosfoinosítidos 1 (PDK1) en la Tre229, en el sitio catalítico de activación y de esta manera se lleva a cabo su activación. (Hou y col., 2007).

En mamíferos se ha observado que la actividad de las S6Ks es inhibida por inhibidores de la PI3K y por la rapamicina, indicando que las señales de PI3K y mTOR son requeridas para la activación de estas cinasas (Raught y col., 2001).

La prS6 fue el primer sustrato identificado de la S6K1. Algunos otros sustratos menos caracterizados de esta cinasa son el factor de transcripción CREM<sub>T</sub>, el factor exportador CBP80 involucrado en el procesamiento del ARN, la proteína apoptótica BAD, la cinasa eEF2 involucrada en el control de la traducción, así como la proteína SKAR que es homóloga a la familia de proteínas involucradas en el procesamiento y exportación del ARNm del núcleo al citoplasma (Tee y Blenis, 2005).

Mucho del conocimiento acerca de la cinasa TOR está basado en el uso de rapamicina, una droga macrolida lipofílica. La rapamicina inhibe la progresión del ciclo celular a través de su interacción específica con un receptor llamado FKBP12.



El complejo rapamicina/FKBP12 interactúa con TOR a través del dominio de unión a rapamicina-FKBP12 (FRB) el cual se encuentra flanqueando el dominio cinasa (Tee y Blenis, 2005).

TOR pertenece a la familia de cinasas relacionadas a las cinasas de fosfoinosítidos (PIKK) (Tee y Blenis, 2005). Esta cinasa es un importante regulador del comienzo de la traducción a través de al menos dos vías distintas pero a su vez relacionadas. Por una parte, está controlando la fosforilación de la proteína 4EBP1 (proteína de unión al factor de iniciación de la traducción eucariótico 4E), que a través de una serie de eventos conduce a la formación de un componente activo necesario en el complejo de iniciación de la traducción de la subunidad ribosomal 40S, permitiendo así la traducción de muchas de las proteínas asociadas con el control del crecimiento y la proliferación celular. En la segunda vía controlada por TOR, se da la fosforilación de la pS6 a través de la cinasa S6K (llamada ZmS6K en maíz) que estimula la traducción de los ARNm 5'TOP. Estos ARNm, los cuales representan un 30% del ARNm total en una célula, codifican muchos de los componentes del aparato traduccional, incluyendo proteínas ribosomales, así como factores de iniciación de la traducción y alargamiento (Stolovich y col., 2002).

A pesar de los diversos procesos controlados por mTOR se conoce poco acerca de sus sustratos. Recientemente se han usado estudios del fosfoproteoma por espectrometría de masas cuantitativa para definir las redes de señalización río debajo de mTORC1 y mTORC2. La caracterización del sustrato de mTORC1 la

proteína de unión al receptor del factor de crecimiento Grb10, demostró que la fosforilación mediada por mTORC1 estabiliza a Grb10 y lleva a la inhibición por retroalimentación de las vías PI3K y ERK-MAPK (Yu y col., 2011).

La cinasa TOR ha sido reportada tanto en *Arabidopsis thaliana* como en *Zea mays*. Se ha observado que esta cinasa participa durante la germinación de semillas de maíz (Dinkova y col. 2007).

Las proteínas ácidas son componentes de la subunidad mayor del ribosoma, su región carboxi-terminal se encuentra altamente conservada. Se ha observado que interactúan con los factores de elongación y por tanto participan en la traducción. El papel de la fosforilación de las proteínas ribosomales ácidas en el proceso de traducción no es claro. Sin embargo, se sabe que éstas no se encuentran fosforiladas en el citoplasma y su fosforilación afecta su conformación y al parecer controla su afinidad por el ribosoma, manteniendo la estabilidad de la asociación ribosoma - proteínas ácidas. No se ha establecido si la fosforilación de estas proteínas ocurre después de su unión con el ribosoma o es un evento citoplásmico (Vidales y col., 1984; Aguilar y col., 1998).

#### **3.1.4. Genes regulados por Insulina**

La insulina incrementa la transcripción de genes que codifican enzimas involucradas en el transporte y oxidación de la glucosa, (como fosfoenolpiruvato carboxi-cinasa PEPCK) y en la síntesis de ácidos grasos (como la acetil-coA carboxilasa y la ácido graso sintasa) (Nakae y col., 2001; Mounier y Posner, 2006).

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 (Scott y col., 1998; Nakae y col., 2001). Los principales factores de transcripción involucrados en la regulación transcripcional en respuesta a insulina son las proteínas Foxo, las SREBP y las Sp1 (Barthel y col., 2005).

### **3.1.5. Proteínas similares a insulina en plantas**

En plantas, varias evidencias han sugerido la presencia de péptidos tipo insulina, tales como los identificados en espinaca, *Lemma gibba* G3 y *Canavalia ensiformis*, algunos de los cuales estimulan la captación de glucosa en animales. En maíz se ha aislado y caracterizado un péptido semejante a insulina denominado ZmIGF de 5.7 kDa que se ha demostrado que regula el crecimiento y desarrollo de ejes embrionarios de maíz (Collier y col., 1987; García-Flores y col., 2001; Rodríguez-López y col., 2011). En maíz, también se han identificado ortólogos de las proteínas TOR y S6K y se tienen evidencias que apoyan la existencia de la vía de señalización PI3K-TOR (Sánchez de Jiménez, 2000; Agredano-Moreno y col., 2007; Dinkova y col., 2007; Sotelo y col., 2010).

## ***3.2 Vía de Transducción de señales inducida por auxinas en plantas***

### **3.2.1. Efectos generales de la auxina**

Las auxinas constituyen un pequeño grupo de hormonas vegetales que originalmente fueron identificadas por su efecto promotor de respuestas trópicas (Sitbon y Perrot, 1997). La auxina natural considerada la más importante es el ácido indol - 3 - acético (AIA), (Napier y Venis, 1991; Sitbon y Perrot, 1997), otras auxinas naturales identificadas son: 4-Cl-AIA y el ácido indol-3-butírico (AIB), mientras que entre las auxinas sintéticas que son utilizadas por inducir efectos similares a las naturales y también se usan como herbicidas, están el ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D), el ácido 1-naftalenacético ( $\alpha$ -ANA) y el ácido 3,6 dicloro o- anisico (DICAMBA) (Sitbon y Perrot, 1997).

Estas hormonas regulan múltiples procesos durante el crecimiento, el desarrollo y la diferenciación de las plantas (Walker y Estelle, 1998; Guilfoyle y col., 1998). Las respuestas de las plantas a las auxinas se pueden observar a diferentes niveles; por ejemplo, a nivel de la planta completa regulan la dominancia apical, las respuestas trópicas, la formación de raíces laterales, el desarrollo de tejidos vasculares y la senescencia (Macdonald, 1997; Sitbon y Perrot, 1997). A nivel celular las respuestas a las auxinas involucran la expansión y la división celular (Weijers y Jürgens, 2004; Dharmasiri y Estelle, 2004).

Entre los efectos moleculares de las auxinas se pueden mencionar: la inducción de la actividad de la ATPasa de protones de la membrana plasmática y la inducción en diversos tejidos blanco de la expresión de genes específicos de respuesta a auxinas

entre los que se encuentran la familia Aux/IAA, la familia SAUR, la familia GH3, y los que codifican para proteínas ribosomales (Abel y Theologis, 1996; Gantt y Key, 1985; Macdonald, 1997).

En resumen, las auxinas pueden estimular o inhibir el crecimiento celular dependiendo de su concentración y localización dentro de la planta y de sus interacciones con las vías de señalización inducidas por otras hormonas vegetales. Recientemente se ha reportado que la homeostasis de las auxinas y los procesos de desarrollo de raíces laterales relacionados con estas hormonas dependen de la regulación mediada por micro-ARNs de componentes clave de la señalización de auxinas, como los ARFs (por sus siglas en inglés, auxin response factors), el activador transcripcional NAC1 (miembro de la familia de factores de transcripción NAM/ATAF/CUC) y los genes de la familia GH3 que son inducidos por auxinas (Guo y col., 2005; Eckardt, 2005; Mallory y col., 2005; Sorin y col., 2005).

El mecanismo de acción a nivel molecular de las auxinas no se conoce con precisión. El conocimiento de los intermediarios de las cascadas de transducción de señales de auxinas desde su percepción hasta la alteración de la expresión genética u otras respuestas podrían ser la clave para entender el(los) mecanismo(s) de acción primario(s) de las auxinas (Abel y Theologis, 1996).

### 3.2.2. Genes regulados por auxinas

Se ha demostrado en diversos estudios que después de la aplicación de auxinas hay una modulación de la expresión genética. Estudios recientes de genomas completos revelan que la expresión de cientos de genes se reprime o se induce por las auxinas. Los primeros estudios se realizaron en chícharos y en soya y permitieron identificar cuatro familias de genes cuya expresión es rápidamente inducida por la aplicación de auxinas exógenas (Abel y Theologis, 1996; Guilfoyle y col., 1998; Garbers y Simmons, 1994; Koshiba y col., 1995; van der Zaal y col., 1996; Hobbie, 2007, Chapman y Estelle, 2009).

- SAURs (ARNs pequeños estimulados por auxinas) codifican para proteínas pequeñas de 9 a 10 kD, de función desconocida, su patrón de expresión indica que podrían estar involucradas en el alargamiento de la célula. Se ha visto que una proteína de (SAUR) de maíz tiene una localización nuclear y un tiempo de vida corto, y hay evidencias que sugiere que las SAURs se unen a la calmodulina y pueden estar reguladas por calcio.
- GH3 son genes que codifican para enzimas de aproximadamente 70 kD que conjugan al AIA con aminoácidos; estas enzimas son inducidas por el incremento de AIA lo cual reduce eventualmente la concentración de AIA libre mediante su conjugación.

- ACS ácido aminociclopropano 1-carboxílico sintasa, son enzimas claves en la biosíntesis de la hormona etileno en plantas. La conocida inducción de la síntesis de etileno por auxinas, parece deberse a la inducción de la síntesis de ACS por AIA.
- AUX/AIA son la última clase de genes inducido por las auxinas. Codifican proteínas pequeñas de 19 a 36 kD con localización nuclear, que se cree funcionan primariamente como represores transcripcionales. Existen 29 AUX/AIA en Arabidopsis. Estas proteínas se caracterizan por tener cuatro dominios conservados. Del extremo N-terminal al C-terminal, el dominio 1 funciona en la represión, el dominio 2 controla la estabilidad de la proteína, los dominios 3 y 4 sirven como dominios de dimerización. Las proteínas AUX/AIA son notables porque la transcripción de muchas de ellas es inducida rápidamente por auxinas, los reportes más rápidos son de 2 a 5 min después de haber aplicado auxinas y también debido a que muchas de estas proteínas tuvieron un periodo de vida corto. Las mutaciones de pérdida de función no producen un fenotipo particular o tienen fenotipos sutiles, presumiblemente debido a la redundancia genética de esta familia.

El análisis de los promotores de los genes inducidos por las auxinas, llevó a la identificación de una secuencia corta 5'-TGTCTC-3', denominada elemento de respuesta a auxina (AuxRE). Los factores de transcripción denominados factores de respuesta a auxinas (ARF) se unen a los AuxRE y regulan la transcripción de los genes adyacentes. Se han identificado 22 ARFs en Arabidopsis. La mayoría de los ARFs contienen tres dominios funcionales: un dominio de unión al ADN en el

extremo N-terminal, una región media variable que afecta la regulación transcripcional y un dominio de dimerización C-terminal que se relacionan con los dominios 3 y 4 de las proteínas Aux/AIA. Los cinco ARFs con regiones medias ricas en glutamina al parecer actúan como activadores transcripcionales, mientras que las ARFs con regiones medias ricas en prolina y serina parecen actuar como represores transcripcionales. Los miembros de esta familia tienen funciones tanto especializadas como superpuestas.

### **3.2.3. Receptores de auxinas**

A partir del descubrimiento de las auxinas y sus múltiples funciones en el crecimiento y desarrollo vegetal se inició la búsqueda de proteínas de unión a estas hormonas que pudieran tener funciones de receptores. Se han reportado dos tipos de proteínas de unión a auxinas las proteínas de unión de membrana y las proteínas de unión a auxinas solubles (Hicks y col., 1993; Garbers y Simmons, 1994; Macdonald, 1997). En este sentido, Napier y Venis (1991) describieron en la membrana plasmática de maíz una proteína que unía a auxinas cuyas características indicaban que podía ser un posible receptor para estas hormonas. En calabaza se han identificado otras ABPs en membrana plasmática entre las que se encuentran, una proteína de 40 y otra de 42 KDa, que se presume son subunidades de una proteína multimérica integral de membrana, la cual puede tener un sitio de unión a auxinas y poseer una función de transportador o canal (Hicks y col., 1993).



## **ABP1.**

En estudios recientes se describió en maíz, la unión de las auxinas a una proteína membranal (ABP1), que se localiza principalmente en el lumen de retículo endoplásmico y en menor proporción en la membrana plasmática (Macdonald, 1997). Es importante señalar que la mayoría de los estudios de unión de ABP1 con auxinas se realizaron usando ABP1 solubilizada, no se tienen datos de unión con la proteína asociada a la membrana plasmática. Los resultados indican que el pH óptimo de unión a ANA es de 5.5 y disminuye al aumentar el pH a 7, por lo que se sugiere que la proteína ABP1 localizada en retículo endoplásmico se comporta como un sitio de muy baja afinidad, mientras que las condiciones de unión óptimas se dan con la proteína asociada a la membrana plasmática. Las mutantes nulas de ABP1 producen letalidad en la etapa del embrión, por lo que ha resultado difícil investigar las funciones de esta proteína. Recientemente se ha reprimido en forma controlada la expresión de un antisentido para ABP1 y también se ha logrado inmunomodular esta proteína mediante la inactivación funcional con la expresión de un anticuerpo recombinante de alta afinidad. Estos estudios revelaron que ABP1 se requiere para casi todas las respuestas mediadas por auxinas incluyendo la regulación de la expresión génica a lo largo de toda la vida de la planta (Tomas y col., 2010).

