



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD.
Maestría en Biología Experimental.

“Regulación de la expresión génica en respuesta a insulina en las distintas partes del eje embrionario de maíz (*Zea mays L.*) durante la germinación.”

T E S I S

para obtener el grado de **Maestra en Biología Experimental**

presenta:

B. E. Alma Xochil Avila Alejandro.

Directora: Dra. Laura J. Pérez Flores

Asesora: Dra. Estela Sánchez de Jiménez.

Asesora: Dra Tzvetanka Dimitrova Dinkova

Asesor: M en C. Fernando Díaz de León Sánchez

México . D. F.

Diciembre 2006

COMITÉ TUTORAL.

DIRECTORA

Dra. Laura J. Pérez Flores

Profesor Titular "C" T. C.

Laboratorio de Fisiología, Bioquímica y Biología Molecular de Plantas.

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

ljpf@xanum.uam.mx

ASESORES

Dra. Estela Sánchez Quintanar

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

Edif. E. Facultad de Química,

Depto. de Bioquímica, UNAM.

estelaservidor@unam.mx

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

Investigador asociado "C" T.C.

Lab 103. Edif. E. Facultad de Química,

Depto. de Bioquímica, UNAM.

cesyservidor@unam.mx

M. en C. Fernando Díaz de León Sánchez

Profesor Titular "C" T. C.

Laboratorio de Fisiología, Bioquímica y Biología Molecular de Plantas.

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

fdls@xanum.uam.mx

fdls5@yahoo.com.mx

AGRADECIMIENTOS

Agradezco:

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

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

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

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

Dedico este trabajo:

A Mis padres:

Juan Avila García

y

María del Refugio Alejandro Hernández

A mis hermanos:

Pili, Iván y Diana

Gracias por todo. Lo logramos juntos.

A mis sobrinos: Michelle y Ricardo

Gracias por ser.

Para Alejandro con todo mi amor.

*Gracias por el tiempo, paciencia y cariño con que apoyas todos
mis proyectos.*

***Gracias por su apoyo y cariño:
A doña Lidia, don Cirilo, Angélica, Hector, Mary, Rafita, Ana, Rafael
y Cristian.***

*A mis compañeros de la Maestría; Elsa, Armando,
Varenka, Ines, Angeles, Gabriel y Tanía.
Gracias por su amistad (son un resultado maravilloso
einesperado del trabajo).*

*Al Laboratorio S-253:Laura, Bety, Fer y Fer,
Janeth,Juan Manuel, Mari, Lucy, Saraí, Esther, Lupita y
Julio no quiero pensar como hubiese sido sin ustedes.
Gracias po su apoyo de todos los días
(las tardes, los sabados y domingos).*

JURADO DE EXÁMEN

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: *“Regulación de la expresión génica en respuesta a insulina en las distintas partes del eje embrionario de maíz (Zea mays L.) durante la germinación.”* Con fecha 07 de diciembre de 2006.

PRESIDENTE

M. en C. Fernando Díaz de León Sánchez

Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

VOCAL

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

Departamento de Bioquímica
Facultad de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México

SECRETARIO

Dra. Estela Sánchez Quintanar

Departamento de Bioquímica
Facultad de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México

ÍNDICE.

RESUMEN.....	I
ABSTRACT.....	III
ABREVIATURAS.....	V
1) INTRODUCCIÓN.....	1
2) ANTECEDENTES.....	3
2.1) EL MAÍZ (<i>Zea mays L.</i>).....	3
2.1.1) Generalidades de la estructura de los cariopses de maíz.....	4
2.1.2) Germinación.....	7
2.1.3) Eventos moleculares durante la germinación de los cereales.....	7
.2.2) SÍNTESIS DE PROTEÍNAS EN EUCARIONTES.....	11
2.2.1) Los elementos de la síntesis de proteínas.....	11
2.2.1.1) Los ARN mensajeros.....	11
2.2.1.2) El ARN de transferencia.....	13
2.2.1.3) Estructura y características de los ribosomas en eucariontes.....	16
2.2.1.3 a) Los ARN ribosomales.....	18
2.2.1.3.b). Las Proteínas ribosomales.....	19
2.2.1.4) Los factores de traducción.....	21
2.2.2) Las etapas de la síntesis de proteínas en eucariontes.....	22
2.2.2.1) Iniciación.....	22
2.2.2.2) Elongación.....	25
2.2.2.3) Terminación.....	28
2.3) REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR INSULINA Y FACTORES SEMEJANTES A INSULINA (IGF) EN ANIMALES.....	30
2.3.1) Vía de transducción de señales por Insulina y los IGF.	30
2.3.2) Regulación transcripcional por insulina e IGF.....	34
2.3.3) Regulación traduccional por insulina e IGF.....	36
2.3.3.1) Cinasas involucradas en la fosforilación de componentes de la maquinaria traduccional.....	36
2.3.3.2) Participación de TOR (Proteína blanco de rapamicina por sus siglas Target of rapamycin)	38

2.4) REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR INSULINA DURANTE LA GERMINACIÓN DE MAÍZ.....	39
2.4.1) <i>Factor semejante a insulina en maíz.....</i>	39
2.4.2.) <i>Regulación de la traducción de elFiso4E en maíz.....</i>	40
2.4.2.) <i>Regulación de la traducción y la fosforilación de la PRS6 en maíz.</i>	41
3) JUSTIFICACIÓN.....	43
4) HIPÓTESIS.....	45
5) OBJETIVO GENERAL.....	45
6) OBJETIVOS PARTICULARES.....	45
7) DISEÑO EXPERIMENTAL.....	45
8) MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
8.1) <i>Material biológico.....</i>	47
8.2) <i>Aislamiento de ARN total.</i>	47
8.3) <i>Aislamiento de ARN polisomal.....</i>	48
8.4) <i>Cebadores.....</i>	50
8.5) <i>Amplificación por RT-PCR.....</i>	50
8.6) <i>Diseño estadístico.....</i>	51
9) RESULTADOS.....	52
9.1) <i>Material biológico obtenido.</i>	52
9.2) <i>Rendimientos de la extracción de ARN total y polisomal.....</i>	52
9.3) <i>Estandarización de la técnica de RT-PCR.....</i>	56
9.4) <i>Expresión de las proteínas ribosomales L3 y S6 y el factor de traducción elFiso4E en las diferentes partes del eje embrionario de maíz.....</i>	59
10) DISCUSIÓN.....	76
11) CONCLUSIONES.....	79
12) PERSPECTIVAS.....	80
13) REFERENCIAS.....	81

RESUMEN.

La insulina afecta el crecimiento y participa en la regulación de la síntesis de proteínas en animales y plantas. En la vía de transducción de insulina en animales participa la cinasa TOR inhibida por rapamicina (Target of rapamicyne) y entre sus efectos están la transcripción de genes específicos y el incremento en la traducción de ARNm denominados 5'TOP (Track of pyrimidines). Entre las proteínas codificadas por los mensajes 5'TOP se encuentran proteínas ribosomales (prS6) y factores de traducción (eIFiso4E). En plantas de lechuga, *Lemna giba*, soya y maíz, se han reportado factores peptídicos semejantes a insulina.

La ruta de señalización activada por insulina y factores semejantes a insulina (ZmIGF) en ejes embrionarios de semillas de maíz, incluye elementos homólogos a los descritos en animales, como la activación de ZmS6K, la fosforilación de S6 y el reclutamiento preferente en polisomas de ARNm 5'TOP (factor eIFiso4E y prS6). Sin embargo, no se sabe en que parte del eje embrionario (coleóptilo, nodo ó radícula) se ubica el efecto. Por lo que, en este trabajo se propuso analizar el efecto de la insulina o insulina/rapamicina en los niveles de transcritos de los genes de prS6, prL3 y eIFiso4E en el ARN total y polisomal de las distintas partes del eje embrionario de maíz en germinación y compararlo con el efecto sobre el eje completo.

Los resultados muestran, que en el eje completo la insulina incrementa los niveles de transcritos de prS6 y del factor eIFiso4E en el ARN polisomal (reclutamiento preferencial). Este efecto es mediado por TOR ya que es revertido por rapamicina. En el ARN total, la insulina no afecta los niveles de expresión del factor eIFiso4E en ninguna de las partes del eje embrionario, pero sí provocó una ligera disminución en los niveles de transcritos de prS6 en el ARN total del eje completo.

Cuando se analizaron las partes del eje embrionario (radícula, nodo y coleóptilo) se encontró que el efecto de la insulina en los transcritos de prS6 y eIFiso4E en el ARN polisomal observado en el eje embrionario completo, se localizaba en la radícula.

El análisis de los niveles de transcritos de prL3 en el ARN polisomal, muestra que éstos no se modifican en el eje embrionario completo, ni en cada una de las partes por separado. Sin embargo, en el ARN total, se observa una disminución de los niveles de estos transcritos en presencia de insulina, que no pudo ubicarse con precisión en ninguna de las partes estudiadas (radícula, nodo y coleóptilo).

En conclusión, el efecto de la insulina en la regulación traduccional observado en el eje completo para la prS6 y el eIFiso4E, se ubica en la radícula y es tejido específico. Además se observó que la insulina no afecta de la misma forma la expresión de los genes de la maquinaria traduccional analizados en el presente estudio (prS6 y prL3), lo que sugiere una heterogeneidad en la regulación de la síntesis de la maquinaria traduccional.

ABSTRACT.

Insuline effects growth and plays a key role in the regulation of protein shyntesis in animal and plants. In animals TOR kinase participates in the signal transduction pathway of insulin and is the target of rapamycin wich inhibit it. Two the insuline effects are the transcription of specific genes an the increased translation of RNAm denominated 5'TOP (Track of piryimidines). Among the protein coded by the 5'TOP message are ribosomal protein (prS6) and translation factor (eIFiso4E). In lettuce, Lemna gibba and the maiz plant Insuline like growth factor had been reported.

In the embryonic axes of maize, designal pathway actives by insuline and factor similar to insulin (ZmIGF) included homologous element to those described in animals, such ZmS6K activation, S6 phosporylation and the preferential recruitment of 5'TOP RNAm in polysomes (eIFiso4E and prS6). However, it is unknown where in the embryonic axes (radicle, node or coleoptile) insulin effect is located. In the present work the effect of insuline or insuline/rapamycin on the level of transcripts of prS6, prL3 and eIFiso4E genes in the total and polysomal ARN from different parts of the germinating maize embryonic axes was compared to their effect on the whole embryonic axes.

Result showed that insulin increases levels ofprS6 and the eIFiso4E factor transcripts in polysomal RNA (preferential recruitment) on the whole embryonic axes. This effects is mediated by TOR since it is reversed by rapamycin. In total RNA, insulin does nos affect expression levels of the eIFiso4E factor in any part of the embryonic axes. However, it slightly diminished levels of transcribed prS6 in the total RNA of the whole axes.

The analysis of the embryonic axes parts (radicle, node and coleoptile) showed that insulin effect on the prS6 and the eIFiso4E factor transcripts in polysomal RNA that had been observed on the whole embryonic axes, was located in the radicle.

Levels of prL3 transcripts in polysomal RNA were not modificated in the whole embrionic axes or in any of its separate parts. However, in total RNA, these

transcripts levels decreases when insulin was present, but this effect was not precisely located in any of the embryo parts (radicle, node or coleoptile).

In conclusion, the observed effect of insulin in the translational regulation of prS6 and eIFiso4E genes is located in the radicle, and is tissue specific. Furthermore, insulin does not affect gene expression for prS6 and prL3 translation machinery in the same manner. This suggests heterogeneity in the synthesis regulation of the translation machinery.

ABREVIATURAS.

ADN,- Ácido desoxirribonucleíco

ADNr.- Ácido ribonucleíco ribosomal.

ARNm.- Ácido ribonucleíco mensajero.

ARNr.- Ácido ribonucleíco ribosomal.

ARNt.- Ácido ribonucleíco de transferencia.

ATP.- Adenosin trifosfato.

eIF.- Factor de iniciación eucarionte (por sus siglas eucariotic initiation factor).

eIFiso4E.- Factor de iniciación iso4E eucarionte (por sus siglas eucariotic initiation factor iso4E).

GTP.- Guanosin trifosfato.

I.- Insulina

I/R.- Insulina-rapamicina

IGF's.- Factor semejante a insulina (por sus siglas insulin growth factor).

IRE.- Elementos de respuesta a insulina (por sus siglas insulina response element)

MDa.- Mega daltones.

5' TOP.- Segmento de pirimidinas en 5' (por sus siglas Track of pyrimidines).

mTOR.- Blanco de rapamicina de mamíferos (por sus siglas Target of rapamycin of mammalian).

prL3.- Proteína ribosomal L3

prS6.- Proteína ribosomal S6

S6K.- Cinasa de S6 (kinase S6)

5'UTR.- Regiones no traducibles en 5'(por sus siglas Untranslated regions).

ZmIGF.- Factor semejante a insulina de *Zea mays* L. (por sus siglas *Zea mays* insuline growth factor).

1) INTRODUCCIÓN.

La insulina es una hormona que afecta el crecimiento en plantas y animales. Actualmente se sabe que tiene un papel importante en la regulación de la síntesis de proteínas. Entre los efectos de la insulina se encuentran: incrementos en la velocidad de la traducción; cambios en las concentraciones de los aminoacil-ARNt y además se ha visto que está relacionada con el incremento en la traducción de ARNm específicos que codifican para proteínas ribosomales, factores de traducción, ciclinas, etc. (Proud, 1997). Los estudios realizados para determinar el mecanismo por el cual la insulina afecta la síntesis de proteínas, apuntan a la regulación por fosforilación de algunos factores de iniciación y elongación de la traducción.

Entre las características de los ARNm regulados por insulina se encuentran la presencia de secuencias reguladoras en el extremo 5': las secuencias 5'UTR (Regiones no traducibles en 5', por sus siglas en inglés *5' Untranslated regions*) que muestran una gran variedad de estructuras secundarias y las secuencias ricas en oligopirimidinas 5'TOP (Segmento de pirimidinas en 5' por sus siglas en inglés *Track of pyrimidines*). Estas secuencias están estrechamente relacionadas con la eficiencia de la traducción. Para los ARNm 5'TOP se sugiere que en respuesta a insulina en las células animales hay un reclutamiento preferente en polisomas que involucra a la cinasa mTOR (cinasa Blanco de rapamicina en mamíferos, por sus siglas en inglés *mammalian Target of rapamycin*). Esta cinasa ha sido reportada en un gran variedad de organismos eucariontes incluyendo plantas (Proud y Denton, 1997; Turck y cols., 2004, Ruvinsky y Meyuhas, 2006).

La cinasa TOR regula la traducción a través de la fosforilación de la cinasa S6K (p70^{S6K} de mamíferos o ZmS6K en maíz) que a su vez fosforila a la proteína ribosomal S6. Algunos autores señalan que la dicha fosforilación es relevante para la traducción preferente de los 5'TOP. Aunque en fechas recientes se ha propuesto que el reclutamiento preferente no depende de la fosforilación de la prS6 de los ribosomas sino de la presencia de las secuencias 5'TOP (Ruvinsky y Meyuhas,

2006; Averous y Proud, 2006). En los últimos años han surgido evidencias de la presencia de factores peptídicos semejantes a insulina en soya (Hanada y Hirano, 2004), lechuga, *Lemna gibba* (Collier y cols., 1987) y maíz (García Flores, 2001). En maíz la proteína reconocida por los anticuerpos contra insulina, fue denominada ZmIGF (factor semejante a insulina, por sus siglas *Zea mays insuline-like growth factor*). Diversos estudios sugieren que los mecanismos involucrados en la regulación traduccional en plantas son similares a los reportados para animales (García Flores y cols., 2002;).

Investigaciones previas sobre de la ruta de transducción de señales para insulina y el ZmIGF, demuestran que en las semillas de maíz, se encuentran involucrados algunos elementos de la ruta de señalización TOR, como la activación de ZmS6K, la fosforilación de S6 (García Flores y cols., 2002; Reyes de la Cruz y cols., 2004) y el reclutamiento preferente en polisomas de ARNm 5'TOP (Dinkova, 2000).

Se han observado también respuestas a insulina tejido-específicos sobre cada parte del eje embrionario de maíz. Por ejemplo, se demostró que al parecer las auxinas e insulina, comparten algunos pasos de la ruta de señalización en el coleóptilo del eje embrionario, específicamente la activación de ZmS6K y la fosforilación de la prS6 (Buentello, 2006). También hay un incremento en la síntesis de ADN en radículas de maíz en respuesta a insulina, que no es observable en el coleóptilo (Paz Lemus, 2005). Sin embargo, es importante mencionar que estos experimentos se realizaron solo en una u otra de las partes del eje embrionario.

Por lo cual el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la insulina sobre la regulación de la síntesis de algunas proteínas relacionadas con el aparato traduccional (prS6, prL3 y el factor eIFiso4E) a nivel traduccional (reclutamiento de los ARNm en polisomas) o transcripcional en las tres partes del eje embrionario (radícula, nodo y coleóptilo) y compararlo con el efecto de la insulina en la regulación de la expresión de estos genes en el eje completo.

2) ANTECEDENTES.

2.1) EL MAÍZ (*Zea mays* L.)

El maíz es una planta de gran importancia económica, originaria del Continente Americano. La historia registrada del maíz se limita a los años posteriores al descubrimiento de América. Al parecer, la primera referencia de la planta fue dada por dos expedicionarios españoles enviados por Colón al interior de Cuba. Estos expedicionarios reportaron que existía: “una especie de grano que llaman *maíz*, cuyo gusto fue bueno, cocido ó secado y convertido en harina” (Jugenheimer, 1988).

Excavaciones arqueológicas y geológicas y mediciones de desintegración radioactiva de antiguas mazorcas encontradas en cuevas (la más antigua conservada, hallada en la cueva Guila Naquitz en el valle mexicano de Oaxaca, fue datada alrededor del 4250 A.C.), indican que la planta debe haberse originado cuando menos hace 5 mil años. Los granos de polen de *Zea*, *Tripsacum* y *Euchlaena* encontrados debajo de la ciudad de México son mucho más antiguos (Jugenheimer, 1988).

El maíz es una planta herbácea monocotiledónea pertenece a la clase Liliopsida, y la subclase Commelinidae, la orden Cyperales, y la familia Poaceae(o Gramíneas), incluye ocho géneros. Cinco de ellos son de origen asiático y de poca importancia económica.

Los tres géneros americanos son:

- *Zea*, de alta importancia económica y alimenticia. Está representado la especie *Zea mays*.
- *Tripsacum*, de cierto valor como cultivo forrajero, pero escaso o ninguno como grano para consumo humano.
- *Euchlaena* (teosintle), el pariente silvestre más cercano al maíz.

El *Tripsacum* y el teosintle han adquirido relevancia para la comprensión de la evolución y domesticación del maíz. El maíz fue probablemente domesticado en

Centroamérica, a partir de un teosinte nativo del valle del río Balsas en el sur de México. Otra fuente probable de material genético es *Z. mays ssp. mexicana*. El desarrollo de la variedad cultivada, que debe de haber sido seleccionada a lo largo de varias generaciones a partir de variedades silvestres de mazorcas excesivamente pequeñas (entonces prácticamente espigas). Actualmente el maíz es una planta muy especializada. A pesar de que la mazorca produce altos rendimientos de grano, carece de un mecanismo satisfactorio para su dispersión, el grueso recubrimiento de brácteas de su mazorca, la forma en que los granos se encuentran dispuestos y están sólidamente sujetos, impiden que la planta pueda dispersar sus granos. Su simbiosis con la especie humana es total, a tal punto que algunos investigadores lo llaman un "artefacto cultural" (Jugenheimer, 1988).

2.1.1) Generalidades de la estructura de los cariopses de maíz.

Las semillas constituyen una de las innovaciones más importantes de las plantas vasculares y son uno de los factores que han permitido su predominio actual en el planeta. Una semilla madura es una estructura de dispersión y resistencia para la planta adulta; su formación es un mecanismo producto de la reproducción sexual. Intervienen gametos femeninos y masculinos, producidos por medio de meiosis, por lo tanto es una fuente de variación genética (Moreno, 1996).

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

En la madurez el endospermo de las semillas de los cereales está compuesto de cinco tejidos o tipos celulares (Figura 1): el endospermo almidonoso central (CSE), un grupo numeroso de células cuya única función es el almacenamiento de reservas alimenticias, principalmente almidón y hemicelulosa, una subcapa de aleurona (SAL), la capa de aleurona (AL) compuesta por una monocapa de células vivas que contienen una gran cantidad de vacuolas, una capa de transferencia del endospermo (BETL) y la región que circunda al embrión (ESR). El embrión consta del eje embrionario propiamente dicho y el escutelo, un tejido especializado en la absorción (Odd-Arne y cols., 1999; Taiz, 1999) .

En la semilla de maíz, hay un solo embrión rodeado por el tejido del endospermo (Figura 1). El eje embrionario se divide en coleóptilo (parte aérea), radícula (raíz) y unido al escutelo está el mesocótilo (éste término se refiere al primer internodo, entre el nudo del coleóptilo y el nudo escutelar) es una característica única de las gramíneas (Jugengheimer, 1988; García Flores, 2002).

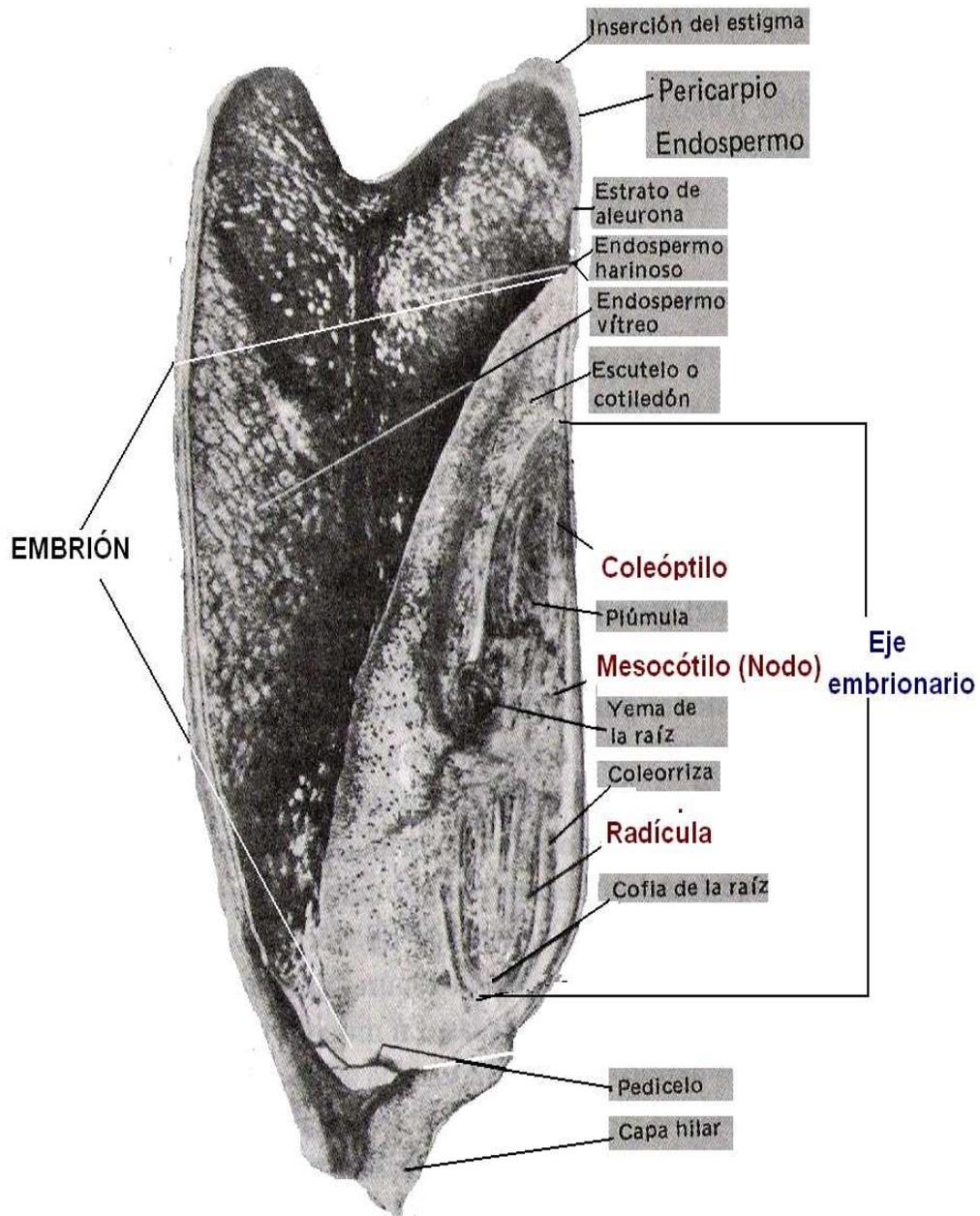


Figura 1. **Estructura del grano maduro de maíz.** Sección longitudinal. 40X (Modificado de Jugengheimer, 1988)

2.1.2.) Germinación

El primer paso para el establecimiento de una planta es la germinación de la semilla. Por definición la germinación incluye los eventos que se inician con la imbibición (entrada de agua) y culmina cuando la radícula, se extiende para penetrar las estructuras que la circundan y emerge de la semilla (protrusión de la radícula) (Bewley, 1997).

