



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES

QUÍMICO-BIOLÓGICAS

**“ANÁLISIS DEL EFECTO DE OLIGOGALACTURÓNIDOS (OGs)
SOBRE LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA TOR EN
MAÍZ (*Zea mays* L.)”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:

Q.F.B. CÉSAR ARTURO PEÑA URIBE

ASESOR:

D.C. HOMERO REYES DE LA CRUZ

Morelia, Michoacán. Febrero, 2011



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO BIOLÓGICAS**

ÍNDICE

RESUMEN	3
SUMMARY	4
I. INTRODUCCIÓN	5
II. ANTECEDENTES	8
2.1. La proteína blanco de la rapamicina, TOR	8
2.1.1. Reguladores río arriba de mTOR	10
2.1.1.1. Factores de crecimiento	10
2.1.1.2. Factores energéticos	11
2.1.2. Síntesis de proteínas	12
2.1.2.1. Inicio de la traducción	13
2.1.3. Blancos en la señalización de mTOR	15
2.1.3.1. 4EBP1	15
2.1.3.2. S6K	16
2.2. La vía de señalización de TOR en plantas	18
2.2.1. Reguladores río arriba de TOR en plantas	19
2.2.2. Blancos en la señalización de TOR en plantas	20
2.2.2.1. S6K en plantas	20
2.3. OGs una conexión entre defensa y desarrollo	22
2.3.1. OGs en los mecanismos de defensa	23
2.3.2. OGs en el crecimiento y desarrollo	24
III. JUSTIFICACIÓN	26
IV. HIPÓTESIS	26
V. OBJETIVO GENERAL	26
VI. METODOLOGÍA	27
VII. RESULTADOS	31
7.1. Análisis de diferentes concentraciones de OGs sobre el crecimiento y desarrollo de plántulas de maíz	31

7.2.	Análisis de diferentes concentraciones de AIA sobre el crecimiento y desarrollo de plántulas de maíz	33
7.3.	Efecto de AIA, OGs y Rapamicina sobre el crecimiento y desarrollo de plántulas de maíz	36
7.4.	Análisis de la S6K de plántulas de maíz tratadas con AIA, OGs y Rapamicina	40
7.5.	Identificación <i>in silico</i> de posibles modificaciones post-traduccionales en S6K	44
VIII.	DISCUSIÓN	46
IX.	CONCLUSIÓN	49
X.	PERSPECTIVAS	49
XI.	BIBLIOGRAFÍA	50

RESUMEN

Estudios en las dos últimas décadas en mamíferos, señalan que el crecimiento celular (incremento en tamaño) está regulado principalmente por la vía de señalización de la proteína mTOR, (por sus siglas en inglés mammalian Target Of Rapamycin) la cual integra las señales ambientales (factores de crecimiento, nutrientes, etc.) que modulan el crecimiento. Al igual que en mamíferos, el tamaño final de los órganos de una planta está determinado por el número de células que lo conforman así como de la capacidad de estas para crecer y se han descrito varias proteínas ortólogas de la vía de señalización de TOR. Específicamente en maíz, se ha reportado que contrario a *Arabidopsis*, es sensible a la rapamicina. Además, esta vía de señalización es activada por la presencia de auxinas. Sin embargo, existen diversos compuestos capaces de regular el crecimiento vegetal, tal es el caso de los fragmentos de pared celular denominados oligogalacturónidos. Se ha propuesto que estos compuestos modulan el crecimiento y desarrollo vegetal a través de una interacción con la vía de señalización de auxinas. En este trabajo reportamos el efecto de estos fragmentos de pared celular sobre el crecimiento y desarrollo de plántulas de maíz, así como su participación en la activación de la proteína S6K la cual es componente de la vía de señalización de TOR. Se encontró que los oligogalacturónidos inhiben el crecimiento del coleóptilo y la raíz primaria de las plántulas tratadas durante diez días. La interacción con el ácido indol-3-acético (auxina) indicó que existen diferencias en la señalización de ambos compuestos dependiendo del tejido. El uso del inhibidor del crecimiento, la rapamicina, mostró una posible interacción de los oligogalacturónidos con la vía de señalización de TOR, lo cual fue corroborado mediante un análisis electroforético en 2 dimensiones y el western blot de los extractos crudos de las plántulas tratadas, con anticuerpos contra la proteína S6K. Los resultados nos indicaron que los oligogalacturónidos modulan el crecimiento y desarrollo a través de la vía de señalización de la proteína TOR.

SUMMARY

Cell growth (increase in size) is regulated by the TOR signaling pathway, which integrates environmental cues that modulate cell growth. In plants the final organ size is determined by its cell number and their ability to grow. Several proteins involved in the TOR signaling pathway are conserved in plants. Maize has been reported to be sensitive to rapamycin treatment contrary to Arabidopsis insensitivity. On the other hand, there are reports about the role of auxins in the activation of maize S6K. However there is large variety of plant growth regulators, among them, cell wall fragments called oligogalacturonides have been described. The proposed mechanism through which oligogalacturonides modulate growth is by an interaction with auxin signaling. Here we report the effect of this kind of cell wall fragments on maize seedlings growth as well as on the activation of S6K which is component of the TOR signaling pathway. We found that oligogalacturonides inhibit coleoptile and primary root growth of seedling treated for ten days. We also found that the interaction with indol-3-acetic acid (auxin) signaling is different depending on the evaluated tissue. The effect shown in addition with the inhibitor rapamycin suggest an interaction of oligogalacturonides with the TOR signaling pathway. This observation was confirmed by western blot, indicating a modulation of S6K activity in response to oligogalacturonides treatment. This result shown that oligogalacturonides modulates growth and plant development through modulation of TOR signaling pathway.

I. INTRODUCCIÓN.

Las plantas son organismos que se adaptan excelentemente bien a las condiciones ambientales, esta característica las ha hecho modular diversos aspectos morfológicos de tal manera, que a lo largo de la evolución, han surgido diferencias en la estructura de las plantas. Se ha observado que aun en plantas estrechamente relacionadas existen diferencias dramáticas en el tamaño de sus órganos (Figura1). Sin embargo, el tamaño final de los órganos de una planta de una especie determinada es remarcablemente uniforme, lo anterior sugiere que el crecimiento vegetal se encuentra finamente regulado (Krizek, 2008).

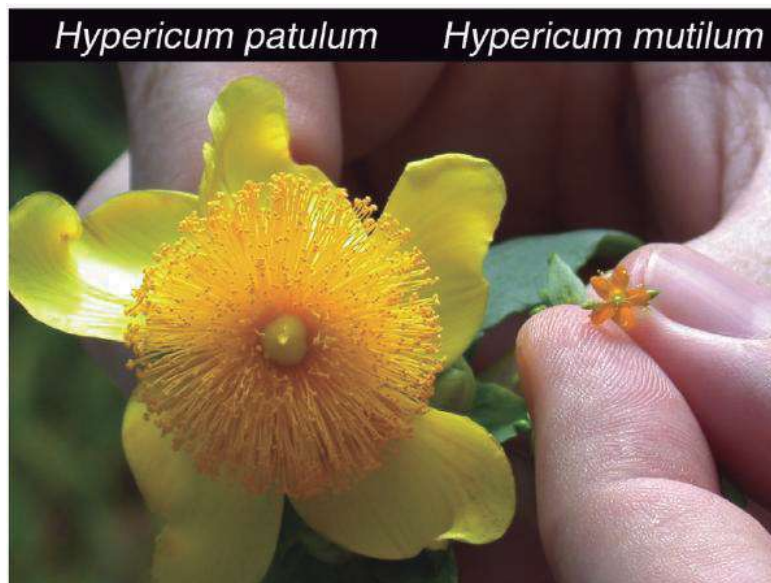


Figura 1. Diferencias en el crecimiento vegetal. Plantas pertenecientes al mismo género (*Hypericum*), con diferencias dramáticas dentro del crecimiento de sus órganos (Tomada de Krizek, 2008).

El crecimiento de cualquier organismo, incluidas las plantas, está determinado por el tamaño y el número de sus células. El incremento del número de células depende de la capacidad de división de las mismas. En plantas existen zonas de alta actividad mitótica denominadas meristemos. Por otro lado, el tamaño celular se ajusta dependiendo de los procesos de diferenciación, por lo que el incremento en el tamaño puede darse por tres diferentes procesos: Una elevación en la masa de la célula dada por una producción de

macromoléculas (proteínas y ADN); un aumento en la capacidad de expansión celular debido a un incremento en el volumen de las vacuolas (Figura 2). El tercer proceso es la endoreduplicación, el cual puede ocurrir frecuentemente en células con algunos tipos de especialización como son los pelos radiculares, células del xilema así como células del endospermo (Sugimoto & Roberts, 2003). La endoreduplicación comprende la re-replicación de los cromosomas en ausencia de mitosis, por lo que el material genético contenido dentro de la célula puede multiplicar varias veces su tamaño original. De esta manera el núcleo crece y por lo tanto la relación núcleo-citoplasma debe incrementarse, por lo que se da un incremento en el tamaño celular (Sugimoto & Roberts, 2003. Breuer *et al.*, 2010).

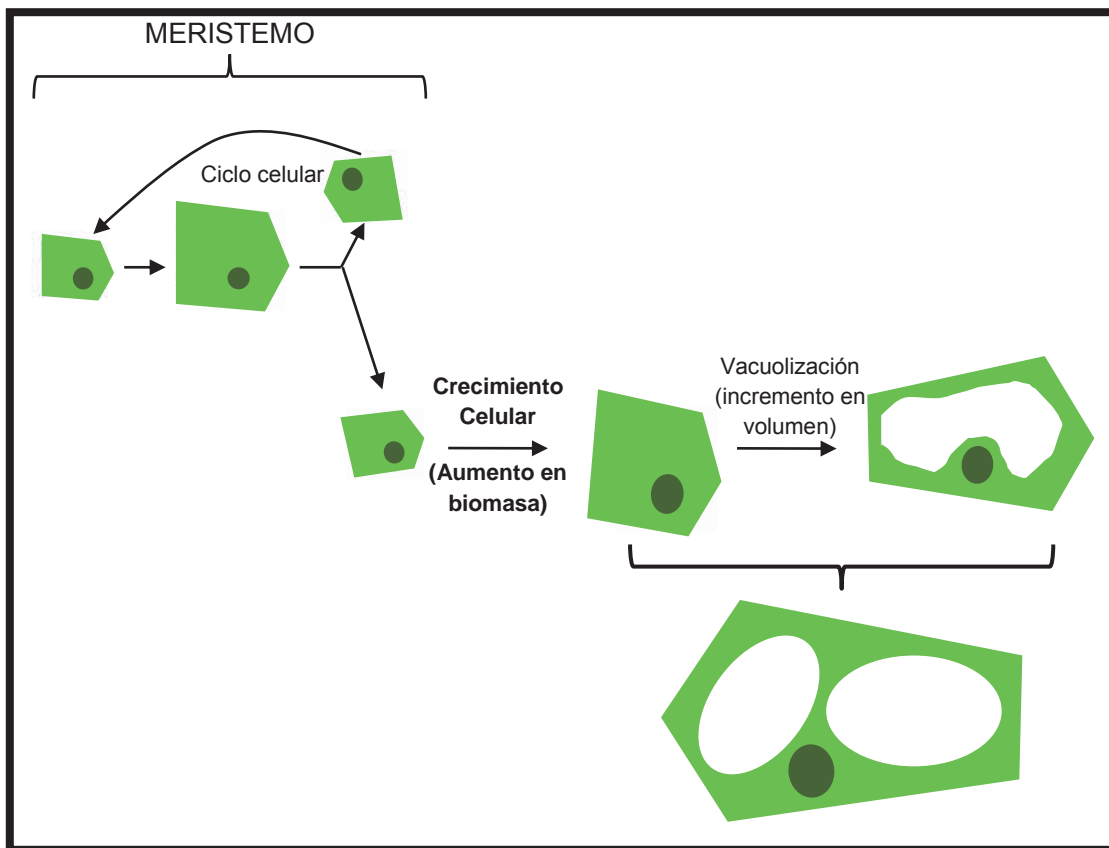


Figura 2. Crecimiento y expansión celular. En las zonas meristemáticas el crecimiento se debe a la proliferación celular. En tanto, al salir de esta zona, las células crecen por expansión (incremento en volumen) y crecimiento por incremento en biomasa (Modificada de Sugimoto & Roberts. 2003).

De acuerdo a lo anterior, se puede definir entonces al crecimiento como un aumento en el tamaño de los órganos de la planta, afectado por diferentes procesos celulares. Por otro lado, existe también la formación de nuevos órganos durante el ciclo de vida de la planta, a este proceso lo definiremos como desarrollo vegetal. Tanto el crecimiento como el desarrollo son modulados en respuesta a factores ambientales como disponibilidad de nutrientes y diferentes tipos de estrés. Se ha determinado que la proteína blanco de la rapamicina TOR es capaz de integrar este tipo de señales para regular el crecimiento celular. Sin embargo, la información sobre la regulación en plantas es escasa.

Las plantas producen una gran variedad de compuestos reguladores del crecimiento y desarrollo vegetal denominados fitohormonas. Las de mayor estudio son las auxinas, estas moléculas regulan el crecimiento. Se ha propuesto que dicha regulación podría ser, en parte, debido a la activación de la vía de señalización de la proteína TOR (Beltrán *et al.*, 2002. Turk *et al.*, 2004). Las auxinas interactúan con diferentes fitohormonas para modular el crecimiento vegetal. Una especie en particular de compuestos derivados de la pared celular, interactúa con las auxinas para controlar el crecimiento. Estos derivados son oligosacáridos compuestos por ácido galacturónico (OGs) que se generan a partir de la hidrólisis de la pared celular y que inhiben el crecimiento vegetal. En este trabajo abordamos la interacción de estos compuestos con las auxinas para determinar si existe una relación entre la inhibición del crecimiento inducida por los OGs y la vía de señalización de la proteína TOR.

II. ANTECEDENTES.

2.1. LA PROTEINA BLANCO DE LA RAPAMICINA, TOR.

En 1975 se aisló y caracterizó una lactona macrocíclica (macrolido) del micelio de *Streptomyces hygroscopicus*, proveniente del suelo de la isla conocida como Rapa-Nui. Los investigadores denominaron a este compuesto rapamicina y observaron que este inhibía el crecimiento de hongos y bacterias por lo que se comenzó a usar como un antibiótico comercial conocido con el nombre de Rapamune® y Sirolimus® (Vezina *et al.*, 1975A. Sehgal *et al.*, 1975B). Sin embargo, este uso decayó cuando se descubrió que era capaz de inactivar a los linfocitos T y a partir de este hecho se comenzó a usar como un agente inmunosupresor especialmente en procedimientos de trasplantes para evitar el rechazo de órganos (Dumont *et al.*, 1990. Mattila *et al.*, 1990. Henderson *et al.*, 1991. Schreiber *et al.*, 1991). Estas propiedades particulares de la rapamicina produjeron una serie de investigaciones para dilucidar el modo de acción de este compuesto.