## **Receptores solubles**

Se han reportado formas solubles de proteínas de unión localizadas en el núcleo de diferentes especies, lo que sugiere que pueden estar involucradas en el control de la expresión de genes regulados por auxinas (Garbers y Simmons, 1994). Algunos reportes implican que las auxinas pueden controlar el alargamiento y división celular a través de distintas vías (Hobbie y col., 2000; Chen y col., 2001). Asimismo, en *N. tabacum* se han detectado dos diferentes proteínas de unión que estimulan dos diferentes vías de señalización inducidas por auxinas, probablemente una para el alargamiento celular y otra para la división (Campanoni y Nick, 2005).

En años recientes se reportó otro receptor de auxinas, TIR1 (por sus siglas en inglés, transport inhibitor response 1), una proteína del complejo SCF del proteasoma, cuya función es la adición de moléculas de ubiquitina a las proteínas que van a ser degradadas (Dharmasiri y col., 2005; Kepinski y Leyser, 2005).

### **3.2.4. Segundos mensajeros y otros intermediarios de la(s) vía(s) de señalización de auxinas.**

En esta vía de transducción de auxinas se ha involucrado a las fosfolipasas, específicamente a la PLA<sub>2</sub> que es una acilhidrolasa que libera ácidos polinsaturados que pueden actuar como mensajeros. Se sabe que la PLA<sub>2</sub> puede ser regulada por la fosforilación de los heterotrímeros de proteínas G (receptores tirosin-cinasa y MAP-cinasa) y por Ca<sup>2+</sup> (Munnik y col., 1998b). El crecimiento de hipocótilos por la aplicación de auxinas está asociado con una rápida activación de la PLA<sub>2</sub>, en microsomas de células de soya se demostró que la activación de esta fosfolipasa

por auxinas esta mediada por un receptor e influenciada por nucleótidos de guanina (Chapman, 1998). Se propone que los lisofosfolípidos producidos por la acción de la PLA<sub>2</sub> pueden actuar como segundos mensajeros en un sistema estimulado por auxinas, ya que pueden activar proteín-cinasas asociadas a la membrana y a la ATPasa de protones localizada en la membrana plasmática (Macdonald, 1997). La aplicación de inhibidores de la PLA<sub>2</sub> reduce en un cincuenta por ciento el crecimiento inducido por auxinas en hipocótilos de *C. pepo* (Scherer y Arnold, 1997).

Por otra parte, la PLD ha sido asociada con la germinación de semillas. Esta fosfolipasa cataliza la hidrólisis de fosfolípidos de membrana como la fosfatidilcolina, en respuesta a luz, temperatura, hormonas y patógenos. Su producto, el ácido fosfátidico (PA), puede ser fosfohidrolizado y convertido a diacilglicerol (DAG) que activa a la proteín cinasa C o directamente puede activar a la PLC y estimular la monogalactosildiacilglicerol sintasa en plántulas de pepino (Chapman, 1998; Munnik y col., 1998b; Wang y col., 1994). En plantas, el PA es producido por algunos tejidos vegetales cuando son tratados con ácido abscísico y en ausencia de esta hormona el PA mimetiza la acción de la misma. Este fosfoinosítido también ha sido encontrado en las vías de señalización inducidas por heridas, patógenos, congelamiento, estrés hiperosmótico, además se ha propuesto como una señal mediadora para activar la vía de MAPK y también afecta la actividad de canales iónicos, principalmente de K<sup>+</sup> (van der Luit y col., 2000; Frank y col., 2000; Lee y col., 2001; Laxalt y Munnik, 2002). El PA es una molécula importante en muchas vías de transducción de señales en células animales, puede controlar los niveles intracelulares de calcio (Ca<sup>2+</sup>), la

organización del citoesqueleto, la actividad de algunas proteín-cinasas (PKC), la mitogénesis, el rompimiento oxidativo en neutrofilos, la unión a proteínas G y la liberación de hormonas. Recientemente se ha demostrado que este fosfoinosítido es un componente importante en la vía de señalización de mTOR y en la síntesis de proteínas. Además es capaz de inhibir la acción de la proteín-fosfatasa 1 (Munnik y col., 1998a; Munnik y col., 1996; Wang, 1999; Fang y col., 2001; Kishikawa y col., 1999).

Por otra parte, se ha reportado que las auxinas generan cambios transitorios en los niveles de inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y en inositol bifosfato (IP<sub>2</sub>) en células en cultivo de *Catharanthus roseus*, (Ettlinger y Lehle, 1988), lo que hace suponer la participación de la PLC (Einspahr y Thompson, Jr., 1990).

El IP<sub>3</sub> en animales funciona como segundo mensajero (Munnik y col., 1998a), movilizandoo Ca<sup>2+</sup> de almacenes intracelulares no mitocondriales (Wheeler y Boss, 1987), con lo cual regula enzimas dependientes de Ca<sup>2+</sup> y calmodulina (CaM) y algunos canales (Munnik y col., 1998b). En plantas se ha mostrado que el IP<sub>3</sub> causa la liberación de Ca<sup>2+</sup> de vesículas membranales de raíces de zanahoria y avena (Ettlinger y Lehle, 1988) y que las oscilaciones de Ca<sup>2+</sup> mediadas por IP<sub>3</sub> están involucradas en respuestas de crecimiento (Stevenson y col., 2000).

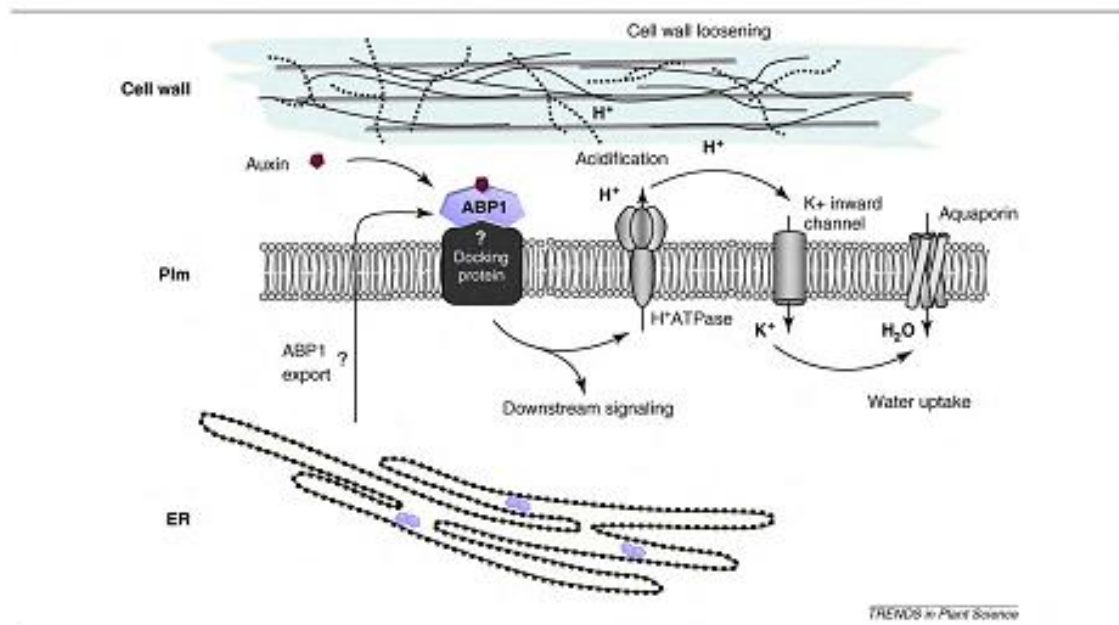
Muchas de las cascadas de señalización en plantas involucran al calcio (Ca<sup>2+</sup>) como un mensajero, tanto la concentración celular de este ión, como la información espacial y temporal que desencadena pueden explicar parcialmente las respuestas celulares a un estímulo en particular (Luan y col., 2002).

El  $\text{Ca}^{2+}$  en las células vegetales se encuentra en cantidades relativamente altas dentro del retículo endoplásmico, en la vacuola y en el espacio extracelular (Bush, 1993). Este ión ha sido involucrado en una gran variedad de vías de estímulo-respuesta (Sanders y col., 1999), los cambios en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico difieren de acuerdo al estímulo, las auxinas producen cambios oscilatorios con periodos regulares o irregulares (Bush, 1993). Se ha reportado una disminución del calcio libre en células de maíz después del tratamiento con auxinas (Felle, 1988), mientras que otros autores observan un incremento de éste con el mismo tratamiento. Asimismo, se ha encontrado que antagonistas de CaM, quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  y bloqueadores de canales de calcio inhiben la alargamiento inducida por auxinas. Estas hormonas además incrementan los niveles de ARNm de genes que codifican para CaM y para proteínas relacionadas con CaM (Tch3 y Cdpk) (Sitbon y Perrot, 1997; Yang y Poovaiah, 2000).

Por otra parte se han aislado en maíz proteínas unidas a CaM con una secuencia similar a las encontradas en la familia SAUR (ARN pequeños inducidos por auxinas), que posiblemente esten involucrados en un sistema de mensajes  $\text{Ca}^{2+}$  / CaM en la acción de las auxinas (Yang y Poovaiah, 2000).

Se ha reportado que ABP1 está involucrada en la percepción inicial de auxinas en la parte externa de la membrana plasmática en la respuesta de expansión celular en distintos tejidos (Figura 4). La unión de auxinas a ABP1 induce la activación de la ATPasa de  $\text{H}^+$  y los canales de entrada de  $\text{K}^+$ . Como consecuencia de la activación de la ATPasa de  $\text{H}^+$  ocurre la acidificación del espacio extracelular que activa las

expansinas de pared celular que son el principal agente de relajamiento de la pared que facilita la expansión de la pared celular. La activación de la bomba de protones también causa la hiperpolarización del potencial de membrana y la activación de los canales de entrada de  $K^+$  dependientes de voltaje, cuya actividad contribuye a la toma de agua necesaria para la expansión celular (Tromas y col., 2010).



**Figura 4.** Mecanismo de acción propuesto de ABP1 en la expansión celular (Tomado de Tromas y col., 2010).

También se ha reportado que la proteína ABP1 participa en la regulación del ciclo celular, actuando en la transición G1/S mediante la regulación de Ciclina D / RBR. Algunos autores sugieren que esta regulación podría explicar la detención del desarrollo del embrión en etapa globular en mutantes nulas de Arabidopsis (Tromas y col., 2010).

La degradación regulada de las proteínas por la vía de la ubiquitina/proteasoma

tiene un papel muy importante en la señalización de las auxinas. La ubiquitina es una proteína con 76 aminoácidos que está altamente conservada en eucariontes. La ubiquitina se une a otras proteínas, y tiene entre otras funciones, marcarlas para su degradación o etiquetarlas para una localización particular en la célula. Tres enzimas actúan en secuencia para ubiquitinar proteínas específicas. La primera es la enzima activadora de ubiquitina (E1) que utiliza ATP para formar un enlace tioéster de alta energía con la ubiquitina, después la E1 transfiere a la ubiquitina activada a la enzima conjugadora de la ubiquitina (E2), la cual junto con la ubiquitina ligasa (E3), une a la ubiquitina a la proteína blanco. Se pueden unir ubiquitinas adicionales a la ubiquitina inicial en una proteína, cuando la cadena alcanza cuatro ubiquitinas, la proteína etiquetada con ubiquitinas se dirige al complejo enzimático cilíndrico denominado proteasoma, que se localiza tanto en el citoplasma como en el núcleo. Enzimas asociadas al proteasoma remueven las ubiquitinas y después degradan a la proteína etiquetada.

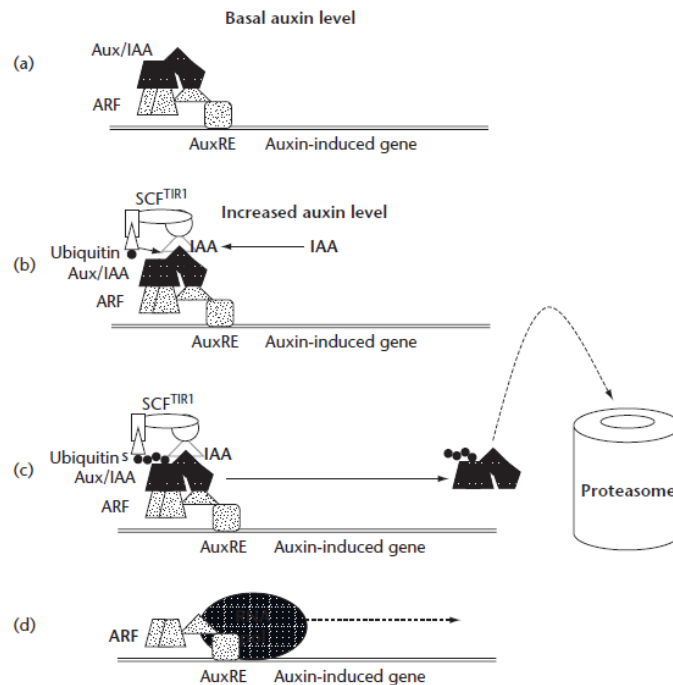
Existen diferentes tipos de ubiquitina ligasas E3 en Arabidopsis. Una de ellas está implicada en la señalización de auxinas, este es el complejo SCF TIR1 que contiene cuatro componentes: SKP1, Cullin, RBX1 y la proteína llamada TIR1. TIR1, que se ha propuesto que actúa como un receptor de auxinas, contiene repeticiones ricas en leucina y un dominio F-box con el que se une a SKP1. Cada uno de los componentes del complejo SCF es codificado por una familia multigenética en Arabidopsis pero el componente más variable es la proteína F-box, hay alrededor de 700 genes que codifican proteínas F-box en Arabidopsis. Otras proteínas F-box participan en

respuestas a enfermedades, en el ritmo circadiano, en respuestas a otras hormonas, y en la floración.

Una característica importante del complejo SCF, es que la proteína Cullin, que tiene un papel central en el andamiaje de la estructura de SCF, es a su vez modificada por una proteína pequeña que está relacionada con la ubiquitina llamada RUB. RUB es activada y unida a Cullin por una serie de tres enzimas similares al complejo que une ubiquitina. Otro complejo de proteínas el señalosoma COP9 está implicado en la remoción de RUB de Cullin. Aunque no está clara la función de la unión de RUB a Cullin, se ha especulado que la remoción y unión de RUB es importante para la formación y disociación del complejo SCF.