Al parecer el crecimiento en eje embrionario, es un proceso asociado con los dos tipos de crecimiento que existen en plantas: el alargamiento y la división celular. Al parecer el coleóptilo crece principalmente por alargamiento. Y la radícula por división y alargamiento. Aunque es importante mencionar que una vez terminada la germinación, los tejidos de todo el eje embrionario entran rápidamente en división celular. Esto permite junto con cambios en la cubierta de la semilla que se complete la germinación. (Baíza, 1995; Bewley, 1997).

La entrada de agua en la semilla madura es trifásica (Figura 2); la fase inicial está caracterizada por una rápida entrada de agua (Fase I), seguida de una fase estable (Fase II), finalmente, hay una segunda entrada rápida de agua después de la germinación, ésta se encuentra asociada con la germinación (Fase III). Los eventos moleculares y bioquímicos relacionados con el reinicio del metabolismo se realizan a lo largo de las tres fases (Bewley, 1997).

2.1.3) Eventos moleculares durante la germinación en cereales.

Las enzimas y organelos celulares necesarias para reiniciar la actividad metabólica se encuentran almacenados en la semilla seca y se conservan relativamente intactos. Durante la imbibición simultáneamente con el incremento del metabolismo se realizan procesos de reparación (Bewley, 1997).

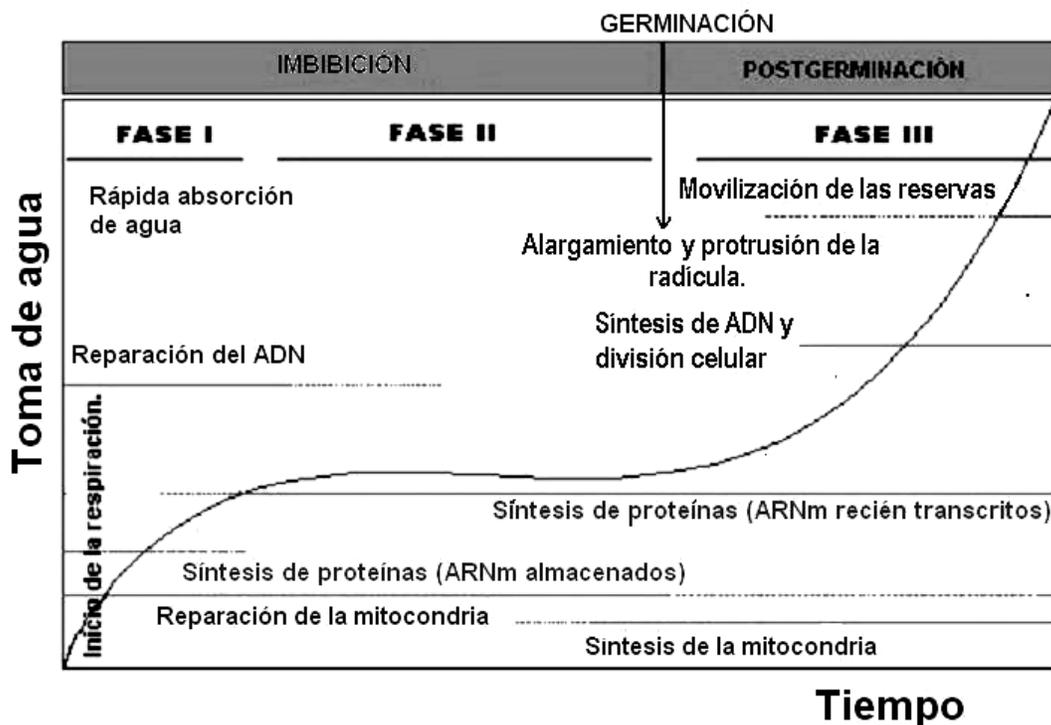


Figura 2. **Eventos moleculares durante la imbibición, germinación y eventos post-germinativos** (Modificado de Bewley, 1997).

La entrada de agua ocasiona cambios en la fisiología y bioquímica de la semilla; así como perturbaciones temporales en la estructura de la célula. En este sentido, los fosfolípidos de las membranas pasan por varios estados, para reestablecer la estructura apropiada que perdieron debido a la falta de agua durante la desecación y maduración de la semilla (Crowe y Crowe, 1992). El reinicio de la respiración sigue un patrón muy similar al de la entrada de agua, con un incremento en la velocidad de consumo de oxígeno hasta que la radícula protruye. Posteriormente, durante los eventos post-germinativos hay un nuevo incremento en la toma de agua. Simultáneamente se reactivan otros eventos relacionados con la respiración como: la glucólisis, la vía de las pentosas fosfato y el ciclo de los ácidos tricarbónicos (Botha y cols., 1992; Bewley, 1994).

Uno de los eventos bioquímicos más relevantes observados durante la germinación de cereales es la síntesis de proteínas. Daños en este proceso pueden causar retrasos en la germinación e incluso la pérdida de la viabilidad de la semilla (Aguilar y cols., 1992; Bewley, 1994).

Se ha establecido que en los ejes embrionarios de semillas de cereales, la síntesis de proteínas se reinicia basándose en la traducción de ácidos ribonucleicos mensajeros (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 cols., 1981; Sánchez de Jiménez y cols., 1997).

La maquinaria enzimática necesaria para reiniciar la síntesis de proteínas se encuentra en la semilla seca; excepto los polisomas (estructuras donde varios ribosomas traducen simultáneamente un mismo ARNm) que se ensamblan durante la imbibición con ARNm almacenados. 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 (Domes y Van Der Walle, 1990).

Asimismo se sabe que, los niveles de expresión de los genes de las proteínas ribosomales (PR) se incrementan rápidamente en los tejidos en desarrollo (Sánchez de Jiménez, 2000). La acumulación equimolar de las PR se mantiene controlando la expresión de los genes correspondientes durante el desarrollo. Los estudios han mostrado que el mecanismo parece estar relacionado con la naturaleza selectiva del control traduccional de los ARNm de las proteínas ribosomales (Meyuhas y Hornstein, 2000).

Se ha observado también que la síntesis de PR se reactiva con la imbibición de las semillas, aún cuando se inhibe la transcripción de ARNm *de novo* con α -amanitina (inhibidor de la ARNpolimerasa III). El análisis por *northern-blot* de los preARNm (sin

corte y empalme) para las proteínas ribosomales L3 y S6 y para algunos ARN maduros para S4 y S6 indican que se conservan en los ejes embrionarios secos de maíz (Beltrán-Peña y cols., 1995). A partir de estos resultados se propuso que algunos ARNm de algunas PR quedan almacenados en el embrión quiescente y son traducidos activamente a partir de la imbibición (Beltrán Peña, 1997; Bailey-Serres, 1998).

En las semillas, al igual que en otros eucariontes, la inducción de la transcripción de genes se debe en gran medida a la presencia de secuencias cis-activadoras en la región 5' (Bailey-Serres, 1998). Por ejemplo, una secuencia de alrededor de 850 nucleótidos del sitio de transcripción del gen PRL16 de *Arabidopsis* fue suficiente para promover la expresión tejido específica de un gen reportero (William y Sussex, 1995).

En estudios previos, semillas de maíz en etapas tempranas de la imbibición (hasta 21 h) mostraron que hay síntesis de factores de iniciación de la traducción (eIF) señalados como ARNm 5'TOP (eIFiso4E). Asimismo, se determinó que los factores de iniciación eIF4E y su isoforma eIFiso4E se expresan particularmente en tejidos en desarrollo (Dinkova y cols., 2000a).

En semillas en germinación se tienen evidencias que apoyan la existencia de un mecanismo de transducción de señales en respuesta a mitogénos en el que participa la fosforilación y desfosforilación de proteínas (Sánchez de Jiménez, 2000). En particular en ejes embrionarios de maíz en germinación, la traducción de ARNm parece ser parcialmente regulada por un mecanismo que involucra la fosforilación de la proteína ribosomal S6 (Sánchez de Jiménez y cols., 1997).

Cuando la semilla comienza a crecer sus procesos metabólicos se ven afectados por fitorreguladores (por ejemplo ácido giberélico y la auxina ácido indol-acético) que controlan los procesos de crecimiento, diferenciación y movilización de reservas. Aunque se ha observado que no sólo las hormonas vegetales promueven el

crecimiento de las plantas; el cuál también puede ser estimulado por diferentes efectores y condiciones ambientales (Sánchez de Jiménez, 2000; García Flores, 2002).

2.2) SÍNTESIS DE PROTEÍNAS EN PLANTAS.

En fechas recientes se ha observado que a pesar de las diferencias entre las células vegetales y las animales, la regulación y la maquinaria celular involucrada en la síntesis de proteínas se encuentran conservados entre los eucariontes.

2.2.1) Los elementos de la síntesis de proteínas.

2.2.1.1) Los ARN mensajeros.

En las células eucariontes la información genética de un organismo se encuentra en el núcleo, una estructura especializada donde el genoma se organiza como cromatina (estructuras superenrolladas de ADN y proteínas).

La transcripción (copiado de un gen del ADN a ARN para su posterior traducción) involucra la participación de una serie de proteínas accesorias, además de varias polimerasas. Los ARNm que se sintetizan en el núcleo a partir del genoma deben exportarse hacia el citosol para su traducción. El producto inicial de la transcripción (el preARNm del núcleo) incluye intrones y regiones de regulación, por lo que el ARNm de eucariontes requiere de un procesamiento antes de salir al citosol para poder ser usado como molde para la traducción. La primera modificación se produce en el extremo 5' del pre-ARNm, donde se añade un GTP que junto con los dos primeros nucleótidos de la cadena forma el capuchón 5' (*capping group* 5' ó cap) que se completa con la adición de dos grupos metilo en N-7 de la guanina y en uno ó dos de los grupos hidroxilo del capuchón.

Posteriormente, el ARNm sufre un proceso de corte y empalme (procesamiento) por el espliceosoma formado por partículas ribonucleoproteicas nucleares con actividad enzimática. En ocasiones presentan también un procesamiento alternativo el cual permite que algunos transcritos génicos puedan cortarse y empalmarse de distintas formas de manera que se incluyan o excluyan determinados exones dependiendo del organismo o la etapa de desarrollo. A continuación, se adiciona una cadena de poliadeninas (poli A) en su extremo 3'. En la Figura 3 se muestra el esquema de un ARNm maduro (Mathews y cols., 2002).

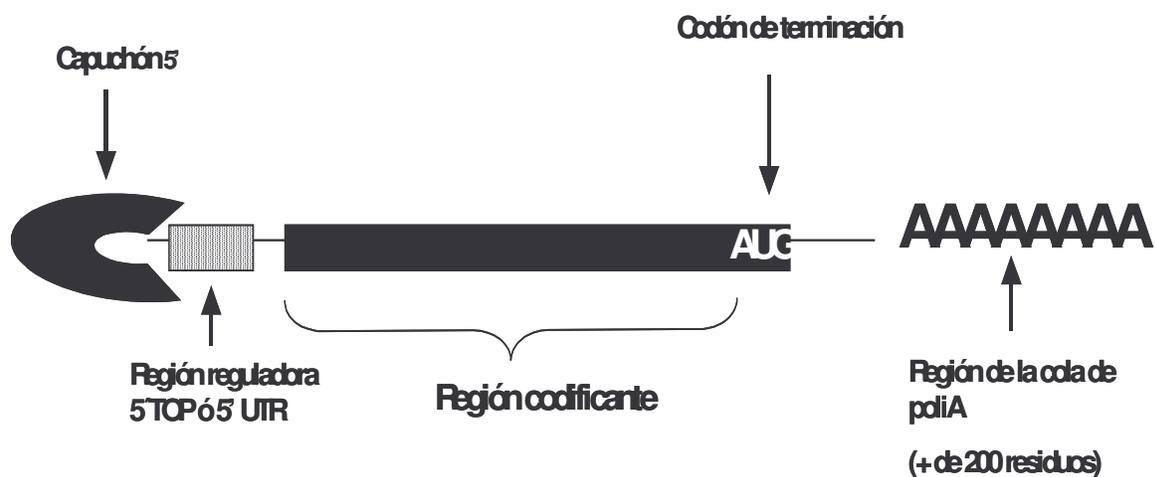


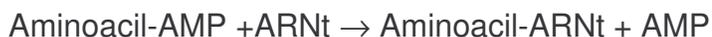
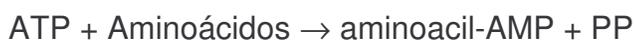
Figura 3.- **Estructura esquemática del ARNm maduro de eucariotes** (Modificado de Mathews y cols., 2002).

2.2.1.2) El ARN de transferencia.

En la década de 1950, Crick propuso la existencia de una molécula adaptadora que permitiría la decodificación del lenguaje genético. Cada uno de los 20 aminoácidos tendría su propio adaptador y en algunos casos más de uno. Esta molécula se conoce como ARNt (ARN de transferencia). Se describió por primera vez en 1965 por Robert Holley, consisten de una sola molécula de ARN de entre 73 y 93 nucleótidos, 10 de los cuales son bases modificadas del código estándar.

El ARN de transferencia tiene una estructura secundaria en forma de trébol (Figura 4a), que al plegarse en su estructura terciaria toma forma de L invertida (Figura 4b). La zona que reconoce el aminoácido correspondiente en el ARNm es denominada anticodón, éste se encuentra en el asa pequeña del ARNt que consta de 7 aminoácidos tres de los cuales corresponden a la zona del anticodón. El reconocimiento de los dos primeros nucleótidos del codón es muy estricto; mientras que el tercero es más flexible, esto permite a un ARNt unirse a más de un codón. El bucle del aminoácido, en la parte superior del “trébol” es donde se fija el aminoácido, siempre tiene la secuencia 5´...CCA-OH 3´. Otras de las características comunes entre los ARNt son el bucle D y el bucle T ψ C, cuyas función aún no está bien determinada y los llamados bucles variables que varían en su composición y su longitud entre los distintos ARNt (Mathews y cols., 2002)

Por otro lado; antes de que el ARNt interactúe con el codón del mensajero, debe activarse, es decir llevar unido su aminoácido. Cada aminoácido se une formando enlaces covalentes a los extremos 3´ de su ARNt mediante la acción de la aminoacil-ARNt- sintetasa. Esta enzima es capaz de unir el aminoácido correcto de acuerdo a la estructura del anticodón, se sabe que la unión se lleva a cabo en dos pasos:



Anteriormente se pensaba que la sintetasa identifica el ARNt correcto mediante su anticodón, aunque estudios recientes muestran que varios nucleótidos actúan como “elementos de identidad” y están agrupados en el bucle del anticodón y en el bucle del aminoácido. Durante la unión del aminoácido se lleva a cabo un proceso que asegura la unión al aminoácido correcto, basado en la energía de fijación disponible es importante verificar esto porque si existe algún error, éste permanece durante la síntesis de proteínas y las modificaciones en el polipéptido resultante pueden afectar su actividad (Karp, 2000).

a)

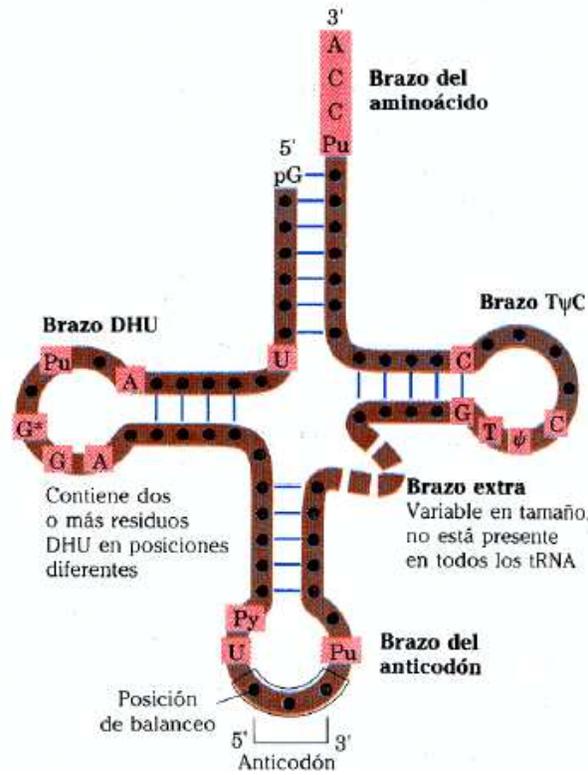
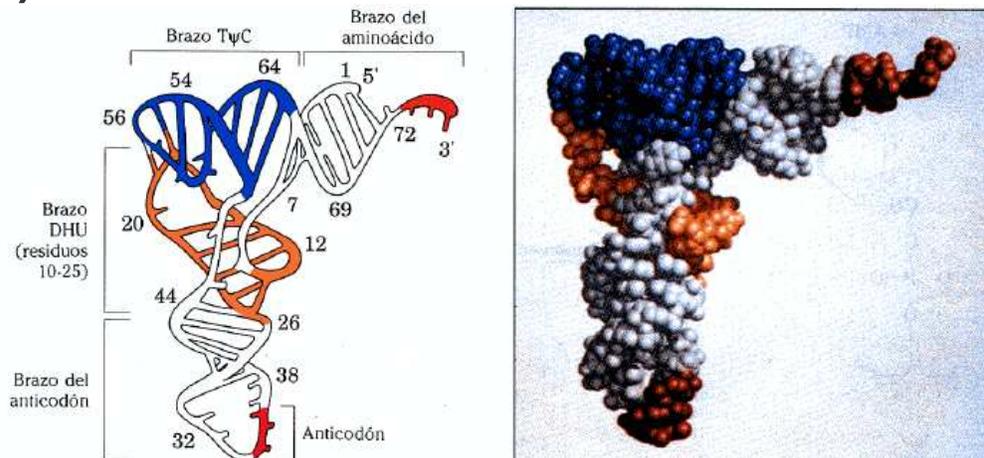


Figura 4. **Representación esquemática del ARNt.** a) estructura secundaria. Los residuos característicos se muestran sombreados en rojo; b) estructura terciaria deducida por análisis de difracción de rayos X. (Modificado de Mathews y cols., 2002).

b)

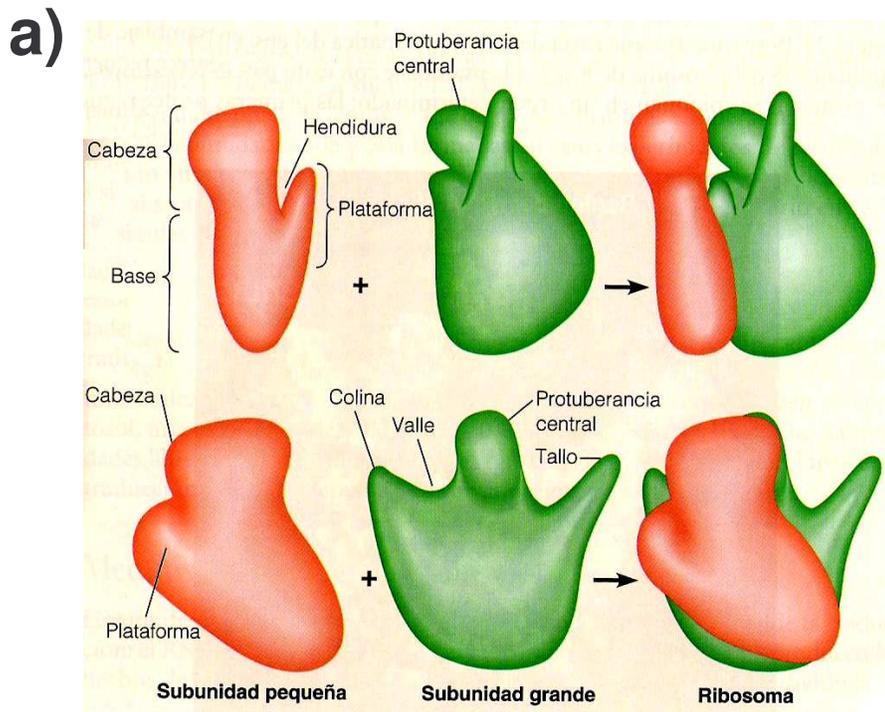


2.2.1.3) Estructura y características de los ribosomas en eucariontes.

La síntesis de proteínas tiene lugar básicamente en los ribosomas, un complejo ribonucleoproteínico citosólico de 2.5 MDa en el caso de los procariontes y de aproximadamente 4 MDa en los eucariontes (Verchoor y cols., 1996). Los ribosomas fueron identificados por microscopía electrónica hace 40 años y actualmente se sigue utilizando este método además de la difracción de rayos X y la cristalografía. El conocimiento actual sobre los ribosomas y su estructura proviene en gran parte de estudios con *Escherichia coli*, levaduras y ratas (Green y Noller, 1997). Los ribosomas eucariontes tienen un coeficiente de sedimentación de aproximadamente 80S. Están compuestas por dos subunidades de distinto tamaño. En el caso de los eucariontes superiores como las plantas, las subunidades ribosomales tienen coeficientes de sedimentación de aproximadamente 40S y 60S. El ribosoma eucarionte es una estructura compleja compuesta de cuatro ARNr y de aproximadamente 80 proteínas ribosomales. El ribosoma representa una pieza esencial de la maquinaria celular, responsable de la síntesis de proteínas y como tal tiene un papel central en el control del crecimiento, división y desarrollo celulares (Barakat y cols., 2001; Mathews y cols., 2002). En la Figura 5a se muestra una representación esquemática de la estructura del ribosoma eucarionte.

En plantas el conocimiento sobre los ribosomas da por resultado un modelo fragmentario, ya que la información proviene de estudios incompletos de muchas especies (Bailey-Serres, 1998). Se sabe sin embargo, que la subunidad grande tiene un peso aproximado de 2.45-2.5 MDa y la pequeña de alrededor de 1.5 MDa. En estudios con microscopía electrónica de alta resolución y reconstrucción tridimensional de ribosomas criopreservados de trigo se ha podido determinar que la estructura del complejo 80S es análoga a la 70S de *Escherichia coli*. Se pudieron observar tres estructuras conservadas: la protuberancia central, la unión de proteínas ácidas laterales y la unión análoga a la PRL1. La subunidad 40S posee también una estructura de interacción con el ARNm similar a la de *E. coli*. (Figura 5b). Además se

pudo observar que en los ribosomas de trigo la subunidad pequeña es de tipo tubular y la grande es semihelicoidal, lo que da por resultado que el complejo 80S de trigo sea más largo y elipsoidal que los ribosomas de las bacterias (Verschoor y cols., 1996).



b)

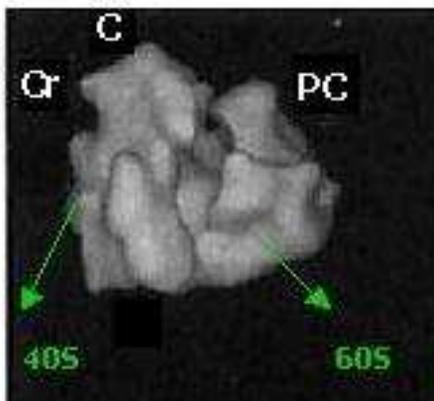


Figura 5. **Estructura del ribosoma.** a) Modelo esquemático de baja resolución de las subunidades ribosomales pequeña y grande de eucariotes. b) Representaciones de la superficie del ribosoma 80S de trigo C, cabeza Cr, cresta; P.-plataforma; CP.- protuberancia central (Modificado de Mathews y cols., 2002 y Verschoor y cols.;1998, respectivamente).

2.2.1.3.a) Los ARN ribosomales.

La biogénesis de ribosomas, tiene lugar en una estructura no membranal conocida como nucleolo. La alta concentración de genes para ARNr en un solo *locus* da lugar a una estructura citológica conocida como el centro organizador del nucleolo (NOR). (Gall, 1992). En los eucariontes los ARNr se encuentran clasificados de la siguiente manera: en la subunidad pequeña hay un ARNr 18S, en la subunidad grande hay tres ARNr ,25S, 5S y 5.8S (Mathews y cols., 2002).

La actividad enzimática básica de los ribosomas es la formación del enlace peptídico. Ésta se lleva a cabo en la subunidad grande, en el llamado centro peptidil transferasa. Es importante mencionar que aunque las proteínas presentes en los ribosomas proporcionan soporte al complejo total, la actividad catalítica reside en el ARNr (Green y Noller, 1997; Nissen y cols., 2000; Steitz y Moore; 2003).

Los ribosomas de las plantas poseen cuatro ARNr, el 18S, 25S, 5.8S y 5S. Los ARNr presentan un número muy alto de copias por genoma en las plantas (por ejemplo, en *Citrus sinesi* están en el orden de 630). El NOR (por sus siglas en inglés: *nucleolar organizing element*) en maíz, se localiza en el cromosoma 6 durante la meiosis y fue descrita por Barbara McClintock en 1931 (Bailey-Serres, 1998).

En plantas los genes de los ARNr se encuentran altamente conservados en las plantas, no así el tamaño de las unidades de repetición, que están pobremente conservadas aún entre especies cercanas. Un solo gen de ADNr en soya es de 7Kpb; mientras que en trigo es mayor de 12Kpb (Bailey Serres, 1998). Los ARNr están codificados en distintos *loci*, de la siguiente manera: los genes que codifican para 18S, 25S y 5.8S están presentes en unos pocos *loci* en arreglos de repeticiones en *tandem*; mientras que el ARNr 5S está codificado en un *loci* separado y algunas veces también en *tandem*. La estructura de estos genes repetidos de ADNr en el trigo contiene un espacio externo de transcripción (ETS) y dos espacios internos de transcripción (ITS) (Figura 10).