La proteína blanco de la rapamicina (TOR) fue originalmente identificada en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Donde se descubrió que la rapamicina se une a una proteína de tipo *cis-trans* peptidil-prolil isomerasa de 12 KDa, inicialmente identificada como el receptor del compuesto inmunosupresor FK506, por lo que se denominó FKBP12 (Harding *et al.*, 1989. Jonh *et al.*, 1989). En base a mutaciones en el gen que codifica para la proteína FKBP12 y tratamientos con compuestos homólogos a la rapamicina se llegó a la conclusión de que la proteína FKBP12 formaba un complejo con la rapamicina y este era el encargado de inhibir el crecimiento de la levadura (Bierer *et al.*, 1990. Heitman *et al.*, 1991). Se identificaron además otras dos mutaciones en genes denominados TOR1 (TOR1-1, Ser1972Arg) y TOR2 (TOR2-1, Ser1975Ile) que conferían resistencia a los efectos inhibitorios de la rapamicina y que dichas mutaciones prevenían la unión del complejo rapamicina-FKBP12 con TOR, indicando que TOR era el blanco a

través del cual la rapamicina inhibe el crecimiento (Heitman *et al.*, 1991. Stan *et al.*, 1994. Lorenz & Heitman, 1995).

Posteriormente, se observó que contrario a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, en eucariontes superiores existe solo un gen que codifica para una proteína TOR (Crespo & Hall, 2002). Casi al mismo tiempo, varios grupos de trabajo lograron clonar, expresar e identificar a esta proteína cinasa en mamíferos, por lo que también se le llegó a conocer como FRAP (proteína asociada a FKBP12-Rapamicina), RAFT (Blanco de la Rapamicina y FKBP12), RAPT (Blanco de Rapamicina) y SEP (Proteína efectora de Sirolimus) (Brown *et al.*, 1994. Chen *et al.*, 1994. Chiu *et al.*, 1994. Sabatini *et al.*, 1995. Sabers *et al.*, 1995). Esta proteína pertenece a la familia de proteínas relacionadas con las cinasas de fosfatidilinositol (PIKK); los miembros de esta familia contienen un dominio catalítico en la región carboxilo terminal de cinasa de Ser/Thr que se asemeja al de las fosfatidilinositol 3-cinasas. Hacia la región del amino terminal, se encuentra el dominio de unión al complejo FKBP12-rapamicina o FRB, además se encuentran una serie de dominios en repeticiones denominados HEAT que median la interacción proteína-proteína. Por otro lado, flanqueando al dominio catalítico se encuentran los dominios FAT y FATc, los cuales se ha propuesto que podrían mediar interacciones proteicas de manera similar a los dominios HEAT además de tener una participación regulatoria de la actividad de cinasa (Crespo & Hall, 2002).

Como podemos notar, la proteína TOR tiene diferentes dominios para la interacción con proteínas, por lo que en mamíferos esta cinasa es capaz de formar dos diferentes complejos multiproteicos denominados mTORC1 y mTORC2. El primero está compuesto por mTOR, mLST8 y raptor, cabe mencionar que este complejo es sensible a los efectos inhibitorios de la rapamicina. mTORC2 está conformado por mTOR, mLST8, rictor, mSIN1 y PRR5, este complejo por otro lado es insensible a la rapamicina. Cada uno de estos dos compuestos es activado por mecanismos diferentes e independientes y regulan aspectos diferentes del crecimiento celular. El complejo TORC2 es activado por factores de crecimiento a

través de mecanismos que aun no han sido bien descritos y este está relacionado con la reorganización de los filamentos de actina (Jacinto *et al.*, 2004). Por otro lado, la información acerca de TORC1 es más clara con respecto a su regulación y su participación en el crecimiento celular.

2.1.1. Reguladores río arriba en la vía de señalización de mTOR.

TOR integra varios tipos de señales que regulan el crecimiento celular. Cuatro tipos principales se han descrito hasta ahora: por factores de crecimiento, energéticos, nutrientes, y de estrés. En este trabajo hablaremos únicamente de los primeros dos casos.

2.1.1.1. Factores de crecimiento.

La respuesta a factores de crecimiento en esta vía de señalización está dada a través de la proteína PI3K (Figura 3). En este caso, un factor de crecimiento como la insulina al acoplarse a su receptor de tipo cinasa de tirosina recluta y fosforila dentro de la célula a la proteína sustrato de receptor de insulina (IRS), con posterior reclutamiento de la proteína PI3K que unida a la IRS fosforila al fosfatidilinositol-4,5-difosfato (PIP2) para transformarlo a fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). Altas concentraciones de PIP3 en la membrana reclutan a la proteína cinasa B (PKB o Akt) y la cinasa dependiente de fosfoinositidos (PDK1), resultando en la fosforilación y activación de Akt por PDK1. El enlace entre la señalización por PI3K y mTOR se da a través de las proteínas de esclerosis tuberosa TSC1 (hamartina) y TSC2 (tuberina). Estas proteínas forman un dímero que regula negativamente la señalización. TSC2 es fosforilada e inactivada por Akt en respuesta a insulina. TSC2 tiene una función de proteína activadora de GTPasa (GAP), esta función está dirigida a la pequeña GTPasa enriquecida en cerebro (Rheb). Rheb se une directamente en dominio de cinasa de mTOR y la activa de manera dependiente de GTP. Sin embargo, aun no se ha establecido si esta activación está dada por la inducción de un cambio conformacional en mTOR o se requiere algún otro paso en la activación de mTOR (Figura 3).

2.1.1.2 .Factores energéticos.

El crecimiento dado por un aumento en la biomasa implica síntesis de macromoléculas, este hecho implica un gasto energético importante para la célula. La vía de señalización de mTOR censa los niveles energéticos de la célula a través de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK). Cuando se encuentra activada, esta cinasa inhibe procesos energéticamente demandantes como la síntesis de proteínas y activa procesos generadores de ATP como la oxidación de ácidos grasos. La AMPK activa, fosforila directamente a la TSC2 y por lo tanto incrementa su actividad de GAP, lo que deriva en la inactivación de mTOR (Figura 3). Por otro lado se ha propuesto que Akt podría estar relacionado con el mantenimiento de altos niveles de ATP, por lo que podría ser otro punto de regulación energético (Hahn-Windgassen *et al.*, 2005).

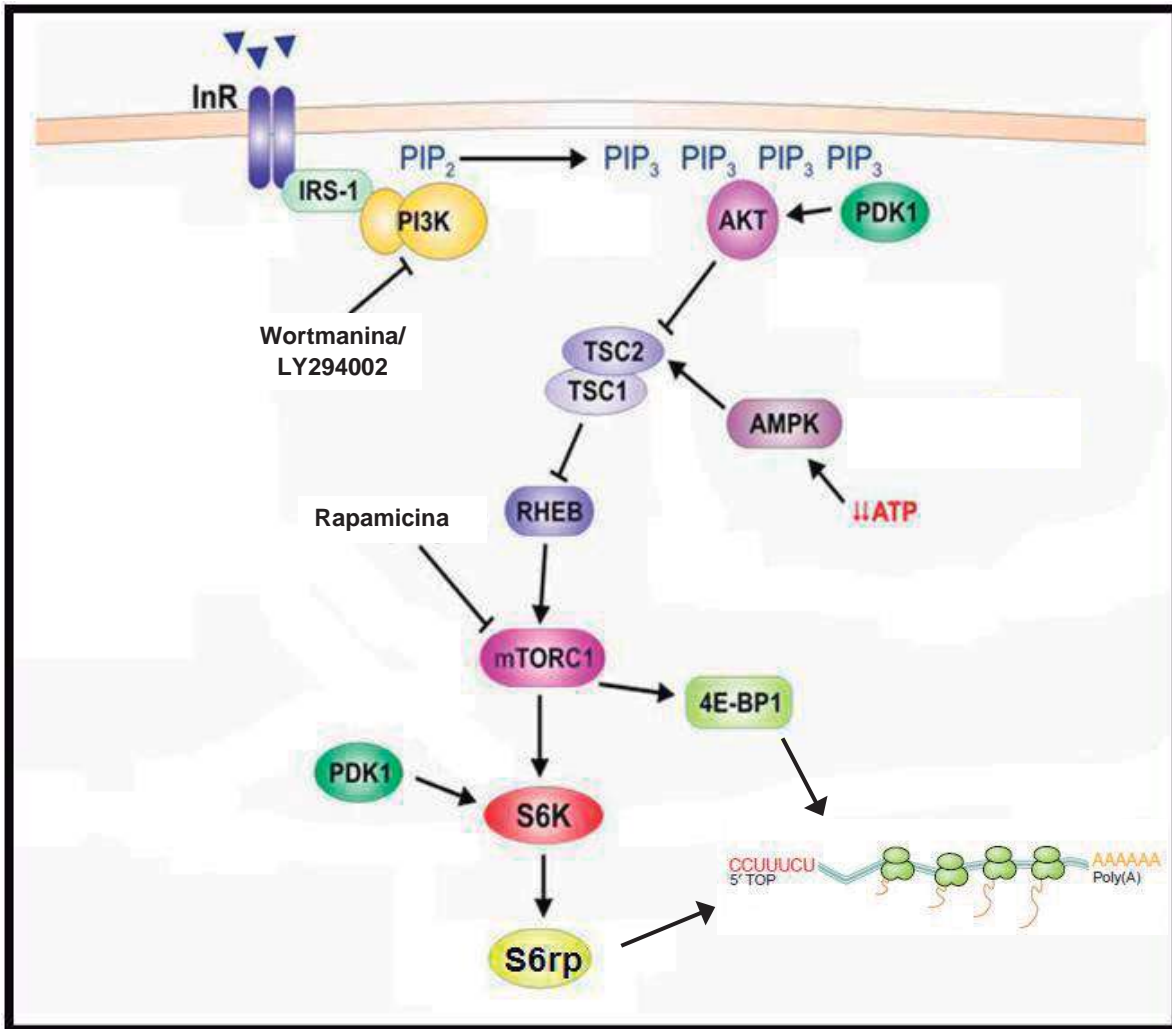


Figura 3. Vía de señalización PI3K-mTOR. La activación de mTOR deriva de una serie de eventos de fosforilación inducidos por el acoplamiento de un factor de crecimiento, como la insulina, a su receptor (InR). La activación de mTOR deriva en un aumento en la síntesis de proteínas, por lo tanto un aumento en la biomasa y como consecuencia un crecimiento celular (modificado de Jaztrzebski *et al.*, 2007).

2.1.2. Síntesis de proteínas

La traducción es uno de los procesos celulares que requiere mayor cantidad de energía, además de ser uno de los más complejos. Es por esto que la regulación de la traducción debe ser finamente controlada además de estar en perfecto acoplamiento al estado metabólico de la célula (Meyuhas *et al.*, 1996).

El proceso de traducción se divide en tres etapas: el inicio, la elongación y el término. En cada una de estas etapas es posible regular el proceso. Sin embargo, es durante el inicio donde se presenta el principal punto de control (Gray & Wickens, 1998. Jackson *et al.*, 2010). Ya que es en este punto cuando se decide si una proteína se sintetiza o no y representa, por tanto, un ahorro energético. Sin embargo, también están presentes puntos de regulación durante la elongación y la terminación (Kapp & Lorsch, 2004). A continuación, únicamente se da un breve resumen de cómo se lleva a cabo el inicio de la traducción.

2.1.2.1. Inicio de la traducción.

El inicio ha sido definido como el proceso que conlleva a la formación de un ribosoma competente para continuar con la elongación. Sin embargo, este es un proceso complejo que aun no se comprende por completo. El inicio comprende varias etapas: **1.** El reciclaje de las subunidades ribosomales, **2.** La formación del complejo ternario, **3.** Formación del complejo de pre-inicio 43S, **4.** Activación del mRNA, **5.** Anclaje de este último al mRNA, **6.** Escaneo del mRNA, **7.** Reconocimiento del codón de inicio y **8.** Acoplamiento de las dos subunidades ribosomales (Jackson *et al.*, 2010).

El reciclaje de las subunidades se realiza a partir del complejo de post-terminación, el cual está formado por las dos subunidades ribosomales, al menos un factor de liberación (eRF, por sus siglas en inglés), el sitio P con un tRNA deacilado y el mRNA aun acoplado al ribosoma. La disociación de las subunidades ribosomales esta mediada por los factores de inicio eIF1, eIF1A, eIF3, eIF5 y eIF6 (Pisarev *et al.*, 2007). La subunidad pequeña queda acoplada entonces a eIF3 y probablemente a eIF1 así como eIF1A, evitando de esta manera que la subunidad 60S se re-acople.

Una vez liberada la subunidad 40S, esta debe acoplarse al complejo ternario. El cual está conformado por eIF2-GTP y el tRNA iniciador aminoacilado con metionina, met-tRNA_i. Finalmente se agrega a esta masa proteínica el factor

eIF5, la cual se encarga de activar a eIF2 como GTPasa. De esta manera queda completo el complejo de pre-inicio 43S.

Para la formación del complejo 48S, es necesario que el mRNA este “activado”. Este proceso esta mediado por la formación de eIF4F, el cual contiene los factores eIF4E, eIF4A y eIF4G. Este complejo se acopla a la estructura cap del mRNA, esta estructura es una modificación que consiste en una metilación en el nitrógeno de posición siete de la guanina (m^7GpppN , donde ppp son fosfatos unidos mediante enlaces fosfodiéster y N, es cualquier base) que le proporciona una carga parcial positiva y facilita la unión con eIF4E. eIF4G funciona como soporte para que puedan acoplarse e interactuar eIF4E, eIF4A, eIF4B y la proteína de unión a la cadena de adeninas (PABP) situadas en la región 3' del mRNA. De esta manera eIF4G permite que el mRNA forme un círculo que ofrece ventajas para su traducción y el reciclaje de factores así como de las subunidades ribosomales. Este proceso requiere de un gasto energético en forma de ATP para desdoblar las estructuras secundarias próximas a cap y que se active correctamente el mRNA.

Una vez que el complejo 43S se une al mRNA activado, comienza el escaneo del mensajero hasta encontrar el codón de inicio. Este proceso se puede dividir en dos procesos: el desdoblamiento de estructuras secundarias en la región 5' y el recorrido del complejo proteínico. El escaneo esta mediado por la actividad de eIF4A que funciona como helicasa. Esta requiere ATP para poder desarrollar su tarea, la cual además recibe una ayuda adicional por parte de eIF4B que incrementa su efectividad para desdoblar las estructuras secundarias. Sin embargo el proceso exacto de cómo participan los diferentes factores de inicio durante el escaneo no se conoce claramente.

Para que el escaneo se detenga se requiere que el complejo 48S sea capaz de reconocer el codón de inicio AUG. Este es por lo general el primer codón con esta secuencia de nucleótidos en el mRNA. Además, El codón esta dentro del mensajero en un contexto que facilita su reconocimiento (GCC(A/G)CCAUGG). Se ha propuesto que este proceso de reconocimiento esta mediado por algunos

factores de inicio de la traducción, ya que en ausencia de eIF1, eIF1A y eIF5 el reconocimiento del codón de inicio no se lleva a cabo de manera satisfactoria, por lo que su participación en este proceso es indispensable (Pestova *et al.*, 1998. Maag *et al.*, 2005. Maag *et al.*, 2006).

Por último la unión de las subunidades ribosomales, así como la liberación de eIF2-GDP, eIF1, eIF3 y eIF5; esta mediada por eIF5B, esta proteína es una GTP-asa que desplaza a los factores antes mencionados sin necesidad de hidrólisis de GTP (Unbehaun *et al.*, 2004. Pestova *et al.*, 2000. Acker & Lorsch, 2008). Sin embargo se requiere de energía para disociar a eIF1A y de esta manera dejar libre el sitio A de la subunidad 40S del ribosoma. En este punto entonces queda formado el complejo de inicio de la traducción 80S, listo para entrar a la etapa de elongación.