Mutaciones en los componentes de la vía ubiquitina/proteasoma confieren una respuesta alterada a las auxinas. ¿Cómo actúa esta vía en la señalización de auxinas? El modelo que se ha propuesto es el siguiente (Hobbie, 2007):





**Figura 5.** Mecanismo de acción de TIR1 en la regulación de la expresión génica por auxinas (Tomado de Hobbie, 2007).

En presencia de una baja concentración de AIA, las proteínas Aux/AIA se dimerizan con ARFs a través de sus dominios 3 y 4 y las ARFs se mantienen así inactivas. Cuando la auxina AIA entra a la célula se une a su receptor TIR1, esta unión estimula la interacción entre SCFTIR1 y la proteína Aux/AIA, de manera que SCFTIR1 ubiquitina a la proteína Aux/AIA, produciendo la degradación de la proteína Aux/AIA. El ARF que estaba unido a la Aux/AIA se libera de su represión y es capaz de estimular la transcripción de genes regulados por auxinas.

Entre los genes inducidos se encuentran los de las proteínas Aux/AIA las que después de ser sintetizadas son capaces de volver a unirse a los ARFs apagando así la vía inducida por auxinas. Así, las proteínas Aux/AIA, como blanco de la

degradación iniciada por auxinas y como represor transcripcional inducido por auxinas, produce una regulación por retroalimentación que limita la respuesta a auxinas.

#### **4. Participación de la auxina e insulina (ZmIGF) durante la germinación**

Como se mencionó anteriormente, entre los efectores que estimulan la síntesis de proteínas en vegetales se encuentran las auxinas como el AIA, el ácido 2(2-metil, 4-cloro) fenoxipropiónico (MCP), el ácido 3,6-dicloro-o-anísico (DICAMBA) y el  $\alpha$ -ANA (Pérez y col., 1987; Pérez y col., 1990; Pérez y col., 1993; Beltrán y col., 2002).

La aplicación de niveles elevados de auxinas exógenas en ejes embrionarios de maíz se induce la desdiferenciación del tejido formándose un callo (Sánchez de Jiménez y col., 1981). Por otra parte, se ha observado que la aplicación de auxinas exógenas a coleóptilos de maíz induce su alargamiento (Park y col., 2001; Edelman y Schopfer, 1989); asimismo, la aplicación de auxinas produce una disminución en el crecimiento de las raíces de maíz (Meuwly y Pilet, 1991).

Las auxinas alteran el patrón de síntesis de proteínas durante la germinación de ejes embrionarios de maíz (Pérez y col., 1987) y este cambio está acompañado por un aumento en la fosforilación de proteínas ribosomales (Pérez y col., 1990). Entre las proteínas ribosomales fosforiladas durante la germinación se encuentra la proteína S6 de la subunidad 40S y su fosforilación también se induce en respuesta a auxinas (Sánchez de Jiménez y col., 1997; Beltrán y col., 2002).

En concordancia con estos resultados se ha observado en ejes embrionarios de maíz

tratados con auxinas una traducción específica de ARNm 5' TOP. Algunos de estos ARNm y factores de traducción han sido identificados. En este sentido, se ha demostrado un reclutamiento específico dentro de los polisomas de algunos mensajes 5' TOP como los de la PR S6 y del factor eIF-iso4E después de la aplicación de auxinas (Beltrán y col., 2002; Dinkova y col., 2000).

Se ha demostrado que la insulina tiene efectos similares a las auxinas, acelerando la germinación y el crecimiento de las plántulas de maíz, además de estimular la fosforilación preferencial de la PR S6. Asimismo, se ha aislado y caracterizado; una proteína parecida a la insulina a partir de ejes embrionarios de maíz en germinación, el *Zea mays* IGF (ZmIGF), el cual activa una cascada de señalización similar a la inducida por la insulina bovina en células eucarióticas no vegetales (García-Flores y col., 2001; Rodríguez-López y col., 2011).

Se ha demostrado que en maíz, la insulina es capaz de inducir la activación de una vía de transducción de señales similar a como lo hace en animales, la cual regula selectivamente la traducción. Además se ha observado que la insulina y el ZmIGF tienen efectos similares a las auxinas acelerando la germinación y el crecimiento de las plántulas de maíz. Durante el proceso de germinación, en presencia de auxinas e insulina se ha observado un cambio en el patrón de proteínas sintetizadas y proteínas fosforiladas. En ejes embrionarios completos estimulados con insulina o ZmIGF, se ha observado un incremento en la fosforilación de la prS6. (Sánchez de Jiménez y col., 1999; Beltrán-Peña y col., 2002; García-Flores y col., 2001; Dinkova y

col., 2007; Sotelo y col., 2010). Sin embargo, no se sabe si los efectos de auxinas e insulina se llevan a cabo mediante vías de señalización que comparten algunos intermediarios entrecruzando en algunos pasos.

## JUSTIFICACIÓN

A pesar de los conocimientos a nivel fisiológico, bioquímico y molecular de la acción de la auxina y recientemente de factores semejantes a insulina no se conocen los mecanismos de acción de estas hormonas. Diversas evidencias indican que las auxinas inducen la síntesis y fosforilación de proteínas en ejes embrionarios de maíz, al igual que la insulina y el factor semejante a insulina de maíz, algunas de las cuales podrían ser comunes.

En las semillas de maíz las auxinas e insulina regulan el crecimiento al parecer a través de la vía PI3K-TOR induciendo a la enzima S6K y fosforilando a la pS6. La mayoría de los estudios con estos efectores se han hecho en ejes embrionarios completos (compuesto por distintos tejidos que podrían enmascarar algunas respuestas). En este proyecto se analizaron los efectos de las auxinas e insulina en la parte aérea de ejes embrionarios de maíz.

## HIPÓTESIS

En la vía de transducción de señales por auxinas pueden estar involucradas diferentes fosfolipasas y sus productos, los cuales pueden actuar como segundos mensajeros. La participación de estos intermediarios en la vía de transducción podrá determinarse a través de inhibidores específicos y del análisis de su efecto en las respuestas inducidas por las auxinas en maíz (patrón de proteínas sintetizadas y fosforiladas).

Así mismo, en esta vía pueden participar elementos comunes a los de la vía de transducción de ZmIGF (factor de crecimiento de maíz semejante a insulina), ya que se ha demostrado que tanto las auxinas como la insulina son capaces de fosforilar la proteína ribosomal S6 ocasionando selectividad en los ARNm que se traducen, por lo que se sugiere que estos efectores actúan mediante vías de señalización que presentan entrecruzamiento.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Determinar el posible entrecruzamiento de las vías de señalización de auxinas e insulina en coleóptilos de ejes embrionarios de maíz en germinación.

### Objetivos Particulares

- Analizar el patrón de fosfoinosítidos y la participación de la fosfolipasa D (PLD) en los coleóptilos de ejes embrionarios de maíz estimulados o no con auxinas o insulina.
- Analizar el patrón de proteínas citosólicas y ribosomales fosforiladas en los coleóptilos de ejes embrionarios de maíz estimulados o no con auxinas o insulina.
- Analizar las formas fosforiladas de la proteína ribosomal S6 y S6K inducidas por auxinas o insulina en coleóptilos de ejes embrionarios de maíz.
- Analizar el patrón de proteínas citosólicas sintetizadas en los coleóptilos de ejes embrionarios de maíz tratados y sin tratar con auxinas o insulina.

## METODOLOGÍA

### 1. Obtención del material biológico

Se usaron granos de maíz (var. Chalqueño). Los granos de maíz fueron desinfestados superficialmente mediante un lavado con etanol al 70 % v/v por 15 seg., a continuación se enjuagaron con agua estéril y se trataron por 10 min. con una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 10 % v/v y se enjuagaron tres veces con agua estéril. Posteriormente los granos se imbibieron en algodón humedecido con agua estéril, a 25 °C por aproximadamente 22 hr., cuando ya habían germinado y su parte aérea se encontraba recién emergida, se disectó. Al tejido disectado se le dio un pulso de auxinas, incubándose por 2hr más en un medio MS con o sin 200  $\mu$ M de la auxinas estudiadas (ácido indol-3-acético (AIA, auxina natural, ácido  $\alpha$  naftalen-acético ( $\alpha$ -ANA) y el análogo inactivo ácido  $\beta$  naftalen-acético ( $\beta$ -ANA)) y con 200  $\mu$ U de insulina, en algunos casos se utilizó como efector 100 mM de ácido fosfatídico (PA).

Para observar la fosforilación de las proteínas se incubó el tejido con los efectores más 200  $\mu$ Ci de [<sup>32</sup>P]- Ortofosfato y para determinar la síntesis *de novo* de las proteínas se utilizó 200  $\mu$ Ci de [<sup>35</sup>S]-Metionina.

Después de la incubación, los tejidos se lavaron tres veces con agua estéril, se congelaron en N<sub>2</sub> líquido y se almacenaron a -70°C hasta su uso.



## **2. Obtención de membranas microsomales**

Cada tejido se homogenizó en un mortero pre-enfriado con amortiguador (Sacarosa 250mM, EDTA 3mM, EGTA 2mM, 2-mercaptoetanol 14mM, DTT 2mM, Tris-HCl 30mM pH 7.4) en una proporción de tres volúmenes por gramo de tejido, agregando 0.1g de polivinil polipirrolidona insoluble. El tejido se filtró a través de cuatro capas de gasa, se centrifugó a 5000 g por 10 min. a 4°C, se desechó la pastilla y el sobrenadante se centrifugó nuevamente a 100,000 g por 1 hr. a 4°C para obtener la pastilla de microsomas, la cual se resuspendió en 500µL de amortiguador de extracción (Cho y Boss, 1995; Perera y col., 1999). Se realizó una cuantificación de proteínas membranales utilizando un ensayo comercial basado en el método de Bradford (Biorad 500-0006).

## **3. Extracción de los derivados fosforilados de fosfatidil inositol y separación de PA**

La separación de los fosfoinosítidos de las membranas se llevó a cabo utilizando 200µg de proteína contenida en las membranas microsomales. A las membranas se les agregó 1.5 mL de una mezcla de cloroformo/metanol (1:2 v/v), 500 µL de HCl 2.4N y 500 µL de cloroformo, (todos los reactivos se encontraban fríos), se agitó en vórtex por 30 segundos, la fase inferior fue extraída y a la fase superior se le añadió 1000 µL de cloroformo, se agitó nuevamente en vórtex por 30 seg. y se extrajo la fase inferior. Las fases inferiores extraídas fueron combinadas y se les agregó 2000 µL de una mezcla de metanol/HCl 1N (1:1 v/v), se agitó en vórtex y se separó la fase

inferior, la cual se dejó secar a temperatura ambiente por una noche. Los fosfolípidos obtenidos fueron resuspendidos en una mezcla de cloroformo/metanol (9:1 v/v) y separados en placas de sílica gel 25TLC (Merck, 0B033695) utilizando como eluyente una mezcla de cloroformo / metanol / acetona / ácido acético / agua (40:14:15:12:7 v/v/v/v/v). Los fosfolípidos fueron visualizados con una mezcla de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, sulfato cérico de amonio y ácido fosfomolibdico y analizados por densitometría. Cuando el tejido se incubó con [<sup>32</sup>P]- Ortofosfato, se obtuvo una autoradiografía de las placas de sílica gel y los fosfolípidos fueron recuperados para determinar la incorporación de [<sup>32</sup>P]- Ortofosfato en un contador de centelleo líquido.

#### **4. Obtención de proteínas ribosomales y citoplásmicas**

Cada tejido se homogenizó con amortiguador de extracción (Tris-ácido acético 50mM pH 8.2, KCl 50mM, (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg 5mM, 2-mercaptoetanol 5mM, Sacarosa 250mM) en una proporción de cuatro volúmenes por gramo de tejido. El tejido homogenizado se centrifugó a 27 000 g por 30 min. a 4°C, se desechó la pastilla y el sobrenadante se colocó en un colchón de sacarosa (Sacarosa 0.5 M, KCl 0.8 M en amortiguador de extracción), se centrifugó nuevamente a 100,000 g por 4hr. a 4°C para obtener la pastilla ribosomal, la cual se resuspendió en 500µL de amortiguador A3 (Hepes 200mM, KOH 20mM, (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg 5mM, CH<sub>3</sub>COOK 125mM, 2-mercaptoetanol 6mM). Las proteínas ribosomales fueron extraídas con ácido acético glacial y (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg 1M, se precipitaron adicionando cinco volúmenes de acetona fría, manteniendo a – 20°C por aproximadamente 15 hr. Las proteínas citosólicas se

precipitaron a partir del sobrenadante post-ribosomal con TCA 10% (Beltrán y col., 1995). Las proteínas ribosomales fueron separadas en SDS-PAGE en geles de acrilamida al 12% y la proteínas citosólicas se separaron en electrofóresis bidimensional: IEF en gel preformado pH 5-8 y separación en gel de acrilamida 13%.

## **5. Inmunoprecipitación de prS6**

La inmunoprecipitación de la prS6 se realizó a partir de las proteínas ribosomales totales obtenidas como se mencionó anteriormente. Las proteínas ribosomales se cuantificaron y 500 µg de proteína se combinaron con 300mL de buffer A (10mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA y 0.05% Nonidet P-40), 16 µL de anticuerpo anti-S6, mas 1mM de PMSF y 2mM de Benzamidina. La mezcla se incubó toda la noche a 4°C con agitación constante. A continuación se le adicionarón 300 µL de proteína A-sepharosa y se incubó a temperatura ambiente durante 2 hrs. más. La mezcla se hizo pasar a través de una microcolumna hecha con una punta de micropipeta taponada con fibra de vidrio y se lavo cinco veces con buffer B (100mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM NaCl, 1mM EDTA, 0.05% Nonidet P-40 y 0.25% Triton X – 100) y cuatro veces con buffer A. Finalmente la prS6 fue eluida con 30 µL de buffer de muestra (Tris 60 mM, pH 7.5, SDS 2% p/v, Glicerol 10% p/v).