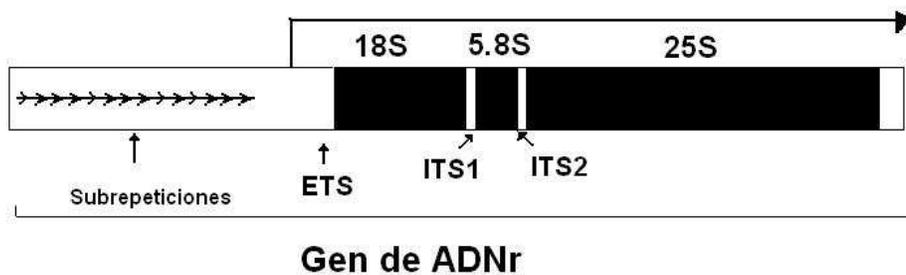


Figura 6.- **Estructura general de un gen de ADNr de trigo.** La flecha larga → indica la unidad de transcripción del gen. Las flechas cortas >>>indican las unidades de repetición corta (<140pb) (Tomado de Bailey-Serres, 1998).

2.1.1.3 b) Las Proteínas ribosomales.

Las proteínas ribosomales (PR) de los eucariontes son en su mayoría derivadas de un progenitor ancestral. Casi todas las PR de los eucariontes están presentes en una copia por ribosoma, con la excepción de un pequeño grupo de fosfoproteínas ácidas de alrededor de 13-15 KDa de la subunidad 60S. Muchos de los genes para las PR de rata y levadura han sido secuenciados. La secuencia de aminoácidos entre la rata y la levadura muestran que existe una homología de entre 40 y 88% lo que apoya la idea de que las PR de eucariontes son ortólogos de bacterias. Es probable que las proteínas ribosomales de las plantas sean también ortólogos de las de animales y levaduras (Green y Noller, 1997; Bailey-Serres, 1998).

La función primaria de las proteínas de las subunidades ribosomales es estabilizar los interdominios de interacción entre el ARNm y la partícula ribosomal (Klein y cols., 2004). Estudios en levaduras y algas han demostrado que los ribosomas funcionales requieren del ensamble coordinado de 70-80 diferentes proteínas ribosomales para formar las subunidades maduras 40S y 60S (Popescu y Turner, 2004).

En los eucariontes, los ARNm de algunas de las proteínas ribosomales tienen una secuencia inmediata al sitio del capuchón de entre 4-13 pirimidinas (5'TOP) con una proporción similar de C y T. En plantas se han analizado una serie de proteínas ribosomales como la prS6, la PRS13 y el factor eIFiso4E, todos presentan la secuencia ARNm 5'TOP (Browning, y cols., 1998; Meyuhas, 2000).

En estudios genéticos se ha reportado que la reducción de la expresión de las PR individuales, causa efectos dañinos en la fisiología de los organismos. En plantas, la mutación en genes de proteínas de PR afecta la viabilidad del embrión y el desarrollo vegetal (Ito y cols., 2000; Barakat y cols., 2001).

En este sentido una de las proteínas ribosomales que ha sido estudiada durante el desarrollo y la diferenciación es la proteína ribosomal L3 (prL3). Los estudios demostraron que está implicada en importantes funciones durante la traducción, la biogénesis de ribosomas y la resistencia a virus. La prL3 forma parte de las proteínas cercanas al centro peptidil transferasa y es una de las primeras proteínas ribosomales que se asocian con el ARNr durante el ensamble de los ribosomas. Esta proteína es codificada por un solo gen en levaduras y dos genes en otros eucariontes incluyendo *Arabidopsis* (Noller, 1997). En *N. tabacum* se han descrito dos genes prL3A y prL3B, el silenciamiento de ambos genes, da por resultado un fenotipo con poco desarrollo e inhibición del crecimiento de las raíces laterales. La deficiencia de prL3, lleva a una reducción del número de células y el crecimiento (Popescu y cols., 2004).

2.2.1.4) Los Factores de Traducción.

En la síntesis de proteínas además de los ribosomas, ARNt y ARNm, intervienen una serie de factores proteínicos que facilitan cada una de las etapas de traducción. Son específicos para cada parte del proceso y suelen ser blanco de la regulación principalmente por el mecanismo de fosforilación. En la Tabla 1, se muestra un resumen de los factores de traducción y su función, éstos se han descrito también en plantas. Todas las proteínas involucradas en el ensamble del complejo 43S han sido descritas en varios cereales como trigo, maíz y arroz (Bailey Serres, 1998, Dinkova, 2000). Por ejemplo, el eIF2 es un complejo heterodimérico de tres subunidades: α ; β y γ de 42, 38 y 50KDa, respectivamente (Merrick y Hershey, 1996; Metz y Browning, 1997).

Tabla 1.- Factores de la síntesis de proteínas en plantas superiores.

INICIACIÓN	
eIF2	Forma el complejo con GTP y el Aminoacil-ARNt (ARNt + metionina) y los une a la subunidad 40S.
eIF3	Participa en la unión del ARNm a la subunidad 40S.
eIF4A	Desenrolla el ARNm con gasto de ATP; participa en la unión del ARNm a la subunidad 40S.
eIF4B	Desenrolla el ARNm con gasto de ATP; participa en la unión del ARNm a la subunidad 40S.
eIF1A/ eIF4C	No aclarado. Previene la unión prematura de las subunidades ribosomales
eIF5A/ eIF4D	No aclarado.
eIF4F	Desenrolla el ARNm con gasto de ATP; participa en la unión del ARNm a la subunidad 40S.
eIF4E y su isoforma eIFiso4E eIF4G y su	Participan en la formación del complejo de iniciación que se une al extremo 5' del ARNm unión al capuchón. Une el eIF3, el

isoforma eIFiso4G	eIF4A y PABP.
eIFiso4F	Desenrolla el ARNm con gasto de ATP; participa en la unión del ARNm a la subunidad 40S
eIF5	Ensambla la subunidad 60S.
EIF3	Previenen la asociación de las subunidades 60S y 40S.
ELONGACIÓN	
eIF1A	Aporta el aminoacil-ARNt a los ribosomas
eIF1B	Facilita el reciclado el factor eIF1A
eEF2	Factor de translocación
TERMINACIÓN	
eRF1 eRF2	Reconocimiento de los codones de terminación y liberación de la cadena polipeptídica.
eRF3	Disociación del complejo 80S, requiere de GTP.

(Modificado de Browning y cols., 1998 y Mathews y cols., 2002)

2.2.2) Las etapas de la síntesis de proteínas en eucariontes.

A grandes rasgos el proceso de traducción puede dividirse en tres etapas: Iniciación, elongación y terminación. A continuación se describe cada una con más detalle.

2.2.2.1) Iniciación.

Antes de comenzar la traducción, en el proceso de iniciación se ensamblan los ribosomas que hasta ese momento se mantienen como subunidades separadas, debido a su interacción con otros factores (eIF3, eIF4C).

En este proceso se forma un complejo de iniciación 43S constituido por la subunidad 40S, el ARNt met y el factor eIF2. El reconocimiento del codón iniciador AUG por este complejo y su unión a la subunidad 60S requiere la unión de GTP dentro del

complejo eIF2-GDP. Este intercambio cíclico GDP-GTP es el ciclo del eIF2 (Figura 7), requiere la presencia del factor eIF2B que aunque su función directa aún no está clara, si se sabe que es un punto importante de regulación en la traducción en plantas (Browning, 1998; Bailey Serres, 1997; Mathews y cols., 2002).

Simultáneamente a la formación del complejo 43S, otros factores de iniciación (ver Tabla 1) se unen al extremo Cap 5' del ARNm para facilitar el inicio de la síntesis de proteínas. En plantas existen dos tipos factores de iniciación, el eIF4E y el eIFiso4E, unidos a su respectiva subunidad eIF4G ó eiFiso4G. Todos los factores unidos forman el complejo eIF4F. Su función principal es la de apoyar la unión del ARNm al complejo 43S. Esta unión no requiere de ATP. Además, el complejo 43S presenta una actividad de helicasa dependiente o no de ATP, dependiendo de que se encuentre unido a eIF4A ó al eIF4B. El complejo 43S unido al ARNm y su complejo de proteínas del capuchón, forman el complejo de iniciación 48S. A este último se . Posteriormente ocurren los procesos de elongación de la cadena polipéptidica (Mathews y cols., 2002).

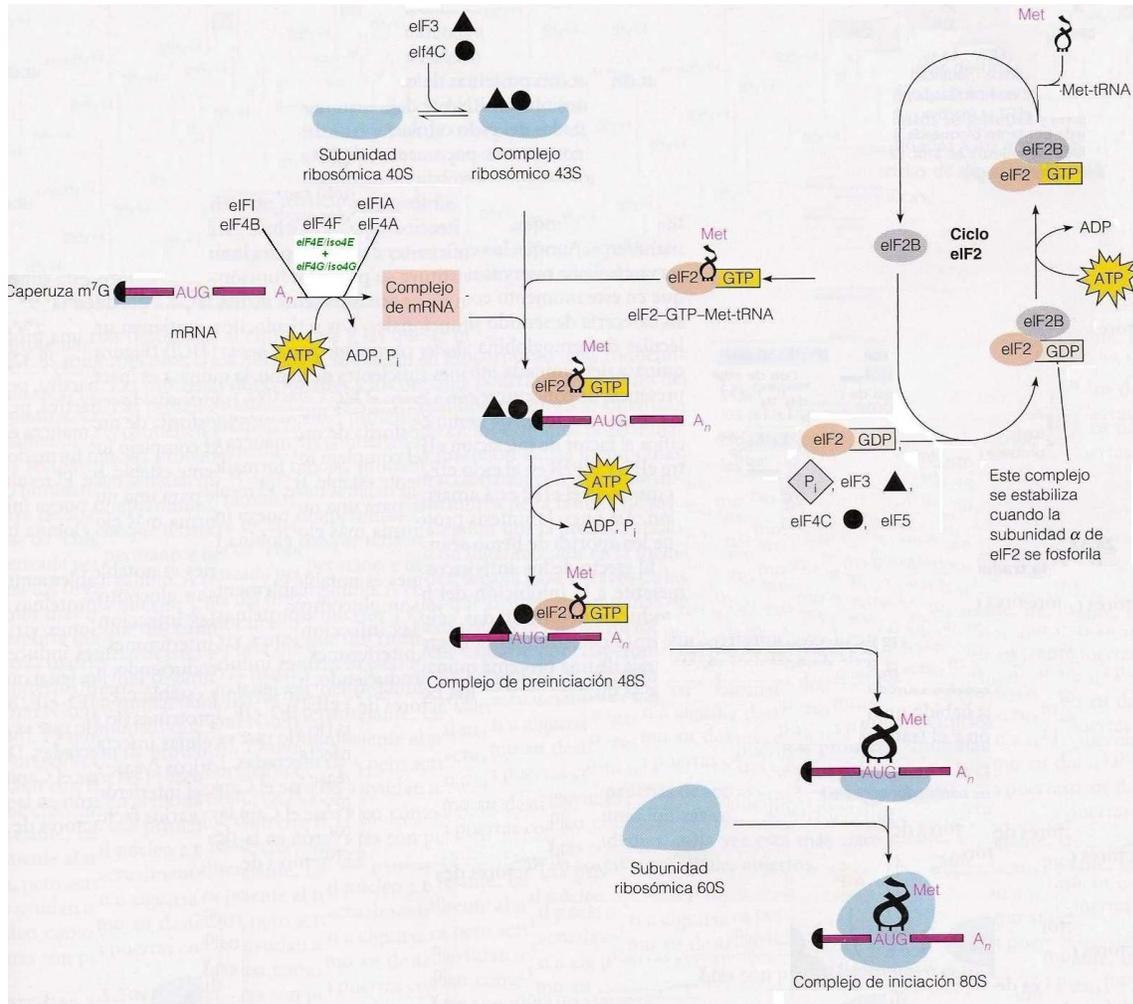


Figura 7. **Iniciación de la traducción** (Modificado de Mathews y cols., 2002)

2.2.2.2) Elongación.

En la etapa de elongación se forman los enlaces peptídicos entre un aminoácido y el siguiente de acuerdo a la secuencia de nucleótidos presentes en el ARNm.

Cada ribosoma tiene dos sitios para asociarse a las moléculas de ARNt, el A (aminoacilo) y el P (peptidilo). En el primero entra el aminoacil -ARNt al complejo de traducción 80S, en el sitio P se realiza la adición de aminoácidos a la cadena en crecimiento, un tercer sitio, el E (salida; en inglés) se propone como el lugar por donde el ARNt sale del ribosoma después de donar su aminoácido (Karp, 2000).

El crecimiento de la cadena polipeptídica se produce mediante un proceso cíclico (Figura 9). El aminoacil-ARNt iniciador, usualmente es el codificante para metionina. Al comienzo de cada ciclo, la cadena polipeptídica esta enganchada a un ARNt en el lugar P, los otros lugares (A y E) están vacíos. Alineado en el lugar A se encuentra el codón del ARNm siguiente. El aminoacil-ARNt correspondiente es colocado en el lugar A por eIF1A, un factor de elongación unido a GTP (Ver Tabla 1). Una vez que se ha reconocido como el aminoácido correcto, se hidroliza el GTP y el complejo eIF1A-GDP se libera y posteriormente se regenera. En este paso se produce la corrección de pruebas, que se limita al reconocimiento del anticodón, no se verifica la identidad del aminoácido. El siguiente paso, la formación del enlace peptídico, es realizado por el centro de peptidil transferasa de la subunidad grande del ribosoma, como se mencionó antes, el ARNr actúa como ribozima (Nissen y cols., 2000; Steitz y Moore; 2003). La cadena unida al sitio P se transfiere al grupo amino del aminoácido del sitio A; ésta transferencia involucra el llamado estado híbrido, donde existe un cambio de los estados basales de los sitios P y A a estados híbridos en los cuales los extremos aceptores de las dos moléculas de ARNt se desplazan entre los sitios A y P, mientras que los extremos del codón permanecen fijos. Finalmente se realiza la translocación en donde el extremo del anticodón del ARNt ya sin aminoácido se transfiere al lugar E, la cadena naciente al lugar P y un nuevo

aminoacil es colocado en A. El proceso se repite hasta encontrar el codón de terminación en el ARNm (Green y Noller, 1997; Bailey Serres, 1997; Karp, 2000; Mathews y cols., 2002).

Durante la síntesis de proteínas, una sola molécula de ARNm puede ser traducida simultáneamente por muchos ribosomas (Figura 8), éstas estructuras se conocen como polisomas (Pardet-Balade y cols.; 2001)

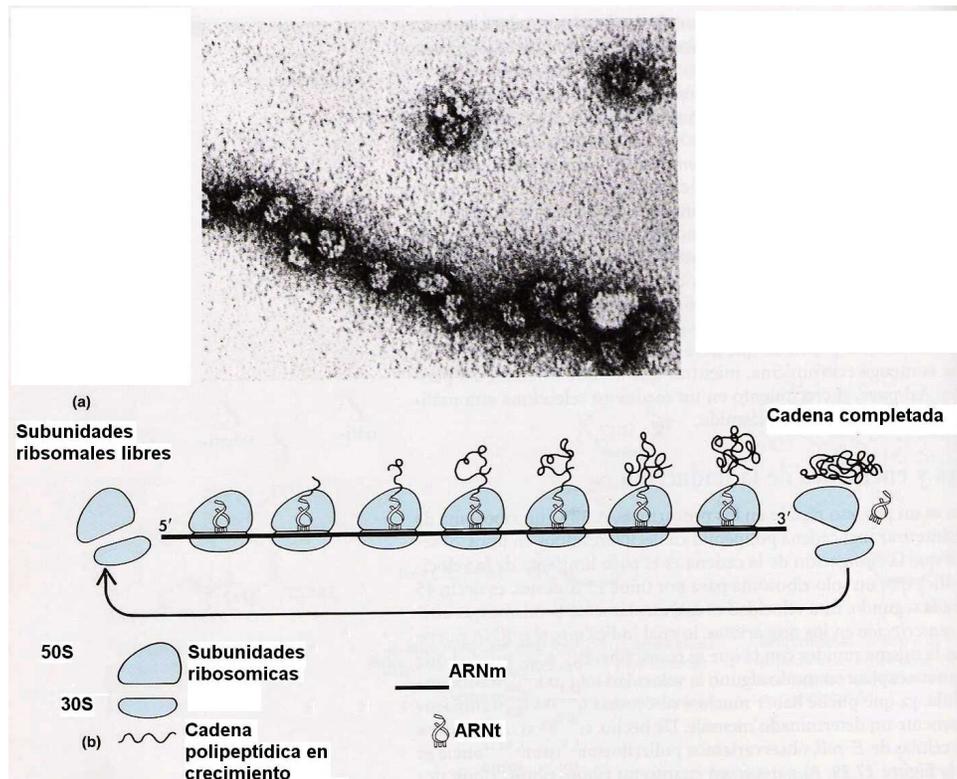


Figura 8. **Polisomas.**

a) Micrografía electrónica de polisomas de *E. coli*. b) Representación esquemática de polisomas de *E. coli* (Tomado de Mathews y cols., 2002).

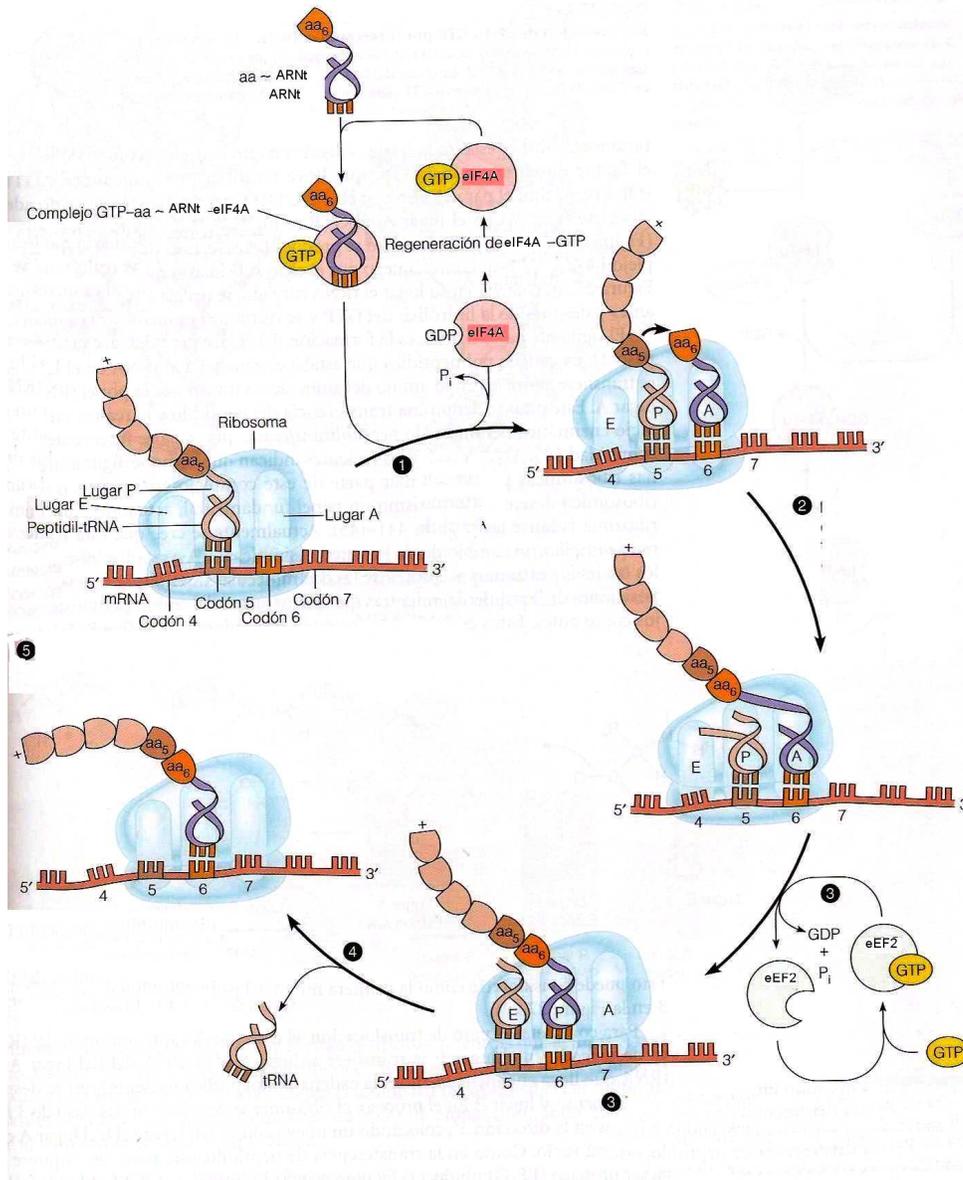


Figura 9. **Elongación de la cadena polipéptica** (Modificado de Mathews y cols., 2002)

2.2.2.3) Terminación.

En esta etapa (Figura 10) se reconoce el codón de terminación que indica el final de la traducción. Los factores eIFR1 y eIFR2 reconocen cada uno dos de los codones de terminación (UAA, UAG y UAA, UGA, respectivamente), el factor eIFR3 es una GTPasa que estimula el proceso de liberación a través de la unión e hidrólisis del GTP y liberan el complejo ribosomal, el ARNm y la proteína recién sintetizada.

Anteriormente se pensaba que eIFR1 y eIFR2, se unían al lugar A, actualmente aunque aún no se ha determinado el mecanismo exacto, si se sabe que al llegar al codón de terminación el centro peptidil transferasa transfiere al C-terminal de la proteína naciente, una molécula de agua, liberando la cadena polipéptica del ribosoma. Finalmente se disocia el complejo 80S y las subunidades ribosomales se separan (Bailey Serres, 1997; Karp, 2000; Mathews y cols., 2002).

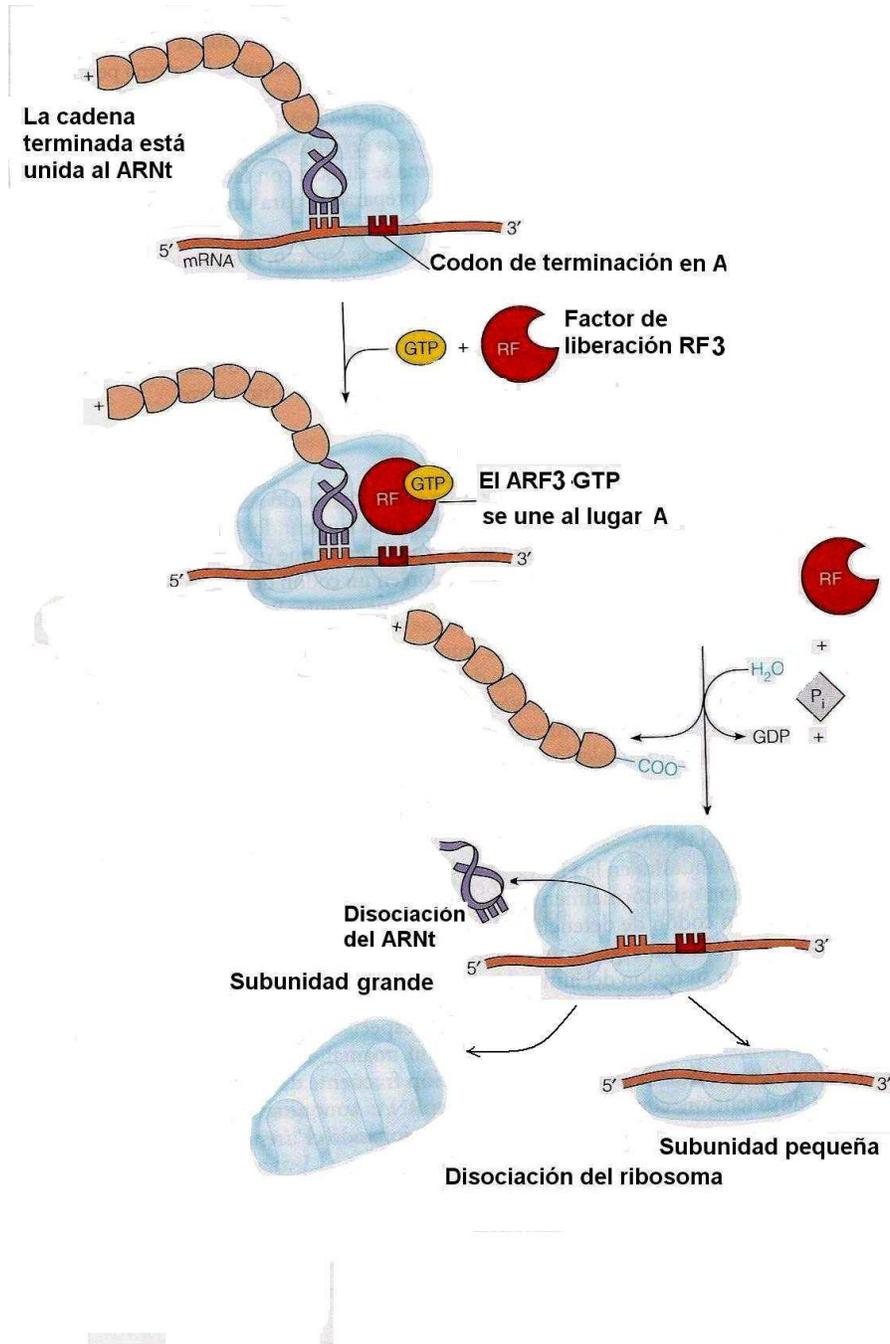


Figura 10. **Fase de Terminación de la síntesis de proteínas** (Modificado de Mathews y cols., 2002).