2.1.3. Blancos en la señalización de mTOR.

Los blancos de la proteína mTOR mejor estudiados son aquellos relacionados con la regulación de la traducción: la proteína de unión al factor eucariótico de inicio de la traducción 4E (4E-BP1) y la cinasa de la proteína ribosomal S6 (S6K). Sin embargo existen otros procesos involucrados en la señalización río abajo de TOR como la autofagia, la organización de los filamentos de actina, así como procesos metabólicos tales como la síntesis de aminoácidos y la homeostasis de glucosa (Hay & Sonenberg, 2004. Wullschleger *et al.*, 2006). En este trabajo nos referiremos solo a aquellos involucrados en la traducción.

2.1.3.1. 4EBP1.

El control traduccional mediado por mTOR está dado a través de las proteínas S6K y 4EBP1. mTORC1 promueve la traducción cap-dependiente al fosforilar a la proteína 4EBP1, la cual libera al factor eucariótico de inicio de la traducción 4E (eIF4E) permitiendo su asociación al eIF4G y dar inicio a la traducción (Hay & Sonenberg, 2004. Wullschleger *et al.*, 2006) (Figura 3).

2.1.3.2. S6K.

Por otro lado, la S6K es una cinasa de la familia de cinasas AGC (por cAMP-dependent protein kinase A, cGMP-dependent protein kinase G y phospholipid-dependent protein kinase C). En mamíferos se han descrito dos genes que codifican para S6K1 y S6K2, las proteínas presentan un alto grado de identidad (70% de manera general y 85% en el dominio catalítico). Sin embargo, cada gen genera dos diferentes isoformas de la proteína. De S6K1 se producen las isoformas denominadas p70 y p85, en tanto que de S6K2 están las isoformas p54 y p60. De estas 4 isoformas, la p85^{S6K1} y ambas isoformas de S6K2 están localizadas en el núcleo, siendo la p70^{S6K1} la única de localización citoplásmica. A pesar de lo anterior, la p54^{S6K2} puede ser fosforilada por la proteína cinasa C (PKC), lo que le permite acumularse en el citoplasma (Valovka *et al.*, 2003). Además, se ha reportado que S6K2 pero no S6K1 es localizada en el centrómero (Rossi *et al.*, 2007). Estos datos nos indican que las diferentes isoformas de S6K podrían ser redundantes y a la vez tener funciones diferenciales. Sin embargo, en este trabajo nos referiremos únicamente a la regulación de S6K1.

De acuerdo a varios reportes se ha llegado a la conclusión de que la activación de esta cinasa involucra fosforilaciones secuenciales en diversos sitios (Ferrari *et al.*, 1992. Pearson *et al.*, 1995. Weng *et al.*, 1995). Se ha propuesto un modelo de activación de S6K1 que involucra un primer paso dado por la interacción de Ca²⁺. Este paso libera los dominios autoinhibitorios presentes en las regiones amino-terminal y carboxilo-terminal de la S6K, permitiendo las primeras 4 fosforilaciones dentro de estos dominios autoinhibitorios (S411, S418, T421 y S424) por parte de mTOR (Isotani *et al.*, 1999). Estas cuatro primeras fosforilaciones producen un cambio conformacional en la S6K1 que permite a mTOR realizar las siguientes 2 fosforilaciones en la S371 y en la T389 (Burnett *et al.*, 1998. Isotani *et al.*, 1999). Estas fosforilaciones por mTOR permiten una posterior fosforilación en la T229 por parte de PDK1, lo que implica una completa activación de la S6K1 (Figura 3). Esta última fosforilación es inhibida por la

rapamicina, lo que indica que las fosforilaciones previas por mTOR son requeridas para que PDK1 active a la S6K1 (Jastrzebski *et al.*, 2007).

La mayoría de los sustratos hasta ahora conocidos de la S6K1 están involucrados en la síntesis de proteínas. El primer sustrato y de mayor estudio de la S6K es la proteína S6 de la subunidad 40s del ribosoma (S6rp), la cual al ser fosforilada (S235, S236, S240, S244 y S247) aumenta la síntesis de proteínas (Krieg *et al.*, 1988). Dado que se ha encontrado a la proteína S6rp fosforilada en los polisomas y que su localización dentro de la subunidad 40s es en el sitio de unión al mRNA, se propuso que esta fosforilación tenía una participación en la regulación de la traducción (Gressner & Wool 1974. Lastick *et al.*, 1977). Se ha relacionado a la actividad de S6K1, a través de la fosforilación de la S6rp, con una selección de mRNAs que contienen en su región 5' no traducible un tracto de oligopirimidinas (TOP) y que codifican para proteínas ribosomales y algunos factores de elongación de la traducción, por lo que se ha propuesto que de esta manera se regula la biogénesis de ribosomas (Jefferies *et al.*, 1994). Sin embargo, esta evidencia ha sido cuestionada, por lo que no se ha definido el papel de la fosforilación de la proteína S6rp en la regulación de la traducción (Tang *et al.*, 2001).

Hasta ahora se ha reportado la existencia de al menos once proteínas que son fosforiladas por la S6K. No obstante, la información acerca de cómo se regula la función biológica de algunas a través de estas fosforilaciones es escasa e incluso nula (Jastrzebski *et al.*, 2007. Ruvinsky & Mayuhas, 2006). Cinco de estas proteínas fosforiladas por S6K están involucradas directa o indirectamente en la regulación de la traducción. Dentro de la vía de señalización PI3K-mTOR, son fosforiladas las proteínas IRS1 y mTOR. La primera al ser fosforilada queda inactiva, lo que produce una resistencia a la insulina (Harrington *et al.*, 2004). mTOR es fosforilada en la S2448 por S6K, sin embargo, no está claro si esta fosforilación juega un papel en la regulación negativa o positiva de mTOR (Chiang *et al.*, 2005. Holz *et al.*, 2005). Los sustratos directamente relacionados con la traducción son la cinasa del factor de elongación 2 (eEF2K) y el factor de inicio de

la traducción 4E (eIF4B). El primero es un regulador negativo de la elongación de la traducción, ya que al fosforilar inhibe al factor eucariótico 2 de la elongación (eEF2). eEF2K al ser fosforilada en la S366 por S6K queda inactiva (Wang *et al.*, 2001). Por otro lado, la proteína eIF4B funciona como un complemento a la función de RNA helicaza del factor de inicio de la traducción 4A (eIF4A). Al acoplarse eIF4B con eIF4A se aumenta esta actividad de helicaza por lo que se pueden traducir mRNAs con estructuras secundarias a lo largo de la region 5' no traducibles. Se ha propuesto que la fosforilación en la S422 en eIF4B por parte de S6K1 recluta a este factor de inicio de la traducción al complejo de inicio (Raught *et al.*, 2004). S6K1 es entonces un mediador de diversos procesos celulares, principalmente se conoce su participación en la síntesis de proteínas a través de la vía de señalización PI3K-mTOR, por lo que esta proteína juega un papel muy importante en la regulación del crecimiento celular.

2.2. LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE TOR EN PLANTAS.

Las plantas son organismos sésiles que se deben adaptar a las condiciones ambientales, por lo que han desarrollado diversos mecanismos para regular aspectos como el crecimiento y desarrollo. Uno de estos podría ser a través de la señalización de la proteína TOR. Investigaciones del genoma de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* indican que las plantas tienen el gen ortólogo de *mTOR* (*AtTOR*). Este gen codifica para una proteína de 2481 aminoácidos con todas las características estructurales de mTOR, incluyendo el dominio cinasa, las repeticiones HEAT y el dominio de unión a rapamicina FRB, a pesar de que existen reportes que indican una resistencia a este compuesto en *Arabidopsis*. Además se reportó que este gen se expresa en meristemas y células del endospermo pero no en células diferenciadas. La mutación nula de este gen es letal en estados embrionarios de la planta, lo que indica que *AtTOR* es crucial para el desarrollo de la planta. (Menand *et al.*, 2002). Para el estudio de este gen en *Arabidopsis* se implementó el uso de RNAi para silenciar dicho gen, estas líneas interferentes presentaron características morfológicas normales pero con hojas más pequeñas y raíces más cortas que sus contrapartes silvestres, lo que

demuestra la importancia de AtTOR en la regulación del crecimiento vegetal (Deprost *et al.*, 2007). En maíz también se reportó la secuencia completa del cDNA de *TOR*, a partir del cual se dedujo una secuencia de 2464 aminoácidos y las estructuras se encontraron conservadas al igual que en AtTOR, con la diferencia de una sensibilidad a la rapamicina, lo que indica diferencias en la regulación de TOR en plantas (Agredano-Moreno *et al.*, 2007).

2.2.1. Reguladores río arriba en la vía de señalización de TOR en plantas.

Los factores de crecimiento como insulina y factores tipo insulina (IGFs) han sido caracterizados como reguladores de la vía de señalización PI3K-mTOR. En maíz se ha descrito un factor de crecimiento similar a la insulina, una proteína de 20KDa que presenta actividad de factor de crecimiento tipo insulina. Esta proteína aumenta la germinación y el crecimiento de plántulas de maíz, además induce la fosforilación de la proteína S6rp que se ve prevenida al incluir un tratamiento con rapamicina (García *et al.*, 2001). Lo anterior sugiere que existen elementos conservados en la vía de señalización de TOR en maíz y que esta integra la señal del factor de crecimiento tipo insulina de manera similar a como se ha reportado en mamíferos.

Sin embargo, los mecanismos río abajo de este tipo de receptor no se conocen en su totalidad. Comenzando con la proteína PI3K, de la cual pueden existir tres clases diferentes (I, II y III) (Stevenson *et al.*, 2000). La PI3K clase I es la encargada de generar PIP3 a partir de PIP2. En plantas no se ha reportado la presencia de esta clase de PI3K, no obstante, las otras clases de PI3K están presentes generando fosfoinosítidos que podrían cubrir la función de segundos mensajeros de PIP3 (Bögge *et al.*, 2003). Sin embargo, el uso de inhibidores como la Wortmanina y el LY294002 (Los cuales bloquean la señal de la PI3K en mamíferos), inhiben la activación de la proteína S6K en células en suspensión de *Arabidopsis*, lo que indica que la señalización a través de la PI3K podría estar conservada (Turck *et al.*, 2004). La generación de fosfoinosítidos en la membrana celular recluta a proteínas que tienen dominios de unión a este tipo de lípidos, una de ellas es la proteína PDK1. En plantas, esta cinasa se puede unir a dos

principales tipos de lípidos, PIP2 y ácido fosfatídico. Los sustratos reportados para PDK1 en mamíferos pertenecen principalmente a la familia de cinasas AGC, entre las cuales se encuentran varias isoformas de proteínas cinasas Bs (PKBs), isoformas de la proteína cinasa C (PKC) y S6K. Sin embargo, solo las dos últimas se encuentran presentes en plantas (Bögge *et al.*, 2003). Por lo que los mecanismos de regulación río abajo de PDK1 se desconocen, ya que en plantas no se ha reportado la presencia de las proteínas PKB/Akt, su blanco TSC2 y la pequeña GTPasa Rheb.

2.2.2. Reguladores río abajo en la vía de señalización de TOR en plantas.

Los blancos principales de TOR en mamíferos son las proteínas 4EBP1 y la S6K. La primera no está presente en plantas, por lo que la regulación de la traducción cap-dependiente se lleva a cabo con mecanismos desconocidos hasta ahora. Sin embargo, se han encontrado dos isoformas del factor de inicio de la traducción 4E (eIF4E y eIFiso4E), ambos factores parecen estar involucrados en la selección de mRNAs (Browning, 2004). Además, se ha encontrado en *Arabidopsis* una proteína de unión a la estructura cap diferente a las isoformas de eIF4E denominada nCBP (Ruud *et al.*, 1998). No obstante, no se conocen las implicaciones de este tipo de proteína en la regulación de la traducción cap-dependiente.

2.2.2.1. S6K en plantas.

Dentro del genoma de *Arabidopsis* se encontraron dos genes homólogos para S6K, estos genes identificados como *AtS6K1* y *AtS6K2*, los productos de estos genes tienen una identidad de alrededor del 80% entre ellos y similitud de alrededor de 70% con la isoforma p70^{S6K1} de mamíferos (Zhang *et al.*, 1994. Turk *et al.*, 1998). Estos genes codifican para las proteínas *AtS6K1* y *AtS6K2*, las cuales carecen de dominios auto-inhibitorios en la región carboxilo-terminal. Sin embargo, los tres sitios de fosforilación importantes para la activación de S6K de mamíferos se encuentran conservados tanto en *AtS6K1* como *AtS6K2*. No obstante, se identificó a la proteína *AtS6K2* como el ortólogo funcional de la

isoforma p70^{S6K} de mamíferos (Turck *et al.*, 1998). Las mutantes hemicigotas de estos genes producen una inestabilidad fenotípica, generando variaciones en el tamaño, en la ramificación de los tricomas y un gran número de semillas abortadas. Además, se determinó una nueva función de S6K como represor de la proliferación celular e incluso es requerida para la estabilización de los cromosomas y los niveles de ploidía (Henriques *et al.*, 2010). Estos datos nos indican la importancia de la S6K tanto para el crecimiento vegetal como para diferentes aspectos del desarrollo de las plantas.

La vía de señalización involucrada en la activación de S6K parece estar conservada en plantas, sin embargo, la evidencia al respecto es escasa. En mamíferos, la activación de S6K1 se ve incrementada en respuesta a mitógenos (Dufner & Thomas, 1999). De manera similar, en células en suspensión de *Arabidopsis* que son llevadas a un estado estacionario de crecimiento, al agregar medio fresco se ve incrementado el índice mitótico que se ve acompañado por un incremento en la activación de S6K. Esta activación resultó ser, en gran medida, debido a la presencia de fitohormonas como las auxinas y las citocininas. Además, el uso de inhibidores de PI3K de mamíferos (wortmanina y LY294002), mostraron una inhibición en la activación de S6K en *Arabidopsis*. Lo anterior sugiere que esta activación es debido a la presencia de una cinasa dependiente de lípidos (Turck *et al.*, 2004).

Se ha reportado además que las auxinas inducen la activación de la S6K de maíz. Los ejes embrionarios de maíz estimulados con la auxina natural ácido indol-3-acético (AIA), así como auxinas sintéticas como dicamba y ácido α -naftalen-acético (ANA), mostraron un incremento en la síntesis de proteínas ribosomales de manera selectiva. También se observó un aumento en la fosforilación de la proteína S6rp, que correlacionó con un aumento en el reclutamiento de 5'TOP mRNAs a los polisomas. Estos datos indican que las auxinas participan en la activación de la vía de señalización TOR en maíz y que de esta manera este tipo de fitohormonas regula de manera específica la síntesis de cierto tipo de proteínas (Beltrán-Peña *et al.*, 2002). Adicionalmente, en maíz se

realizó la caracterización funcional de la S6K. En donde se identificó que la cinasa de 62KDa (ZmS6K) tenía actividad tanto *in vivo* como *in vitro* y que su activación estaba dada por fosforilaciones en residuos serina/treonina. Durante la germinación se observó un incremento en la activación de ZmS6K de manera dependiente de TOR, ya que (a diferencia de *Arabidopsis*) la rapamicina inhibe dicha activación (Reyes de la Cruz *et al.*, 2004).

Los datos anteriores nos indican que la vía de señalización en plantas se encuentra conservada en parte. Sin embargo, existen preguntas por responder acerca de los eslabones río arriba de TOR. Así como los mecanismos de regulación involucrados. Sabemos entonces que las fitohormonas (que son reguladores del crecimiento y desarrollo vegetal) activan la proteína S6K, que esta activación río arriba podría ser por una señalización a través de una cinasa dependiente de lípidos como la PI3K y que río abajo inducen la síntesis específica de proteínas. Sin embargo existen en plantas una gran variedad de compuestos reguladores del crecimiento y desarrollo vegetal, tal es el caso de fragmentos de pared celular denominados oligogalacturonidos (OGs).