## **6. Preparación de los extractos crudos de maíz para determinación de formas fosforiladas de la ZmS6K**

Los tejidos de cada tratamiento se pulverizaron con N<sub>2</sub> líquido y se adicionaron 3 mL de buffer de extracción de la enzima ZmS6K [50 mM HEPES, pH 7.6, 50 mM pirofosfato de sodio, 1 mM vanadato de sodio, 1 mM molibdato de sodio, 4 mM EDTA, 20 mM EGTA, 1 mM benzamidina, 20 mM fluoruro de sodio, 80 mM β-glicerofosfato, 20 mM manitol, 0.2 mM PMSF, 2 mM DTT y 0.7% PVPP] por gramo de tejido. Los tejidos se homogeneizaron en vortex tres veces y se centrifugarán a 15 000 x g, 45 minutos a 4°C (Reyes de la Cruz y col., 2004). Las proteínas del sobrenadante se cuantificaron por el método de Bradford (Bradford, 1976).

## **7. Inmunoprecipitación de ZmS6K**

La inmunoprecipitación de la enzima de maíz (ZmS6K) se realizó por el método descrito por Turck et al., (2004), con las siguientes modificaciones: a 3 mg de proteínas citoplásmicas del extracto crudo se combinaron con 500 µL de buffer A (Tris HCl 10 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Nonidet-P 40 0.05% p/v) más 2mM benzamidina y PMSF 1 µM. A esta mezcla se le adicionó 5 µL de anticuerpo anti p70S6K en una dilución de 1:200 y la mezcla se incubó toda la noche a 4°C con agitación constante. A continuación se le adicionarón 100 µL de proteína A-sepharosa y se incubó a 4° C durante 4 hrs. más. La mezcla se hizo pasar a través de una microcolumna hecha con una punta de micropipeta taponada con fibra de vidrio y se lavo tres veces con buffer B (Tris-HCl, pH 7.5, NaCl 1mM, Nonidet-P40

0.05% p/v, Triton X-100 0.25% p/v) y dos veces con buffer A. Finalmente la ZmS6K fue eluida con 300  $\mu$ L de buffer de muestra (Tris 60 mM, pH 7.5, SDS 2% p/v, Glicerol 10% p/v).

## **8. Separación de formas fosforiladas de la PRS6 y de ZmS6K**

La separación de las formas fosforiladas de las proteínas se llevó a cabo a partir de las proteínas inmunoprecipitadas y por medio de por isoelectroenfoco en un rango de pH 3-10 (de acuerdo al manual RadyStrip™ IPG Strip de BIO-RAD).

Los geles resultantes fueron teñidos con plata ( $\text{AgNO}_3$ ). Las fluorografías fueron obtenidas con un phosphorimager (BIO-RAD).

## **9. Análisis Estadístico**

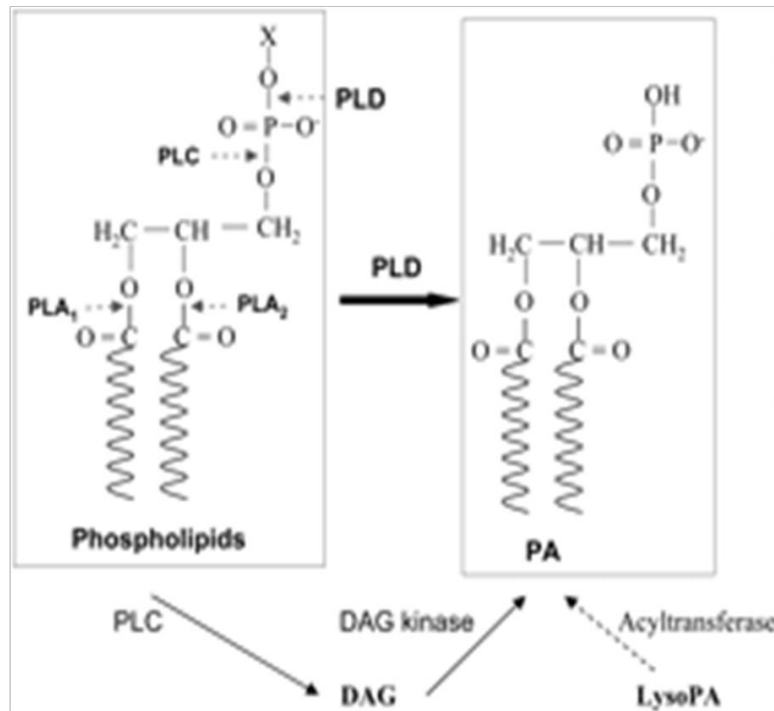
Todos los experimentos fueron repetidos al menos tres veces usando extractos de diferentes muestras biológicas. Las incorporaciones de [ $^{32}\text{P}$ ]- Ortofosfato y de [ $^{35}\text{S}$ ]- Metionina fueron comparadas por análisis de varianza (ANOVA,  $p < 0.05$ ) y por comparación de medias de Tukey ( $p < 0.01$ ) usando el software SPSS ver.16.0.

## RESULTADOS y DISCUSIÓN

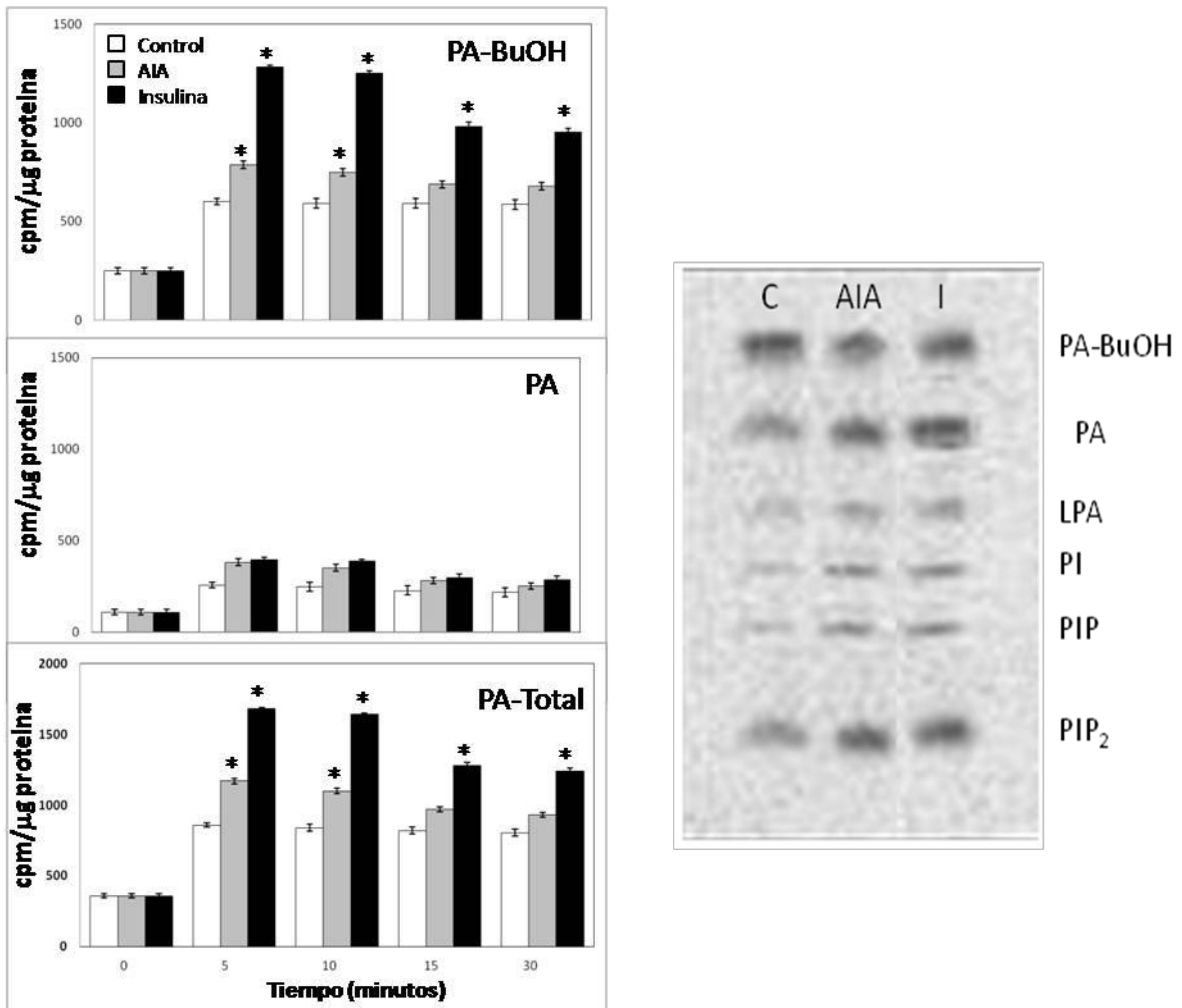
### 1. Participación de PA en la vía de señalización de auxinas o insulina.

Recientemente, se ha demostrado en células de mamíferos, que el PA es un importante componente de la vía de señalización mTOR y para la síntesis de proteínas (Fang et al, 2001; Foster, 2007; Toschi et al, 2009). Por otra parte, PA se ha implicado en la regulación de la germinación de semillas y como intermediario en respuesta a diversos tipos de estrés (Munnik, 2001; Testerink y Munnik, 2005). Por lo tanto, los niveles de este fosfolípido fueron cuantificados en coleóptilos de *Z. mays* expuestos a AIA o insulina por diferentes períodos de tiempo. La incubación con butano permitió la identificación de PA originado de la actividad PLD, ya que este fosfolípido se une al alcohol, mientras que cuando se origina a partir de la acción combinada de PLC y DAGK esta unión no ocurre (Figura 6). Los resultados indicaron una mayor contribución (casi el 80%) de PLD en la biosíntesis del PA. Un aumento significativo y transitorio en los niveles de PA se observó a los 5 y 10 minutos con el tratamiento de AIA o insulina ( $p < 0,01$ ), sin embargo, este estímulo fue mayor con la insulina (175%), que con la auxina (120%) en comparación con el control (Fig. 7). El efecto de inducción disminuye después de 15 minutos de tratamiento. Esta estimulación está en el mismo orden de lo reportado en células de mamíferos activadas por mitógenos (Fang et al., 2001). Estos resultados apoyan la participación de PA como intermediario en la vía de transducción de la insulina y de AIA en maíz.

El tratamiento con la auxina sintética  $\alpha$ -ANA mostro un efecto similar al de AIA mientras que su análogo inactivo  $\beta$ -ANA no mostro cambios significativos respecto al control en ninguno de los tiempos analizados (datos no mostrados), por lo que en lo sucesivo se decidió trabajar únicamente con la auxina natural AIA.



**Figura 6.** Síntesis de Acido Fosfatídico (PA) a partir de PLC y PLD.



**Figura 7.** Efecto de auxinas e insulina en los niveles de PA en coleóptilos de *Zea mays*. **A)** Los niveles de PA-BuOH, PA y PA total se presentan como los valores de las medias  $\pm$  1 DE (n=3 mediciones de  $[^{32}\text{P}]$ -ortofosfato incorporado en fosfolípidos). **B)** Autorradiografía de una placa de TLC de los  $[^{32}\text{P}]$ -fosfolípidos obtenidos a los 10 minutos de tratamiento. \* Diferencias Estadísticas ( $p < 0,01$ ).



## 2. Patrones de fosforilación de proteínas citosólicas y ribosomales.

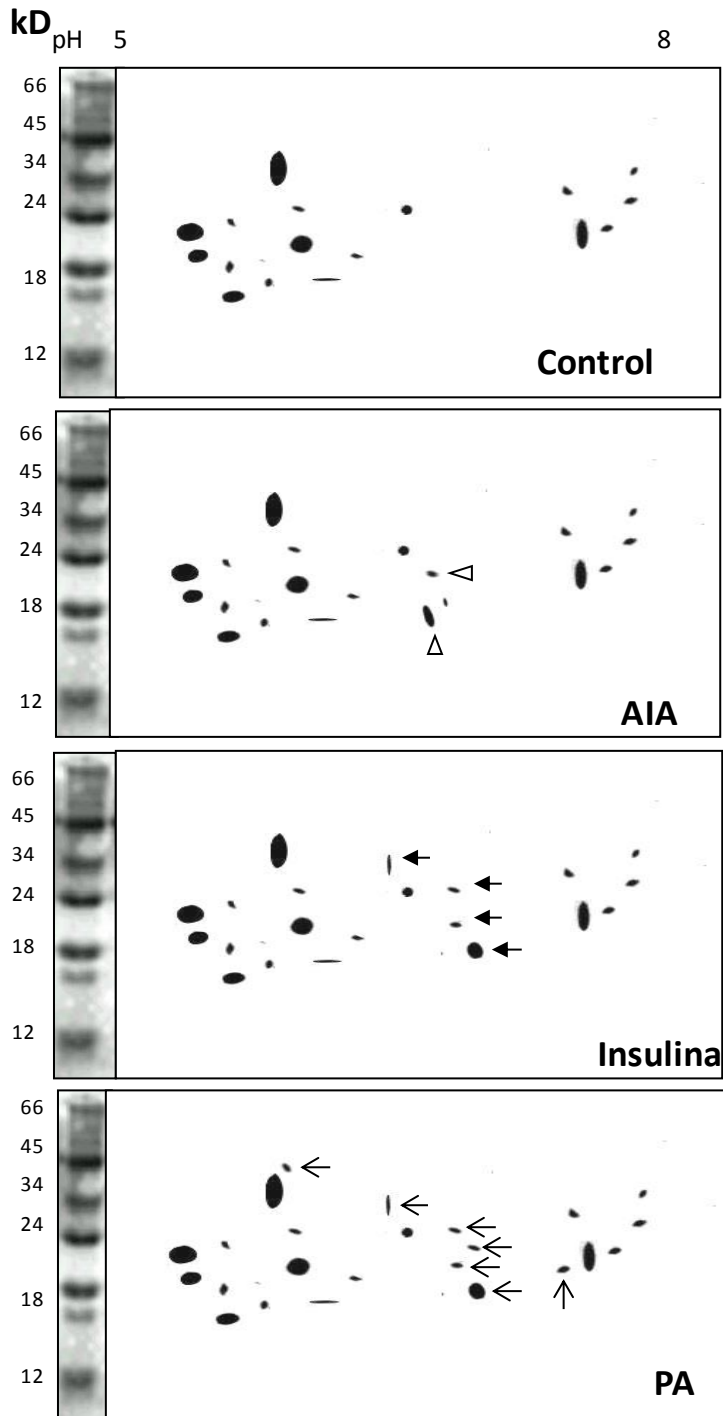
El efecto de las auxinas, la insulina o PA en la fosforilación de las proteínas citoplásmicas se determinó en los coleóptilos de *Z. mays* para conocer las fosfoproteínas involucradas en la vía de señalización activada por estos efectores. [<sup>32</sup>P]-ortofosfato se adicióna a ejes embrionarios con 24 h de germinación, previamente estimulados con cualquiera de los efectores. Los coleóptilos fueron obtenidos y la incorporación de [<sup>32</sup>P]-ortofosfato en las proteínas citoplasmáticas fue medido. Los resultados indicaron un aumento general de la incorporación [<sup>32</sup>P] en estas proteínas, significativamente mayor en el caso de insulina o PA (aproximadamente el 80%) que para la auxina (aproximadamente el 35%) en relación con el control ( $p < 0,05$ ) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Efecto de auxina, insulina y ácido fosfatídico en la fosforilación de proteínas citoplásmicas y ribosomales de coleóptilos de *Zea mays*. Los resultados se muestran como los valores de las medias  $\pm$  1 DE de  $n=3$ .