2.3) REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR INSULINA Y FACTORES SEMEJANTES A INSULINA (IGF) EN ANIMALES.

Los procesos que ocurren durante el crecimiento normal, la diferenciación y el desarrollo o la transformación maligna de eucariontes involucran la regulación de la biosíntesis de ribosomas. Observaciones hechas en épocas recientes han sugerido que la síntesis de muchos componentes del aparato traduccional está regulada precisamente a nivel traduccional (Meyuhas y Hornstein, 2000).

Un mecanismo de control traduccional bien documentado en animales y descrito recientemente en plantas, es aquel en el que se encuentra involucrada la insulina y los factores de crecimiento semejantes a insulina (IGF's por sus siglas en inglés: *insulin growth factors*), que incrementan la síntesis de proteínas, uno de los primeros eventos requeridos para iniciar el crecimiento, la división y diferenciación celular (Collier, 1987; Pardee, 1989; García Flores y cols., 2001).

2.3.1) Vía de transducción de señales por Insulina e IGF.

La insulina es una molécula muy antigua y se ha conservado prácticamente sin cambios durante la evolución. Frederick Grant Banting, Charles Best, James Collip, y J.J.R. Macleod de la Universidad de Toronto, Canadá, descubrieron la insulina en 1922. El Doctor Banting recibió el Premio Nobel de Fisiología o Medicina por descubrir esta hormona.

La insulina (Latín *insula*, "isla") es una hormona polipeptídica formada por 51 aminoácidos. Es segregada por las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas, en forma de precursor inactivo (proinsulina de 11.5KDa), el cual pasa al aparato de Golgi, donde se modifica, eliminando una parte y uniendo los dos fragmentos restantes mediante puentes disulfuro. La insulina madura es un

polipéptido de 6KDa constituida por dos cadenas A y B las cuales cuentan con 21 y 30 aminoácidos, respectivamente; unidas por puentes disulfuro (Mathews y cols., 2002). Entre las respuestas inmediatas de esta hormona se encuentran el transporte de glucosa y activación o inhibición de la actividad de algunas enzimas. En períodos más largos, estimula la síntesis de ácidos nucleícos, de proteínas y promueve el crecimiento celular (Proud y Denton, 1997; Mounier y Posner, 2006).

Los resultados de estudios de la señalización de insulina y de los IGF's revelan que la interacción de estos efectores con sus receptores (del tipo tirosin-cinasa) activan a la cinasa del fosfatidil-3-inositol (PI3K), generando PIP₃ que activa a su vez a fosfatidil cinasa B (PKB, también denominada AKT). La PKB fosforila e inactiva al complejo hamartina/tuberina (TSC1/TSC2 por sus siglas en inglés: *tuberous sclerosis complex 1/2*) inhibidor del crecimiento celular. Resultando en la activación de Rheb que a su vez lleva a la activación de la vía de TOR, S6K, a la fosforilación de prS6 y a la traducción de mensajes 5'TOP (Figura 11) (Harrington y cols., 2005).

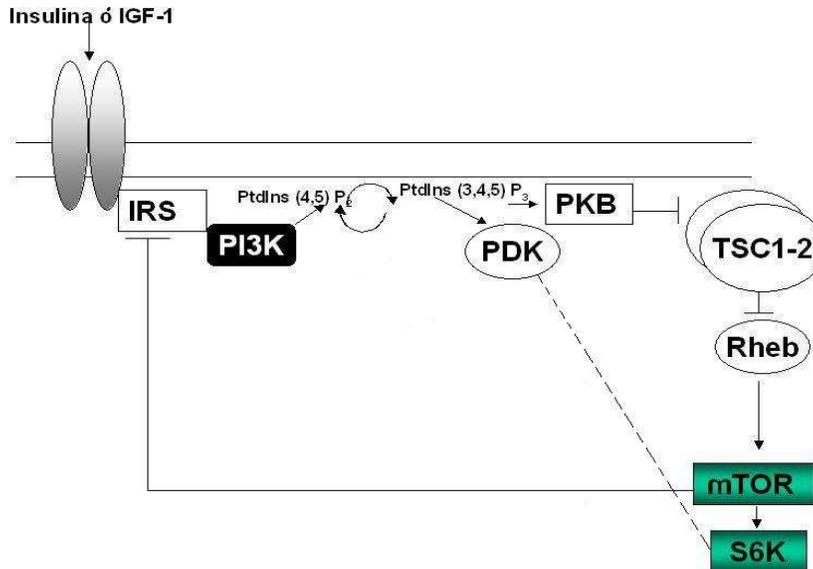


Figura 11. **Control de insulina y PI3K en la señalización de TOR y PS6K.** IGF.-factor semejante a insulina; PI3K.- fosfatidil 3 cinasa, PDK.- fosfatidil cinasa D; PKB.- fosfatidil3 inositol cinasa B; TSC1-2.- complejo 1/2 de Tuberous sclerosis; IRS.- sustrato del receptor de insulina (Tomado de Harrington y cols., 2005)

La cinasa TOR pertenece a una familia de cinasas de serina/treonina denominada PIKK's (cinasas relacionadas con la cinasa de fosfatidil inositol) (Raught y cols., 2001).

Como ya se mencionó, la cinasa TOR es conocida por tener un papel central en la regulación del crecimiento celular y la proliferación. Su actividad ha sido relacionada con varios fenómenos celulares incluyendo la transición G₀/ G₁-S (Yoonseok y Exton, 2004). La vía de señalización de la cinasa TOR integra varias señales como las de los niveles de nutrientes, de energía y de factores de crecimiento que regulan procesos como la autofagia, la biogénesis de ribosomas (Figura 12). Además esta cinasa es una molécula clave de la vía de señalización de insulina. Como resultado de todo lo anterior ocurre la acumulación de biomasa y por lo tanto el crecimiento celular (Averous y Proud, 2006).

Para determinar la participación de la cinasa TOR en una vía de señalización se utiliza la rapamicina, un antibiótico producido por la bacteria *Streptomyces hygroscopicus*. La rapamicina tiene un receptor intracelular específico llamado FKBP12. El complejo rapamicina-receptor interactúa inhibiendo a las proteínas cinasas TOR (Raught y cols., 2001).

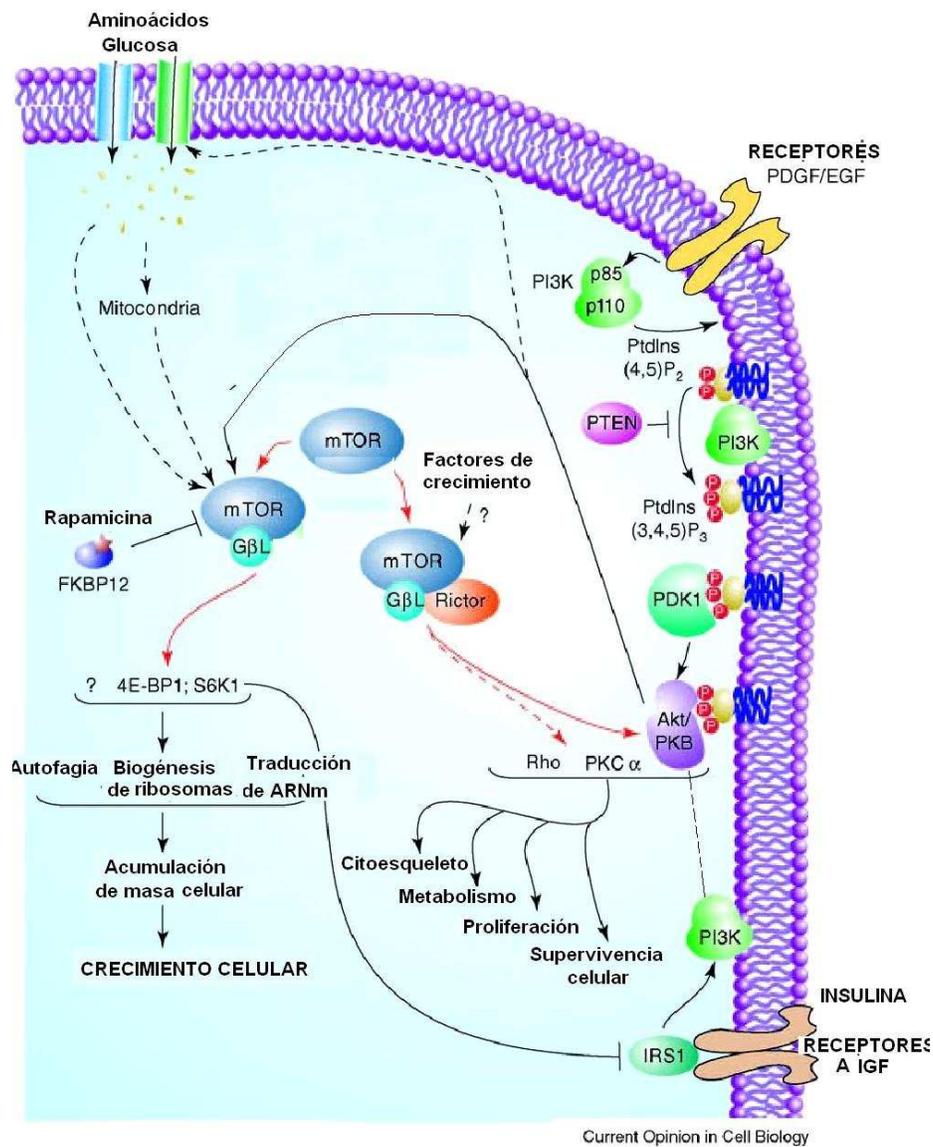


Figura 12.-El papel de TOR en el crecimiento celular. (Modificado de Sarbassov y cols., 2005)

Cuando la insulina se une a su receptor en la membrana la señal se transduce a través de los sustratos del receptor de insulina (IRS por sus siglas en inglés *insulin receptor substrate*) los cuáles a través de diversas cascadas de fosforilación estimulan a moléculas clave de la señalización entre ellas a la PI3K que como se mencionó anteriormente activa a TOR y ésta a su vez activa a S6K.

La TOR de mamíferos (mTOR) es una proteína constituida de varios dominios que forma complejos con otras proteínas, algunas de las cuales al parecer regulan su actividad (como la proteína G Rheb), mientras otras como raptor o rictor están involucradas en la señalización río abajo mediando su interacción con los sustratos que fosforila. Las interacciones de mTOR con raptor y rictor son mutuamente excluyentes. Los complejos en los cuales participa son llamados complejo 1 de mTOR (TOR C1) y complejo 2 de mTOR (mTORC2), respectivamente (Sarbasov y cols., 2005). Raptor participa en la respuesta de señalización cuyo control es sensible a rapamicina, como la de la proteína S6K y el factor de unión al eIF4E (eIF4E-BP1). Los motivos que participan en la unión Raptor-TOR son denominados TOS (motivos de señalización de TOR). TOS1 participa en la vía sensible a rapamicina, mientras que TOS 2 es insensible a éste antibiótico (Averous y Proud, 2006).

2.3.2) Regulación transcripcional por Insulina e IGF.

La insulina y los IGF's tienen un papel importante en la regulación de la expresión génica. En los últimos cuarenta años han recibido gran atención y actualmente se sabe que regulan positiva y negativamente la expresión de aproximadamente 150 genes, estudiados principalmente en hígado y páncreas (Mounier y Posner, 2006). En general, 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 cols., 2001; Mounier y Posner, 2006).

Los mecanismos de regulación son diversos ya que la insulina tiene como se mencionó efectos opuestos para diferentes genes. Se han encontrado varias secuencias de elementos de respuesta a insulina (IRE), aunque no existe una secuencia consenso universal. Al parecer la insulina regula la transcripción afectando el nivel, la localización y la actividad de los factores de transcripción (Mounier y Posner, 2006). La inhibición de la expresión génica en respuesta a insulina, es mediada por la vía de la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K) y AKT (Nakae y cols., 2001). Los principales factores de transcripción involucrados en la regulación transcripcional en respuesta a insulina son las proteínas Foxo, las SREBP y las Sp1 (Mounier y Posner, 2006).

Las proteínas Foxo, son una familia de factores de transcripción que muestran un efecto de represión de la transcripción en presencia de insulina. La insulina estimula FoxO1 a través de la PI3KB en una cascada de señalización que involucra a la cinasa AKT. La cual media la fosforilación secuencial de FoxO1. En páncreas FoxO1, regula la inhibición de la expresión génica del preproglucagon (Mckinnon y cols., 2006).

Las SREBP, son una familia de factores de transcripción con tres isoformas, que contienen un motivo del tipo cierre de leucina, en el hígado SREBP-1c regula la síntesis de lípidos, mientras SREBP-2, regula la síntesis de colesterol. La expresión del gen SREBP1 está regulada por insulina en el hígado y los adipocitos, vía la activación de IP3K y AKT (Eberle y cols., 2004).

Finalmente las proteínas Sp1, son activadores ubicuos que contienen tres regiones de tipo dedos de zinc en el extremo carboxilo terminal, y se unen a motivos ricos en GC en los promotores de los genes involucrados en la respuesta a insulina. Su efecto sobre la transcripción depende del carácter de cada gen. Cuando se une a SREBP-1c regulan la transcripción de la PEPCK (Barroso y Santisteban, 1999; Chakravarty y cols., 2004).

2.3.3) Regulación traduccional por insulina e IGF.

En el caso de la regulación traduccional aparentemente tres distintas vías de señalización intracelulares están involucradas en la regulación mediada por insulina (Proud, 1997). La primera vía de señalización regula la iniciación mediante la fosforilación del factor eEIF2. En la segunda vía, la insulina regula la formación del complejo 43S, al fosforilar a la proteína 4E-BP1 permitiendo la liberación del factor eIF4E que forma parte del complejo de iniciación. Un tercer mecanismo es a través de la fosforilación de prS6 que regula la traducción selectiva de los mensajes 5'TOP que codifican proteínas ribosomales y factores de elongación. En todos estos efectos participa la proteína TOR (Proud, 1997; Holz y cols., 2005; Wang y cols., 2005; Averous y Proud, 2006).

Los efectos de insulina sobre la traducción mejor caracterizados, incluyen dos vías de señalización paralela; la vía de la cinasa de la proteína ribosomal S6 (la S6K) y la de la proteína de unión al factor de iniciación eucariótico eIF4E (eIF4E-BP1) (Rubinski y Meyuhas, 2006).

2.3.3.1) Cinasas involucradas en la fosforilación de componentes de la maquinaria traduccional.

Los estudios sobre la regulación de la actividad de los ribosomas se han enfocado en la prS6, constituyente de la subunidad 40S del ribosoma, que se encuentra localizada en el área relacionada con la unión al ARNm y parece ser el “blanco” de la actividad de diversos efectores del crecimiento (Ferrari y Thomas, 1994).

La proteína ribosomal S6 tiene entre 6 y 8 sitios de fosforilación en distintas especies (Ruvinsky y Meyuhas, 2006). En maíz se ha descrito la fosforilación de cinco residuos de serina y treonina que ocurre en una secuencia específica en respuesta a

hipoxia (Williams y cols., 2003). Estos sitios están localizados en un fragmento de 15 residuos en el extremo C-terminal (Kleijn y cols., 1998).

Se han identificado dos clases de proteínas cinasas capaces de fosforilar a S6 *in vitro* las S6K de 70 y 90 KDa sensibles a rapamicina (S6Ks) y las S6 cinasas de proteínas ribosomales p90 (RSKs) insensibles a rapamicina activadas a través de la vía clásica de las MAP cinasas (ERK). Datos recientes de ratones *knockout* para S6K apoyan la participación de la ERK en la fosforilación de S6 en respuesta a ciertos estímulos y condiciones específicas. En ratones y humanos existen dos genes de p70^{S6K} (S6K1 y S6K2) cada uno de ellos da lugar a dos proteínas distintas debido a un procesamiento alternativo. Las proteínas S6K son activadas por fosforilación en múltiples sitios (Averous y Proud, 2006; Ruvinsky y Meyuhas, 2006).

En células intactas, la fosforilación de prS6 es uno de los primeros eventos detectados después de la estimulación mitogénica de células quiescentes al entrar al ciclo celular y está estrechamente relacionada con un incremento en la síntesis de proteínas. En las células animales en cultivo se ha demostrado que existe una poza de proteínas S6 que son fosforiladas en respuesta a estímulos hormonales (Harold y cols., 2000; Holz y cols., 2005).

Se ha observado también que las subunidades ribosomales en las que la proteína S6 está fosforilada se encuentran preferentemente en la fracción de los polisomas asociada a los ARNm 5' TOP (Duncan y McConkey, 1982; Meyuhas y Hornstein, 2000). Aunque el sentido fisiológico de la fosforilación de S6 aún no está completamente claro, parece estar relacionado con una iniciación y/o elongación más eficiente (Ruvinsky y Meyuhas, 2006).

2.3.3.2) Participación de TOR.

El papel mejor conocido de TOR en células de mamíferos está relacionado con el control de la traducción de ARNm. La regulación mediada por TOR se encuentra a varios niveles dependiendo de sus “blancos”, es sensible a rapamicina y activada por insulina e IGF's. Entre los efectos más estudiados están la fosforilación directa o indirecta de la proteína S6K, de 4E-BP la proteína de unión al eIF4E, de los factores de iniciación de la traducción eIF4G1 y eIF4B y del factor de elongación eEF2 que promueve la unión del aminoacil ARNt al ribosoma (Figura 13).

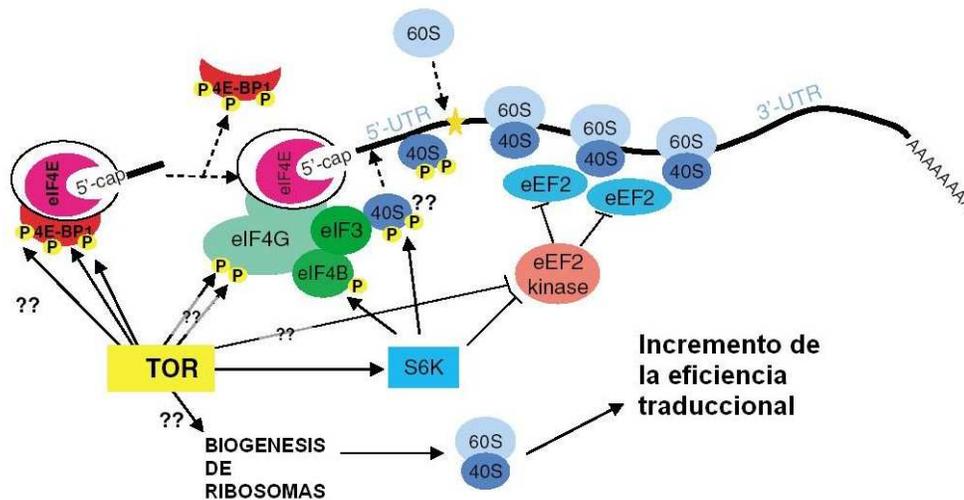


Figura 13.- **El papel de TOR en la regulación de la traducción** (Modificado de Averous y Proud; 2006).

La actividad de S6K es dependiente de la fosforilación mediada por TOR, mientras que la fosforilación de 4E-BP1 permite la disociación de eIF4E y el inicio de la traducción. Los estudios con mutagénos que bloquean o restauran la señalización a través de alguna de éstas vías demuestran que están involucradas de manera independiente en la regulación del crecimiento y la progresión del ciclo celular (Ruvinsky y Meyuhas, 2006). De esto se infiere que las proteínas TOR no son

componentes de una sola vía de señalización. Se ha observado que pueden ser “encendidas” por una gran variedad de efectores, entre los que se pueden incluir factores de crecimiento, mitógenos como la insulina y nutrientes como aminoácidos (Harold y cols., 1996; Raugth y cols., 2001; Turck y cols., 2004).

La regulación de la elongación de la síntesis de proteínas es otro efecto bien documentado de TOR. El factor eEF2 forma parte de un complejo (que incluye al aminoacil-ARNt y requiere GTP) que permite el anclaje del aminoacil-ARNt al ribosoma. Cuando eEF2 está fosforilado, no puede unirse al ribosoma. La cinasa EF2 (EF2K) es quien fosforila a eEF2. En presencia de insulina EF2K es fosforilada por un mecanismo que no se conoce con exactitud y se inactiva. El factor EF2 es desfosforilado (por la fosfatasa PP2A) y se incorpora al ribosoma permitiendo la elongación; ya que como se mencionó antes eEF2 participa en el desplazamiento del ARNm del sitio A al sitio P (Averous y Proud, 2006).

2.4) REGULACIÓN DE LA TRADUCCIÓN POR INSULINA DURANTE LA GERMINACIÓN EN MAÍZ.

2.4.1) Factor semejante a insulina en maíz.

Los vegetales no producen insulina pero sí se ha podido demostrar la existencia de una molécula semejante a insulina. En espinaca se reportó un péptido reconocido por anticuerpos contra insulina y en soya un péptido de 4KDa que es reconocido por los receptores de insulina bovinos (Collier y cols., 1987; Hanada y Hirano, 2004).

Se ha descubierto también un factor endógeno semejante a insulina en maíz, el ZmIGF. Dicho péptido también induce la fosforilación de S6 y estimula el crecimiento, ya que en semillas imbibidas en presencia de insulina y ZmIGF se observó un incremento en el crecimiento de la radícula y el alargamiento del coleóptilo por arriba del reportado para el testigo imbibido sólo en agua. El ZmIGF se encontró ubicado en

los tejidos meristemáticos del eje embrionario de maíz. Probablemente actúe de manera similar a la insulina ya que su efecto sobre la fosforilación de S6 es revertido por rapamicina (García Flores y cols., 2002).

En semillas de maíz la insulina acelera la germinación y el crecimiento de las plántulas y promueve el paso de fase G₁ a S (García Flores y cols., 2001). Este efecto está acompañado de la estimulación de la síntesis de proteínas (Sánchez de Jiménez, 2000; Paz Lemus, 2005). Como se mencionó previamente, los ejes embrionarios quiescentes de maíz contienen una gran cantidad de ARNm almacenados. Se ha observado que dichos ARNm y una poza abundante de subunidades ribosomales, se encuentran en el eje embrionario de la semilla seca y que cuando la imbibición comienza son utilizadas directamente en la síntesis de proteínas (Rincón Guzmán y cols., 1998).

2.4.2) Regulación de eIFiso4E en maíz.

En eucariontes, el paso limitante en la síntesis de proteínas es el reconocimiento y la unión del ARNm a los ribosomas, existen varias proteínas que ayudan al reconocimiento de los ARNm por parte de la subunidad 40S del ribosoma; a las que se les denominan genéricamente factores de Iniciación de la traducción eucarióticos (eIF), (Ver Tabla 1). Este proceso también puede ser regulado por la fosforilación y desfosforilación de componentes claves de la traducción (Harold y cols., 2000).

En maíz existen dos isoformas el eIFiso4E y el eIF4E. Se ha demostrado que ambos tienen una estructura muy similar (homología mayor al 50 %). Estudios de los espectros de fluorescencia de cada una demuestran que uno o más de un grupo de ocho triptofános conservados están involucrados en la unión al capuchón (Carberry y cols., 1991).

Estudios previos del grupo de trabajo muestran que los factores eIFiso4E y eIF4E tienen un patrón de expresión diferencial durante la germinación. En las semillas de

maíz, existe el eIF4E entre los mensajes almacenados, mientras que el eIFiso4E, es sintetizado *de novo*. También pudo demostrarse *in vitro* que la traducción es dependiente de la fosforilación de S6 y es estimulada por insulina en el eje completo (Dinkova y cols., 2000; García Flores y cols., 2001). Además, el factor eIFiso4E es el más abundante y reclutado preferentemente en los polisomas, como parte de una vía de regulación mediada por insulina que involucra la fosforilación de la prS6 (Dinkova; 2000 b).

Por otro lado, la insulina promueve un incremento en la traducción de mensajes ARNm 5'TOP en plantas acompañado de la fosforilación de S6 así como de los factores eIF4E y eIFiso4E probablemente por la misma vía utilizada en animales, ya que la aplicación de rapamicina inhibe ambos efectos (Dinkova y cols., 2000). En esta vía participa la enzima ZmS6K, homóloga de la proteína P70^{S6K} recientemente clonada en maíz (Reyes de la Cruz y cols., 2004).

2.4.3) Regulación de la fosforilación de la prS6 en maíz.