2.3. OGs UNA CONEXIÓN ENTRE DEFENSA Y DESARROLLO.

Actualmente se considera a la pared celular como una estructura dinámica involucrada en aspectos cruciales del desarrollo vegetal. Esta estructura celular es fundamental en procesos como la división celular, el crecimiento y diferenciación. Por lo que la pared celular juega un papel crucial en el tamaño, forma y velocidad de crecimiento de los órganos vegetales (Somerville *et al.*, 2004. Humphrey *et al.*, 2007).

La pared celular es una red compleja de polímeros constituida principalmente de celulosa, hemicelulosa y pectina (Figura 4). La celulosa es el más abundante y está compuesta por monómeros de glucosa unidos mediante enlaces β 1-4. La hemicelulosa por otra parte, está formada por monómeros de varios tipos de azúcares como la D-xilosa, D-galactosa, D-manosa, L-arabinosa y L-ramnosa (Humphrey *et al.*, 2007). La pectina representa alrededor de un 30% de

la pared celular y sus principales componentes son tres: homogalacturonanos (HGs), ramnogalacturonano-I (RG-I) y ramnogalacturonanos-II (RG-II). Los HGs están formados en su totalidad por residuos de ácido D-galacturónico en enlaces α 1-4, por lo que su estructura es lineal. Cabe mencionar que los fragmentos que son capaces de inducir una respuesta de defensa ante el ataque de un patógeno así como modular el crecimiento y desarrollo vegetal, provienen de HGs (Ridley *et al.*, 2001).

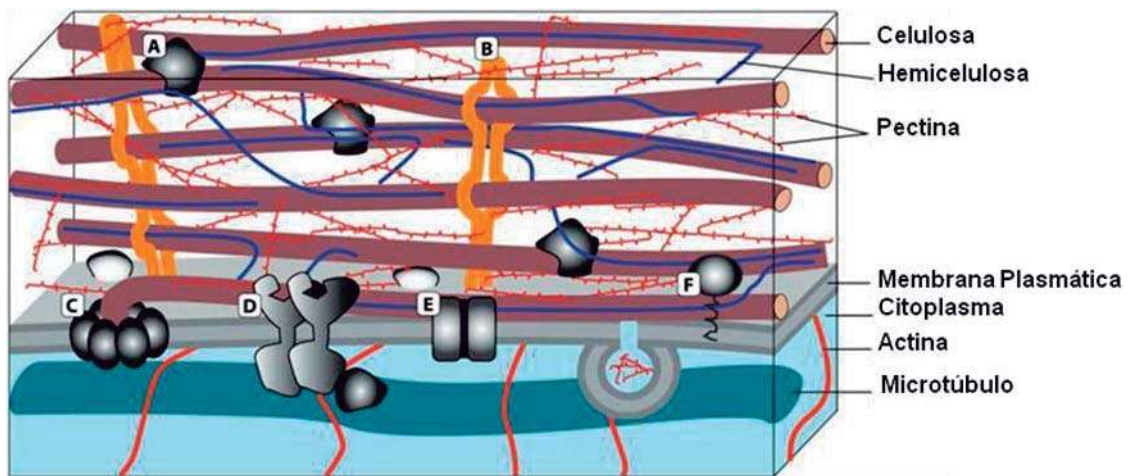


Figura 4. Estructura de la pared celular. La pared está formada por filamentos de celulosa y de hemicelulosa que se entrelazan con una matriz de pectina. Además podemos encontrar proteínas como: A, Expansinas. B, Extensinas. En la membrana celular hay proteínas que interactúan directamente con la pared como son: C, complejo de la celulosa sintetasa. D, Receptores tipo cinasa. E, canales iónicos. F, proteínas ancladas a fosfoinosítidos (Tomada de Humphrey *et al.*, 2007).

2.3.1. OGs en los mecanismos de defensa.

Cualquier organismo patógeno, como hongos o bacterias, que ataca a una planta se enfrenta a la pared celular como primera barrera de defensa. Por lo que entran en acción enzimas como las pectatoliasas, las cuales degradan la pectina y generan OGs (Cote & Hahn, 1994. Mattei *et al.*, 2005).

La interacción planta-patógeno desencadena una lucha que involucra la síntesis de enzimas degradadoras de la pared así como proteínas inhibitoras de dichas enzimas (Bergmann *et al.*, 1994). Una vez que se percibe la presencia de

OGs se dispara una cascada de señalización que deriva en la activación de genes relacionados con defensa. Por otro lado, se ha observado que los OGs inducen la síntesis de fitoalexinas (Hahn *et al.*, 1981. Nothnagel *et al.*, 1983. Flores *et al.*, 2004). Además, se ha reportado que inhiben la respuesta hipersensible e incrementan las especies reactivas de oxígeno (Baker *et al.*, 1990. Bellincampi *et al.*, 2000. Aziz *et al.*, 2004). Este tipo de respuestas son inducidas por un grupo de OGs de tamaños específicos, ya que se requiere que tengan de 10 a 15 residuos de ácido galacturónico (Cote & Hahn, 1994). Sin embargo se ha reportado que los OGs de pocos residuos de ácido galacturónico son capaces de inducir la expresión de genes relacionados en la síntesis de jasmonatos y aumentar la producción de etileno, dos fitohormonas relacionadas con mecanismos de defensa (Simpson *et al.*, 1998. Norman *et al.*, 1999). Esta interacción de los OGs con diversas fitohormonas involucra además una relación de estos oligosacáridos con el desarrollo de la planta.

2.3.2. Los OGs en el crecimiento y desarrollo vegetal.

Con el fin de comprobar si los OGs afectan directamente el desarrollo de la planta, diversos grupos de investigación han aislado fragmentos de homogalacturónidos con grado de polimerización (GP) variable y probado su efecto sobre plantas silvestres sanas. Los resultados muestran que los OGs afectan el desarrollo de las plantas y que sólo aquellos del tamaño requerido para la síntesis de fitoalexinas (GP= 9 a 12) son eficaces para regular la morfogénesis de plántulas de tabaco (Eberhard *et al.*, 1989), inducir floración (Marfá *et al.*, 1991) e inhibir el crecimiento de la raíz (Bellincampi *et al.*, 1993) o para modificar la arquitectura de la raíz de *Phaseolus vulgaris* (Hernández-Mata *et al.*, 2006).

El papel de los OGs en los mecanismos de defensa, como ya se mencionó, es el de inducir la síntesis de moléculas antibióticas que afectan al agente infeccioso, este proceso puede llegar a ser muy demandante en cuanto a energía y recursos celulares se refiere, por lo que se dejaría en un estado de “reposo” al resto de las actividades celulares, incluida la síntesis de ribosomas. Este último efecto junto con una limitación de nutrientes, inducida por la competencia del

patógeno, provocaría una disminución en el tamaño celular y de la planta completa. Por lo tanto, la síntesis de fitoalexinas dependiente de la presencia del microorganismo dispararía la primera respuesta de la célula incrementando la síntesis de enzimas que participan en la producción de fitoalexinas (Ebel, 1986; Lamb *et al.*, 1989).

Algunos autores han propuesto que la acción de los OGs en cuanto a su participación en el desarrollo de la planta está dada por una interacción con reguladores del crecimiento como las auxinas, incluso han sugerido que su acción inhibitoria del crecimiento es a través de una inhibición competitiva de los OGs sobre la acción promotora del crecimiento por auxinas (Branca *et al.*, 1988. Bellicampi *et al.*, 1993). Sin embargo, esta propuesta no ha sido confirmada, no obstante, la interacción con auxinas u otras fitohormonas no parece una idea ilógica, ya que si estos fragmentos de pared regulan el crecimiento, su interacción con fitohormonas que regulan el crecimiento vegetal sería altamente probable. Simpson *et al.* en 1998 encontraron que los OGs de cadena corta (GP= 4 a 6) estimulaban la producción de etileno en plantas de tomate, infiriendo con ello que las repuestas de defensa están estrechamente relacionadas con la señalización por OGs.

Las hormonas relacionadas con defensa son: el etileno, el ácido jasmónico y el ácido salicílico, sin embargo, ellas también desempeñan otras funciones relacionadas con crecimiento y desarrollo. Además, es conocido que para la correcta señalización por reguladores de crecimiento debe existir una co-regulación con otros fitoreguladores, es decir, una fitohormona regula la biosíntesis de otra o en su defecto la inhibe (Benkova y Hejatko 2009). El trabajo reciente de Hernández-Mata *et al.* (2009) en *Arabidopsis*, mostró que la producción de flavonoides por efecto de OGs, inhibe el transporte de auxinas, afectando con ello el crecimiento y disparando la síntesis de camalexina como respuesta de defensa.

III. JUSTIFICACIÓN.

La vía de señalización de TOR en maíz implica un aumento en la traducción, especialmente de biogénesis de ribosomas; con lo que se induce un crecimiento celular. Las auxinas que son moléculas reguladoras del crecimiento vegetal participan en la activación de la proteína S6K, reflejado en un aumento en la fosforilación de la S6rp. Por otro lado sabemos que los OGs (que son compuestos que también regulan el crecimiento y desarrollo de las plántulas de maíz) tienen interacción con dichas auxinas. Por lo que es probable que exista una conexión entre los OGs y la vía de señalización de TOR.

IV. HIPÓTESIS.

Los oligogalacturonidos modulan el crecimiento y desarrollo a través de la activación de la S6K, componente de la ruta de transducción de señales de la proteína TOR.

V. OBJETIVO GENERAL.

Determinar si los OGs interfieren con el crecimiento y desarrollo de plántulas de maíz a través de la proteína S6K.

Objetivos particulares.

1. Analizar el efecto de los OGs y el AIA sobre el crecimiento de plántulas de maíz.
2. Determinar el estado de fosforilación de la proteína S6K en plántulas de maíz tratadas con OGs, AIA y Rapamicina.

VI. METODOLOGÍA.

Material biológico.

Para todos los experimentos se utilizaron plántulas de maíz (*Zea mays* L. cv. Chalqueño). Las semillas fueron desinfectadas utilizando etanol al 70% por 5 minutos y colocadas en camas de algodón humedecidas con agua desionizada estéril para su germinación (24 hrs. a 25 ± 2 °C en oscuridad). Una vez transcurrido este periodo, los ejes embrionarios fueron disectados manualmente para ser colocados en medio de Murashige-Skoog (Murashige & Skoog, 1962).

Reguladores del crecimiento y reactivos.

Los OGs se obtuvieron a partir de hidrólisis enzimática de pared celular extraída de hipocótilos de *Phaseolus vulgaris* cv " flor de mayo", las plantas se obtuvieron de semillas germinadas en macetas con tierra estéril y crecidas en invernadero. Los hipocótilos fueron recolectados cuando el primer par de hojas verdaderas emergió, estos se congelaron en N₂ líquido y almacenados a -70° C. la pared celular se preparó a partir de 35 g de hipocótilos pulverizados finamente en N₂ líquido, el polvo se resuspendió en 500 ml de Na₂HPO₄ 0.5 M pH 7.0 (por duplicado). La suspensión se centrifugó a 10, 000 rpm por 15 minutos a 4° C. el precipitado se lavó dos veces con la solución de fosfato ácido de sodio con tres lavados posteriores con agua desionizada. La pastilla fue resuspendida en 500 ml de etanol previamente calentado con agitación constante por 1 hr, posteriormente se filtró mediante vacío usando papel Wathmann #3. El residuo sólido se resuspendió en etanol con lavados posteriores con 500 ml de mezcla cloroformo-metanol (1:1 v/v) y con 500 ml de acetona usando vacío para descartar los disolventes. La pared se dejó secar en estufa a 37° C para su posterior uso.

Los OGs se obtuvieron a partir de 0.30g de pared celular disuelta en 35 ml de amortiguador de acetato de sodio 50 mM pH 4.0 y 24.5 unidades de pectinasa de *Rhizopus sp* (Sigma). La mezcla se agitó por un minuto con varilla de vidrio, se pasó a un baño maría previamente calentado a 25°C para agitación constante

(100 rpm) por una hora. La muestra se filtró mediante vacío usando papel Wathmann #3, la solución obtenida se hirvió por 5 minutos y se centrifugó por 5 minutos a 5000 rpm. El sobrenadante se redujo a 1 ml mediante vacío a 40°C, una vez reducido se colocó en la columna cromatográfica (1 x 132cm) de Bio-Gel P6 (Bio-Rad) previamente equilibrada con agua desionizada. La muestra se eluyó con agua desionizada. Se colectaron fracciones de 2 ml a partir de las cuales se determinó el contenido de ácidos urónicos totales espectrofotométricamente ($\lambda=525\text{nm}$) en una mezcla de reacción de tetraborato de sodio y carbazol (Davidson, 1966). Mediante este método se identificaron cuatro (I, II, III y IV) diferentes fracciones con lectura positivas de presencia de ácidos urónicos, se tomó la fracción III (Cano *et al.*, 1995), para una posterior purificación por medio de una columna cromatográfica (0.7 x 228 cm) de Bio-Gel P4 (Bio-Rad) previamente calibrada con agua desionizada. La muestra se colectó en fracciones de 2 ml, la cuantificación se realizó por triplicado usando 25 μl de muestra eluída, 2.5 ml de tetraborato de sodio, 100 μl de carbazol y 475 μl de agua. La mezcla se hirvió por 20min y se leyó a 525 nm. El valor se multiplicó por el factor de dilución (20) y el factor de conversión (93.64), se promedió el valor obtenido de cada una de las replicas para obtener la concentración final de ácidos urónicos en la mezcla (1360.2146 $\mu\text{g/ml}$).

Se prepararon 20 ml de ácido indol-3-acético 6 μM obtenido comercialmente (Sigma), en alícuotas de 1 ml. La Rapamicina se disolvió en metanol (10 μM), y se separó en alícuotas de 50 μl . El resto de los reactivos de grado analítico se obtuvieron de Sigma o Bio-Rad.

Cinéticas de crecimiento.

Se preparó medio basal MS [sales de acuerdo a Murashige y Skoog (1966), 26 mM de glicina, 55 mM de *myo*-inositol, 4 mM de ácido nicotínico, 24 mM de piridoxal, 3 mM de tiamina, 87.6 mM de sacarosa y 7.5 g de agar por litro de medio] mas las diferentes concentraciones tanto de OGs como de AIA (Tabla I).

La concentración de rapamicina usada fue la reportada con efectos inhibitorios en la activación de S6K de maíz de 100 mM (Reyes de la Cruz *et al.*, 2004). Se colocaron 5 ml de este medio con los diferentes tratamientos, en tubos de 20 x 150 mm en condiciones estériles.

OGs	AIA
0.017ng/ml	$1 \times 10^{-12} \text{M}$
0.17ng/ml	$1 \times 10^{-11} \text{M}$
1.7ng/ml	$1 \times 10^{-10} \text{M}$
17ng/ml	$1 \times 10^{-9} \text{M}$
170ng/ml	$1 \times 10^{-8} \text{M}$
1700ng/ml	$1 \times 10^{-7} \text{M}$

Tabla I. Tratamientos de OGs y AIA. Las plantas tratadas fueron monitoreadas al 3°, 5°, 7° y décimo día de tratamiento.