<b>Incorporación de [<sup>32</sup>P] en las proteínas Citoplásmicas y Ribosomales (cpm x 10<sup>3</sup> /mg protein)</b>				
	<b><i>CONTROL</i></b>	<b><i>AIA</i></b>	<b><i>INSULINA</i></b>	<b><i>PA</i></b>
Citoplásmicas	500.8 $\pm$ 55	687.3 $\pm$ 51	881.1 $\pm$ 54	955.73 $\pm$ 57
Ribosomales	375.3 $\pm$ 50	845.3 $\pm$ 53	1539.4 $\pm$ 59	1612.4 $\pm$ 52

Se obtuvieron las autoradigrafías de la electroforesis 2D de las proteínas citoplásmicas fosforiladas. La aplicación de AIA indujo cambios en el patrón de proteínas fosforiladas con respecto al control (punta de flecha), aunque diferentes a los cambios promovidos por la insulina (flechas con punta negra) o PA (flechas) (Fig. 8) aunque estos efectores estimularon la fosforilación de algunas proteínas comunes, los patrones de proteínas entre el PA y la insulina son más similares entre sí que con los producidos por la auxina. Estos datos sugieren que los coleóptilos estimulados por la insulina o la auxina no internalizan la señal a través de la misma vía. Por otro lado, estos resultados sugieren además el papel del PA como intermediario en la vía TOR en *Z. mays*.

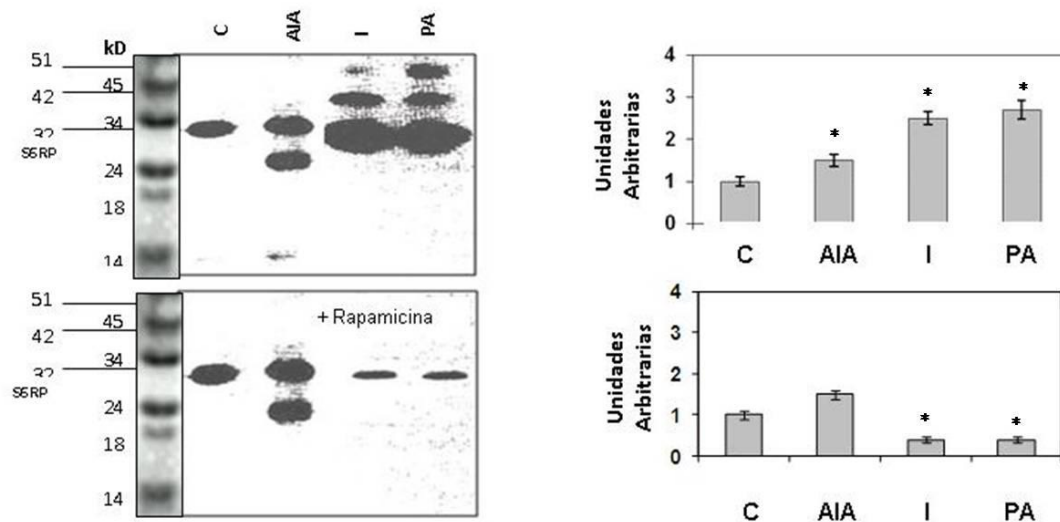
En términos generales, los datos presentados apoyan un modelo de crecimiento del coleóptilo a través de dos vías diferentes, ya sea inducida por la auxina o por la insulina. La interpretación de las dos vías diferentes inducida por la auxina o la insulina es consistente con las diferencias en los patrones de fosforilación de las proteínas citosólicas que se encuentran después de la estimulación con cada efector (Fig.8).



**Figura 8.** Autorradiografía de electroforesis en geles 2D de proteínas citoplásmicas fosforiladas inducidas por auxinas, insulina o PA en coleóptilos de Zea mays. El experimento se reprodujo al menos tres veces en forma independiente con resultados similares. Las puntas de flecha indican proteínas citoplásmicas fosforiladas inducidas por auxinas; las flechas con puntas negras, indican las fosforiladas por insulina y las flechas representan las proteínas fosforiladas por PA.

La auxina y la insulina se sabe que inducen la fosforilación de la S6rp en *Z. mays* y *A. thaliana* (Beltrán et al, 2002; Turck et al, 2004), una proteína conocida por ser el blanco de activación de la vía PI3K-TOR en los mamíferos. Por lo tanto, la posibilidad de un estrechamiento en este paso en las vías de señalización inducida por la auxina o la insulina se analizó. Con este fin, se analizaron las proteínas ribosomales extraídas de ejes embrionarios de *Z. mays* marcados con [<sup>32</sup>P] y estimulados con la auxina, la insulina o PA. También se aplicó la rapamicina, un inhibidor de la cinasa TOR, a los tejidos en combinación con el efector y se determinó la incorporación de [<sup>32</sup>P]. La incorporación de [<sup>32</sup>P] fue significativamente mayor en las proteínas ribosomales obtenidas de coleótilos estimulados con insulina o PA (aproximadamente 400% con respecto al control) en comparación con los estimulados con AIA (aproximadamente un 225% con respecto al control) (Tabla 2). Las proteínas ribosómicas fosforiladas se separaron en SDS-PAGE (Fig. 9). Las correspondientes autorradiografías mostraron nuevamente tres modelos diferentes, uno para cada efector (auxina, insulina o PA). Una banda de 32 kDa fosforilada se observó en todas las muestras, que corresponde a S6rp identificada por Western blot (datos no mostrados). El análisis por densitometría de esta proteína indica un nivel significativamente mayor de incorporación de [<sup>32</sup>P] (aproximadamente 250%) en los ejes embrionarios estimulados con insulina o PA, mientras que el estímulo fue significativamente menor (150%) con la auxina relación con el control (Fig. 9B). En cuanto al resto de las proteínas ribosomales fosforiladas, también se observaron importantes diferencias cualitativas. La insulina o el PA indujeron la fosforilación de 2

proteínas ribosomales de 42 y 51 kDa respectivamente. La auxina induce la fosforilación de una proteína ribosomal de aproximadamente 24 kDa, y una más pequeña de 14 kDa, que posiblemente correspondan a las llamadas fosfoproteínas ribosomales ácidas (Montoya et al, 2002; Santos et al., 2004) (Fig. 9). Por otra parte, la adición de rapamicina a los ejes embrionarios, resultó en una disminución significativa del efecto de la insulina o el PA en la fosforilación S6rp, pero casi no se observó efecto por la auxina en la proteína fosforilada S6rp (Fig. 9A y 9B). Esto sugiere que la vía TOR está involucrada en la acción de la insulina y el PA, siendo este un intermediario del efecto de la insulina, como ya se había reportado en animales (Fang et al. 2001, Hay y Sonenberg, 2004), mientras que la inducción por la auxina no sigue este camino.

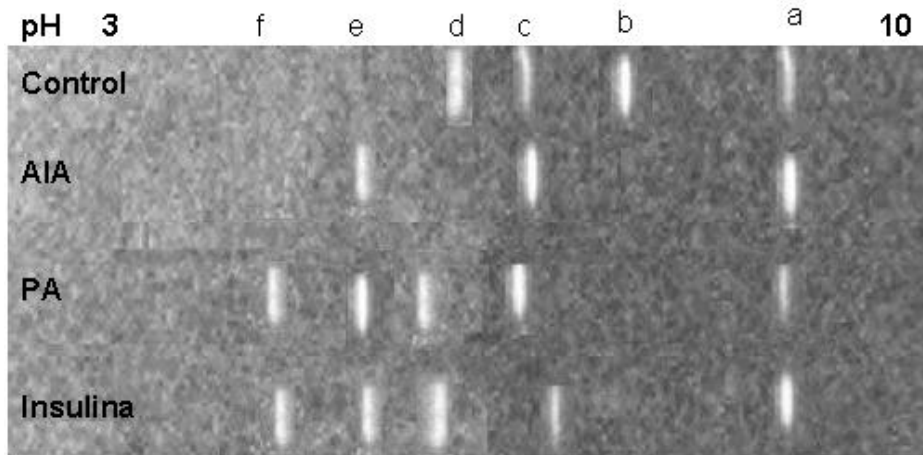


**Figura 9.** Análisis de las proteínas ribosomales fosforiladas, inducidas por auxinas, insulina o PA en coleóptilos de *Zea mays*. A) Autorradiografía de las proteínas ribosomales fosforiladas resueltas por SDS-PAGE. B) Análisis densitométrico de pS6 fosforilada. El experimento se reprodujo al menos tres veces en forma independiente con resultados similares.\* Diferencias estadísticas ( $p < 0,01$ ).

### **3. Activación por fosforilación de la ZmS6K y fosforilación de S6pr.**

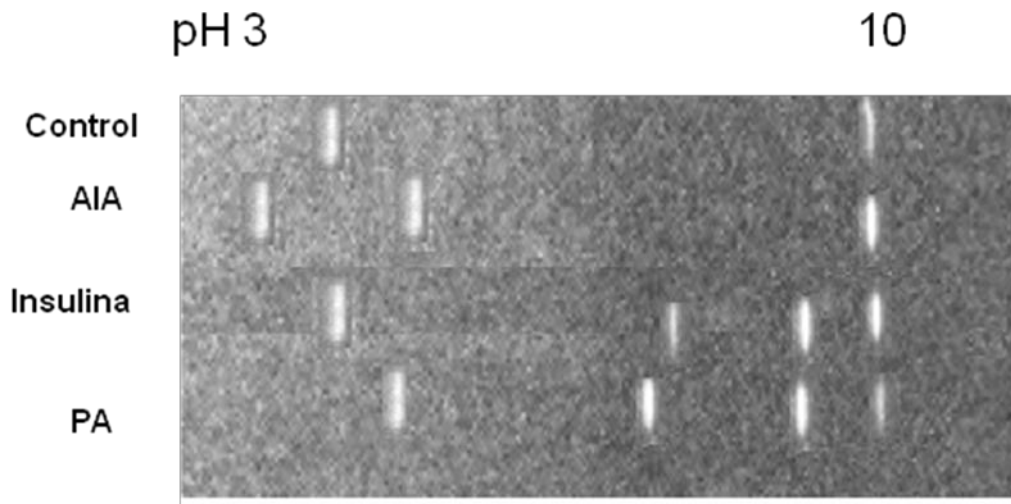
La fosforilación de S6rp requiere de la activación de la cinasa S6K de 70 kDa, (S6K1 o S6K2) (Fumagalli y Thomas, 2000, Kozma y Thomas, 2002). S6K es activada por mitógenos, por insulina y por una gran cantidad de aminoácidos (Kozma y Thomas, 2002). La activación de la S6K1, involucra una serie compleja y secuencial de fosforilaciones múltiples de las serinas y treoninas (Rebholz y col., 2006). Esta fosforilación involucra al menos ocho residuos de Ser/Thr, que incluyen a la Thr229, Ser371, Thr389, Ser404, Ser411, Ser418, Thr421, y Ser424, las cuales están localizadas en el dominio catalítico y en el dominio C-terminal (Hou y col., 2007). Por lo que se inmunoprecipito la ZmS6K y se realizo un IF para determinar el efecto de la auxina y de la insulina / PA en la fosforilación de la cinasa (Fig.10).

En la separación por IEF de la ZmS6K se observaron cuatro isoformas fosforiladas de la enzima (a, b, c, d). En presencia de auxina (AIA) se observaron sólo dos formas fosforiladas (c y e), mientras que con insulina / PA se observaron de la forma c a la f (Fig. 10).



**Figura 10.** Isoformas fosforiladas de la cinasa ZmS6K de coleóptilos de maíz en germinación estimulados con auxina, insulina y PA.

Diversos reportes indican que la S6rp contiene entre cinco y seis residuos de serina fosforilables: Ser-235, Ser-236, Ser-240, Ser-244, y Ser-247, algunos de éstos pueden ser fosforilados por más de una cinasa y en respuesta a distintas señales externas (Fumagalli y Thomas, 2000; Williams y col., 2003). Para determinar si las auxinas y la insulina / PA inducen la fosforilación de los mismos sitios de la PRS6 se inmunoprecipito la proteína y se separo por IEF (Fig. 11). En el control se observaron dos isoformas fosforiladas de la PRS6 con puntos isoeléctricos de aproximadamente pH 3.4 y 9.3. En las muestras tratadas con AIA se observaron tres isoformas con pH 3.1, 3.8 y 9.3, respectivamente. En los tejidos tratados con insulina / PA se observaron cuatro isoformas con pH de 3.4, 6.8, 8.8 y 9.3 (Fig. 11). Estos datos sugieren que la S6rp es fosforilada en distintos sitios dependiendo del efector utilizado. En ambos casos se pueden observar que los patrones de isoformas fosforiladas de S6rp y S6K son similares en los tratamientos con insulina y PA mientras que el AIA produjo un patrón de isoformas distinto.



**Figura 11.** Isoformas fosforiladas de la proteína ribosomal S6 de coleóptilos de maíz en germinación estimulados con auxina, insulina y PA.