La proteína ribosomal S6 de 30KDa es la principal fosfoproteína de los ribosomas de los eucariontes. Se ensambla con el precursor del ARNr 45S en el nucleolo y se localiza en la subunidad ribosomal 40S. La prS6 de maíz es codificada por dos genes y está altamente conservada entre los eucariontes con homologías de 54.2%, 62.8% y 87.3% con levadura, *R. Norvergicus* y *Arabidopsis thaliana*, respectivamente. En general los residuos susceptibles de ser fosforilados se encuentran conservados (Williams y cols., 2003).

Se ha reportado que en semillas de maíz deshidratadas el transcrito para la prS6 se encuentra almacenado como partícula ribonucleoproteica y se moviliza a los polisomas para su traducción durante la imbibición (Beltrán Peña, 1997). En presencia de insulina hay un incremento del reclutamiento para el mensaje de la prS6. La wortmanina y la rapamicina (inhibidores de la vía de señalización de insulina en animales) revirtieron dicho efecto (Beltrán Peña, 1997).

Como se mencionó recientemente se ha caracterizado una proteína homóloga a p70^{S6K} en ejes embrionarios de maíz, la ZmS6K. Esta enzima es un péptido de 62KDa, que se activa por fosforilación de residuos serina/treonina, específicamente la treonina 389. La ZMS6K fosforila específicamente a prS6 tanto *in vivo* como *in vitro* durante el desarrollo y también en respuesta a insulina, este efecto es bloqueado por rapamicina (Reyes de la Cruz, 2004). Los resultados anteriores apoyan la existencia en ejes de maíz de una vía de señalización en respuesta a insulina muy similar a la de animales.

Se ha reportado que el crecimiento vegetal ocurre por dos mecanismos: alargamiento y división celular. El balance entre estos dos tipos de crecimiento depende del estímulo y del tejido analizado (Eckardt, 2005). En el caso del eje embrionario de maíz durante la germinación se ha observado que existen estas formas de crecimiento en las diferentes partes del embrión; asimismo se ha reportado que la división celular se activa de manera diferencial en dichas partes (Baíza y cols.,1989). Es importante mencionar que la mayoría de los estudios del efecto de la insulina en la síntesis de proteínas en maíz se han realizado en ejes embrionarios completos. Sin embargo, en estudios recientes de nuestro grupo de trabajo se ha demostrado que las respuestas a insulina no son iguales en el coleóptilo y la radícula (Paz Lemus, 2005; Buentello, 2006). Estos resultados indican que la respuesta a insulina es tejido- específica en el eje embrionario de maíz.

3) JUSTIFICACIÓN.

En animales, la insulina induce la división celular y la síntesis de proteínas a través de una vía de transducción de señales en la que se encuentra involucrada la proteína cinasa mTOR. Esta cinasa regula la traducción a través de la fosforilación de la cinasa S6K que a su vez fosforila a la proteína ribosomal S6. La proteína ribosomal S6 se localiza en el sitio de unión del ARNm de la subunidad 40S. Se ha sugerido que esta fosforilación de S6 participa en la selección específica de ARNm 5'TOP (mensajeros con un segmento de pirimidinas) para su traducción. La rapamicina inhibe a TOR impidiendo la fosforilación de S6. Otro punto de la regulación traduccional, es la disponibilidad de eIF4E (factor de iniciación de la traducción) que participa en la formación del complejo de iniciación. En plantas existe además la isoforma eIFiso4E.

Resultados previos de nuestro grupo de trabajo sugieren que la proteína TOR también participa en la vía de transducción de señales de insulina y ZmIGF en maíz (Sánchez de Jiménez y cols., 2000; García Flores, 2005). En este sentido, se ha reportado que en maíz la insulina induce la fosforilación y activación de la proteína cinasa de S6, la cual como se mencionó, es sustrato de TOR (Reyes de la Cruz y cols., 2004). Algunos de los efectos de la insulina en la síntesis de proteínas en maíz se revierten con rapamicina (un inhibidor de la proteína TOR) (Buentello, 2006). También se ha encontrado que la síntesis de los factores de iniciación de la traducción (eIFiso4E) es dependiente de la fosforilación de la proteína ribosomal S6 (Dinkova y cols., 2000).

Hasta el momento no se ha caracterizado completamente la vía por la que la insulina promueve el crecimiento celular en etapas tempranas de la germinación de maíz. Se sabe que comparte algunos intermediarios con la ruta reportada en animales. Sin embargo, no se sabe que parte del eje embrionario (coleóptilo, nodo o raíz) es la que más contribuye al efecto observado de la insulina en el eje completo. Tampoco se ha analizado la contribución de la regulación transcripcional y traduccional en la

expresión génica de proteínas de la maquinaria traduccional en las distintas partes del eje embrionario durante la germinación. Por lo que en este trabajo se analizará el efecto de la insulina en la regulación transcripcional y traduccional de la expresión de los genes de prS6 prL3 y eIFiso4E en las distintas partes del eje embrionario de maíz en germinación.

4) HIPÓTESIS:

La insulina promueve el crecimiento de la plántula de maíz en forma tejido específica por división celular y/o alargamiento del eje embrionario de maíz, por lo que se esperaría que incremente de forma selectiva la expresión de proteínas que regulan la traducción y el crecimiento en las diferentes partes del eje embrionario de maíz.

5) OBJETIVO GENERAL:

Determinar el efecto de la insulina sobre la expresión génica de proteínas que intervienen en la traducción en las diferentes partes del eje embrionario de semillas de maíz durante la germinación.

6) OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Determinar el efecto de la insulina y el inhibidor rapamicina en los niveles de ARN mensajero de prS6, prL3 y eIFiso4E en el ARNtotal de la radícula, el nodo, el coleóptilo y ejes embrionarios completos de maíz durante la germinación.
2. Determinar el efecto de la insulina y el inhibidor rapamicina en los niveles de ARN mensajero de prS6, prL3 y eIFiso4E en el ARNpolisomal de la radícula el nodo, el coleóptilo y ejes embrionarios completos de maíz durante la germinación.
3. Determinar, en su caso, el nivel al que se encuentra la regulación de la expresión génica por insulina (transcripcional o traduccional).

7) DISEÑO EXPERIMENTAL.

Con el objetivo de determinar el efecto de insulina sobre las diferentes partes del eje embrionario se propuso la siguiente estrategia.

1.- Imbibir semillas de maíz por 22 h, disectar el eje embrionario e incubar por 2 h con un pulso de insulina o la mezcla insulina rapamicina. Hasta completar 24 h.

2.- A partir de los ejes embrionarios incubados con los efectores, obtener muestras de coleóptilo, radícula, nodo y eje completo.

3.- Establecer las técnicas para la extracción del ARN total y polisomal en el eje completo.

4.- A partir de las muestras de coleóptilo, radícula y nodo, extraer el ARN total y polisomal.

4.- Se estableció la técnica de RT-PCR para verificar la regulación transcripcional o traduccional de los genes de interés.

8) MATERIALES Y MÉTODOS.

8.1) Material biológico

Durante este estudio se utilizaron semillas de maíz (*Zea mays* L. var. Chalqueño) de tamaño homogéneo, sin daño visible o cambios de coloración de la testa.

Para eliminar contaminación por hongos o bacterias las semillas fueron desinfestadas superficialmente con etanol al 70 % v/v por 15 seg., en agitación. Posteriormente se enjuagaron con agua estéril y se sumergieron en hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1 % p/v por 10 min, se enjuagaron con agua estéril y se imbibieron en camas de algodón humedecido con agua estéril, a 25 °C por 22 h en la oscuridad. Posteriormente los embriones fueron disectados manualmente. Los embriones completos se incubaron por 2 h a 25 °C en medio Murashagi y Skoog (MS) suplementado con Insulina bovina® (Sigma) 200µU/mL ó la mezcla Insulina 200µU/mL /rapamicina 0.1µM; el Testigo se mantuvo sólo en medio MS. Después de la incubación se separaron la parte área, el nodo y la radícula. Las muestras se congelaron en N₂ líquido y se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

8.2) Aislamiento de ARN total.

La extracción de ARN total se realizó usando la técnica de Trizol (Invitrogen®) modificada para tejidos vegetales de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La modificación realizada consistió en agregar un paso extra en la extracción usando Isopropanol y una mezcla de Citrato de sodio 0.8M/Cloruro de sodio 1.2M p/v con la finalidad de precipitar los carbohidratos presentes en las muestras, debido a que las células vegetales tienen altos contenidos de estos compuestos.

Una muestra de 0.2g de cada tejido se pulverizó con N₂ líquido hasta obtener un polvo fino. Se añadió 1 ml del reactivo de Trizol por cada 0.05 - 0.1g de tejido y se homogenizó. Se incubó el homogenado 5 min. a temperatura ambiente. Se centrifugó

a 12 000 x g por 10 min a 4 °C. Al sobrenadante se le añadieron 200µL de cloroformo por ml de Trizol, se agitó con un vórtex por 30 s y se incubó 3 min. a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 12 000 x g por 15 min. a 4°C. Se repitió el procedimiento.

Al sobrenadante se añadieron 250µL de Isopropanol y 250µL de la mezcla de Citrato de sodio 0.8M /Cloruro de sodio 1.2M. Se mezcló por inversión suave e incubó 10 min. a temperatura ambiente y se centrifugó a 12 000 x g por 10 min. a 4 °C.

La pastilla de ARN se lavó con 1 ml de etanol al 75% v/v recién preparado y frío. Se centrifugó a 10 000 x g por 10 min. a 4°C. La pastilla de ARN obtenida se secó al aire con una lámpara durante 20-30 min. La pastilla se resuspendió con 50 µL de agua tratada con DEPC y se almacenó a -70 °C. Todas las centrifugaciones se realizaron en una centrífuga refrigerada Beckmann GS-100 y un rotor F2402

8.3) Aislamiento de ARN polisomal.

Para el ARN polisomal, se separaron los polisomas de acuerdo a la técnica de Beltrán (1995) y posteriormente se aisló el ARN según Dinkova (2000) como se indica a continuación.

Para separar los polisomas, se utilizó 1.0 g de cada parte del eje embrionario. Todos los pasos se realizaron en frío. El tejido se pulverizó con N₂ líquido hasta obtener un polvo fino. Se homogeneizaron con 5 ml de amortiguador de extracción (Tris-HCl 0.2M, pH 9; KCl 0.2M; MgCl₂ 35 mM, sacarosa 0.2M, PTE (polyoxietileno 10-tridécil eter) al 2% v/v; Heparina 0.5 mg/mL y β- Mercaptoetanol 100mM).

El homogenado se filtró en papel Whatman N° 1. Se centrifugó a 11 000 x g por 15 min a 4 °C (para eliminar núcleos y restos de tejido). El sobrenadante se colocó en 5 ml de colchón de Sacarosa (Sacarosa 1.5 M en Tris-HCl 40 mM, pH 8.5; KCl 40 mM

y MgCl_2 20 mM) y se centrifugó a $50\,000 \times g$ por 3.5 h a $4\text{ }^\circ\text{C}$. La pastilla polisomal se resuspendió en aproximadamente $500\mu\text{L}$ agua DEPC y se almacenó a $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Para aislar el ARN polisomal, a partir de $500\mu\text{L}$ de la resuspensión de polisomas (Beltrán, 1995), se añadieron $20\mu\text{L}$ de EDTA 0.5 M (pH 8.5) y $25\mu\text{L}$ de SDS al 10% p/v. Se agitó en el vórtex 30s. Se añadieron $500\mu\text{L}$ de Fenol para ARN (fenol saturado con agua libre de RNAasas) y $100\mu\text{L}$ de alcohol isoamílico (49:1 v/v). Se agitó en el vórtex por 30s. Se centrifugó a $11\,000 \times g$ por 15 min. a $4\text{ }^\circ\text{C}$. Al sobrenadante se añadieron $450\mu\text{L}$ de Acetato de potasio 2M (pH 4.8). Se incubó por 45 min. en hielo, se centrifugó a $44\,000 \times g$ por 20 min. a $4\text{ }^\circ\text{C}$ en una ultracentrífuga Beckmann 110.

Al sobrenadante se añadieron $650\mu\text{L}$ de isopropanol helado. Se incubó a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ por 45 min. Se centrifugó a $11\,000 \times g$ por 20 minutos a $4\text{ }^\circ\text{C}$. La pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 70% v/v y se centrifugó a $11\,000 \times g$ por 5 min. a $4\text{ }^\circ\text{C}$. La pastilla se resuspendió en $80\mu\text{L}$ de agua DEPC. Se añadieron $20\mu\text{L}$ de Cloruro de Litio 10 M; se agitó en el vórtex y se incubó a $4\text{ }^\circ\text{C}$ por una noche.

Pasado ese tiempo se centrifugó a $14\,000 \times g$ por 20 min. a $4\text{ }^\circ\text{C}$. La pastilla se lavó dos veces con 1 ml de etanol al 70% v/v. En cada lavado se centrifugó a $14\,000 \times g$ por 5 min. a $4\text{ }^\circ\text{C}$. La pastilla se resuspendió en $100\mu\text{L}$ de amortiguador TEN (Tris 10mM, EDTA 1mM-NaCl 0.1M, pH 8). Se añadieron $300\mu\text{L}$ de etanol absoluto y se incubó a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ por 15 min. a $4\text{ }^\circ\text{C}$. La pastilla de ARN se lavó con 1 ml de etanol al 70% v/v y se centrifugó a $14\,000 \times g$ por 5 minutos a $4\text{ }^\circ\text{C}$. Finalmente la pastilla de ARN polisomal se resuspendió en $50\mu\text{L}$ de agua DEPC.

Tanto para el ARN total como para el polisomal, el rendimiento (μg ARN por g de peso fresco) se calculó por espectrofotometría (Beckman 605) a partir de la determinación de la absorbancia a 260 nm, la pureza del ARN se calculó usando la relación $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ considerando un valor de 2 para el ARN puro.

La integridad de las muestras se verificó usando 3 µg de ARN total o polisomal en geles de agarosa al 1.5% en amortiguador TAE 1X ((Tris- Ácido acético 1mM, EDTA 0.5 M, pH 8.5) y tiñendo los geles con Bromuro de etidio 0.1µM.

8.4) Cebadores.

Con el objetivo de determinar la expresión de las PR's S6 y L3 y el factor elFiso4E se utilizaron cebadores específicos basados en la secuencia de maíz. Se incluyó también la expresión de gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GADPH) de maíz, un gen constitutivo, para usarlo como gen de normalización El tamaño aproximado del fragmento es de 500, 835, 700 y 880 pb respectivamente.

8.5) Amplificación por RT-PCR

Una vez que se verificó la integridad de las muestras a partir del ARN total y polisomal se realizó la estandarización de las condiciones de PCR para cada gen. Se estandarizó la técnica de RT-PCR en un solo paso con RT_PCR-one step® de Invitrogen, para determinar la cantidad óptima de ARN. La síntesis de la primera cadena de ADNc se llevó a cabo a 55°C durante una hora, usando oligos específicos para los genes de interés. La amplificación por PCR se realizaron en las siguientes condiciones: 94°C por 5 min y 26 ciclos de 94°C por 30 s, 58°C ó 60°C por 60 s y 72°C por 60s. Las muestras se almacenaron a -70°C.

La expresión se verificó usando geles de Agarosa al 1.0% p/v con amortiguador TAE (Tris- Ácido acético 1mM, EDTA 0.5 M, pH8.5), por 1.5 h a 95 volts. Posteriormente el gel se tiñó con Bromuro de etidio 0.1µM por 15 minutos. En cada caso se realizó una densitometría utilizando el programa ImageJ.

8.6) Análisis estadístico.

Para realizar el experimento se utilizó un diseño experimental, donde se imbibieron tres lotes independientes de semillas. De cada lote se obtuvieron el eje completo, la radícula, el nodo y el coleóptilo tratados con los siguientes efectores: Testigo (MS), Insulina (MS + insulina 200 μ u/mL) e Ins/Rapa (MS+insulina μ U/mL+rapamicina 0.1 μ M). Se utilizó el programa NCSS para obtener los parámetros de estadística descriptiva (promedio y ES). Y para determinar las diferencias entre los tratamientos se realizó la prueba de comparación de medias contra testigo de Dunnett, con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$.

9) RESULTADOS.

9.1) Material biológico obtenido.

Se utilizaron semillas de maíz de la variedad Chalqueño. Las semillas se imbibieron por 22 h, (Figura 14 a) se disectaron los ejes embrionarios completos y se incubaron 2 h más en medio MS con y sin insulina o con la mezcla insulina /rapamicina. Posteriormente, se cortaron el coleóptilo, el nodo y la radícula del eje embrionario como se muestra en la Figura 14b. El corte se realizó hasta terminados los tratamientos para evitar que respuestas de daño por herida interfirieran con los tratamientos de los efectores. Se obtuvieron tres muestras independientes de cada tratamiento (Testigo, Insulina e Insulina/Rapamicina).

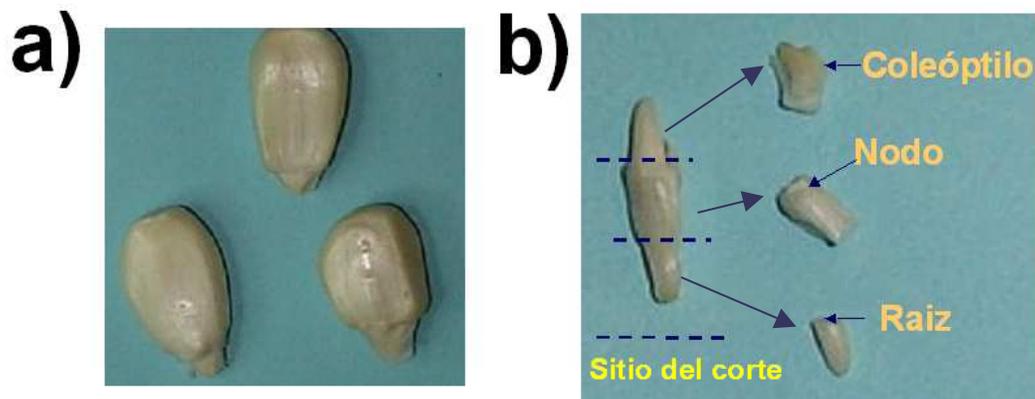


Figura 14. **Muestra de semillas de maíz Chalqueño utilizadas en el experimento.**
A) semilla de 22 h de imbibición; b) Ejes embrionarios disectados y sitios de corte del coleóptilo, el nodo y la radícula después de los tratamientos.

9.2) Rendimientos de la extracción de ARN total y polisomal.

Para determinar la regulación de la expresión de los genes de prS6, prL3 y del factor elFiso4E se aisló el ARN total (regulación transcripcional niveles de transcritos) y el ARN polisomal (regulación traduccional ARNm reclutados en polisomas) de cada tejido (eje completo, nodo, coleóptilo y radícula).

En la Figura 15 se muestra un gel de integridad representativo para una muestra de ARN total y una muestra de ARN polisomal de cada parte del eje embrionario de maíz. En cada carril del gel se cargaron 3µg de ARN. En todos los gels se observan las dos bandas correspondientes a los ARNr 25S y 18S. Estos resultados indican que se tiene una integridad adecuada del ARN para los experimentos posteriores.

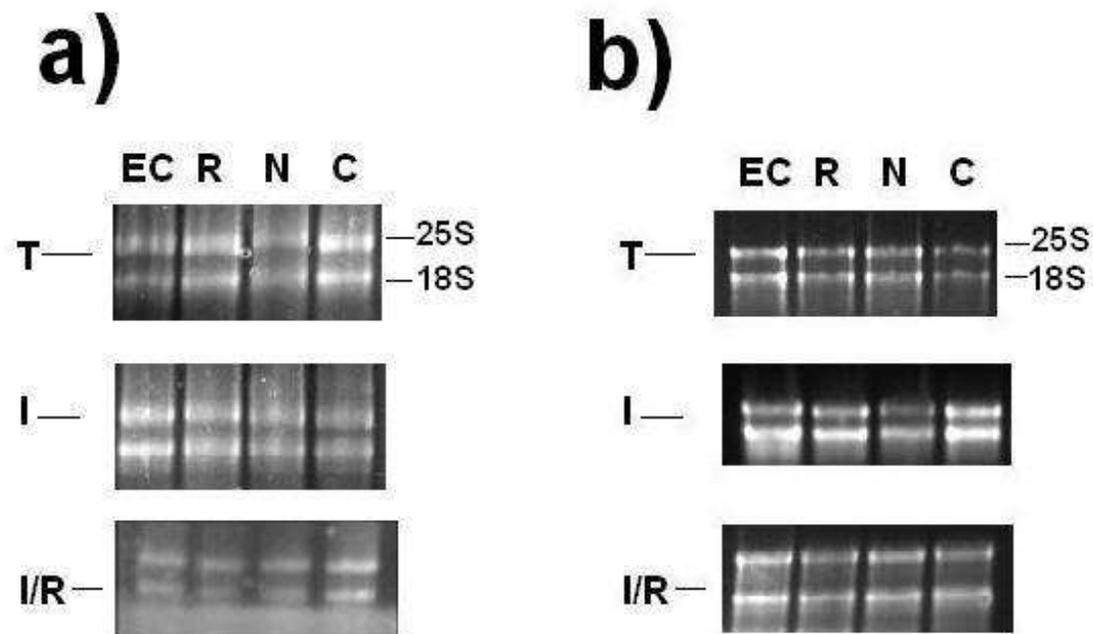


FIGURA 15. **Integridad del ARNr.** a) ARN total b) polisomal. EC.- eje completo, R.- radícula; N.- nodo; C.- coleóptilo. T.- testigo, I.-insulina 200µU/mL; I/R.- insulina-200µU/mL/rapamicina 0.1µU/mL . Las muestras se verificaron en un gel de agarosa 1% v/v en TAE 1X a 90v por 55 minutos.

En la Tabla 2 se muestran las medias y DE del cociente de la absorbancia a 260nm/280nm de tres muestras independientes. Se considera que para que la pureza de una muestra sea aceptable, el valor del cociente antes mencionado debe

ser de 2. En la Tabla 2 se observa que para todas las muestras de las distintas partes del eje embrionario de maíz y para todos los tratamientos, el valor de la relación es cercano a 2, por lo que la pureza del ARN de las muestras obtenidas fue aceptable.

Tabla 2. Relación de A_{260}/A_{280} de las muestras de ARN total y polisomal de las distintas partes del eje embrionario y los distintos tratamientos.

	ARN TOTAL*		ARN POLISOMAL*	
	PUREZA (Abs_{260}/Abs_{280})	± DE	PUREZA (Abs_{260}/Abs_{280})	± DE
<i>EJE COMPLETO</i>				
TESTIGO	2.1	0.2	2.0	0.1
INSULINA	1.9	0.2	1.9	0.2
INSU/RAPA	1.9	0.2	2.1	0.1
<i>RADICULA</i>				
TESTIGO	1.8	0.3	1.9	0.0
INSULINA	2.0	0.2	1.8	0.7
INSU/RAPA	2.0	0.2	1.9	0.0
<i>NODO</i>				
TESTIGO	2.0	0.2	2.1	0.3
INSULINA	2.0	0.3	2.1	0.2
INSU/RAPA	2.0	0.2	2.1	0.1
<i>COLEOPTILO</i>				
TESTIGO	1.9	0.2	2.0	0.2
INSULINA	2.1	0.3	2.0	0.2
INSU/RAPA	2.0	0.3	2.0	0.2

*n=3

En la Tabla 3 se muestran las medias y DE del rendimiento (expresado como μg de ARN/ gramo de peso fresco) del ARN total o polisomal en cada parte del eje

embrionario y en el eje completo de todos los tratamientos de tres muestras independientes.

Tabla 3.- Rendimientos de las muestras de ARN total y polisomal de las distintas partes y el eje completo de *Zea mays* L. tratado con distintos efectores.

	ARN TOTAL*		ARN POLISOMAL*	
	RENDIMIENTO (µg ARN por gr de peso fresco)	± DE	RENDIMIENTO (µg ARN por gr de peso fresco)	±DE
<i>EJE COMPLETO</i>				
TESTIGO	1397.8	551.7	145.2	15.3
INSULINA	1544.2	341.3	179.6	50.4
INSU/RAPA	1402.6	697.9	105.7	31.3
<i>RADICULA</i>				
TESTIGO	805.4	179.7	258.4	40.9
INSULINA	1181.9	698.1	254.5	21.3
INSU/RAPA	1417.5	145.8	58.9	34.1
<i>NODO</i>				
TESTIGO	1052.7	364.8	248.2	24.2
INSULINA	838.0	93.2	199.0	89.0
INSU/RAPA	964.4	36.3	188.4	94.2
<i>COLEÓPTILO</i>				
TESTIGO	3030.7	194	293.1	107.7
INSULINA	1976.2	465.4	159.9	76.1
INSU/RAPA	1376.9	318.7	169.2	87.0

*n= 3.

Se observa en general que el rendimiento del ARN polisomal es aproximadamente 10 veces menor que el del ARN total. No se observó un efecto significativo de los tratamientos (I ó I/R) en el rendimiento del ARN total o polisomal con respecto al testigo.

9.3) Estandarización de la RT-PCR.

Para estudios de RT-PCR semicuantitativo es necesario estandarizar la temperatura de alineamiento, el número de ciclos de amplificación y la cantidad de ARN. En el caso de los genes estudiados (prS6, prL3 y el factor elFiso4E) en estudios previos del grupo de trabajo en maíz, se había establecido la temperatura óptima de alineamiento y el número de ciclos (Dinkova. Comunicación personal). Por lo que solamente se estandarizó la cantidad de ARN para la mezcla de reacción.