Los ejes embrionarios se desinfectaron con NaClO comercial (cloralex) al 50% en agua por 10 minutos, se lavaron tres veces con agua desionizada estéril. Se sembró un eje por tubo colocando la radícula dentro del medio, dejando únicamente la punta del coleóptilo sobresaliendo de este. Las condiciones de crecimiento fueron a $25 \pm 2^\circ \text{C}$ en obscuridad por 10 días. Se usaron 10 tubos por concentración con al menos tres replicas por experimento. Al término del tratamiento se midió la longitud del coleóptilo y la longitud de la raíz primaria, a la cual también se le contaron el número de raíces laterales formadas.

Western blot.

Una vez teniendo las plantas a los diez días de tratamiento y analizado los parámetros mencionados, se trituró el tejido vegetal y se agregó un amortiguador de extracción preparado al instante [50 mM HEPES (pH 7.6), 50 mM Na₄P₂O₇, 1 mM Na₂VO₄, 1 mM Na₂MoO₄, 4 mM EDTA, 20 mM EGTA, 20 mM NaF, 80 mM β-glicerofosfato, 200 mM manitol, 2 mM DTT, 0.2 mM PMSF, 1 mM benzamidina]. El homogenizado se centrifugó a 9000 g por 30min a 4° C, el sobrenadante (extracto crudo) se separó y se analizó al instante o cuando fue necesario, se almacenó a -70° C. Se realizó la cuantificación de proteína por el método de Bradford (Bradford, 1976). Cantidades iguales de extracto crudo (50 µg de proteína) se resolvieron por electroforesis bidimensional de acuerdo al procedimiento de O'Farrell (O'Farrell, 1975), usando un gradiente de pH de 3.5-10 amplificado de 6 a 8 y geles de SDS-poliacrilamida al 12%. Estos geles se transfirieron a una membrana de PVDF (Millipore) para incubar con el anticuerpo primario, anti-p70^{S6K} de humano (Santa Cruz Biotechnology). El revelado se realizó bajo las mismas condiciones de tiempo de exposición.

Análisis estadístico.

Para los experimentos de crecimiento en tubo, se usaron 10 tubos por concentración con al menos tres replicas por experimento. Las graficas representan el promedio ± el error estándar. Para determinar diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) entre tratamientos, se realizó un análisis de varianza de dos vías (ANOVA), seguido por la prueba post-hoc de Tukey, usando el programa Graphpad prism (GraphPad Software Inc. USA).

VII. RESULTADOS.

7.1. Análisis de diferentes concentraciones de OGs sobre el crecimiento y desarrollo de plántulas de maíz.

Para observar el efecto de los OGs sobre el crecimiento de las plántulas de maíz, se probaron una serie de concentraciones que fueron en el rango de 0.017 ng/ml a 1700 ng/ml (Tabla I). Como parámetro principal se usó la medición del coleóptilo de las plántulas, donde se observó un claro efecto inhibitorio sobre el crecimiento en todas las concentraciones comparadas con las plántulas control, siendo la de 1700 ng/ml la que presentó un efecto más evidente (Figura 5).

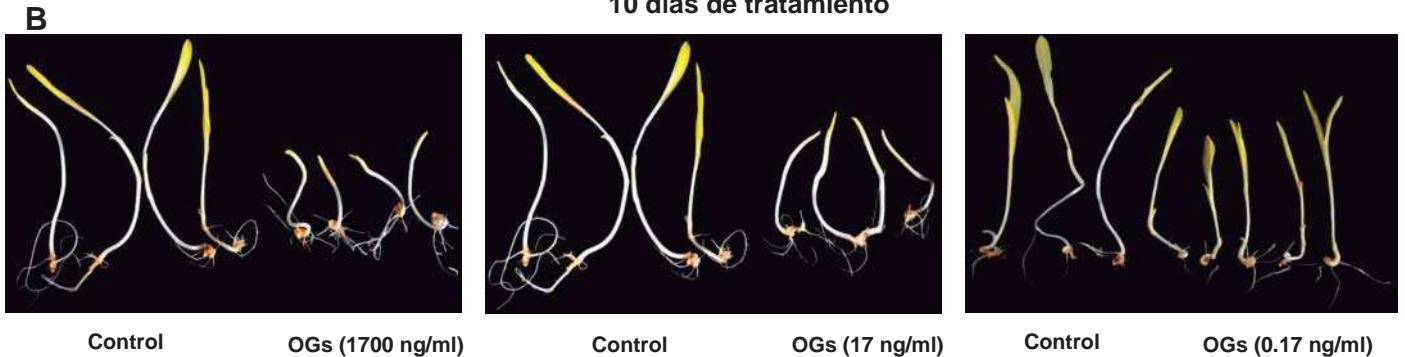
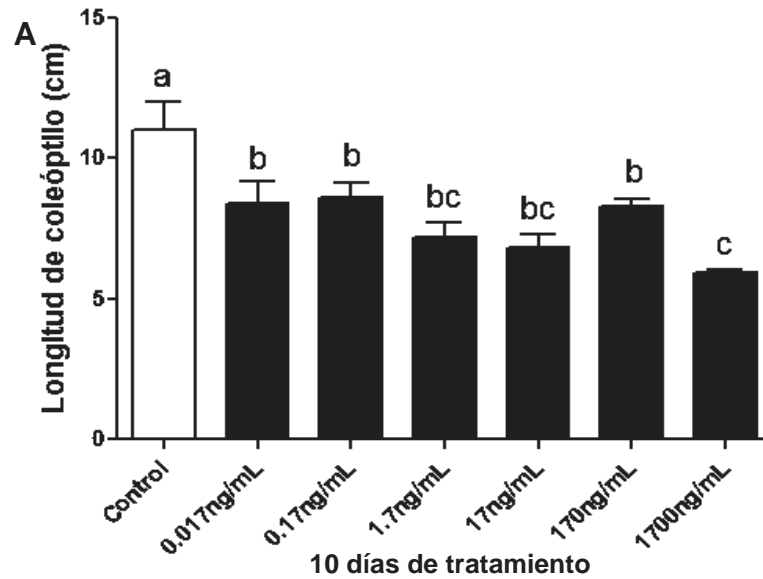


Figura 5. Efecto de OGs sobre coleóptilo. Se germinaron semillas de maíz por 24 hrs a 25 ± 2 °C en camas de algodón humedecido con agua desionizada. Tiempo transcurrido, se extrajeron los ejes embrionarios y se colocaron en tubos con medio MS con las concentraciones señaladas de OGs. A los 10 días se midió el coleóptilo (A) y se tomó la fotografía (B). Las barras muestran el promedio \pm el error estándar, n=30.

Por otro lado, los OGs también son capaces de modificar la arquitectura de la raíz de las plántulas de maíz, ya que al analizar la arquitectura de la raíz primaria, se encontró que las concentraciones de 0.017, 0.17, 1.7 y 1700 ng/ml son inhibitorias sobre el crecimiento de dicho órgano (Figura 6A). Además, las concentraciones de 1.7 y 1700 ng/ml fueron capaces de inducir la formación de raíces laterales (Figura 6B), este efecto es más claro al graficar la densidad de raíces laterales ya que muestra el número de raíces laterales por cm² de raíz principal (Figura 6C).

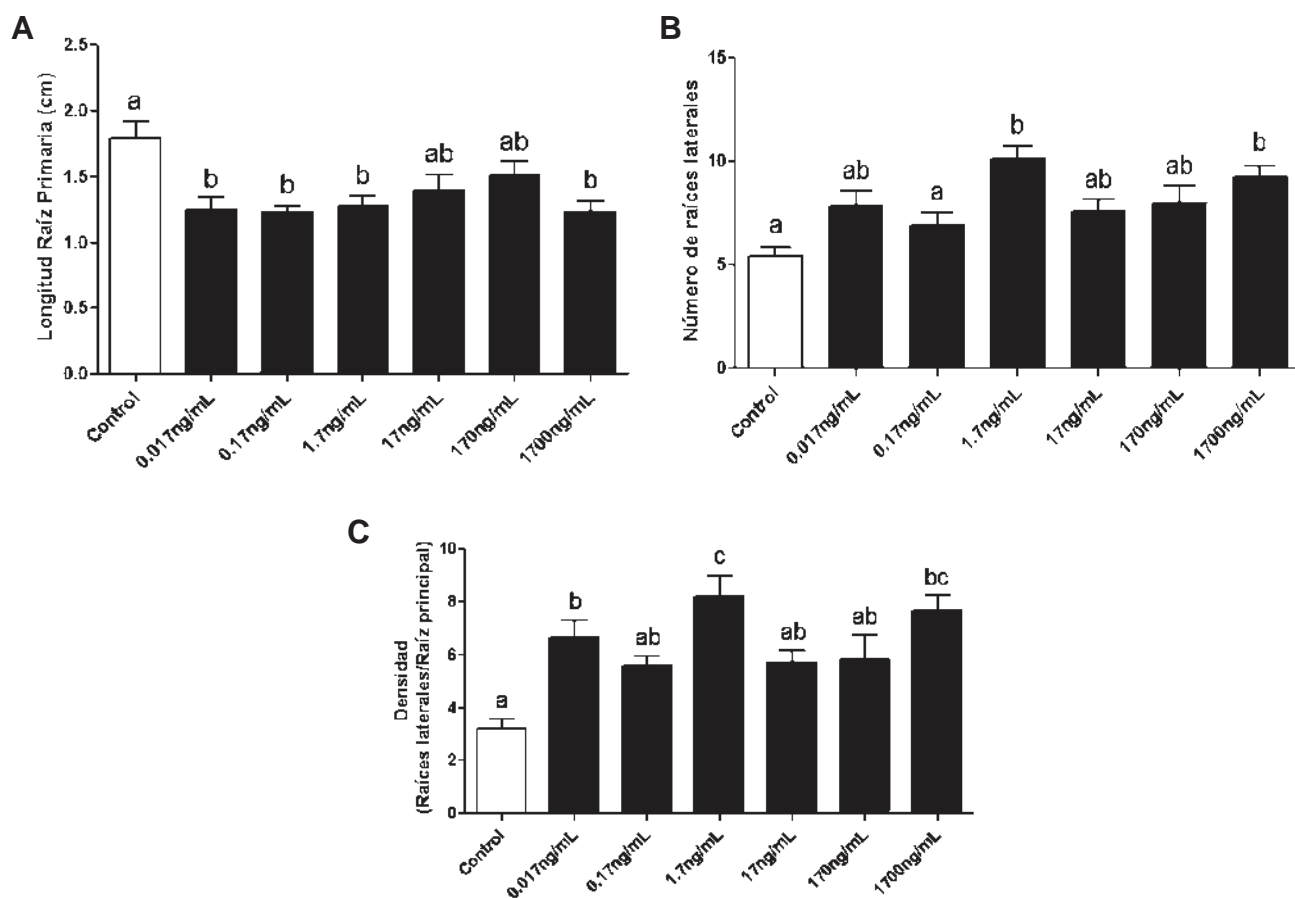


Figura 6. Efecto de OGs sobre arquitectura de la raíz principal. A las plántulas del experimento de la figura 5 se les midió además (A) la longitud de la raíz primaria y (B) el número de raíces laterales en respuesta a las diferentes concentraciones de OGs. (C) La densidad de raíces laterales se mide tomando el número de raíces por cm² de raíz primaria. Las barras muestran el promedio \pm el error estándar, n=30.

En base principalmente a los resultados sobre el crecimiento del coleóptilo se eligió la concentración de 1700 ng/ml de OGs para posteriores experimentos,

ya que si bien, estadísticamente el efecto es igual a le de 1.7 y 17 ng/ml, de manera evidente, presento una mayor inhibición en el crecimiento. Además, inhibió el crecimiento de la raíz primaria e indujo la formación de raíces laterales.

Estos resultados muestran que las concentraciones de 1.7 y 1700 ng/ml regulan el crecimiento y desarrollo de la raíz primaria de manera similar a lo reportado en *Arabidopsis* (Hernández *et al.*, 2010). Por otro lado en las plántulas de maíz podemos observar además un efecto inhibitorio de la parte a área de la planta, lo que indica que los OGs inhiben el crecimiento vegetal, pero inducen procesos del desarrollo al inducir la formación de raíces laterales.

7.2. Análisis de diferentes concentraciones de AIA sobre el crecimiento y desarrollo de plántulas de maíz.

Como ya se ha establecido, existe una interacción entre los OGs y las auxinas. Por esta razón iniciamos la búsqueda de una concentración de efectos antagónicos por parte del AIA en comparación con los de OGs. Las concentraciones probadas fueron de $1 \times 10^{-12} \text{M}$ a $1 \times 10^{-7} \text{M}$ (Tabla I). Se puede observar una respuesta dependiente de la dosis, ya que conforme las concentraciones aumentan el crecimiento del coleóptilo disminuye. Si bien no se encontró una concentración promotora del crecimiento, la de $1 \times 10^{-12} \text{M}$ no inhibió el crecimiento (Figura 7).

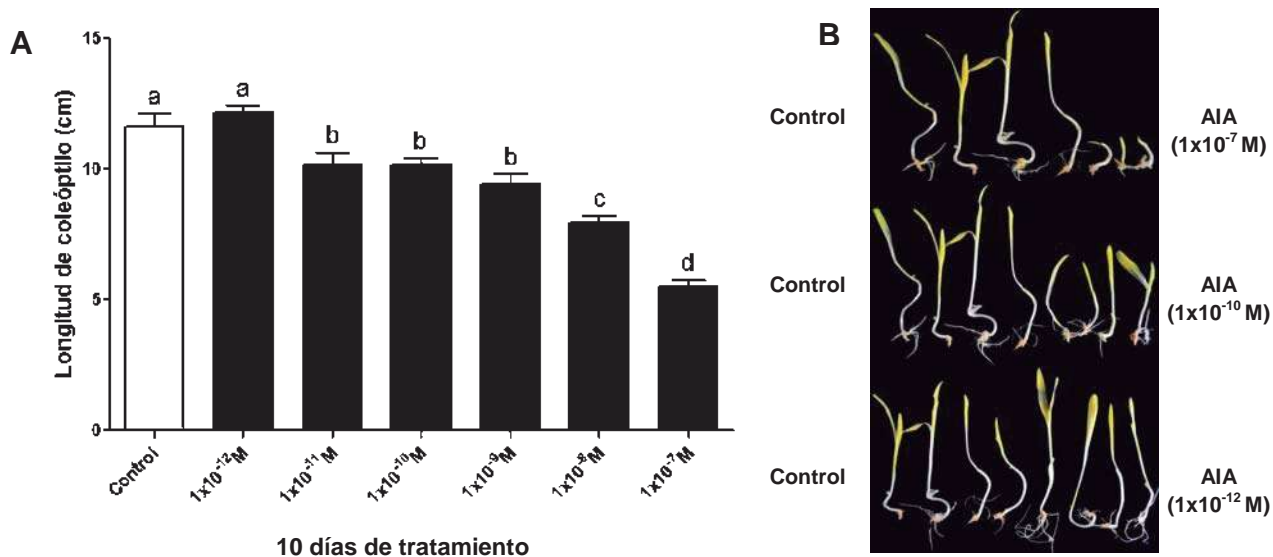


Figura 7. Efecto del AIA sobre el coleóptilo. Se germinaron semillas de maíz por 24 hrs a 25 ± 2 °C en camas de algodón humedecido con agua desionizada. Tiempo transcurrido, se extrajeron los ejes embrionarios y se colocaron en tubos con medio MS con las concentraciones señaladas de AIA. A los 10 días se midió el coleóptilo (**A**) y se tomó la fotografía (**B**). Las barras muestran el promedio \pm el error estándar, n=30.