En resumen, aunque ambos efectores estimulan la fosforilación S6rp, también se identificaron una serie diferente de otros productos fosforilados específicamente por la auxina o la insulina (Fig. 8 y 9). De igual importancia y en concordancia con estas diferencias, es la inhibición específica de la fosforilación de S6rp observada al aplicar rapamicina en los coleóptilos estimulados con la insulina, efecto que no se observó cuando el estímulo fue con auxina (Fig. 9). Esto indica que en el primer caso la vía TOR se ha activado (Fang et al. 2001, Hay y Sonenberg, 2004), mientras que la inducción por la auxina no sigue este camino. Una explicación para esta diferencia podría ser la activación de dos isoformas diferentes de la cinasa ZmS6 responsable de la fosforilación de S6rp por cada efector (Tabla 2, Fig. 10). Existen reportes que indican la presencia de dos isoformas de S6K en muchos organismos, una de las cuales podría ser una enzima nuclear (Panasyuk et al.2006). Los diferentes productos obtenidos de S6rp fosforilada después de la estimulación con los



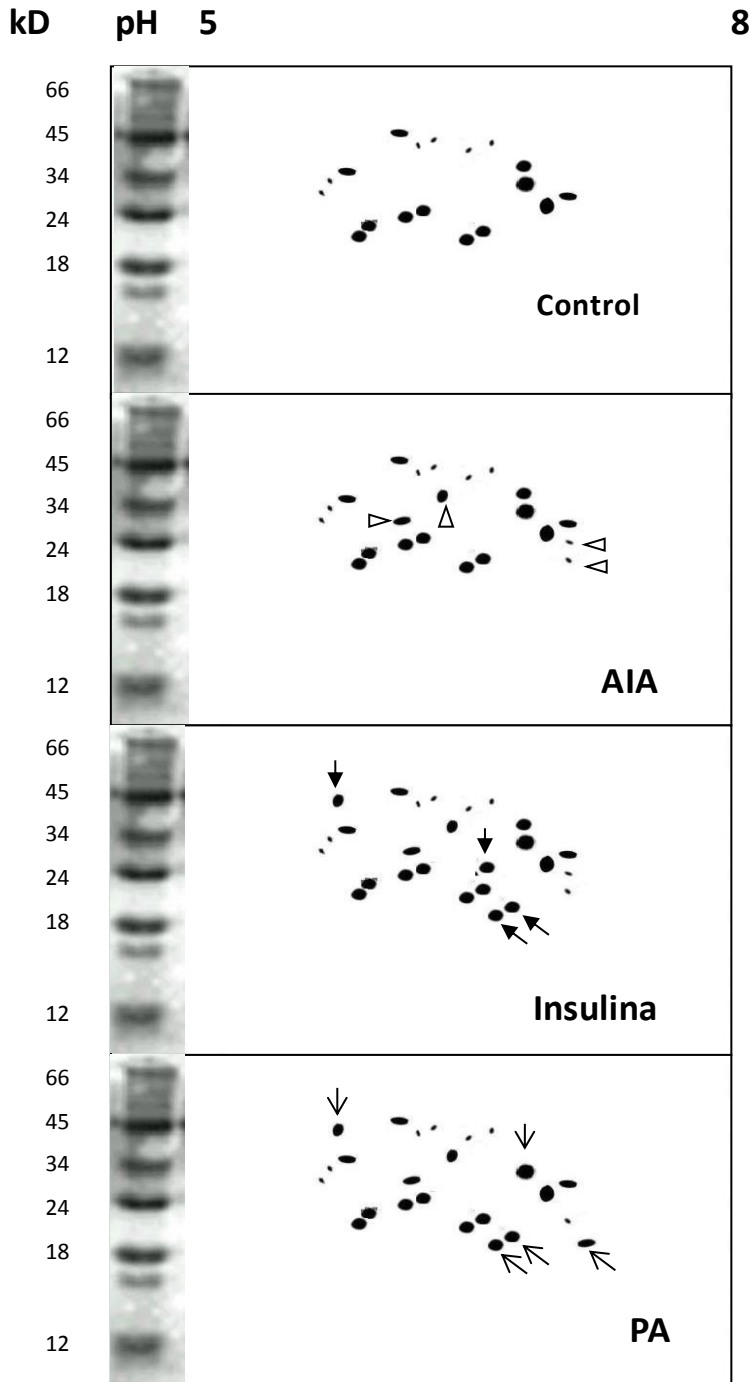
diferentes efectores, así como con la diferente sensibilidad a la rapamicina observada en esta investigación son consistentes con esta explicación (Fig. 9 y 11). Existen también reportes que indican que S6K también podría ser activada por otra cinasa, estrechamente relacionada con la vía TOR, llamada, PDK1, que es dependiente de la activación por  $\text{Ca}^{2+}$  (Bögge et al., 2003). Se sabe que después de la estimulación de células con auxina, se provoca un aumento en el  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico (Macdonald, 1997), estos datos sugieren que la activación de la cinasa S6 inducida por la auxina en los coleóptilos de *Z. mays* puede deberse a la activación de esta segunda vía. Reportes anteriores también han demostrado que la vía de señalización TOR-S6K es funcional en *Z. mays* en germinación, dirigida a los aparatos de traducción a través de una cinasa TOR que es inhibida por la rapamicina (Dinkova, 2007). Interesantemente, la auxina pero no la insulina o el PA, induce la fosforilación de proteínas ribosomales de bajo peso molecular (Fig. 3A, aproximadamente 14 kDa), que probablemente corresponden a las fosfoproteínas ácidas (Montoya et al, 2002.; Santos et al., 2004). Estas proteínas son conocidas por desempeñar un papel central en la regulación de la traducción debido a su interacción con factores de elongación (Vard et al, 1997; Santos et al, 2004).

#### 4. Patrones de síntesis de proteínas citosólicas.

Es conocido que la insulina activa a TOR y a S6K regulando la síntesis *de novo* de proteínas en células estimuladas. Para probar si la auxina y la insulina afectan diferencialmente el patrón de proteínas sintetizadas en los coleóptilos de *Z. mays*, los ejes embrionarios extraídos de semillas germinadas por 24 h fueron incubados con [<sup>35</sup>S]- metionina y estimulados con auxina, insulina o PA. La cantidad total de [<sup>35</sup>S]- metionina incorporada en las proteínas citosólicas fue determinada y las proteínas fueron separadas en electroforesis 2D.

La incorporación de [<sup>35</sup>S]- metionina en las proteínas citosólicas presentó ligeros cambios cuantitativos inducidos por la auxina, la insulina o el PA. El rango de incorporación es de 25 al 31 % mayor comparado con el control. Las autoradiografías de la separación en electroforesis bidimensional mostraron un patrón específico para cada efector. Los coleóptilos tratados con AIA mostraron cambios en el patrón de proteínas sintetizadas en comparación con el control (punta de flecha) y fueron diferentes a los inducidos por insulina (flechas con puntas negras) o PA (flechas).

Es importante mencionar que el PA induce la síntesis de una proteína extra con respecto a la insulina e inhibe la síntesis de otra con respecto al control (Fig. 12). Estos datos indican claramente que cada efector (auxina, insulina o PA) causan una diferente respuesta bioquímica después de la estimulación de los coleóptilos.



**Figura 12.** Efecto de auxinas, insulina y PA en la síntesis de novo de proteínas citoplásmicas de coleótilos de *Zea mays*. Autoradiografía de los patrones electroforéticos en geles 2D de las proteínas citoplásmicas sintetizadas de novo. Los experimentos se reprodujeron al menos tres veces con resultados similares. Las puntas de flecha indican proteínas citoplásmicas sintetizadas de novo inducidas por auxinas; las flechas con puntas negras indican aquellas sintetizadas por insulina, y las flechas representan aquellas inducidas por PA.

Las plantas crecen siguiendo dos modos de crecimiento en respuesta a varios estímulos: alargamiento y división celular. El balance entre estos dos modos de crecimiento depende del estímulo, del tipo de tejido blanco y de su estado de desarrollo (Eckardt, 2005). Nuestros resultados son consistentes con esta propuesta, ya que dos reguladores del crecimiento producen diferentes eventos bioquímicos después de actuar en el mismo tejido, en maíz, aún cuando estos efectores tienen algunos intermediarios en común. El alargamiento de los coleóptilos es un efecto de auxinas bien conocido (Benjamins y Scheres, 2008). Por otra parte, la insulina, así como los factores semejantes a insulina tales como el factor semejante a insulina de maíz ZmIGF se han reconocido por tener actividad mitogénica en tejidos vegetales, induciendo la síntesis de ADN en plántulas de maíz y división celular en zanahoria y maíz en cultivos de células in vitro (García y col., 2001; Yamazaki y col., 2003; Sotelo y col., 2010). Así la literatura apoya que las auxinas pueden ser consideradas como estimuladoras del crecimiento que promueven el alargamiento o expansión celular, mientras que la insulina lo haría principalmente estimulando la división celular.

En términos generales, los datos presentados apoyan un modelo de crecimiento del coleóptilo a través de dos vías diferentes, ya sea inducida por la auxina o por la insulina. Por otra parte, la sensibilidad a la rapamicina de la fosforilación de S6pr inducida por PA apoya la participación de este fosfolípido como un segundo mensajero en la acción de la insulina que implica la vía TOR en las plantas, como se ha demostrado que se producen en los metazoos (Fang et al.2001). Sin embargo, las

respuestas del PA y de la insulina no eran idénticas, lo que posiblemente indica la participación de la PA como intermediario de otras vías inducidas por otras hormonas o el estrés. En general, el presente trabajo contribuye a la comprensión de los posibles mecanismos implicados en la regulación del crecimiento vegetal. Los datos apoyan la propuesta de que la auxina o la insulina provocan el crecimiento del coleóptilo de *Z. mays* por mecanismos distintos, a través de dos vías independientes de transducción de señales. Aún cuando ambos efectores comparten algunos intermediarios, al parecer no tienen los mismos blancos ni inducen los mismos eventos bioquímicos río abajo, en particular en la síntesis de las proteínas.

## CONCLUSIONES

- Los niveles de ácido fosfatídico (PA) en los coleóptilos de maíz en germinación incrementaron al tratar éstos con auxina o insulina.
- El incremento en PA se debe principalmente a la participación de la fosfolipasa D (PLD).
- La fosforilación de proteínas citosólicas y ribosomales fue incrementada al tratar los coleóptilos de maíz en germinación con insulina, AIA y PA.
- El incremento en la fosforilación fue mayor en las proteínas ribosomales y al aplicar insulina o PA.
- Cada efector tiene un patrón específico de proteínas citosólicas fosforiladas, aunque los patrones entre insulina o PA son más similares entre sí que los observados con AIA.
- El AIA, insulina o PA incrementaron la fosforilación de la proteína ribosomal S6. El incremento fue mayor con insulina o PA.
- La rapamicina inhibe la fosforilación inducida por insulina o PA, lo que indica que estos efectores actúan a través de la vía PI3K-mTOR-S6K.
- El AIA indujo la fosforilación de proteínas ribosomales de bajo peso molecular, que podrían corresponder a las proteínas ribosomales ácidas.
- Los patrones de proteínas citosólicas recién sintetizadas son específicos para cada efector, aunque los patrones entre insulina o PA son más similares entre sí que los observados con AIA.

- La auxina y la insulina comparten algunos intermediarios en su vía de transducción, (activación de S6k, fosforilación de S6p). Sin embargo, no producen los mismos efectos en estos intermediarios y las respuestas finales en los patrones de proteínas sintetizadas son distintos.

## **PERSPECTIVAS**

El eje embrionario de maíz está compuesto por diferentes tejidos que pudieran responder de manera diferente a la auxina o insulina, por lo que es necesario analizar la respuesta de estos tejidos a los efectores. Asimismo, se puede determinar la participación del ácido fosfatídico en la respuesta de división celular al aplicar auxina o insulina en los ejes embrionarios de maíz.

Los efectores utilizados cambiaron el patrón de proteínas sintetizadas, sin embargo estas no fueron identificadas, lo que sería interesante para conocer qué proteínas están participando en la(s) respuesta(s) de los tejidos a auxina o insulina.



## BIBLIOGRAFÍA

- Abel, S. y Theologis, A. 1996. Early genes and auxin action. *Plant Physiol.* 111: 9-17.
- Agredano Moreno, L.T., Reyes de la Cruz, H., Martínez Castilla, L.P. y Sánchez de Jiménez, E. 2007. Distinctive expression and functional regulation of maize (*Zea mays* L.) TOR kinase ortholog. *Mol. Biosyst.* 3: 794-802.
- Aguilar, R., Montoya, L. y Sánchez de Jiménez, E. 1998. Synthesis and phosphorylation of maize acidic ribosomal proteins. *Plant Physiol.* 116: 379-385.
- Anastasiou, E. y Lenhard, M. 2007. Growing up to one's standard. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10(1): 63-69.
- Bailey-Serres, J. 1998. Cytoplasmic ribosomes of higher plants. In *A Look beyond Transcription: Mechanisms Determining mRNA Stability and Translation in Plants*. J. Bailey-Serres and D.R. Gallie, eds (Rockville, MD: American Society of Plant Physiology), pp. 125–144.
- Baíza, A. y Sánchez-de-Jiménez, E. 1989. Effect of the auxin, 2-(2-methyl-4-chlorophenoxy)propionic acid, on cell cycle regulation in maize embryonic tissues. *Physiol. Plant.* 75 (2): 261–266.
- Barthel, A., Schmoll, D. y Unterman, T.G. 2005. FoxO proteins in insulin action and metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 16: 183–189.
- Beltrán-Peña, E., Aguilar, R., Ortíz-López, A., Dinkova. T.D. y Sánchez de Jiménez, E. 2002. Auxin stimulates S6 ribosomal protein phosphorylation in maize thereby affecting protein synthesis regulation. *Physiol. Plant.* 115: 291-297.
- Benjamins, R., y Scheres, B. 2008. Auxin, the looping star in plant development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 443–465.
- Bevan, P. 2001. Insulin signalling. *J. Cell Sci.* 114: 1429-1430.
- Bewley, J.D. 1997. Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell.* 9: 1055-1066.
- Bewley, J.D. y Black, M. 1994. *Seeds: Physiology of Development and Germination*. New York: Plenum Press.445p
- Bewley, J.D. y Marcus, A. 1990. Gene expression in seed development and germination. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 38: 165-193.