En “Materiales y Métodos” se presentan las condiciones de temperatura, de alineamiento, número de ciclos y cantidad de ARN utilizadas para cada gen. A continuación se presentan la estandarización para el gen de normalización GADPH y prS6 como ejemplo de los experimentos realizados para este fin. Para determinar la temperatura de alineamiento óptima, se utilizó un termociclador de gradiente donde se probaron 3 diferentes temperaturas: 55, 58 y 60 °C. En todas las temperaturas se observó una sola banda bien definida (Datos no mostrados). Se eligió la temperatura de 58 °C para las pruebas de concentración debido a que varios de los genes de interés, tenían esa temperatura óptima de alineamiento. Posteriormente, se realizó una curva de concentración de ARN contra número de ciclos.

Los resultados se muestran en la Figura 16. En general se observa que hay un incremento lineal de la banda de amplificación con respecto al número de ciclos. Sin embargo la pendiente de la recta es menor a 1250 ng indicando que ésta concentración se encuentra cercana a la saturación, por lo que se seleccionó la concentración de 300 ng y 26 ciclos para la amplificación de este gen.

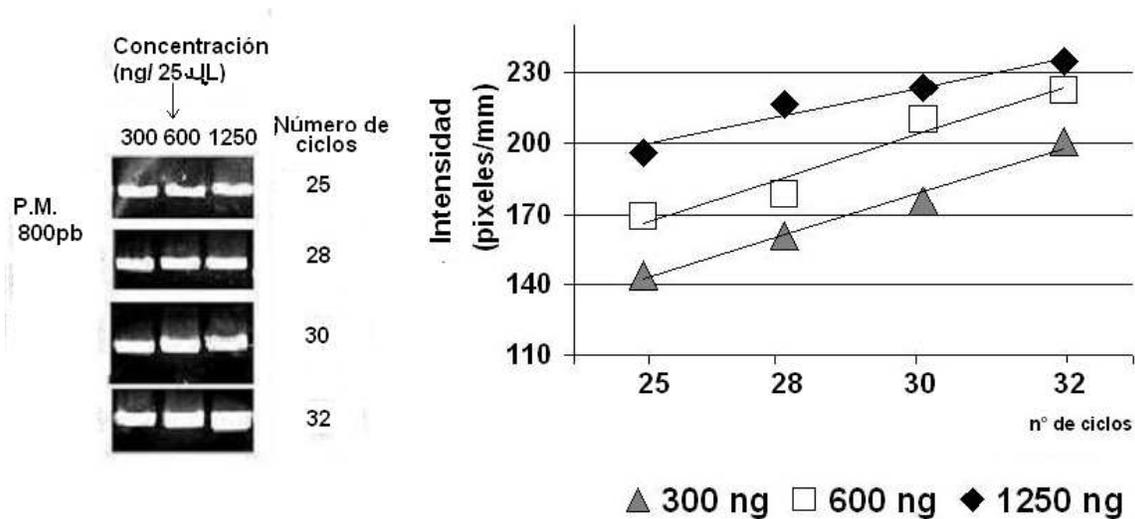


Figura 16. **Amplificación de GADPH con distintas concentraciones y diferente número de ciclos.** En la gráfica se presenta la recta de regresión lineal. Los valores de R^2 son 0.96, 0.92 y 0.98 para 300, 600 y 1250 ng, respectivamente.

Para la estandarización de la amplificación de prS6 se determinó la concentración adecuada de ARN total o polisomal. En la Figura 17 se muestran estos resultados. Para este ensayo se eliminó la concentración de 1250 ng ya que como se mencionó antes esta cercana a la saturación por lo que se analizó una concentración menor (150 ng). En la Figura 17 se observa que la intensidad de la banda de amplificación de prS6 es proporcional a la concentración. Se obtuvieron resultados similares para la prL3 y el factor elFiso4E. Con base en estos resultados se decidió utilizar 300ng de ARN para todas las muestras ya que se encuentran en la zona lineal de amplificación.

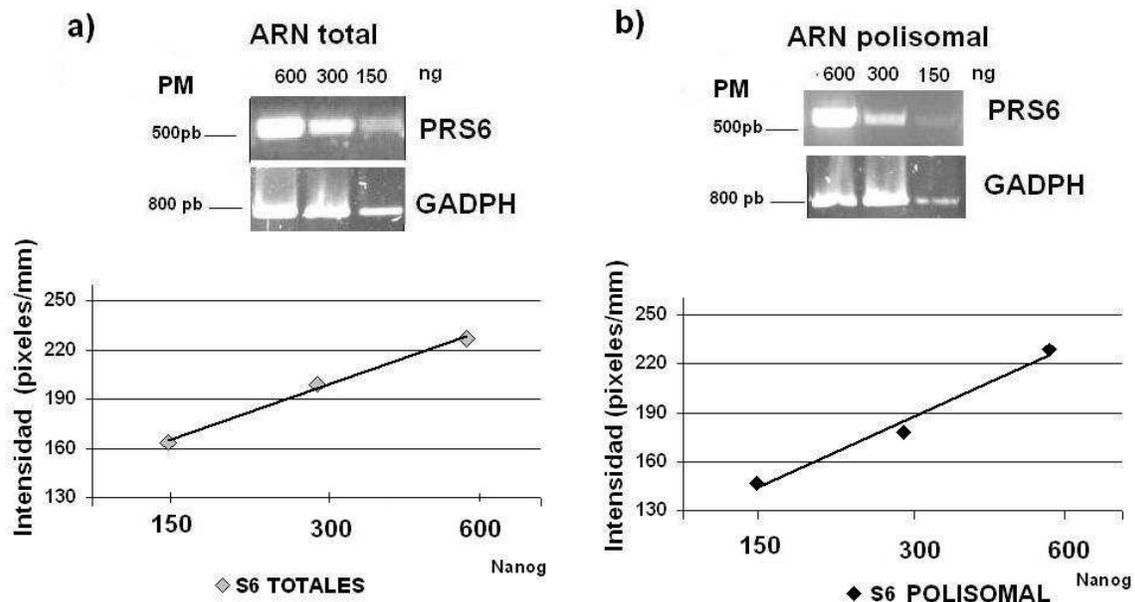


Figura 17.- **Amplificación de la prS6 a distintas concentraciones de ARN con una T de 60°C y 26 ciclos** a) ARN total b) ARNpolisomal. En la gráfica se presenta la recta de regresión lineal. Los valores de R^2 son 0.99 y 0.98 respectivamente.

Una vez estandarizadas las condiciones de la amplificación, se analizó la expresión de los genes estudiados en cada una de las partes del eje embrionario. Los resultados se muestran a continuación. Los valores de las gráficas en todos los casos corresponden a la expresión relativa del gen estudiado con respecto al gen de normalización en este caso (GADPH) de tres experimentos independientes para cada gen. Es importante indicar que a los valores de expresión relativa de los testigos se le asignó arbitrariamente un valor de 1; los valores de expresión graficados para los tratamientos se obtuvieron con respecto al testigo.

9.4) expresión de las proteínas ribosomales L3, S6 y el factor de traducción eIFiso4E en las diferentes partes del eje embrionario de maíz.

Expresión de la prL3.

La expresión de prL3 en las distintas partes del eje embrionario en el ARN total y polisomal en respuesta a los distintos tratamientos se presenta en las Figuras 18 a 21. En la Figura 18a se muestran los patrones de expresión de este gen en el ARN total de eje completo. Se puede observar que la insulina indujo una disminución significativa en los niveles de ARNm del gen prL3 presentes en el ARN total con respecto al testigo. No se observaron diferencias significativas en el tratamiento de I/R con respecto al testigo ni con respecto al tratamiento de insulina.

En la Figura 18b, se muestran los niveles del ARNm de este gen en el ARN polisomal del eje completo. No se observaron diferencias significativas en el reclutamiento de este transcrito en los polisomas, en los tratamientos con Insulina o Insulina/rapamicina con respecto al testigo. Lo que indica que no hay una regulación traduccional por insulina en la expresión de este gen en el eje embrionario completo.

En relación a los niveles de expresión de prL3 en el ARN total en las distintas partes del eje embrionario: radícula, nodo y coleóptilo (Figuras 19a, 20a y 21a) no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de Insulina ó Insulina/rapamicina con respecto al testigo. Lo anterior indica que la insulina no ejerce una regulación transcripcional en la expresión de este gen en las distintas partes del eje embrionario al tiempo de germinación estudiado.

Por otra parte, tampoco se encontró efecto de la Insulina ó de la mezcla Insulina/rapamicina en el reclutamiento en los polisomas del transcrito de prL3 en la radícula y el nodo (Figuras 19b y 20b), mientras que en el caso del coleóptilo se observó una disminución significativa del reclutamiento de este gen por efecto de la Insulina.

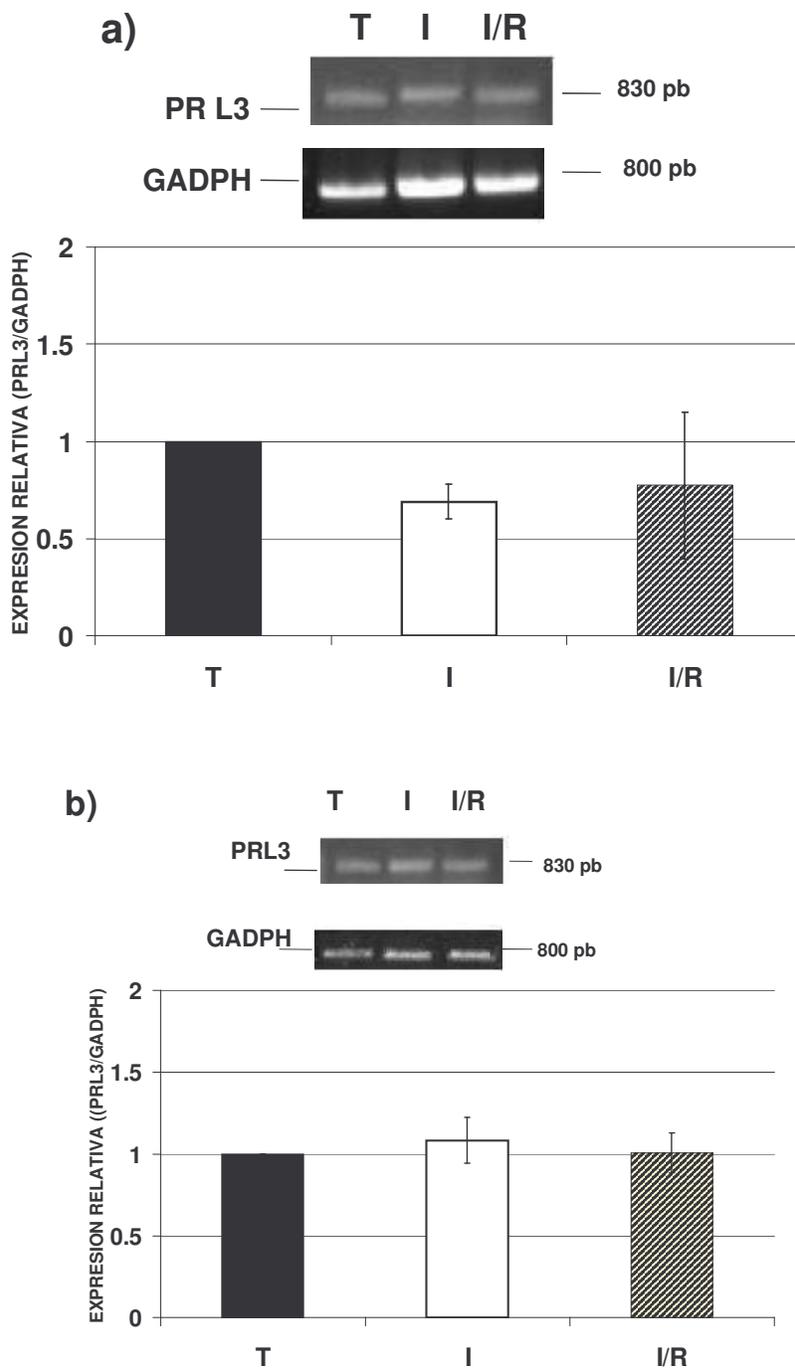


Figura 18.- **Expresión de la PRL3 en el eje completo**

a) ARN total; b) ARN polisomal. **T**., Testigo, **I**.-Insulina 200 μ U/mL; **I/R**.- Insulina200 μ U/mL rapamicina 0.1 μ M. n=3 repeticiones independientes.

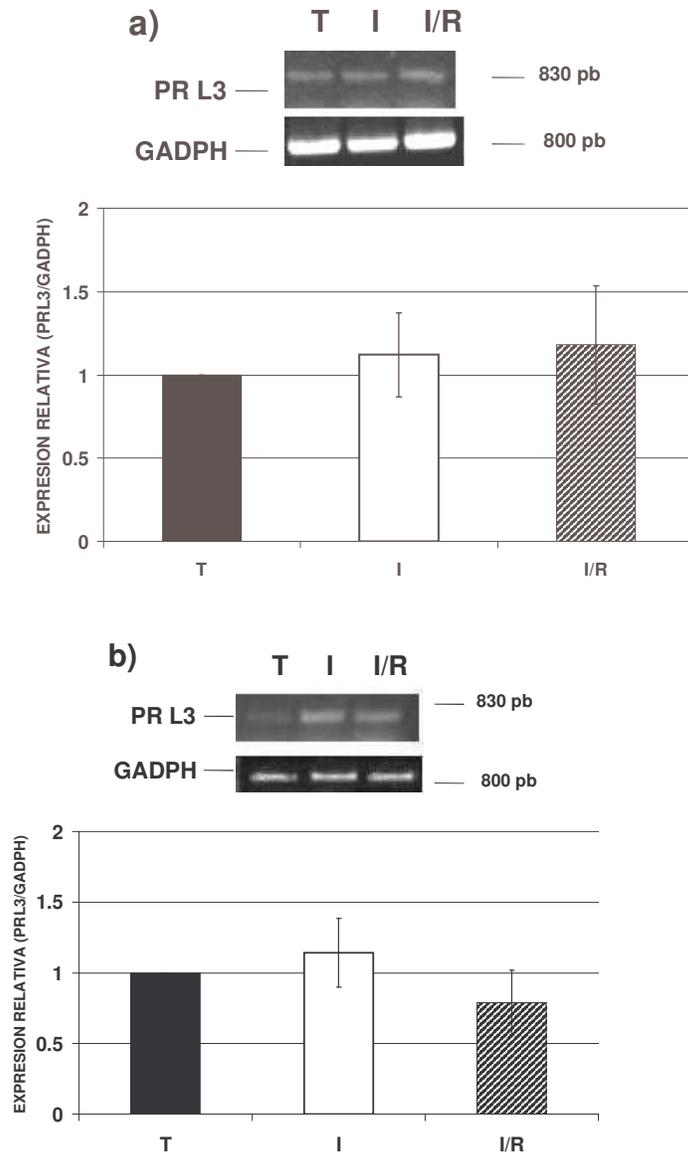


Figura 19.- **Expresión de la PRL3 en la radícula**

a) ARN total; b) ARN polisomal. T,. Testigo, I.-Insulina 200 μ U/mL; I/R.- Insulina200 μ U/mL rapamicina 0.1 μ M. n=3 repeticiones independientes.

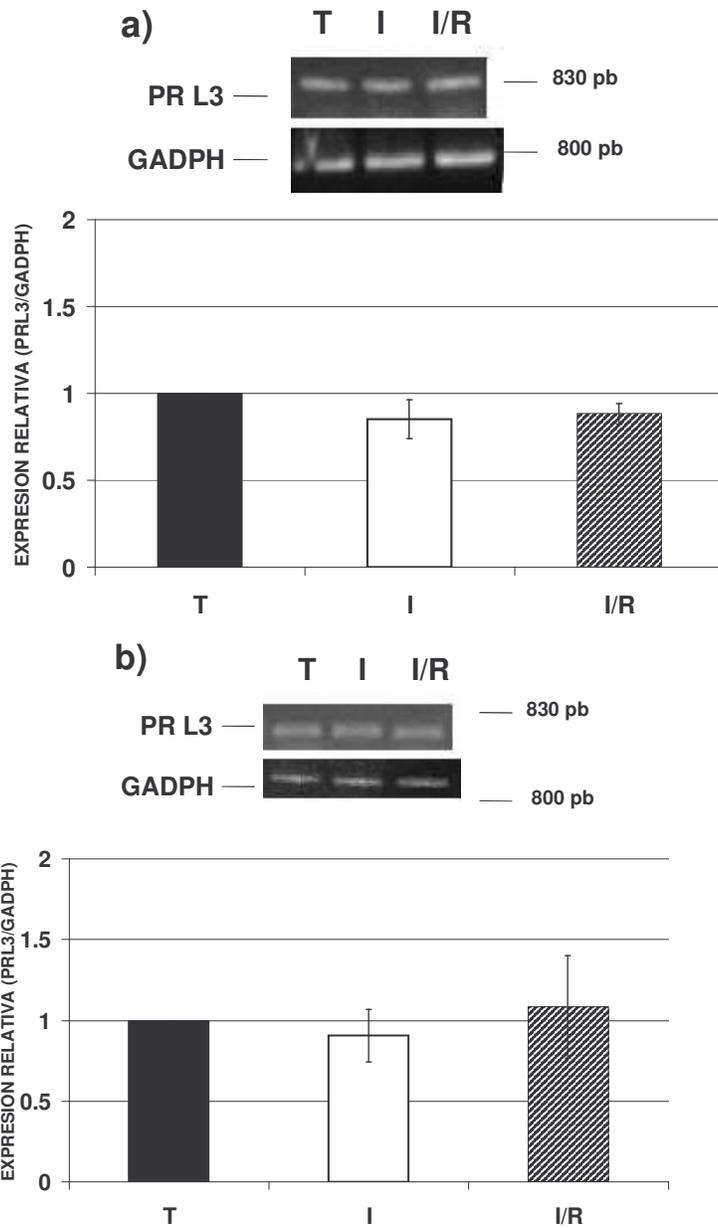


Figura 20.- **Expresión de la PRL3 en el nodo**

a) ARN total; b) ARN polisomal. T., Testigo, I.-Insulina 200µU/mL; I/R.- Insulina 200µU/mL rapamicina 0.1µM. n=3 repeticiones independientes.

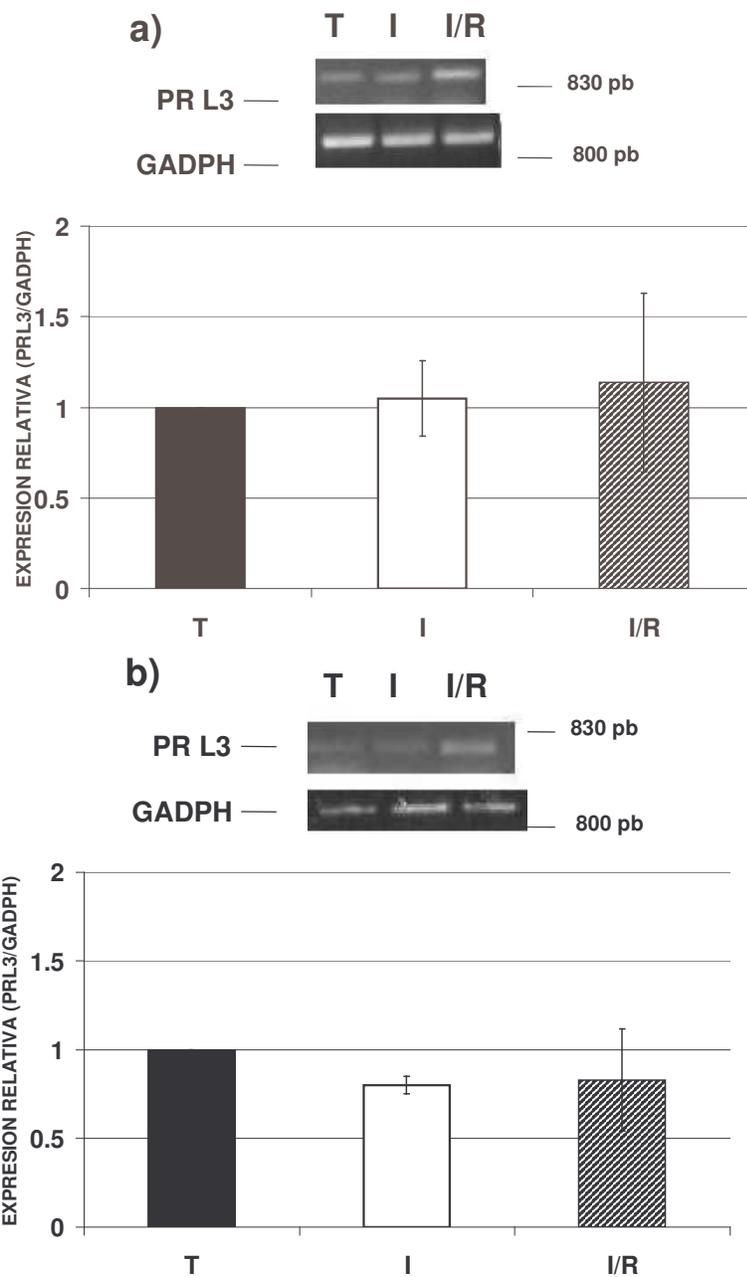


Figura 21.- **Expresión de PRL3 en el coleóptilo.**

a) ARN total; b) ARN polisomal. T., Testigo, I.-Insulina 200 μ U/mL; I/R.- Insulina200 μ U/mL rapamicina 0.1 μ M. n=3 repeticiones independientes.

Expresión de prS6.

La expresión en el ARN total y polisomal de la prS6 en el eje embrionario completo y sus diferentes partes se muestra en las Figuras 22 a 25.

En la Figura 22 se presenta la expresión de la prS6 en el eje embrionario completo de semillas de maíz. En la Figura 22a se observó que los niveles de transcritos de prS6, en el ARN total en respuesta a los tratamientos con Insulina ó Insulina/rapamicina mostraron una disminución significativa respecto al testigo. Asimismo, el tratamiento con Insulina no presentó diferencias significativas con respecto a Insulina/rapamicina. Lo anterior sugiere que la Insulina inhibe la transcripción de prS6 en el eje completo y este efecto no se revierte por rapamicina.

En la gráfica 22b se observa el efecto de los tratamientos Insulina ó Insulina/rapamicina sobre el reclutamiento en polisomas del ARNm de la prS6. La Insulina incrementó significativamente el reclutamiento del mensaje con respecto al testigo. Este efecto de insulina se revierte con rapamicina. Estos resultados demuestran que la insulina regula la traducción a la prS6 en el eje completo.

En la Figura 23 se muestra la expresión en el ARN total y polisomal de la prS6 en la radícula de ejes embrionarios de maíz. En la Figura 23a se observa que ninguno de los tratamientos (Insulina ó Insulina/rapamicina) modificó significativamente la expresión del ARNm de la prS6 en el ARN total. Esto indica que la insulina no regula transcripcionalmente a la prS6 en la radícula.

La Figura 23b muestra la expresión del gen de prS6 en el ARN polisomal de la radícula. Se puede observar que la Insulina incrementó significativamente el reclutamiento de este mensaje en los polisomas con respecto al testigo. Este efecto de insulina se revierte por rapamicina. Estos resultados indican que la insulina tiene un efecto de regulación traduccional sobre la expresión de la prS6 en la radícula. El

efecto de la Insulina observado en el eje completo se debe principalmente a su efecto en la radícula.

En las Figuras 24 y 25 se observa la expresión de la prS6 en el ARN total y polisomal del nodo y el coleóptilo de ejes de maíz tratados con Insulina ó Insulina/rapamicina. En las Figuras 24a y 25a se observa la Insulina no modificó significativamente los niveles del ARNm de la prS6 en el ARN total en el nodo y en el coleóptilo, respectivamente. Estos resultados indican que en dichas partes del eje embrionario la Insulina no regula la transcripción de la prS6.

En las Figura 24b y 25b, se muestran los niveles del ARNm de prS6 en el ARN polisomal. Los tratamientos con Insulina ó Insulina/rapamicina no modificaron significativamente el reclutamiento del mensaje de prS6 en los polisomas. Estos resultados indican que la insulina no regula la traducción de prS6 en el nodo o el coleóptilo de ejes embrionarios de maíz.