Esta auxina también mostró actividad al modular la arquitectura de la raíz primaria. Las concentraciones más altas (1×10^{-8} M y 1×10^{-7} M) fueron capaces de inhibir el crecimiento de la raíz primaria (Figura 8A). En cuanto a la formación de raíces laterales, la concentración más baja (1×10^{-12} M) promovió la formación de raíces laterales comparado con el control, en tanto que a concentraciones más altas (1×10^{-8} M y 1×10^{-7} M) se observó una inhibición en la formación de este tipo de raíces (Figura 8B). Estas últimas concentraciones inhibieron el crecimiento general de la planta además de reprimir el desarrollo. Por otro lado, debido a que la concentración de 1×10^{-12} M no mostró efectos inhibitorios sobre el crecimiento y sin embargo si indujo la formación de raíces laterales, se decidió usar esta concentración en experimentos posteriores.

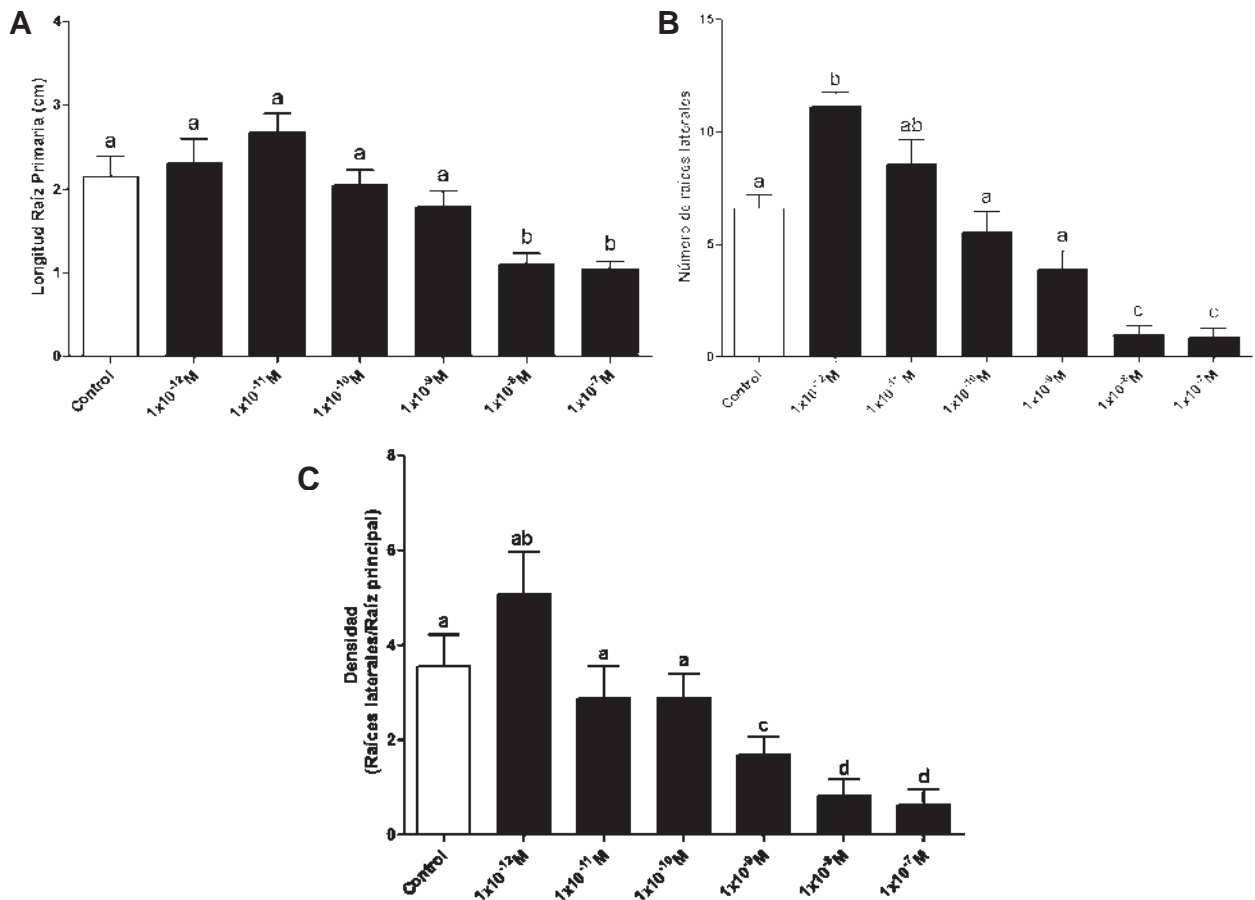


Figura 8. Participación del AIA en la arquitectura de la raíz. A las plántulas del experimento de la figura 7 se les midió además (A) la longitud de de la raíz primaria y (B) el número de raíces laterales en respuesta a las diferentes concentraciones de AIA. (C) La densidad de raíces laterales se mide tomando el número de raíces por cm^2 de raíz primaria. Las barras muestran el promedio \pm el error estándar, $n=30$.

Se ha establecido que tanto en plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas se encuentran conservados los mecanismos de síntesis, transporte, y transducción de señales de las auxinas, no obstante, existen diferencias en el número de copias de los genes involucrados en dichos procesos y de la expresión de estos genes. Esto hace que existan diferencias en la respuesta a auxinas entre plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas (McSteen, 2010). Sin embargo, no existen reportes en los cuales diferentes concentraciones de auxinas sean

estudiadas con respecto a la respuesta en el crecimiento de plantas etioladas de maíz. Nuestros resultados muestran una respuesta diferente a aquellas reportadas para *Arabidopsis*, ya que se ha observado que concentraciones nano-molares ($1 \times 10^{-9} \text{M}$) modifican la arquitectura de la raíz inhibiendo el crecimiento de la raíz primaria e induciendo la formación de raíces laterales y adventicias (Woodward & Bartel, 2005). En este trabajo a esas concentraciones no se observan diferencias significativas con respecto al control, ya fuera en coleóptilo, raíz primaria o formación de raíces laterales. Las concentraciones más altas usadas aquí inhibieron de manera global el crecimiento de la plántula, sin embargo $1 \times 10^{-7} \text{M}$ de AIA es capaz de inhibir la germinación de semillas de *Arabidopsis* (Woodward & Bartel, 2005). Se observó que la concentración de $1 \times 10^{-12} \text{M}$ no inhibió el crecimiento de la planta pero si indujo la formación de raíces laterales, indicando que la respuesta a auxinas es diferente en nuestro sistema. El hecho de que nuestras plantas se encuentren etioladas incluye otro factor importante a considerar, ya que en estas condiciones el crecimiento de la raíz primaria de plántulas de maíz se inhibe, en tanto que se induce la formación de raíces de corona y el crecimiento de las raíces seminales. Sin embargo, estos parámetros no fueron evaluados con respecto a la respuesta a auxinas.

7.3. Efecto de AIA, OGs y Rapamicina sobre el crecimiento y desarrollo de plántulas de maíz.

Una vez determinadas las concentraciones de OGs (1700 ng/ml) y AIA ($1 \times 10^{-12} \text{M}$) se procedió a realizar un experimento comparativo donde se usarán ambos compuestos a la vez para determinar si existía una interacción de estos dos reguladores del crecimiento vegetal. Se ha reportado que entre estos compuestos existe un antagonismo que se ve reflejado por el hecho de que las auxinas pueden revertir el efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los OGs dependiendo de la concentración de la auxina (Bellincampi et al, 1993. Reyes de la Cruz et al, 2002). Sin embargo, los resultados nos muestran que en el coleóptilo la concentración elegida para AIA, no es capaz de restablecer el efecto inhibitorio dado por los OGs (Figura 9A). Por otro lado, una concentración mayor podría potenciar el efecto inhibitorio y dado que no se encontró una concentración de AIA

promotora del crecimiento, es probable que para observar el efecto de reversión en la inhibición dado por OGs se necesitaría evaluar una concentración menor de estos últimos.

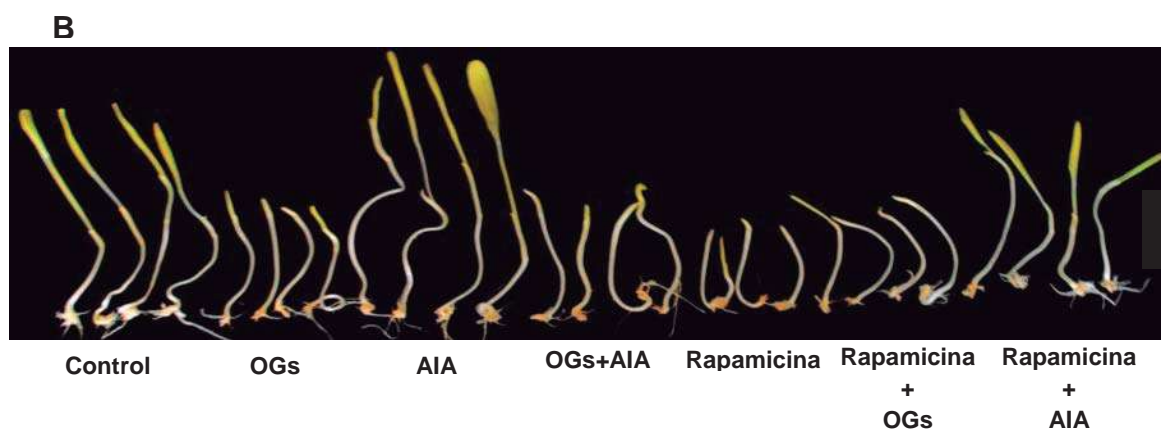
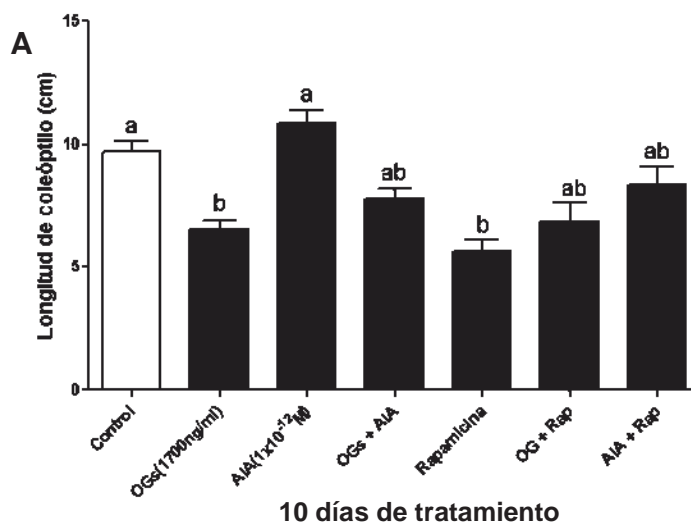


Figura 9. Respuesta a tratamientos combinados y rapamicina. Se germinaron semillas de maíz por 24 hrs a 25 ± 2 °C en camas de algodón humedecido con agua desionizada. Tiempo transcurrido, se extrajeron los ejes embrionarios y se colocaron en tubos con medio MS con los compuestos señalados. A los 10 días se midió el coleóptilo (**A**) y se tomó la fotografía (**B**). Las concentraciones usadas para OGs y AIA fueron las previamente determinadas (1700 ng/mL y 1×10^{-12} M, respectivamente), de la rapamicina se usó a la concentración (100 nM) inhibitoria de la activación de S6K de maíz (Reyes de la cruz *et al*, 2004). Las barras muestran el promedio \pm el error estándar, $n=30$.

Las plantas crecidas con rapamicina fueron significativamente más pequeñas que el control, esto probablemente se debió a que es un inhibidor específico de la proteína TOR, por lo que esta proteína está involucrada en la regulación del crecimiento de plantas etioladas de maíz. Lo que contrasta con la propuesta de que el crecimiento de los hipocótilos en plantas etioladas de *Arabidopsis* no es regulado por TOR (Deprost *et al*, 2007). Estos resultados son consistentes con el hecho de que el maíz se ha reportado como sensible a la rapamicina (Reyes de la Cruz *et al*, 2004). Al combinar los tratamientos de OGs y rapamicina no se observó un efecto aditivo en la inhibición del crecimiento de los coleóptilos, lo que podría indicar una posible interacción de OGs y la vía de señalización de la proteína TOR, ya que si el efecto inhibitorio sobre el crecimiento por parte de los OGs fuera por algún mecanismo independiente de TOR este se vería potenciado por el efecto de la rapamicina sobre el crecimiento. Finalmente, la combinación de AIA y rapamicina producen un efecto igualmente inhibitorio sobre el crecimiento lo que es consistente con que las auxinas interactúan con la vía de señalización (Beltrán-Peña *et al.*, 2002. Turk *et al.*, 2004). Si la rapamicina inhibe el crecimiento aun en presencia de auxinas, indica que es probable que las auxinas estén regulando el crecimiento de las plántulas etioladas a través de TOR.

Se evaluó además la arquitectura de la raíz primaria de las plántulas. De manera interesante, en este caso al combinar OGs y AIA si se observó una reversión de la inhibición del crecimiento de la raíz primaria dada por OGs, lo que indica que en la raíz la interacción entre estos compuestos es diferente que en el coleóptilo (Figura 10A). Al agregar rapamicina como tratamiento en el medio se observó una inhibición del crecimiento de la raíz (Figura 10A), lo que indica que TOR juega un papel importante en el crecimiento general de las plántulas de maíz. Al agregar OGs más la rapamicina no se observó el efecto aditivo que se podría esperar al agregar dos compuestos inhibidores del crecimiento (Figura 10A), lo que indica, como se mencionó anteriormente, una posible interacción entre estos derivados de pared celular y la vía de señalización de TOR. Por otro lado, al agregar AIA y rapamicina al medio se observó, de manera sorprendente, que no se presenta una inhibición del crecimiento por parte de la rapamicina (Figura 10A).

Esto nos indica que el AIA regula el crecimiento de la raíz primaria por medio de mecanismos que actúan de una manera independiente de la proteína TOR.