- Bögre, L., Okrész, L., Henriques, R. y Anthony, R.G. 2003. Growth signaling pathways in Arabidopsis and the AGC protein kinases. *Trends Plant Sci.* 8: 424-43.
- Botha, F. C., Potgieter, G. P., y Botha, A.M. 1992. Respiratory metabolism and gene expression during seed germination. *Plant Growth Regul.* 11(3): 211-224.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bradford, K.J. 1995. Water relations in seed germination. In: Kigel, J.; Galili, G. *Seed development and germination.* New York: Marcel Dekker. pp.351-395.
- Brown, E.J., Beal, P.A., Keith, C.T., Chen, J., Shin, T.B. y Schreiber, S.L. 1995. Control of p70 S6 Kinase activity of FRAP *in vivo*. *Nature* 377: 441-446.
- Browning, K. S., Humphreys, J., Hobbs, W., Smith, G.B. y Ravel, J.M. 1990. Determination of the amounts of the protein synthesis initiation and elongation factors in wheat germ. *J. Biol. Chem.* 265: 17967-17973.
- Burgering, B.M., Freed, E., Van der Voorn, L., McCormick, F. y Bos, J.L. 1994. Platelet-derived growth factor-induced p21ras-mediated signaling is dependent of platelet-derived growth factor receptor interaction with GTPase-activating protein or phosphatidylinositol -3-Kinase. *Cell Growth Differ.* 5: 341-347.
- Bush, D.S. 1993. Regulation of cytosolic calcium in plants. *Plant Physiol.* 103: 7-13.
- Campanoni, P. y Nick, P. 2005. Auxin-dependent cell division and cell elongation. 1-naphthaleneacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid activate different pathways. *Plant Physiol.* 137: 939-948.
- Catusse, J., Strub, J.M., Job, C., Van Dorsselaer, A. y Job, D. 2008. Metabolic control of seed germination. *J. Soc. Biol.* 202(3): 223-229.
- Chapman, E.J. y Estelle, M. 2009. Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Genet.* 43: 265-285.
- Chapman, K. D. 1998. Phospholipase activity during plant growth and development and in response to environmental stress. *Trends Plant Sci.* 3(11): 419-426.
- Chen, J. G., Ullah, H., Young, J. C., Sussman, M. R. y Jones, A. M. 2001. ABP1 is required for organized cell elongation and division in Arabidopsis embryogenesis. *Genes Dev.* 5: 902-911.

- Cho, M.H. y Boss, W.F. 1995. Transmembrane signaling and phosphoinositides. *Methods Cell Biol.* 49: 543-553.
- Collier, E., Watkinson, A., Cleland, C.F. y Roth, J. 1987. Partial purification and characterization of an insulin-like material from spinach and *Lemna gibba* G3. *J. Biol. Chem.* 262: 6238-6247.
- Dann, S.G., Selvaraj, A. y Thomas, G. 2007. mTOR Complex1-S6K1 signaling; at the crossroads of obesity, diabetes and cancer. *Trends Mol. Med.* 13: 252-259.
- Dennis, P.B., Jaeschke, A., Saitoh, M., Fowler, B., Kozma, S.C. y Thomas, G. 2001. Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science* 294: 1102–1105.
- Dharmasiri, N. y Estelle, M. 2004. Auxin signaling and regulated protein degradation. *Trends Plant Sci.* 9: 302-308.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S. y Estelle, M. 2005. The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature.* 435: 441-445.
- Dinkova, T.D., Aguilar, R. y Sánchez de Jiménez, E. 2000. Expression of maize eukaryotic initiation factor (eIF) iso4E is regulated at the translational level. *Biochem. J.* 351: 825-831.
- Dinkova, T.D., Marquez-Velázquez, N.A., Aguilar, R., Lázaro-Mixteco, P.E. y 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.
- Dinkova, T.D., Reyes de la Cruz, H., García-Flores, C., Aguilar, R., Jiménez-García, L.F., y 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, T.D. y Sánchez de Jiménez, E. 1999. Differential expression and regulation of translation initiation factors -4E and -iso4E during maize seed germination. *Phyiol. Plant.* 107: 419-425.
- Dommes, J. y Van de Walle, C. 1990. Polysome formation and incorporation of new ribosomes into polysomes during germination of the embryonic axis of maize. *Physiol. Plant.* 79: 289-296.
- Edelmann, H. y Schopfer, P. 1989. Role of protein and RNA synthesis in the initiation of auxin-mediated growth in coleoptiles of *Zea mays* L. *Planta* 179: 475-485.

- Efstratiadis, A. 1998. Genetics of mouse growth. *Int. J. Dev. Biol.* 42: 955–976.
- Einspahr, K.J. y Thompson, Jr. G.A. 1990. Transmembrane signalling via phosphatidylinositol 4,5 biphosphate hydrolysis in plants. *Plant Physiol.* 93: 361-366.
- Eckardt, N.A. 2005. MicroRNAs regulate auxin homeostasis and plant development. *Plant Cell* 17: 1335-1338.
- Erwin, L., van Dijk, Sussenbach, J.S. y Holthuisen, P.E. 2000. Distinct RNA structural domains cooperate to maintain a specific cleavage site in the 3'-UTR of IGF-II mRNAs. *J. Mol. Biol.* 300 (3): 449-467.
- Ettlinger, C. y Lehle, L. 1988. Auxin induces rapid changes in phosphatidylinositol metabolites. *Nature.* 331: 176-1786.
- Fang, Y., Vilella-Bach, M., Bachmann, R., Flanigan, A. y Chen, J. 2001. Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science* 294:1942-1945.
- Felle, H. 1988. Auxin causes oscillations of cytosolic free calcium and pH in *Zea mays* coleoptiles. *Planta.* 174: 495-499.
- Finch, S.W.E. y Leubner, M.G. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist* 171: 501–523.
- Foster, D.A. 2007. Regulation of mTOR by Phosphatidic Acid?. *Cancer Res.* 67: 1-4.
- Frank, W., Munnik, T., Kerkmann, K., Salamini, F. y Bartels, D. 2000. Water deficit triggers phospholipase D activity in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Cell* 12: 111-123.
- Fumagalli, S. y Thomas, G. 2000. S6 phosphorylation and signal transduction. In: Sonenberg, N., Hershey, J.W.B. y Mathews, M.B. (eds) *Translational Control of gene expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor NY, pp 695-717.
- Gantt, J.S. y Key, J.L. 1985. Coordinate expression of ribosomal protein mRNA following auxin treatment of soybean hypocotyls. *J. Biol. Chem.* 260: 6175-6181.
- Garbers, Ch. y Simmons, C. 1994. Approaches to understanding auxin action. *Trends Cell Biol.* 4: 245-250.

- García-Flores, C., Aguilar, R., Reyes de la Cruz, H., Albores, M. y Sánchez de Jiménez, E. 2001. A maize insulin-like growth factor signals to a transduction pathway that regulates protein synthesis in maize. *Bioch. J.* 358: 95-100.
- Guilfoyle, T., Hagen, G., Ulmasov, T. y Murfett, J. 1998. How does auxin turn on genes?. *Plant Physiol.* 118: 341-347.
- Guo, H.S., Xiea, Q., Feia, J.F. y Chua, N.H. 2005. MicroRNA Directs mRNA Cleavage of the Transcription Factor *NAC1* to Downregulate Auxin Signals for Arabidopsis Lateral Root Development. *Plant Cell* 17(5): 1376-1386.
- Georgieva, E.I., López-Rodas, G., Hittmair, A., Feichtinger, H., Brosch, G. y Loidl, P. 1994. Maize embryo germination. *Planta* 192 (1): 118-124.
- Gingras, A.C., Raught, B., y Sonenberg, N. 1999. eIF4 initiation factors: Effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 913–963.
- Gingras, A.C., Raught, B. y Sonenberg, N. 2001. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev.* 15: 807-826.
- Hannan, K.M., Brandenburger, Y., Jenkins, A., Sharkey, K., Cavanaugh, A., Rothblum, L., Moss, T., Poortinga, G., McArthur, G.A., Pearson, R.B. y Hannan, R.D. 2003. mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcription factor UBF. *Mol. Cel. Biol.* 23: 8862-8877.
- Harrington, L.S., Findlay, G.M. y Lamb, R.F. 2005. Restraining PI3K: mTOR signalling goes back to the membrane. *Trends Bioch. Sci.* 30 (1): 35-42.
- Hay, N. y Sonenberg, N. 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Gen. Dev.* 18: 1926-1945.
- Hershey, J.W.M. 1989. Protein phosphorylation controls translation rates. *J. Biol. Chem.* 264: 20823-20826.
- Hicks, G.R., Rice, M.S. y Lomax, T.L. 1993. Characterization of auxin-binding proteins from zucchini plasma membrane. *Planta* 189: 83-90.
- Hobbie, L.J. 2007. Auxins. In *Encyclopedia of Life Sciences*, pp 1-9.
- Hou, Z., He, L. y Qi, R.Z. 2007. Regulation of S6 kinase 1 activation by phosphorylation at Ser-411. *J. Biol. Chem.* 282: 6922-6928.

Ingram, G.C. y Waites, R. 2006. Keeping it together: co-ordinating plant growth. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9(1):12-20.

Jayachandran, S. y Bailey-Serres, J. 1995. Nucleotide sequence of a cDNA for the maize protein synthesis initiation factor 4A. *Plant Physiol.* 108(3): 1317-1328.

Jefferies, H.B.J. y Thomas, G. 1996. Ribosomal protein S6 phosphorylation and signal transduction. In: Hershey, J.W.B., Mathew, M.B. y Sonenberg, N. (eds) *Translation Control*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor NY, pp 389-409.

Kapp, L.D. y Lorsch, J.R. 2004. The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annu. Rev. Biochem.* 73: 657–704.

Kepinski, S. y Leyser, O. 2005. The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435: 446-45.

Kieffer, M., Neve, J. y Kepinski, S. 2010. Defining auxin response contexts in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13: 12-20.

Kishikawa, K., Chalfant, C.E., Perry, D.K., Bielawska, A. y Hannun, Y.A. 1999. Phosphatidic acid is a potent and selective inhibitor of protein phosphatase 1 and an inhibitor of ceramide-mediated responses. *J. Biol. Chem.* 274: 21335–21341.

Kleijn, M., Scheper, G.C., Voorma, H.O. y Thomas, A.A.M. 1998. Regulation of translation initiation factors by signal transduction. *Eur. J. Biochem.* 253: 531-544.

Koornneef, M., Bentsink, L. y Hilhorst, H. 2002. Seed dormancy and germination. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 33–36.

Koshiba, T., Ballas, N., Wong, L.M. y Theologis, A. 1995. Transcriptional regulation of PS-IAA4/5 and PS-IAA6 early gene expression by indoleacetic acid and protein synthesis inhibitors in pea (*Pisum sativum*). *J. Mol. Biol.* 253: 396-413.

Kozak, M. 1991. An analysis of vertebrate mRNA sequences: initiations of translational control. *J. Cell Biol.* 115: 887-903.

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

Laxalt, A.M. y Munnik, T. 2002. Phospholipid signalling in plant defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5(4): 332-338.

Lee, S., Hirt, H. y Lee, Y. 2001. Phosphatidic acid activates a wound-activated MAPK in *Glycine max*. *Plant J.* 26: 479-486.

Lewin, B. 1997. *Genes VI*. Oxford University Press. p 1260.

Lewin, B. 1997. *Genes VII*. Oxford University Press. p 990.

Long, X., Lin, Y., Ortiz-Vega, S., Yonezawa, K. y Avruch, J. 2005. Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Curr. Biol.* 15: 702-713.

Luan, S., Kudlab, J., Rodriguez-Concepcion, M., Yalovsky, S. y Gruissem, W. 2002. Calmodulins and Calcineurin B-like Proteins. Calcium Sensors for Specific Signal Response Coupling in Plants. *Plant Cell* 14: S389-S400.

Macdonald, H. 1997. Auxin perception and signal transduction. *Physiol. Plant.* 100: 423-430.

Mallory, A.C., Bartel, D.P. y Barte, B. 2005. MicroRNA-Directed Regulation of Arabidopsis *AUXIN RESPONSE FACTOR17* is Essential for Proper Development and Modulates Expression of Early Auxin Response Genes. *Plant Cell* 17(5): 1360-1375.

Martínez Silva, A.V., de la Torre Díaz, S. y Dinkova, T.D. 2009. Los factores de traducción tipo eIF4E en plantas: redundancia y diversidad funcional. *Mensaje Bioquímico XXXIII* 117-130.

Mathews, M.B., Sonenberg, N. y Hershey, J.W.B. 2000. Origins and Principles of Translational Control. In M.B. Mathews, N. Sonenberg, and J.W.B. Hershey (eds). *Translational Control of gene expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor NY, pp 1-31.

Mathews, M.B., Sonenberg, N. y Hershey, J.W.B. 2007. Origins and Principles of Translational Control. In M.B. Mathews, N. Sonenberg, and J.W.B. Hershey (eds). *Translational Control in Biology and Medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor NY, pp 1-25.

Meuwly, P. y Pilet, P.E. 1991. Simultaneous gas chromatography - mass spectrometry quantification of endogenous [<sup>12</sup>C]- and applied [<sup>13</sup>C] Indole-3-yl- acetic acid levels in growing maize roots. *Plant Physiol.* 95: 179-183.

Merrick, W.C. 1992. Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiol. Rev.* 56(2): 291-315.

Meyuhas, O., Avni, D. y Shama S. 1996. Translational Control of ribosomal protein mRNAs in eukaryotes. In: Hershey, J.W.B., Mathews, M.B. y Sonenberg, N. (eds) Translation Control. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor NY, pp 363-388.

Meyuhas, O. y Hornstein, E. 2000. Translational control of TOP mRNA. In: Sonenberg, N., Hershey, J.W.B. y Mathews, M.B. (eds) Translational Control of gene expression. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor NY, pp 671-693.

Montoya-Garcia, L., Muñoz-Ocoter, V., Aguilar, R. y Sanchez de Jimenez, E. 2002. Regulation of acidic ribosomal protein expression and phosphorylation in maize. *Biochem.* 41: 10166-10172.