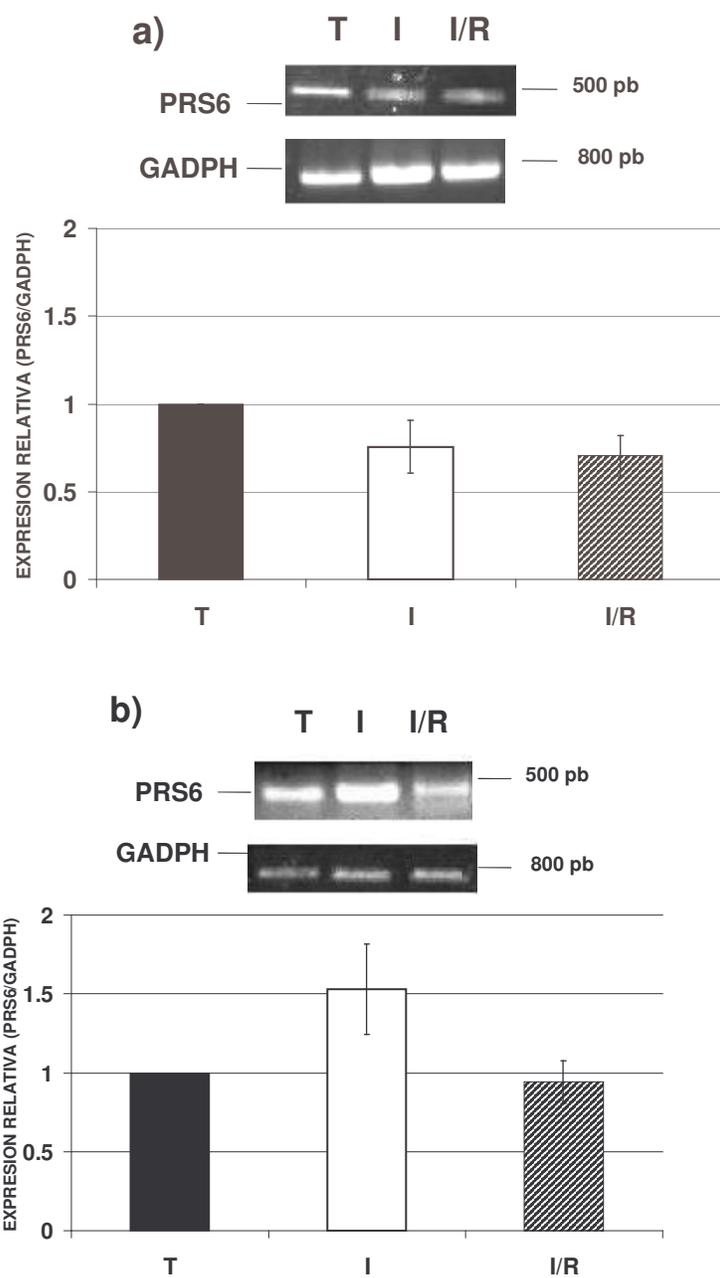


Figura 22.- **Expresión de la prS6 en el eje completo.**

a) ARN total; b) ARN polisomal. T,. Testigo, I.-Insulina 200 μ U/mL; I/R.- Insulina200 μ U/mL rapamicina 0.1 μ M. n=3 repeticiones independientes.

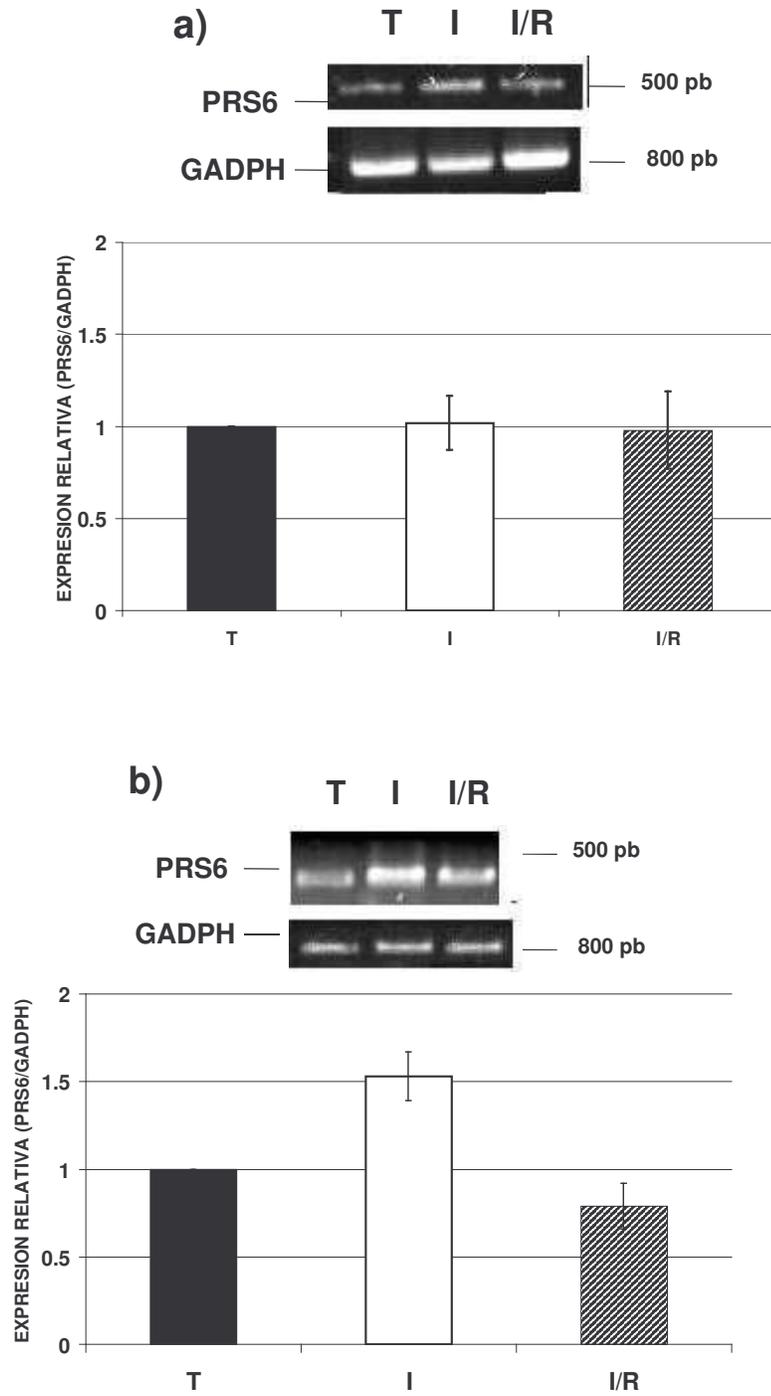


Figura 23.- **Expresión de la prS6 en la radícula**

a) ARN total; b) ARN polisomal. T,. Testigo, I.-Insulina 200 μ U/mL; I/R.- Insulina200 μ U/mL rapamicina 0.1 μ M. n=3 repeticiones independientes.

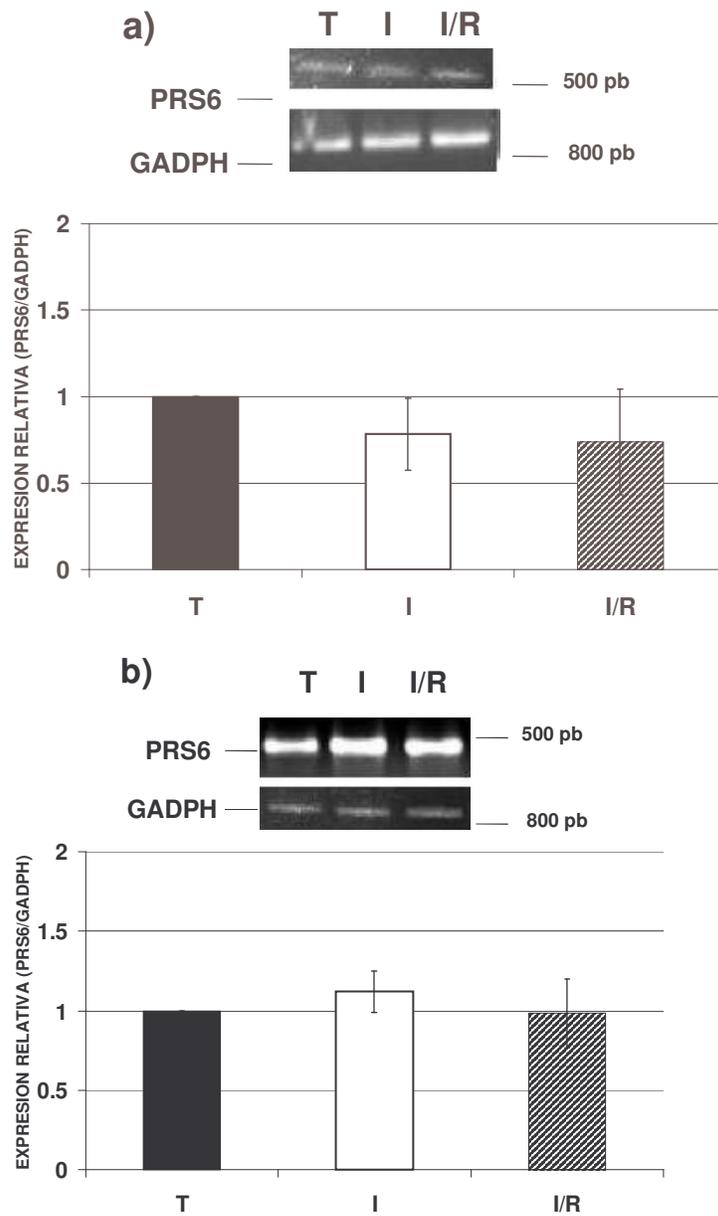


Figura 24.- **Expresión de la prS6 en el nodo**

a) ARN total; b) ARN polisomal. T,. Testigo, I.-Insulina 200 μ U/mL; I/R.- Insulina200 μ U/mL rapamicina 0.1 μ M. n=3 repeticiones independientes.

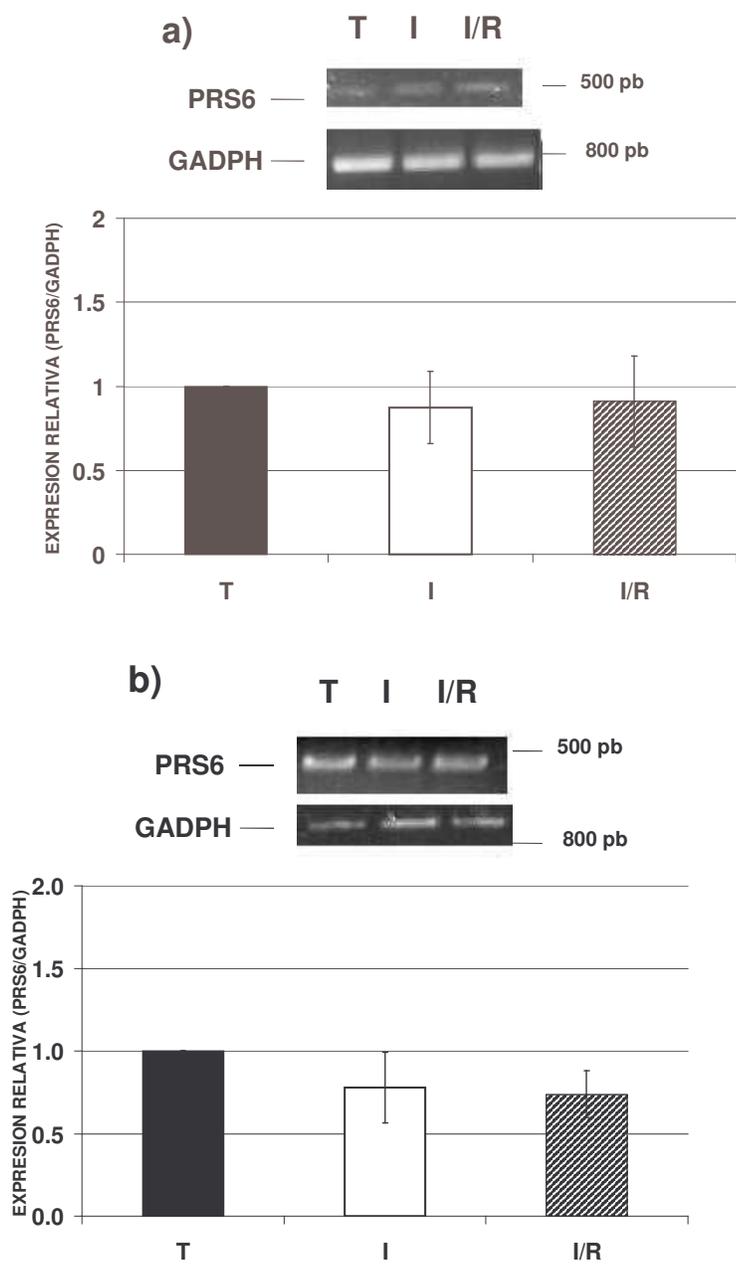


Figura 25.- **Expresión de prS6 en el coleóptilo.**

a) ARN total; b) ARN polisomal. T., Testigo, I.-Insulina 200 μ U/mL; I/R.- Insulina200 μ U/mL rapamicina 0.1 μ M. n=3 repeticiones independientes.

Expresión de eIFiso4E.

Las Figuras 26 a 29 muestran la expresión del eIFiso4E en respuesta a Insulina ó Insulina/rapamicina en el eje embrionario completo de maíz y sus diferentes partes.

En la Figura 26 se muestra la expresión de eIFiso4E en el eje embrionario completo. Se puede observar que no hubo modificaciones significativas en los niveles del ARNm de eIFiso4E en el ARN total, en respuesta a Insulina ó Insulina/rapamicina, con respecto al testigo (Figura 26a). En cambio, se observó que la Insulina incrementó significativamente el reclutamiento de este mensaje en el ARN polisomal con respecto al testigo (Figura 26b). También se muestra que el tratamiento con Insulina/rapamicina disminuyó significativamente el reclutamiento de este mensaje en los polisomas. Los resultados anteriores indican que en el eje embrionario completo, la Insulina regula la traducción del gen de eIFiso4E y dicho efecto se revierte por la rapamicina.

En la Figura 27 se muestra la expresión de eIFiso4E en la radícula de ejes embrionarios de maíz. Se observa que el tratamiento con Insulina ó Insulina/rapamicina no cambió significativamente los niveles de ARNm en el ARN total con respecto al testigo (Figura 27a). Esto indica que en caso del eIFiso4E la insulina no regula la transcripción del mensaje.

En la Figura 27 b se muestra que en presencia de Insulina incrementó significativamente el reclutamiento del ARNm del eIFiso4E en los polisomas con respecto al testigo y el tratamiento con Insulina/rapamicina disminuyó significativamente dicho reclutamiento. Estos resultados indican que la Insulina regula la traducción del mensaje del eIFiso4E en las radículas de ejes embrionarios de maíz.

En las Figuras 28 y 29 se muestra el efecto de los tratamientos con Insulina ó Insulina/rapamicina en la expresión del eFiso4E, en el nodo y el coleóptilo de ejes embrionarios de maíz.

En la Figura 28a se observa que el tratamiento con Insulina ó Insulina/rapamicina no modificó significativamente los niveles del ARNm de dicho gen en el ARN total con respecto al testigo. Lo que indica que la transcripción de eFiso4E no está regulada por insulina en el nodo del eje embrionario de maíz.

El reclutamiento del ARNm del eFiso4E en polisomas en respuesta a Insulina ó Insulina/rapamicina tampoco muestra modificaciones significativas con respecto al testigo en el nodo (Figura 28b). Lo anterior indica que el eFiso4E no está regulado a nivel traduccional en el nodo de los ejes embrionarios de maíz.

Finalmente, se analizó la expresión del eFiso4E en el coleóptilo de ejes embrionarios de maíz en germinación. En la Figura 29a se muestran los niveles de expresión del ARNm de dicho factor en el ARN total, no se observaron diferencias significativas en los tratamientos con Insulina ó Insulina/rapamicina con respecto al testigo. Asimismo, se puede observar que ocurre algo similar en el ARN polisomal (Figura 29b). Es decir no se encontraron diferencias significativas en el reclutamiento del ARNm en polisomas, en respuesta a Insulina con respecto al testigo ni en el tratamiento con Insulina/rapamicina. Estos resultados indican que la Insulina no participa en la regulación transcripcional o traduccional del eFiso4E en el coleóptilo de ejes embrionarios de maíz.

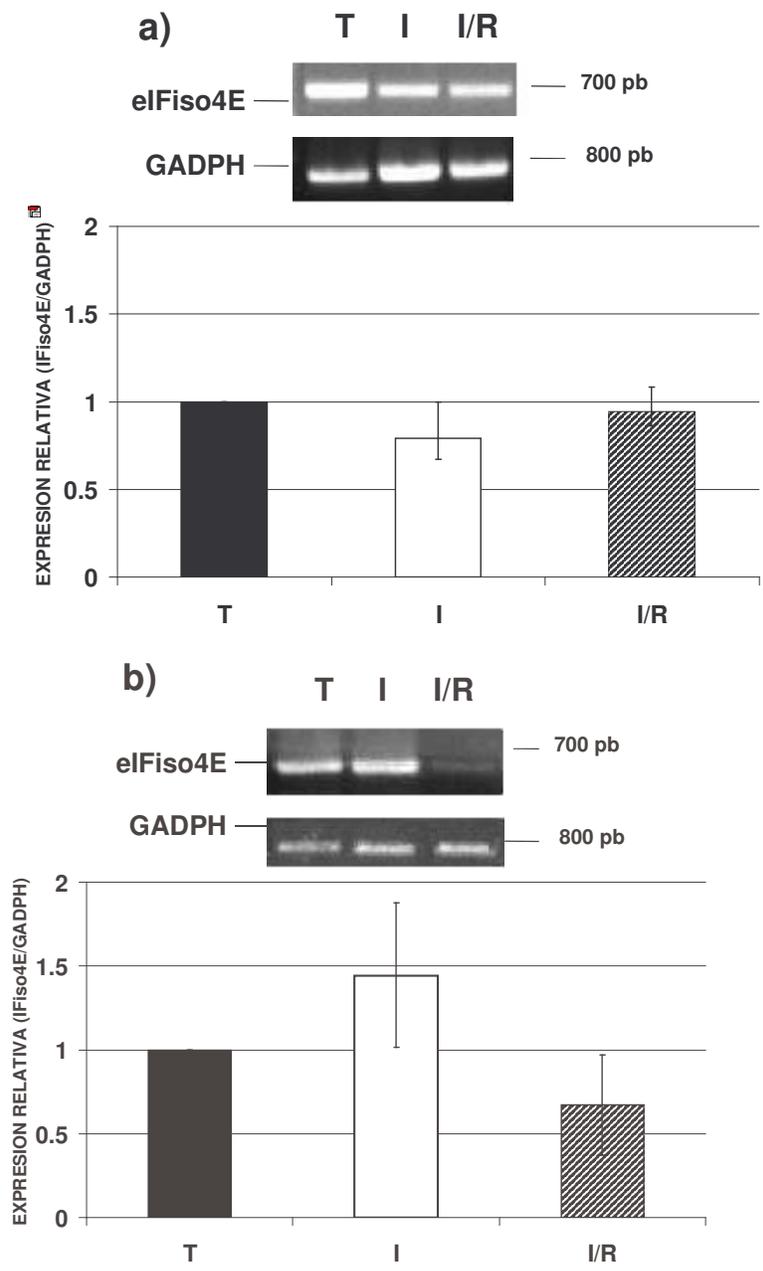


Figura 26.- **Expresión de eIFiso4E en el eje completo.**

a) ARN total; b) ARN polisomal. T,. Testigo, I.-Insulina 200µU/mL; I/R.- Insulina200µU/mL rapamicina 0.1µM. n=3 repeticiones independientes.

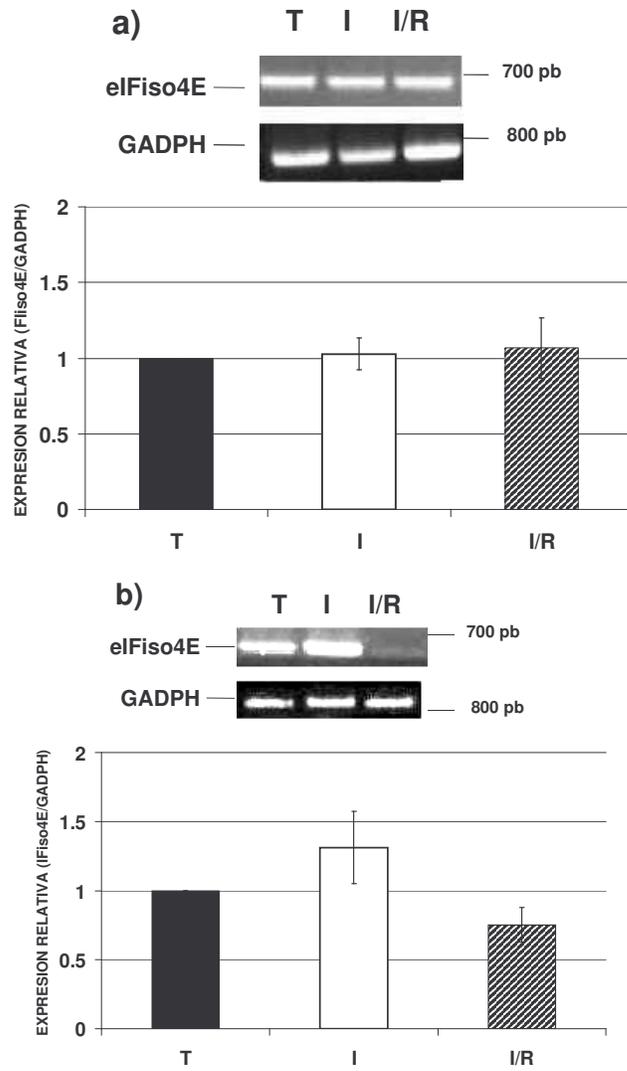


Figura 27.- **Expresión de eFiso4E en la radícula**

a) ARN total; b) ARN polisomal. **T**.- Testigo, **I**.-Insulina 200 μ U/mL; **I/R**.- Insulina200 μ U/mL rapamicina 0.1 μ M. n=3 repeticiones independientes.

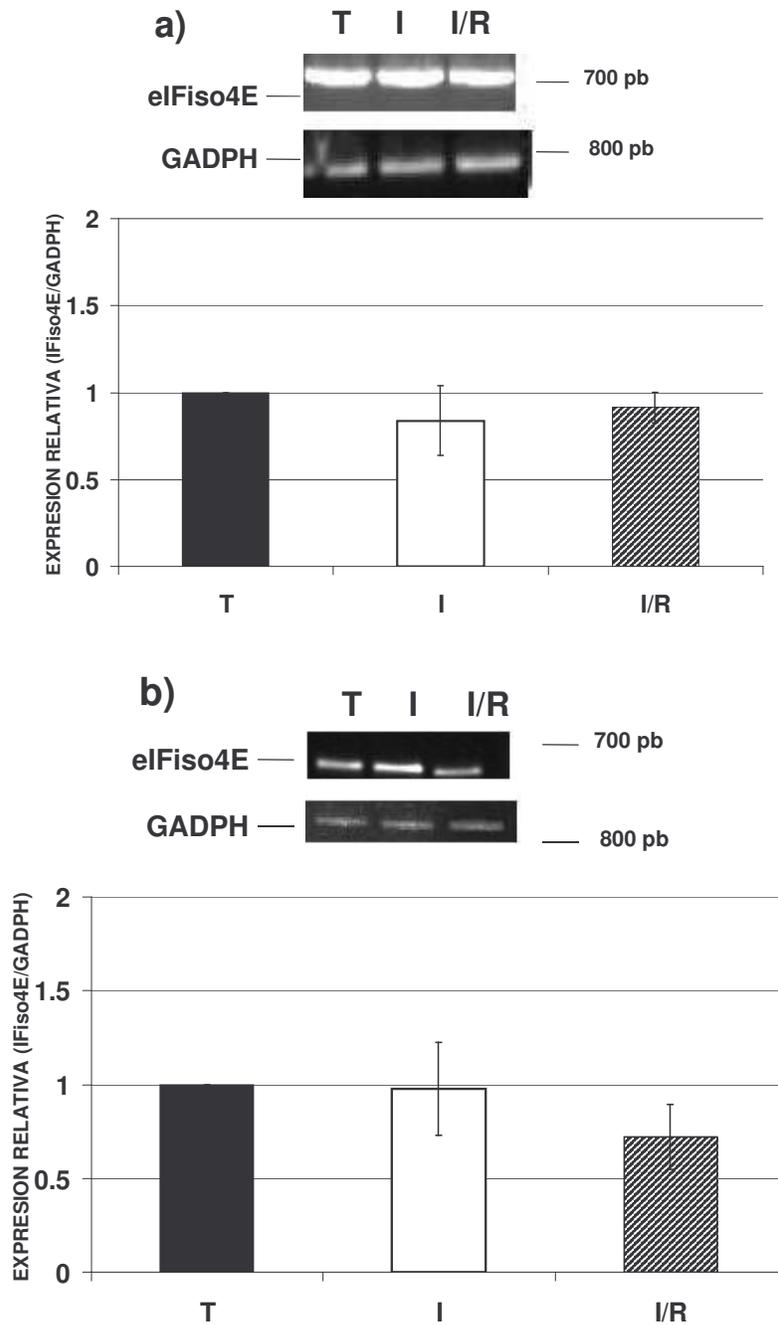


Figura 28.- **Expresión de eiFiso4E en el nodo.**

a) ARN total; b) ARN polisomal. T,. Testigo, I.-Insulina 200 μ U/mL; I/R.- Insulina200 μ U/mL rapamicina 0.1 μ M. n=3 repeticiones independientes.