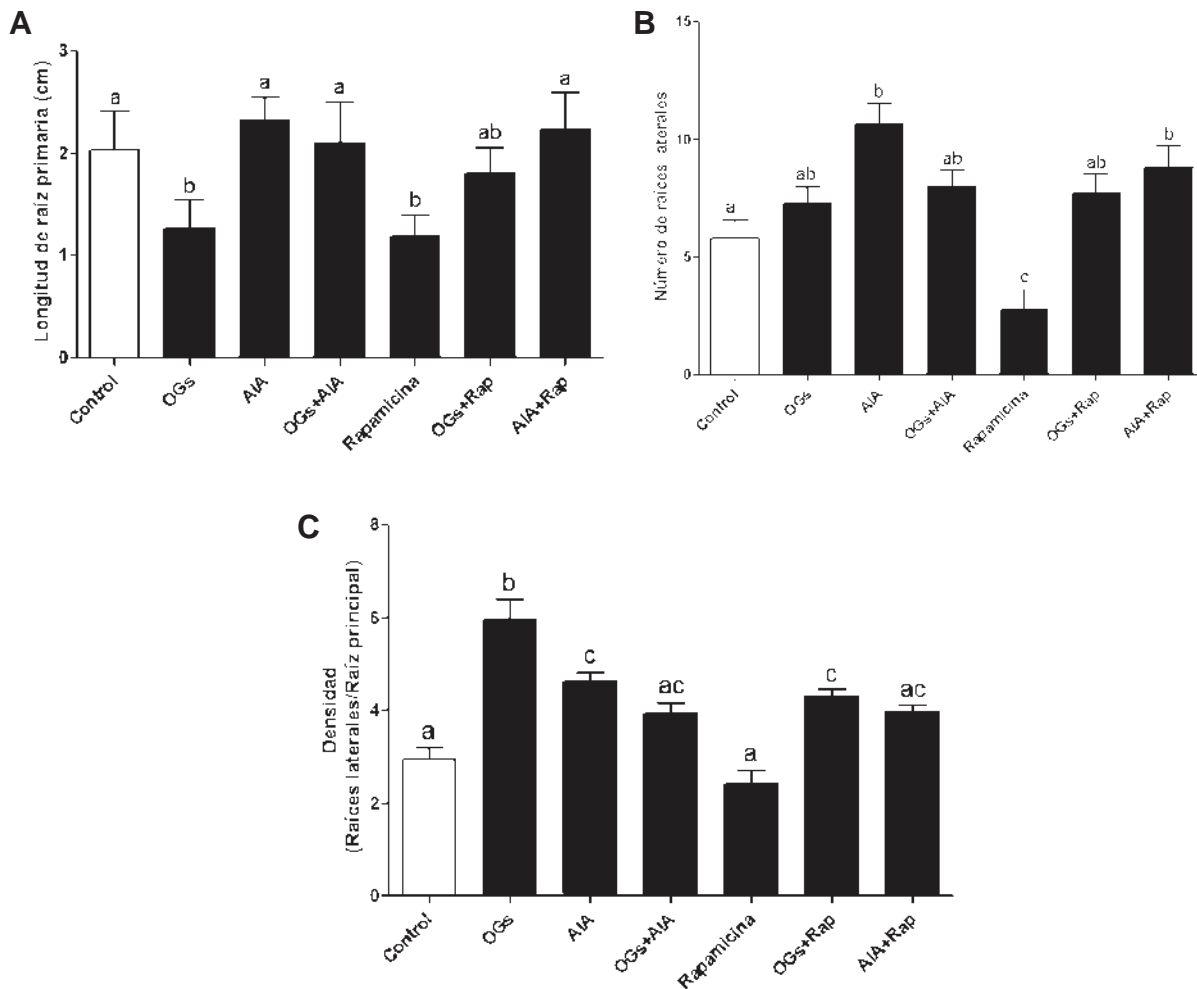


Figura 10. Arquitectura de la raíz primaria. A las plántulas del experimento de la figura 8 se les midió además (A) la longitud de de la raíz primaria y (B) el número de raíces laterales en respuesta a los diferentes tratamientos. (C) La densidad de raíces laterales se mide tomando el número de raíces por cm^2 de raíz primaria. Las barras muestran el promedio \pm el error estándar, $n=30$.

Como ya se había observado, tanto los OGs como el AIA indujeron la formación de raíces laterales. Sin embargo, al agregar ambos compuestos como tratamiento no se ve un efecto sumatorio (Figura 10B), esto podría ser resultado

de una saturación del sistema, es decir, no se pueden llegar a formar más raíces laterales que las observadas con los tratamientos individuales o podríamos estar viendo el efecto de uno solo de los componentes, ya que si observamos la densidad el grupo tratado con los dos compuestos es estadísticamente igual a las tratadas únicamente con AIA. La rapamicina no muestra un efecto claro sobre la formación de raíces laterales, ya que no se observa diferencias significativas en la densidad con respecto al control (Figura 10C). Esto nos indica que la proteína TOR no es indispensable para algunos procesos de desarrollo vegetal como es la formación de raíces laterales. Lo cual se puede reafirmar al observar como los tratamientos combinados con OGs y AIA mostraron un comportamiento similar a cuando se añaden cada uno por separado sin la presencia de rapamicina. Es decir, solo se observa el efecto inductor de la formación de raíces laterales tanto de OGs y AIA (Figura 10C).

7.4. Análisis de la S6K de plántulas de maíz tratadas con los compuestos.

Para corroborar que los efectos observados sobre el crecimiento por parte de los OGs eran a través de la modulación de la vía de señalización de TOR, se realizó una electroforesis bidimensional del extracto crudo obtenido de las plantas a los 10 días de tratamiento. Posteriormente se realizó un western blot contra la proteína S6K mediante el uso de anticuerpos comerciales contra la p70^{S6K1} de mamíferos. Se pudo observar cómo en condiciones control se encuentran los niveles basales de activación de la proteína S6K, se presentan al menos 4 señales con movilidad electroforética hacia el ánodo (Figura 11). Es decir, que las isoformas de la proteína que se encuentran con un mayor desplazamiento hacia esta región se encuentran cargadas negativamente, lo que indica posibles estados de fosforilación de manera similar a lo reportado en ejes embrionarios de maíz (Reyes de la Cruz *et al*, 2004). En aquellas plantas tratadas con rapamicina la proteína presentó isoformas con desplazamiento electroforético hacia el cátodo (Figura 11). Esto podría indicar que estas isoformas se encuentran hipofosforiladas, indicando que podría existir una inactivación de la proteína S6K. Además se observó la desaparición de la señal con mayor desplazamiento hacia el ánodo lo que podría indicar una desaparición de alguna isoforma

hiperfosforilada o completamente activa. Estos resultados concuerdan con la disminución en el tamaño general de la planta, ya que la S6K se encontraría inactiva.

En el tratamiento con AIA, además de los cambios referentes a la carga, aparecen señales con cambios referentes a la masa, lo que indica posibles modificaciones post-traduccionales que pudieran jugar un papel importante en la regulación de la ruta. Además podemos observar cómo, al igual que en el control, las señales se encuentran desplazadas hacia el ánodo (Figura 11). Estos resultados indican que las isoformas se encuentran hiperfosforiladas y por lo tanto la S6K activa. Sin embargo, las plantas tratadas con AIA no son estadísticamente más grandes que los controles, esto podría ser debido a que las plántulas etioladas tengan un máximo de crecimiento en el coleóptilo y por este motivo el AIA no promueva el crecimiento. No obstante otra posibilidad sería que las plántulas fueran de alguna manera más robustas, es decir que el coleóptilo fuera más grueso, esto se podría evaluar tomando en consideración el peso fresco de las plantas y de esta manera ver si existen diferencias con el control.

En las plantas tratadas con AIA y rapamicina se observó una desaparición en las señales de mayor peso además de un incremento en las isoformas hipofosforiladas de la proteína (Figura 11), lo que indicaría una inactivación de la S6K. Si recordamos, en raíz el AIA era capaz de revertir el efecto inhibitorio de la rapamicina. No obstante, los resultados muestran una probable inactivación de la proteína, por lo que se requeriría una separación de órganos para el analizar los efectos fisiológicos observados ya que el western blot se realizó usando la planta completa.

Por otro lado, en aquellas plantas tratadas con OGs no se observa una disminución en el número de señales. Al contrario, aparecen nuevas isoformas hipofosforiladas probablemente inactivas en conjunto con una disminución en las señales de las isoformas hiperfosforiladas (Figura 11). Estos resultados concuerdan con la inhibición del crecimiento dado por los OGs. Estos compuestos, como se ha mencionado anteriormente, son conocidos principalmente por su

papel en los mecanismos de defensa. La planta al estar expuesta a ataques por patógenos ha desarrollado diversos mecanismos de protección, uno de ellos es la síntesis de fitoalexinas (Ebel, 1986). Para desencadenar este tipo de respuestas celulares la planta sigue el principio de máxima economía, por lo que detiene la biogénesis de ribosomas inactivando a la vía de señalización de TOR. Esto da como resultado una disminución en la producción de proteínas y por lo tanto una inhibición del crecimiento.

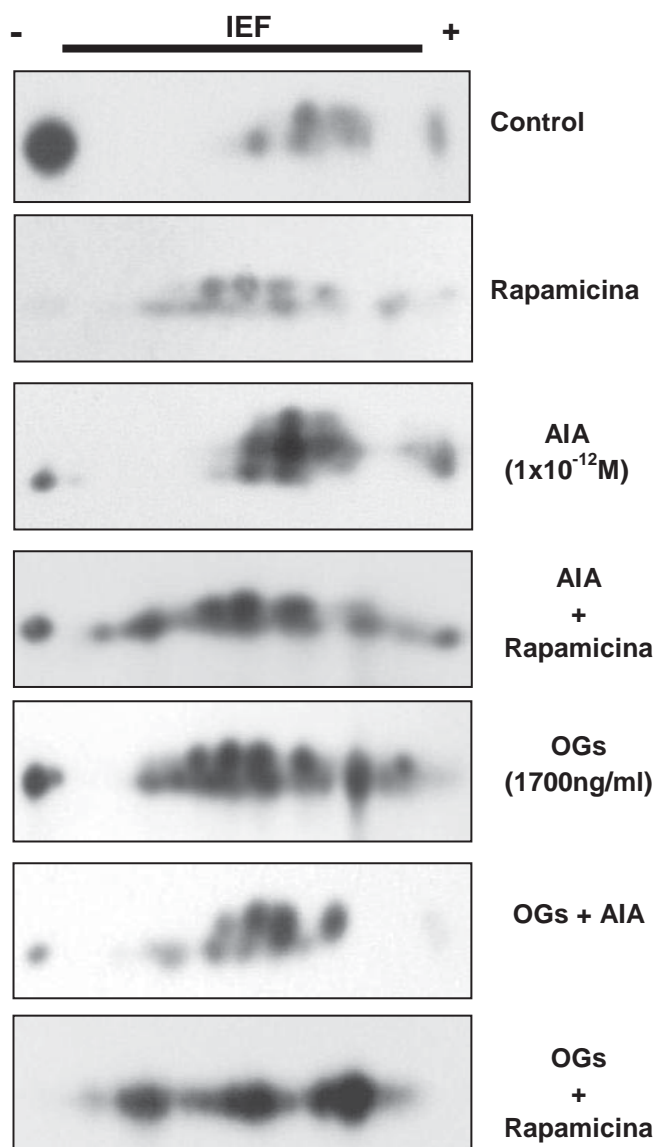


Figura 11. Activación de S6K. Se prepararon extractos crudos de las plantas tratadas por 10 días y se resolvieron por electroforesis bidimensional y Western blot.. Se utilizaron anticuerpos contra la p70^{S6K} de humano, originados en conejo a una dilución 1:1000. En los geles se cargaron 50 µg de proteína. Se muestra un experimento representativo de al menos 3.

Con el tratamiento combinado de OGs mas AIA se presentan señales muy similares a las del control, la diferencia es que en el tratamiento combinado se observó un mayor número de señales de isoformas de menor estado de fosforilación (Figura 11). Estos datos nos remarcan el hecho de que en todos los parámetros de crecimiento evaluados no existen diferencias significativas del tratamiento combinado con respecto al control, esto nos indica que de cierta manera existe una interacción de estos dos compuestos a nivel de la vía de señalización de TOR.

Cuando se agregan tanto OGs como rapamicina desaparecen las señales de mayor peso, indicando que esta modificaciones post-traduccionales podrían ser importantes para la señalización de la vía. Además, aparecieron señales correspondientes a las isoformas de menor estado de fosforilación (Figura 11). Estos resultados nos indican que si bien no se observaron efectos aditivos sobre la inhibición del crecimiento del coleóptilo y raíz primaria, en la proteína si se observó una probable inactivación mayor a la vista en los tratamientos por separado.

Estos resultados nos indican que la regulación de la vía de señalización de la proteína TOR es increíblemente plástica. Esto debido a que cada uno de los diferentes tratamientos, si bien en los parámetros medidos, no mostraron diferencias significativas en algunos casos con respecto al control, si modularon la actuación de la S6K de maneras diferentes en cada uno de los caso. Esto también nos refiere a la capacidad de las plantas para adecuarse al medio ambiente, ya que cada estímulo percibido podría ser capaz de modular a la proteína S6K.

Es interesante también el identificar cuáles de esas isoformas son activas y cuales inactivas. En mamíferos se requiere de una serie de fosforilaciones consecutivas y en un determinado orden para activar la S6K. Es decir, que esta cinasa en mamíferos, cuando se encuentra fosforilada en sus siete sitios descritos, es la que se encuentra completamente activa (Jastrzebski *et al.*, 2007). En plantas la S6K no presenta dominios auto-inhibitorios, los cuales pierden su función en mamíferos con las primeras fosforilaciones (Turk *et al.*, 1998). Es probable que en

plantas no necesariamente se requiera el total de fosforilaciones para tener una cinasa activa, ya que aquellas isoformas que tengan solo dos estados de fosforilación podrían ser las necesarias para tener la S6K activa. Sin embargo, no existen hasta el momento reportes acerca de esto.

7.5. Identificación *in silico* de posibles modificaciones post-traduccionales en S6K.

Se ha reportado que podrían existir posibles modificaciones post-traduccionales en la proteína S6K de maíz (Reyes de la Cruz *et al.*, 2004), además en este trabajo también se observaron isoformas de la proteína con cambios en la masa, que indicarian este tipo de modificaciones. Por esta razón se realizó un análisis *in silico* de la secuencia reportada por Reyes de la Cruz *et al.* en 2004 (no. Acceso: NP_001105237) para encontrar posibles sitios de modificaciones en la S6K de maíz, usando la herramienta Scanprosite de la base de datos PROSITE dentro del servidor EXPASY (Castro *et al.*, 2006).

Se encontraron siete posibles sitios para fosforilación (similares en posición y cantidad a las reportadas para mamíferos), cuatro para N-miristoilaciones y 4 más para N-glicosilaciones (Tabla II), cabe mencionar que no hay reportes de este tipo de modificaciones en esta proteína por lo que es probable que estas participen de alguna manera en la activación de la S6K.

Modificación Post-Traduccional	Secuencia Consenso	Posición
N-Miristoilación	GNamTE	138 – 143
	GScpGG	392 – 397
	GGghSN	458 – 463
	GGhsNF	459 – 464
N-Glicosilación	NRSH	85 – 88
	NTSE	173 – 176
	NHSE	192 – 195
	NASG	480 – 483
Fosforilación	S	72
	S	100
	S	133
	T	174
	T	205
	T	344
	S	423

MVSSQPSSLTAILAQQPNHCPVKILLPMGPPDVVSSDNVEYDFSDVFGSTPVQTPT
 NLCGFGPESPAPTAESNEEFYSDPVVIIINRSHSLVGPTSLVSRSLRLSKLSLGKNEG
 SSELVKCLSEEKEGDQGQLSDEDLGNAMTE DGGIGLDDLEILKLVGQGAFGKVFQ
 VRKKNTSEIYAMKVMRKDRILEKNHSEYMKAEREILTKVDHPPFIVQLRYSFQTKYRL
 YLVLD FINGGHLFFQLYKQGLFREELARIYTAIEIVSAVAHLHANGIMHRDLKPENILL
 DADGHAMLTDFGLAKEFCENTRSNSMCGTLEYMAPEIVLGRGHDKAADWWSVGI
 LLFEMLTIGKPPFVGNREKVQKIIKDKLKLPSFLSSEAHSLLRGLLHKEPNKRLGS
 CPGGSNEIKNHKWFKPINWRKLEARQIQPSFRPNVAGLTCIANFDDDECWTKTPVL
 DSPVSTPAGGGHSNFAGFTYVRPAPILEEVNASGSRLKD

Tabla II. Modificaciones post-traduccionales de S6K. Se analizó la secuencia completa del cDNA reportado por Reyes de la Cruz *et al* en 2004. En el panel de abajo se observan dentro de la secuencia los sitios probables, fosforilaciones (rojo), N-miristoilaciones (azul) y N-glicosilaciones (verde).