Moreno, M. E. 1996. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. 3a. ed. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. pp. 393.

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

Munnik, T. 2001. Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger. *Trends Plant Sci.* 6: 227-233.

Munnik, T., De Vrije, T., Irvine, R.F. y Musgrave, A. 1996. Identification of diacylglycerol pyrophosphate as a novel metabolic product of phosphatidic acid during G-protein activation in plants. *J.Biol. Chem.* 271: 15708-15715.

Munnik, T., Van Himbergen, J.A.J., Ter Riet, B., Braun, F.J., Irvine, R.F., Vanden Ende, H. y Musgrave, A. 1998a. Detailed analysis of the turnover of phosphoinositides and phosphatidic acid upon activation of phospholipases C and D in *Chlamydomonas* cells treated with non - permeabilizing concentrations of mastoporan. *Planta* 207: 133 - 145

Munnik, T., Irvine, R.F. y Musgrave, A. 1998b. Phospholipid signalling in plants. *Bioch. Biophys. Acta* 1389: 222-272.

Nakae, J., Kitamura, T., Ogawa, W., Kasuga, M., y Accili, D. 2001. Insulin regulation of gene expression through the forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) requires kinases distinct from Akt. *Biochem.* 40: 11768–11776.



Napier, P.M. y Venis, M.A. 1991. From auxin-binding protein to plant hormone receptor?. *Trends Biochem. Sci.* 16: 72-75.

Nijhout, H.F. 2003. The control of growth. *Development* 130: 5863-5867.

Nonogaki, H., Bassel, G.W. y Bewley, J.D. 2010. Germination- Still a mystery. *Plant Sci.* 179: 574-581.

Nygård, O. y Nilsson, L. 1990. Translational dynamics. Interactions between the translational factors, tRNA and ribosomes during eukaryotic protein synthesis. *Eur. J. Biochem.* 191: 1-17.

Oldham, S. y Hafen, E. 2003. Insulin/IGF and target of rapamycin signaling: a TOR the force in growth control. *Trends Cell Biol.* 13: 79-85.

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

Panasyuk, G., Nemazanyy, I., Zhyvoloup, A., Bretner, M., Litchfield, D.W., Filonenko, V. y Gout, I.T. 2006. Nuclear export of S6K1 is regulated by protein kinase CK2 phosphorylation at Ser-17. *J. Biol. Chem.* 281: 31188-31201.

Park, W.J., Schäfer, A., Prinsen, E., van Onckelen, H., Kang, B.G. y Hertel, R. 2001. Auxin-induced elongation of short maize coleoptile segments is supported by 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one. *Planta* 213: 92-100.

Patarsky-Polischuk, I., Stolovich-Rain, M., Hausner-Hanochi, M., Kasir, J., Cybulski, N., Avruch, J., Rüegg, M.A., Hall, M.N. y 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.

Perera, I.Y., Heilmann, I. y Boss, W.F. 1999. Transient and sustained increases in inositol 1,4,5-trisphosphate precede the differential growth response in gravistimulated maize pulvini. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 5838-5843.

Pérez, F.L., Aguilar, R. y Sánchez de Jiménez, E. 1987. Effect of an exogenous auxin on maize tissues. Alteration of protein synthesis and phosphorylation. *Physiol. Plant.* 69: 517-522.

Pérez, F.L., Aguilar, R., Pérez, M.A. y Sánchez de Jiménez, E. 1990. Phosphorylation of ribosomal proteins induced by auxins in maize embryonic tissue. *Plant Physiol.* 94: 1270-1275.

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

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

Perrot-Rechenman, C. 2010. Cellular responses to auxin: division versus expansion. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2: a001446.

Pestova, T.V. y Hellen, C.U. 2000. The structure and function of initiation factors in eukaryotic protein synthesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 57(4):651-674.

Peterson, R.T. y Schreiber, S.L. 1998. Translation control: connecting mitogens and the ribosome. *Curr. Biol.* 8: R248-R250.

Proud, C.G. 1994. Peptide-chain elongation in eukaryotes. *Mol. Biol. Rep.* 19: 1961-1700.

Proud, C.G. y Denton, R.M. 1997. Molecular mechanisms for the control of translation by insulin. *Biochem. J.* 328: 329-341.

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

Quevedo, C., Alcázar, A., y Salinas, M. 2000. Two different signal transduction pathways are implicated in the regulation of initiation factor 2B activity in insulin-like growth factor-1-stimulated neuronal cells. *J. Biol. Chem.* 275:19192-19197.

Raught, B., Gingras, A.C. y Sonenberg, N. 2001. The Target of Rapamycin (TOR) Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98(13): 7037-7044.

Rebholz, H., Panasyuk, G., Fenton, T., Nemazanyy, I., Valovka, T., Flajolet, M., Ronnstrand, T., Stephens, L., West, A. y Gout, I.T. 2006. Receptor association and tyrosine phosphorylation of S6 kinases. *FEBS J.* 273: 2023-2036.

Remacha, M., Jimenez-Diaz, A., Santos, C., Briones, E., Zambrano, R., Rodriguez Gabriel, M.A., Guarinos, E. y Ballesta, J.P. 1995. Proteins P1, P2, and P0, components of the eukaryotic ribosome stalk. New structural and functional aspects. *Biochem. Cell. Biol.* 73: 959-968.

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

Rodríguez-López, C.D., Rodríguez-Romero, A., Aguilar, R. y Sánchez de Jiménez, E. 2011. Biochemical characterization of a new maize (*Zea mays* L.) peptide growth factor. *Protein Pept. Lett.* 18(1):84-91.

Rutter, J., Probst, B.L. y McKnight, S.L. 2002. Coordinate Regulation of Sugar Flux and Translation by PAS Kinase. *Cell* 111 (1): 17-28.

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

Saltiel, A.R. y Kahn, C.R. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414: 799-806.

Sánchez de Jiménez, E., Albores, M. y Loyola, V.M. 1981. Effect of 2,4-D analogues on the induction and maintenance of callus in maize tissue culture. *Ann. Appl. Biol.* 98: 347-353.

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

Sánchez de Jiménez, E., Beltrán, P.E. y Ortiz, L.A. 1999. Insulin-stimulated ribosomal protein synthesis in maize embryonic axes during germination. *Physiol. Plant.* 105: 148-154.

Sánchez de Jiménez, E. 2000. Protein synthesis in seed germination: Connecting external cell signals with the ribosome. In: Black, M., Bradford, K.J. y Vázquez-Ramos J. (eds.). *Seed Biology: Advances and Applications*. CABI Publishing. Londres, pp 11-24.

Sanders, D., Brownlee, C. y Harper, J.F. 1999. Communicating with calcium. *Plant Cell* 11: 691-706.

Santos, C., Rodríguez-Gabriel, M.A., Remacha, M. y Ballesta, J.P.G. 2004. Ribosomal P0 protein domain involved in selectivity of antifungal sordarin derivatives. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 48: 2930-2936.

Scherer, G.F.E. y Arnold, B. 1997. Inhibitors of animal phospholipase A<sub>2</sub> enzymes are selective inhibitors of auxin - dependent growth. Implications for auxin - induced signal transduction. *Planta* 202: 462-469.

Scott, P.H., Brunn, G.J., Kohn, A.D., Roth, R.A. y Lawrence, J.C., Jr. 1998. Evidence of insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin mediated by a protein kinase B signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 7772-7777.

Shah, Z.H., Hakkaart, G.A., Arku, B., de Jong, L., van der Spek, H., Grivell, L.A. y Jacobs, H.T. 2000. The human homologue of the yeast mitochondrial AAA metalloprotease Yme1p complements a yeast yme1 disruptant. *FEBS Lett.* 478: 267–270.

Sitbon, F. y Perrot, C. R. 1997. Expresión of auxin-regulated genes. *Physiol. Plant.* 100: 443-455.

Sorin, C., Bussell, J.D., Camus, I., Ljung, K., Kowalczyck, M., Geiss, G., McKhann, H., Garcion, C., Vaucheret, H., Sandberg, G. y Bellini, C. 2005. Auxin and light control of adventitious rooting in *Arabidopsis* require ARGONAUTE1. *Plant Cell* 17: 1343-1359.

Sotelo, R., Garrocho-Villegas, V., Aguilar, R., Calderón, M.E. y Sánchez de Jiménez, E. 2010. Coordination of cell growth and cell division in maize (*Zea mays* L.) relevance of the conserved TOR signal transduction pathway. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 46(6): 578-586.

Stevenson, J.M., Perera, I.Y., Heilmann, I., Persson, S. y Boss, W.F. 2000. Inositol signaling and plant growth. *Trends Plant Sci.* 5(6): 252-258.

Stolovich, M., Tang, H., Hornstein, E., Levy, G., Cohen, R., Bae, S.S., Birnbaum, M. J. y Meyuhas, O. 2002. Transduction of growth or mitogenic signals into translational activation of TOP mRNAs is fully reliant on the phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathway but requires neither S6K1 nor rpS6 phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 22: 8101-8113.

Strunk, B.S., Loucks, Ch.R., Su, M., Vashisth, H., Cheng, S., Schilling, J., Brooks III, C.L., Karbstein, K., y Skiniotis, G. 2011. Ribosome assembly factors prevent premature translation initiation by 40S assembly intermediates. *Science* 333: 1449-1453.

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

Tee, A.R. y Blenis, J. 2005. mTOR, translational control and human disease. *Cell. Dev. Biol.* 16: 29–37.

Testerink, C. y Munnik, T. 2005. Phosphatidic acid: A multifunctional stress signaling lipid in plants. *Trends Plant Sci.* 10: 368-375.

Thomas, G., Pérez, M.M., Siegmann M. y Otto, A.M. 1982. The effect of serum EGF, PGF<sub>2</sub> $\alpha$  and insulin on S6 phosphorylation and initiation of protein and DNA synthesis. *Cell* 30: 235-242.

- Tomas, A., Paponov, I. y Perrot-Rechenman, C. 2010. AUXIN BINDING PROTEIN1: functional and evolutionary aspects. *Trends in Plant Sci.* 15: 436-446.
- Toschi, A., Lee, E., Xu, L., Garcia, A., Gadir, N. y Foster, D.A. 2009. Regulation of mTORC1 and mTORC2 complex assembly by phosphatidic acid: competition with rapamycin. *Mol. Cell. Biol.* 29: 1411-1420.
- Turck, F., Zilbermann, F., Kozma, S.C., Thomas, G. y Nagy, F. 2004. Phytohormones participate in an S6 kinase signal transduction pathway in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 134: 1527-1535.
- Ullrich, A. y Schlessinger, J. 1990. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61(2): 203-212.
- Van der Luit, A.H., Piatti, T., van Doorn, A., Musgrave, A., Felix, G.B. y Munnik, T. 2000. Elicitation of suspension-cultured tomato cells triggers the formation of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate. *Plant Physiol.* 123: 1507-1516.
- Van der Zaal, B.J., Droog, F.N., Pieterse, F.J. y Hooykaas, P.J.J. 1996. Auxin-sensitive elements from promoters of tobacco GST genes and a consensus as-1-like element differ only in relative strength. *Plant Physiol.* 110: 79-88.
- Vard, C., D. Guillot, P.B., Lavergne, J.P. y Reboud, J.P. 1997. A specific role for the phosphorylation of mammalian acidic ribosomal protein P2. *J. Biol. Chem.* 272: 20259-20262.
- Vernoux, T., Besnard, F. y Traas, J. 2010. Auxin at the shoot apical meristem. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2: a001487.
- Verschoor, A., Srivastava, S., Grassucci, R. y Frank, J. 1996. Native 3D structure of eukaryotic 80S ribosome: morphological homology with the *E. coli* 70S ribosome. *J. Cell Biol.* 133: 495-505.
- Vidales, J.F., Saenz, R.M.T. y Ballesta, J.P.G. 1984. Acidic protein of the large ribosomal subunit in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem.* 23: 390-396.
- Walker, L. y Estelle, M. 1998. Molecular mechanisms of auxin. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1(5): 434-439.
- Wang, X. 1999. The role of phospholipase D in signaling cascades. *Plant Physiol.* 120: 645-651.

Wang, X., Xu, L. y Zheng, L. 1994. Cloning and expresión of phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase D from *Ricinus communis* L. J. Biol. Chem. 269(32): 20312-20317.

Warner, J.R. 1999. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. Trends Biochem. Sci. 24(11):437-440.

Weijers, D. y Jurgens, G. 2004. Funneling auxin action: Specificity in signal transduction. Curr. Op. Plant Biol. 7: 687-693.

Wheeler, J.J. y Boss, W.F. 1987. Polyphosphoinositides are present in plasma membranes isolated from fusogenic carrot cells. Plant Physiol. 85: 389-392.

White, M.F. 1998. The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. Mol Cell Biochem. 182: 3-11.

Williams, A.J., Werner-Fraczek, J., Chang, I.F. y Bailey-Serres, J. 2003. Regulated phosphorylation of 40S ribosomal protein S6 in root tips of maize. Plant Physiol. 132: 2086-2097.

Yamazaki, T., Takaoka, M., Katoh, E., Hanada, K., Sakita, M., Sakata, K., Nishiuchi, Y. y Hirano, H. 2003. A possible physiological function and the tertiary structure of a 4-kDa peptide in legumes. Eur. J. Biochem. 270: 1269-1276.

Yang, T. y Poovaiah, B.W. 2000. Molecular and biochemical evidence for the involvement of calcium/calmodulin in auxin action. J. Biol. Chem. 275: 3137-3143.

Yu, Y., Yoon, S.O., Poulogiannis, G., Yang, Q., Ma, X.M., Villen, J., Kubica, N., Hoffman, G.R., Cantley, L.C., Gygi, S.P. y Blenis, J. 2011. Phosphoproteomic analysis identifies Grb10 as an mTORC1 substrate that negatively regulates insuling signaling. Science 332: 1322-1326.

Zanetti, M.E., Ghang, I.F., Gong, F., Galbraith, D.W. y Bailey Serres, J. 2005. Immunopurification of polyribosomal complexes of Arabidopsis for global analysis of gene expression. Plant Physiol. 138: 624-635.