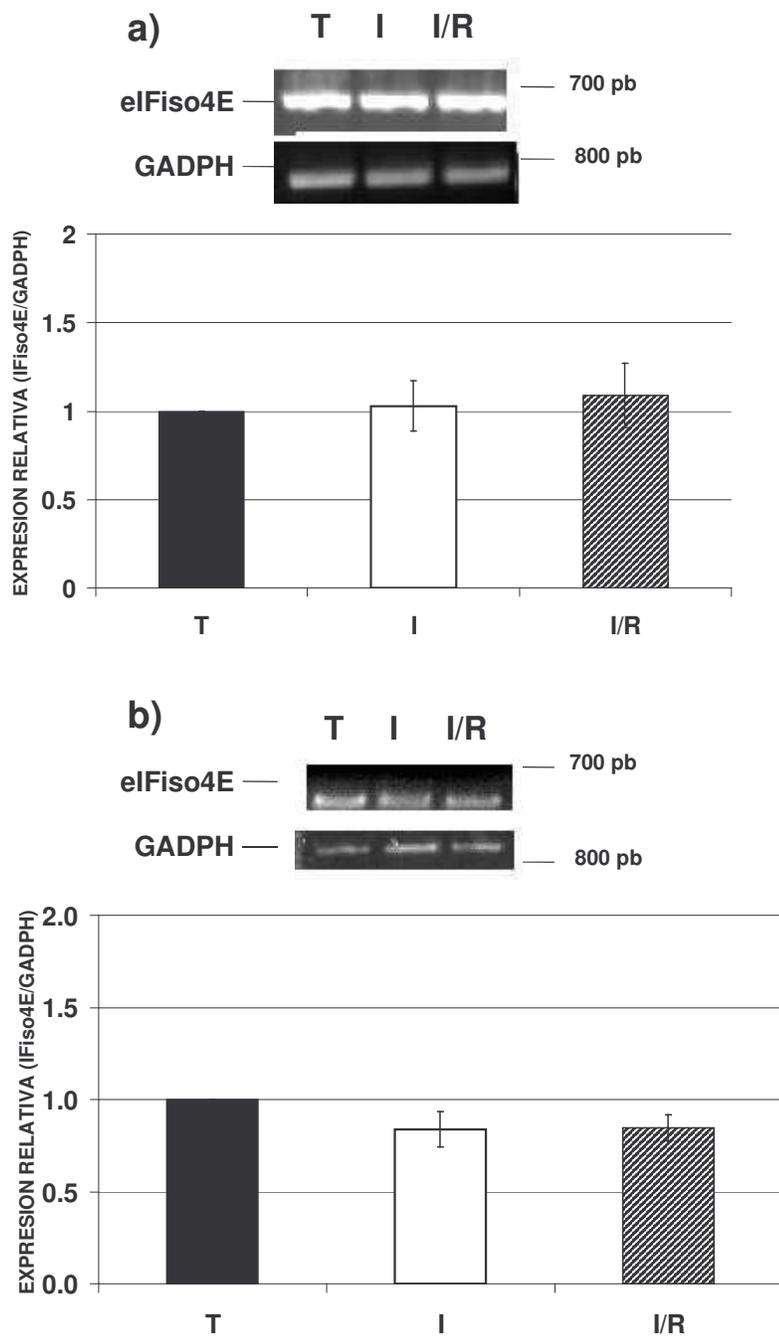


Figura 29.- **Expresión de eIFiso4E en el coleóptilo.**

a) ARN total; b) ARN polisomal. T., Testigo, I.-Insulina 200μU/mL; I/R.- Insulina200μU/mL rapamicina 0.1μM. n=3 repeticiones independientes.

10) DISCUSIÓN.

Durante la germinación el metabolismo de la semilla se reactiva reiniciándose el crecimiento. En estudios previos del grupo de trabajo se reportó que la Insulina estimula la germinación y el crecimiento de ejes embrionarios de maíz. Asimismo se aisló un factor semejante a insulina ZmIGF de estos tejidos (García Flores y cols., 2001). Recientemente se encontró que el efecto de la insulina en maíz es tejido específico (Paz –Lemus, 2005; Buentello, 2006). Existen diversas evidencias de que la expresión de las PR puede estar controlada a nivel transcripcional y postranscripcional (Van-Lijsebettens y cols., 1994; Beltrán Peña y cols., 1995; William y Sussex, 1995; Revenkova y cols., 1999; Szick-Miranda y Bailey-Serres, 2001).

En este trabajo se analizó el efecto de la Insulina sobre la regulación de genes de la maquinaria traduccional (prS6, prL3 y el eIFiso4E) en los principales tejidos que forman el eje embrionario de maíz: la radícula, el nodo, el coleóptilo y se comparó con su efecto en el eje embrionario completo.

Se abordó el estudio de la regulación de estos genes debido a que en resultados previos de nuestro grupo de trabajo se encontró que la insulina induce la síntesis preferencial de proteínas ribosomales y factores de traducción en ejes embrionarios completos de maíz por una vía de señalización semejante a la reportada en animales. En este sentido se han identificado en maíz algunos de los intermediarios de esta vía entre ellos TOR, la ZmS6K y la fosforilación de S6.

En este trabajo se corroboró el incremento reportado previamente en la traducción de prS6 y eIFiso4E en respuesta a insulina en los ejes completos, como resultado del reclutamiento preferencial de estos mensajes en los polisomas (Dinkova y cols., 2000). El efecto observado en el eje completo se debe a la inducción del reclutamiento de estos mensajes en los polisomas en la radícula. Este efecto parece estar mediado por TOR ya que se revierte en presencia del inhibidor rapamicina.

No se observó ningún efecto de la insulina en la regulación de la traducción de estos genes en el coleóptilo y el nodo. Asimismo, no se encontró un efecto de la insulina en los niveles de los transcritos del mensaje de eIFiso4E en el ARN total, ni en el eje completo ni en las distintas partes del eje embrionario estudiadas. Sin embargo, se observó una disminución significativa de los mensajes de prL3 y prS6 en el ARN total del eje completo, este efecto no se revierte por rapamicina.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la regulación de la expresión de las proteínas ribosomales estudiadas no están completamente coordinadas. Al respecto se ha reportado en estudios en levaduras que la expresión de la prL3 está desacoplada de la expresión coordinada de otras proteínas ribosomales, en este caso de la expresión de prS6 (Popescu y Tumer, 2004). En este sentido, a pesar de que las PR's de eucariontes se encuentran altamente conservadas, en los ribosomas de plantas como *Arabidopsis* pueden diferir como consecuencia de modificaciones postraduccionales y/o por variaciones en la composición de las PR's con distintas características bioquímicas en los ribosomas. En este sentido es importante mencionar que el mensajero de la prS6 en maíz, presenta la secuencia 5'TOP, mientras que los reportes en plantas y animales no incluyen a la prL3 en esta categoría.

La heterogeneidad de los ribosomas se ha descrito como diferencias en la composición de proteínas, de los componentes del ARN polisomal o por modificaciones postraduccionales. Hay diversos ejemplos de heterogeneidad de PR's en diversos eucariontes dependiendo de la etapa del desarrollo. En plantas se han descrito cambios cuantitativos en la composición de PR's durante el enverdecimiento (Koyama y cols., 1996). La existencia de familias multigénicas que codifican para PR reguladas diferencialmente contribuye también a la posibilidad de la heterogeneidad ribosomal. En este sentido Barakat y cols. (2001), observaron que la frecuencia de EST's para diferentes miembros de familias de genes de PR es variable y se regulan de manera tejido específica. En 2001 Szick-Miranda y Bailey-Serres también demostraron heterogeneidad en las PR del tipo P2 en ribosomas de maíz reguladas

en distintos órganos y a nivel subcelular durante el desarrollo y en respuesta a condiciones ambientales. Estos resultados abren la posibilidad de que esta heterogeneidad en la composición de los ribosomas ocurra a nivel tejido específico y contribuya a una regulación fina de la regulación traduccional en respuesta a estímulos específicos y durante el desarrollo de las plantas.

Recientemente se ha descrito la inmunopurificación de complejos polisomales de *Arabidopsis*. La inmunopurificación de los ribosomas de tipos celulares específicos o que posean PR específicas contribuirá a entender el significado funcional de la heterogeneidad de los ribosomas durante el desarrollo de la planta o en respuesta a distintos efectores o condiciones ambientales (Zanetti y cols., 2005). Además existen reportes en animales que muestran que algunas PR's tienen una doble función, por un lado estabilizan al ribosoma y participan en el control traduccional, por ejemplo, estudios realizados en líneas celulares de reticulocitos, muestran que en presencia del interferon- γ , la PR's L13a es fosforilada y se separa de la subunidad 60S, una vez libres pueden unirse a los elementos reguladores en 3'-UTR y silenciar la traducción de genes (Mazmuder, 2003).

Se considera que la respuesta tejido-específica observada en este estudio, está relacionada con las características fisiológicas de cada una de las partes del eje embrionario analizadas. Estudios previos apoyan esta conclusión. En estos estudios se observó que la insulina incrementa el crecimiento, la síntesis de proteínas ribosomales y de ADN en la radícula, mientras que estos efectos no se observaron en el coleóptilo (Paz-Lemus, 2005). Estos resultados sugieren que la raíz es uno de los primeros tejidos que entran en división celular durante el crecimiento de ejes embrionarios de semillas en germinación; mientras que el coleóptilo crece principalmente por alargamiento. Lo anterior sugiere también que en esta etapa del desarrollo cada parte del eje embrionario responde de manera distinta al mismo efector.

11) CONCLUSIONES .

El efecto de insulina en la regulación de la expresión de genes de la maquinaria traduccional en ejes embrionarios de maíz es tejido específico.

La insulina ejerce un efecto de regulación traduccional sobre la expresión de la prS6 y el factor eIFiso4E por el mecanismo de reclutamiento preferente de estos mensajes en los polisomas de ejes embrionarios completos de maíz.

El efecto observado en la regulación traduccional en el eje completo se debe a la inducción en la radícula.

La regulación traduccional por insulina es mediada por TOR ya que se revierte en presencia del inhibidor rapamicina.

La insulina no afecta la transcripción del factor eIFiso4E en ninguna de las partes del eje embrionario, aunque disminuye ligera pero significativamente los niveles de transcrito de prL3 y prS6 en el ARN total en el eje completo.

La insulina no afecta de la misma forma la expresión de los genes de la maquinaria traduccional analizados en el presente estudio, lo que implicaría una heterogeneidad en la regulación de la biogénesis de los ribosomas.

12) PERSPECTIVAS.

Es necesario observar el efecto de insulina sobre ejes embrionarios de maíz durante el desarrollo para determinar si a tiempo posteriores el nodo y el coleóptilo se comportan de manera similar a la radícula con respecto a prS6 y el eIFiso4E.

Es necesario también incluir otros fitoreguladores del crecimiento ya que se ha observado que las rutas de señalización pueden variar.

Finalmente considerando que la insulina acelera el crecimiento de la radícula sería interesante estudiar su efecto sobre mensajes que se relacionen con el ciclo celular.

12) REFERENCIAS.

Aguilar, R., Reynoso E., Albores, M., Sánchez de Jiménez, E. 1992. Protein síntesis alterations in axes from long-term stored maize sedes. *Seed Sciences Research*. 94:71-79.

Averous, J. and Proud, C.G., 2006. When translation meets transformation: the mTOR story. *Oncogene* .25, 6423–6435

Baíza, A.M & Sánchez de Jiménez. 1989. Effect of the auxin, 2, (2 methyl-4-chloro phemoxy) propionic acid, on the cell cycle regulation in maize embryonic tissues. *Physiologia Plantarum*. 75: 261-266.

Baíza A.M. 1995. Efecto de una auxina sintética en la división celular de maíz durante la germinación. Tesis de Doctorado. UNAM. D.F. México.

Barakat, A., Szick-Miranda, K., Chang, I-F., Guyot, R., Blanc, G. Cooke, R. Delseny, M. & Bailey-Serres, J. 2001. The organization of cytoplasmic ribosomal protein genes in the Arabidopsis genome. *Plant Physiology*. 127: 398-415.

Barthel, A., Schmoll, D., Unterman, T.G. 2005. FoxO proteins in insulin action and metabolism. *Trends Endocrinology. Metabolism*. 16: 183-189.

Barroso, I., Santisteban, P. 1999. Insulin induces early growth response gene (Egr-1) mediates a short term repression of rat malic enzyme gene transcription. *The Journal Of Biological Chemistry*. 274:17997-18004.

Beltrán-Peña, E.M. G. 1997. Expresión genética de las proteínas ribosomales durante la germinación en maíz. Tesis de Doctorado. UNAM. D.F. México.

Bailey-Serres, J. 1998. Cytoplasmic ribosomes of higher plants. *In A look beyond transcription. Mechanisms Determining mRNA Stability and translation in Plants.* Ed. Julia Bailey-Serres and Daniel R. Gaille. American Society of Plant Physiologist. Capital Press. USA

Browning, K., Goss, D., Roth, D.A., Gallie, D.R. 1998. Cytoplasmic ribosomes of higher plants. *In A look beyond transcription. Mechanisms Determining mRNA Stability and translation in Plants.* Eds. Julia Bailey-Serres and Daniel R. Gaille. American Society of Plant Physiologist. Capital Press. USA

Bailey-Serres, J. 1999. Selective translation of cytoplasmic mRNA's in plants. *Trends in Plant Science.* 4: 142-148.

Bewley JD, Black M. 1994 Seed Physiology of development and Germination. Plenum Press, Nueva York, London.

Bewley, D.J. 1997. Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell.* 9: 1055-1066.

Botha, F.C., Potgieter, G.P., and Botha, A.M. 1992. Respiratory metabolism and gene expression during seed germination. *Journal Plant Growth Regulation.* 11: 211-224.

Buentello; V.B. 2006. Tesis de Doctorado. Comunicación personal.

Carberry, S.E., Darzynkiewicz, E., Goss, D. J. 1991. A comparision of the binding of methylated caps analogues to wheat germ protein synthesis initiation factors 4F and (iso)4F. *Biochemistry.* 30: 1624-1627.

Chakravarty, K., Wu, S.Y., Chiang, C.M. Samols, D., Hanson, R.W. 2004. SREBP-1c and Sp1 interact to regulate transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in the liver. *The Journal of Biological Chemistry.* 279: 15385-15395.

Collier, E., Watkinson, A., Cleland, C.F., Roth, Jess. 1987. Partial purification and characterization of an insulin-like material from spinach and *Lemna gibba* G3. *The Journal of Biochemical Chemistry*. 262: 6238-6247.

Crowe, J.H., and Crowe, I.M. 1992. membrane integrity in anhydrobiotic organism: Toward a mechanism for stabilizing dry seeds. *In Water and Life*, eds. G.N. Somero, C.B. Osmond and C.L. Bolis Berlin, Springer-Verlag, pp.87-103.

De Jager SM, Maughan S, Dewitte W, Scofield S, Murray JA. 2005 The developmental context of cell-cycle control in plants. *Semanarium Cell Development and Biology*. 16:385-96.

Dinkova, T.D., Aguilar, R., Sánchez de Jiménez, E. 2000 a. Expresión of maize eukaryotic initiation factor (eIF) isoelF4E is regulated at the translational level. *The Journal Biochemical Society*. 351: 825-831.

Dinkova T.D. 2000 b. "Regulación de la expresión y actividad de Iso factores de iniciación de la traducción eIF4E y eIFiso4E durante la germinación en maíz" Tesis de Doctorado. Fac de Química. UNAM. D.F. México.

Dommes, J., & Van De Waalle, C. 1990. Polysome formation and incorporation of new ribosomes in to polysomes during germination of the embrionic axes of maize. *Physiologia Plantarum*. 79:289-296.

Duncan, R. & McConkey, E.H. 1982. preferential utilization of phosphorylated 40S ribosomal subunits during initiation complex formation. *European Journal Biochemistry* 3: 535-538.

Eberle, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferre, P. & Fougelle, F. 2004. SREBP transcription factors: master regulators of lipids homeostasis. *Biochemie*. 86:839-948.

Eckardt, N.A. (2005) MicroRNAs regulate auxin homeostasis and plant development. *The Plant Cell* 17: 1335-1338.

Ferrari, S., Thomas, G., 1994. S6 phosphorylation and the p70^{S6K}/p85^{S6K}. *Critical Review of Biochemistry and Molecular*. 29:385-413.

García Flores, C. 2002. Aislamiento y caracterización de una proteína semejante a insulina, presente en tejidos de maíz y su relevancia en la germinación y el desarrollo. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias. UNAM. México D.F. México.

García Flores, C., Aguilar, R., Reyes de la Cruz, H., Albores, M., y Sánchez de Jiménez, E.1 2001. A maize insulin-like growth factor signals to a transduction pathway that regulates protein synthesis in maize. *Journal of Biochemistry*. 358: 95-100.

Green R., and Noller, H. 1997. Ribosomes and translation. *Annual Review of Biochemistry*. 66: 679–716.

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

Harrington, L.S., Findlay, G.M., Lamb, R.F. 2005. Restaining PI3K: mTOR signalling goes back to the membrane. *Trends in Biochemical Sciences*. 30: 35-41.G

Harold, B., Jefferies, J., Thomas G. 2000. Ribosomal protein S6 phosphorylation and signal transduction. *In* Translational control. Eds Hersey.

Ito, T., Kim, G-T. & Shinosaki, K . 2000. Disruption of an Arabidopsis cytoplasmic ribosomal protein S13-homologous gene by trasposon-mediated mutagenesis caused aberrant growth and development. *The Plant Journal*. 22: 257-264.

Jefferies, H.B.J., Reinhard, C., Kozma, S.C. and Thomas, G. (1994) Rapamycin selectively represses translation of the "polypyrimidine tract" mRNA family. *Proceeding of the National Academic Sciences*. 91: 4441-4445.

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

Karp, G. 2000. Biología celular y molecular. Mc Graw-Hill. D.F. México. 472-480.

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

Klein, D. J., Moore P. B., and Steitz T. A. 2004. Assembly, and Evolution of the Large Ribosomal Subunit. *Journal Molecular Biology* 340: 141–177.

Koyama,K., Wada, A, Maki, Y., & Tanaka, A. 1996. Changes in the protein composition of cytoplasmic ribosomes during the greening of etiolates barley leaves. *Physiologia Plantarum*. 96:85-90.

Mathews, Holde y Ahern, C. K., VanHolde, K. y Ahern, K.G. 2002 .The Roles of Ribosomal Proteins in the Structure. *In Bioquímica*. 3aEd. Addison Westl Ahern, MB and Sonenberg N. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.

Mazumder, B., Sampath, P., Seshadri, V.,Maitra, R, DiCorleto, P & Fox, P. 2003. Regulated release of L13a from the 60S ribosomal sununit as a mechanism of transcript specific translational control. *Cell*. 105:187-198.

McKinnon, c.M., Ravier, M.A., Rutter, G.A. 2006. FoxO1 is required for the regulati6n of preproglucagon gene expression by insulin in pancreatic α -(TC1-9)cells. *Journal of Biochemical Chemistry*. In Press. M605022200.

Merrick, W.C. and Hershey, J.W.B. 1996. The pathway and mechanism of eukaryotic protein synthesis. *In*. Translational Control. J.W.B. Hershey, M.B. Mathews, Holde y Ahern and N. Sonenberg, eds. Cold Spring Harbor. New York: Cold Spring Harbor Press. Pp. 31-69

Metz, A.M. and Browning, K.S. 1997. Assignment of the β - subunit of wheat EIF2 by protein and DNA sequence analysis and immunoanalysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 342:187-189.

Meyuhas, O., Hornstein, E. 2000. Translational control de TOP mRNAs. *In* Translational control. Eds. Hersey, JWB, Mathews, Holde y Ahern, MB and Sonenberg N. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.

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

Mounier, C., Posner, B.I. 2006. transcriptional regulation by insulin:from the receptor to the gene. *Clinical Journal of Physiology and Pharmacology*. 84: 713-724.

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

Nakagami H., Kawamura K., Sugisaka K., Sekine M., Shinmyo A.. 2002. Phosphorylation of retinoblastoma-related protein by the cyclin D/cyclin-dependent kinase complex is activated at the G₁/S-phase transition in tobacco. *The Plant Cell*. 14: 1847- 1857.

Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P.B. & Steitz, T.A. 2000. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science*. 289: 920-930.

Noller, H.F. 1997. Ribosomes and translation. *Annual Review of Biochemistry*. 66:679-715

Pardee, A.B. 1989. G₁ events and regulation of cell proliferation. *Science*. 246: 603-608.

Paz Lemus, E. 2005. Efecto de la insulina en la síntesis de proteínas, síntesis de DNA y síntesis de RNA en semillas de maíz (*Zea mays* L.) Tesis de licenciatura en Química de alimentos. UNAM. D.F. México.

Pertseva, M.N., Shpakov, A.O., Plesneva, S.A., and Kuznetsova, L.A. 2003. A novel view on the mechanisms of action of insulin and other insulin superfamily peptides: involvement of adenylyl cyclase signaling system. *Biochemistry and Molecular Biology*. 134: 11-36.

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

Pradet-Balade, B., Boulmé, F., Beug, H., Müllner, E.W. and Garcia-Sanz, J.A. 2001. Translation control: bridging the gap between genomics and proteomics?. *Trends in Biochemical Sciences*. 26:

Proud, C.G. & Denton, R.M. 1997. Molecular mechanism for the control of translation by insulin. *Journal Biochemistry* . 328: 329-341.

Raught, B., Gingras, A., Sonenberg, N. 2001. The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proceeding of the National Academic Sciences*. 98: 7037-7043.

Revenkova, E., Masson, J.K., Afsar, K. Jakovleva L. & Paszkowski, J. 1999. Involvement of *Arabidopsis thaliana* ribosomal protein S27 in mRNA degradation triggered by genotoxic stress. *EMBO. J.* 18: 490-499.

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

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

Ruvinsky, I. & Meyuhas, O. 2006. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends. in Biochemical. Sciences* 31: 342-348.

Sánchez de Jiménez, E., Aguilar R., López.,S. 1981. Distinctive characteristics of protein synthesis in maize embryos during early stages of germination. *Biochemical and Biophysical Research Community.* 99: 445-50.

Sánchez de Jiménez,E. Aguilar, R., Dinkova, T. 1997. S6 ribosomal protein phosphorylation and translation of stored mRNA in maize. *Biochimie.* 79: 197-194.

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

Sarbassov, D., Ali, S., Sabatini, D.M. 2005. Growing roles for the mTOR pathway. *Current. Opinion in Cell Biology.* 17:596–603

Scick-Miranda & Bailey-Serres. 2001. Regulates heterogeneity in 12kDa P-protein phosphorylation and compition of ribosomes in maize (*Zea mays* L.). *The Journal of Biochemical Chemistry*. 276: 10921-10928.

Steitz, T.A., & Moore, P.B. 2003. RNA, The first macromolecular catalyst: the ribosome is a ribozyme. *Trends in Biochemical Sciences*. 28: 411-418.

Taiz L., Zeiger E. 1998. *Plant Physiology*. 2^a ed. Sinauer Associates, Inc., Publishers. USA.

Tettweiler, G. and Lasko, P. 2006. A new model for translational regulation of specific mRNAs. *Trends in Biochemical Sciences*. Datos en prensa. Disponible www.sciencedirect.com.

Traas, J. and Bonh-Courseau, I. 2005. Cell proliferation patters at the shoot apical mesristemo. *Current Opinion in Plant Biology* 8:587-592.

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

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

Van Lijsebettens, M. Vanderhaeghen, R., De Block, M., Bauw, G., Villarroel, R., Van Montagu, M. 1994. An S18 ribosomal protein gene copy al the *Arabidopsis* PLF locus affects plant development by its specific expression in meristems. *EMBO J*. 13: 3378-3388.

Verschoor, A., Srivastava, S., Grassucci, R. and Frank, J. 1996. Native 3D structure de eukaryotic 80S ribosome: morphologicalhomology with the E, coli 70S ribosome. *Journal of Cell Biology*. 133: 497-505

Weinstein, I.B., Zhou P. 1997. Defectos de los genes de control del ciclo celular y cáncer humano. Enciclopedia of Cancer. Academic Press. USA.

Williams, M.,E., and Sussex, I.M. 1995. Developmental regulation of ribosomal protein L16 genes in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal Plant*. 8: 65-76

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

Zanetti, M. E. Chanf, I.F, Gong, F., Galbraith, D. W. & Bailey-Serres. 2005. Inmunopurification of polyribosomal complexes of *Arabidopsis* for global analysis of gene expression. *Plant Physiology*. 138: 624-635.

COMITÉ TUTORAL.

DIRECTORA

Dra. Laura J. Pérez Flores



Profesor Titular "C" T. C.

Laboratorio de Fisiología, Bioquímica y Biología Molecular de Plantas.

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

ljpf@xanum.uam.mx

ASESORES

Dra. Estela Sánchez Quintanar

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

Edif. E. Facultad de Química,

Depto. de Bioquímica, UNAM.

estelaservidor@unam.mx

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

investigador asociado "C" T.C.

Lab 103. Edif. E. Facultad de Química,

Depto. de Bioquímica, UNAM.

cesyservidor@unam.mx

M. en C. Fernando Díaz de León Sánchez

Profesor Titular "C" T. C.

Laboratorio de Fisiología, Bioquímica y Biología Molecular de Plantas.

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

fdls@xanum.uam.mx

fdls5@yahoo.com.mx