VIII. DISCUSIÓN.

Para determinar el efecto de los OGs sobre el crecimiento, fue necesario utilizar diferentes concentraciones de la mezcla obtenida en el proceso de purificación de los fragmentos de pared celular. Anteriormente a esta mezcla se le denominaba OGA₁₀ ya que se creía que el método de obtención daba como resultado una fracción de oligogalacturónidos de grado de polimerización de 10. Sin embargo, Hernández *et al.* (2010), establecieron que lo que se obtenía era una mezcla de OGs de grado de polimerización que variaba de los 6 a los 13. Dado que el procedimiento para la obtención de OGs usado en este trabajo es igual al reportado en ese trabajo, nosotros denominamos a nuestras fracciones como OGs. Las concentraciones usadas se manejan en ng/ml ya que el método de cuantificación determina los ácidos urónicos totales presentes en nuestra fracción.

Previamente Reyes de la Cruz *et al.* (2002), encontraron que el denominado OGA₁₀ inhibía el crecimiento de los ejes embrionarios de maíz a las 96 horas de tratamiento, usando una concentración de 4×10^{-7} M (680 ng/ml). No obstante, no se encontraron diferencias significativas con el control. Por esta razón nosotros tomamos como parámetro de referencia esta concentración para escoger las diferentes concentraciones usadas en este trabajo. Nosotros encontramos que todas las concentraciones presentaron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento del coleóptilo. Algo interesante fue que no se encontraron diferencias significativas entre las plantas con las concentraciones de OGs, esto podría ser por la mezcla de una amplia gama de grados de polimerización. Ya que se ha reportado que las respuestas a los OGs dependen tanto de su grado de polimerización como de su concentración. Sin embargo, la concentración de 1700 ng/ml presentó una inhibición del crecimiento más evidente. Por lo que decidimos continuar con esta concentración para determinar la participación de estos OGs sobre la vía.

En el mismo trabajo de Reyes de la Cruz *et al.* (2002) se propuso un papel antagónico de los OGS con el AIA. Ya que este último restableció la inhibición dada por OGs. Por lo que nosotros, tratando de encontrar una concentración de AIA que presentara las características opuestas a los OGs, realizamos un barrido de diferentes concentraciones de dicha auxina, en base a la concentración

reportada en ese trabajo. No obstante, no se encontró una concentración con las características mencionadas. Dentro del rango de concentraciones usado, las de mayor concentración (1×10^{-7} y 1×10^{-8} M) inhibieron el crecimiento de manera dramática, en tanto que las intermedias (1×10^{-9} , 1×10^{-10} y 1×10^{-11} M) lo inhibieron sutilmente, por lo que se podría describir como una respuesta dependiente de la dosis. Por otro lado, la concentración menor (1×10^{-12} M) no inhibió el crecimiento (Figura 7). Sin embargo, esta concentración si indujo la formación de raíces laterales, lo que indica que tiene un efecto sobre el desarrollo de la planta (Figura 8). Por esta razón decidimos utilizar esta concentración para analizar si existía una interacción con los OGs y de esta manera estos últimos inhibían el crecimiento del coleóptilo.

El restablecimiento de la inhibición dada por AIA sobre el efecto de los OGs, como reportaron Reyes de la Cruz *et al.* (2002), no se observó en el coleóptilo pero si en la raíz (Figura 10). Esto nos habla de la sensibilidad del tipo de órgano a las diferentes concentraciones de AIA, ya que en el coleóptilo 1×10^{-12} M no fue suficiente para restablecer la inhibición.

Para presentar un primer contacto con la vía de señalización por parte de los OGs, se uso el inhibidor rapamicina de la proteína TOR. Las plantas tratadas únicamente con este compuesto presentaron una inhibición general del crecimiento, esto sugiere un papel importante de la proteína TOR en la regulación del crecimiento de las plantas etioladas de maíz (Figura 9). Esto contrasta con lo reportado por Deprost *et al.* (2007) ya que ellos reportan que dicha cinasa no es requerida para la elongación de los hipocótilos de plantas etioladas de *Arabidopsis*. Esta diferencia sugiere una regulación diferencial entre los tipos de plantas.

La respuesta observada a los tratamientos combinados de OGs más rapamicina nos indican una posible conexión entre la inhibición del crecimiento inducida por OGs y la vía de señalización. Sin embargo, no se podría determinar si esta estaría mediada por algún proceso referente a la señalización por auxinas. Hernández *et al.* (2010) determinaron que los OGs inducen la acumulación de flavonoides que deriva una interferencia del transporte polar de auxinas. Este

hecho podría estar relacionado con la formación de raíces laterales inducida por OGs, sin embargo no se comprende cómo estos dos eventos podrían estar relacionados.

Finalmente para analizar directamente el papel de los OGs sobre la modulación de la vía de señalización de TOR, se realizaron los western blots de los extractos crudos resueltos por electroforesis bidimensional contra la proteína S6K (Figura 11). Los resultados nos muestran una clara regulación en la activación de esta proteína. Sin embargo, no podemos decir si las isoformas de la S6K hipofosforiladas se encuentran inactivas, ya que en plantas no se sabe como son los eventos de fosforilación para que la cinasa quede completamente activa. Por otro lado, encontramos diferencias en peso en diversas isoformas de la S6K, lo que indica posibles modificaciones post-traduccionales que al ser moduladas por los diversos tratamientos, nos habla de una posible participación en la actividad de esta proteína. Por lo tanto se realizó el análisis *in silico* de la secuencia para encontrar sitios putativos para sufrir algún tipo de modificación (Figura 12). Encontramos, que al igual que en mamíferos, están presentes siete probables sitios de fosforilación, sin embargo, no podríamos establecer cuáles de ellos son esenciales para la completa activación de la S6K. Se ha establecido que las N-miristoilaciones se llevan a cabo cuando el último aminoácido en la región del amino terminal es glicina (Mann & Jensen, 2003). Sin embargo, no se encontró ninguna secuencia consenso de este tipo cerca del amino terminal en la secuencia analizada, por lo que es poco probable que este tipo de modificación se lleve a cabo en la S6K de maíz. Por otro lado, las N-glicosilaciones se pueden realizar en cualquier lugar dentro de la secuencia de la proteína siempre y cuando se encuentre la asparagina en el contexto adecuado. Este tipo de modificaciones son generalmente etiquetas para que las proteínas sean transportadas a organelos como retículo endoplásmico y aparato de golgi (Spiro, 2002). Lo interesante de este tipo de modificación es que precisamente se ha reportado que TOR en mamíferos se encuentra localizada en las membranas de estos organelos (Drenan *et al.*, 2003). Lo anterior nos sugiere una posible función de las N-glicosilaciones en la S6K que serian cruciales en la regulación de su actividad.

IX. Conclusión.

Los OGs regulan el crecimiento y desarrollo de las plántulas de maíz a través de la modulación de la proteína S6K, componente de la vía de señalización ruta de la proteína TOR.

X. Perspectivas.

- Secuenciar cada una de las señales de la S6K encontradas en el western blot para identificar las posibles modificaciones post-traduccionales.
- Separar los órganos de planta para evaluar los efectos por separado, cada uno con su propio western blot.
- Determinar si la regulación en la activación de la S6K es dependiente de un número determinado de fosforilaciones y el orden en que estas se llevan a cabo.
- Identificar las diferencias entre las condiciones de luz y oscuridad en el crecimiento de las plántulas de maíz.

XI. Bibliografía.

Acker M. G. & Lorsch J. R.. 2008. Mechanism of ribosomal subunit joining during eukaryotic translation initiation. *Biochem. Soc. Trans.* 36: 653–657.

Bellicampi D., Salvi G., De Lorenzo G., and Cervone F. 1993. Oligagalacturonides inhibit the formation of roots on tobacco explants. *Plant J.* 4: 207-213.

Bellincampi D., Dipierro N., Salvi G., Cervone F., De Lorenzo G. 2000. Extracellular H₂O₂ induced by oligagalacturonides is not involved in the inhibition of the auxin-regulated *rolB* gene expression in tobacco leaf explants. *Plant Physiol.* 122: 1379-1385.

Beltrán-Peña E., Aguilar R., Ortíz-López. A., Dinkova T. D., Sánchez de Jiménez E. 2002. Auxin stimulates S6 ribosomal protein phosphorylation in maize thereby affecting protein synthesis regulation. *Physiol Plant.* 115: 291-297.

Benková E., Hejátko J. 2009. Hormone interactions at the root apical meristem. *Plant. Mol. Biol.* 69:383-396.

Bergmann C. W., Ito Y., Singer D., Albersheim P., Darvill A. G., Benhamou N., Nuss L., Salvi G., Cervone F., and De Lorenzo G. 1994. Polygalacturonase-inhibiting protein accumulates in *Phaseolus vulgaris* L. in response to wounding, elicitors and fungal infection. *Plant J.* 5: 625-634.

Bierer B. E., Somers P. K., Wandless T. J., Burakoff S. J., Schreiber S. L. 1990. Probing immunosuppressant action with a nonnatural immunophilin ligand. *Science* 250: 556-559.

Bögre L., Ökrész L., Henriques R., Anthony G. R. 2003. Growth signalling pathways in Arabidopsis and the AGC protein kinases. *Trends Plant Sci.* 8(9): 424-431.

Bradford, M.M. 1976. A dye binding assay for protein. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

Branca, C, De Lorenzo, G. and Cervone, F. 1988. Competitive inhibition of the auxin-induced elongation by α -D-oligagalacturonides in pea stem segments. *Physiol. Plant.* 72: 499–504.

Breuer C., Ishida T., Sugimoto K. 2010. Developmental control of endocycles and cell growth in plants. *Curr Opin Plant Biol.* 13: 654-660.

Brown E. J., Albers M. W., Shin T. B., Ichikawa K., Keith C. T., Lane W. S. and Schreiber S. L. 1994. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin receptor complex. *Nature.* 369: 756-759.

Browning K. S. 2004. Plant translation initiation factors: it is not easy to be green. *Biochem Soci Transa.* 32(4): 589-591.

Burnett P. E., Barrow R. K., Cohen N. A., Snyder S. H., Sabatini D. M. 1998. RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. *Proc Natl Acad Sci.* 95(4): 1432–1437.

Cano H., Zavala G., Soriano E., López-Romero E. 1995. Oligosaccharides from plant and fungal origin elicit phaseollin accumulation with similar kinetics in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Rev Mex Fitopat.* 12: 163-173.

-
- Castro E., Sigrist C. J. A., Gattiker A., Bulliard V., Langendijk G., Gasteijer E., Bairoch A., Hulo N. 2006. Scanprosite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acid Research*. 34: 362-365.
- Chen Y, Chen H, Rhoad AE, Warner L, Caggiano TJ, Failli A, Zhang H, Hsiao CL, Nakanishi K, Molnar-Kimber KL. 1994. A putative sirolimus (rapamycin) effector protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 30. 203(1):1-7.
- Chiang G. C. & Abraham R. T. 2005. Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at S-2448 is mediated by p70S6 kinase. *J. Biol. Chem*. 280: 25485-25490.
- Chiu M. I., Katz H., and Berlin V. 1994. RAPT1, a mammalian homolog of yeast Tor, interacts with the FKBP12/rapamycin complex. *Proc Natl Acad Sci*. 91(26):12574-12578.
- Coté F. & Hahn M. G. 1994. Oligosaccharins: structures and signal transduction. *Plant Mol Biol*. 26: 1379-1411.
- Davidson E. A. 1966. Analysis sugar found in mucopolysaccharides. *Methods Enzymol*. 8: 52-60.
- Deprost D., Yao L., Sormani R., Moreau M., Leterreux G., Nicolai M., Bedu M., Robaglia C., Meyer C. 2007. the Arabidopsis TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO rep*. 8(9): 864-870.
- Drenan R. M., Liu X., Bertram P. G., Zheng X. F. S. 2003. FKBP12-Rapamycin-associated Protein or Mammalian Target of Rapamycin (FRAP/mTOR) Localization in the Endoplasmic Reticulum and the Golgi Apparatus. *J Biol Chem*. 279: 772-778.
- Dufner A., Thomas G. 1999. Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation. *Exp Cell Res*. 253: 100-109.
- Dumont F. J., Staruch M. J., Koprak S. L., Melino M. R. and Sigal N. H. 1990. Distinct mechanisms of suppression of murine T cell activation by the related macrolides FK-506 and rapamycin. *The journal of immunology*. 144(1): 251-258.
- Ebel J. 1986. Phytoalexin synthesis: the biochemical analysis of the induction process. *Ann. Rev. Phytopathol*. 24: 235-264.
- Ebel J. 1986. Phytoalexin synthesis: the biochemical analysis of the induction process. *Ann Rev Phytopathol*. 24: 235-264.
- Eberhard S., Doubrava N., Marfa V., Mohnen D., Southwick A., Darvill A., and Albersheim P. 1989. Pectin cell wall fragments regulate tobacco thin-cell-layer explants morphogenesis. *Plant Cell*. 1: 747-755.
- Ferrari S., Bannwarth W., Morley S. J., Totty N. F., Thomas G. 1992. Activation of p70s6k is associated with phosphorylation of four clustered sites displaying Ser/Thr-Pro motifs. *Proc Natl Acad Sci*. 89(15):7282-7286.
- Flores-Villavicencio L., Richards A., Soriano-Bello E. L. 2004. Phytoalexin production induced by glucuronide elicitor during elongation of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) embryos. *Rev Mex Fitopat*. 22: 333-337.

Garcia F. C., Aguilar R., Reyes de la Cruz H., Albores M., Sanchez de Jimenez E. 2001. A maize insulin like growth factor signals to a transduction pathway that regulates protein synthesis in maize. *Biochem J.* 358: 95-100.

Gray N. K., Wickens M. 1998. Control of translation initiation in animals. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 14: 399-458.

Gressner A. M. & Wool I. G.. 1974. The phosphorylation of liver ribosomal proteins in vivo. Evidence that only a single small subunit protein (S6) is phosphorylated. *J Biol Chem.* 249(21): 6917–6925.

H Hahn M. G., Darvill A. G. and Albersheim P. 1981. Host-Pathogen Interactions: XIX. The endogenous elicitor, a fragment of plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. *Plant Physiol.* 68: 1161-1169.

Hahn-Windgassen, A., Nogueira, V., Chen, C.C., Skeen, J.E., Sonenberg, N., and Hay, N. 2005. Akt activates the mammalian target of rapamycin by regulating cellular ATP level and AMPK activity. *J. Biol. Chem.* 280: 32081–32089.

Harding M. W., Galat A., Uehling D. E., and Schreiber S. T. 1989. A receptor for de immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase. *Nature.* 341:758-760.

Harrington L. S., Findlay G. M., Gray A., Tolkacheva T., Wigfield S., Rebholz H., Barnett J., Leslie N. R., Cheng S., Shepherd P. R., Gout I., Downes C. P., Lamb R. F. 2004. The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *J Cell Biol.* 166(2):213–223.

Hay N. & Sonenberg N. 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Genes & Develop.* 18: 1926-1945.

Heitman J., Movva N. R., Hall M. N. 1991. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 253: 905-909.

Henderson D. J., Naya I., Bundick R. V., Smith G. M. and Schmidt J. A. 1991. Comparison of the effects of FK-506, cyclosporin A and rapamycin on IL-2 production. *Immunology.* 73: 316-321.

Henriques R., Magyar Z., Monardes A., Khan S., Zalejski C., Orellana J., Szabados L., De la Torre C., Koncz C., Bögre L. 2010. Arabidopsis S6 kinase mutants display chromosome instability and altered RBR1-E2F pathway activity. *EMBO J.* 29: 2979-2993.

Hernández M. G., Sepúlveda B., Richards A., Soriano E. 2006. The architecture of *Phaseolus vulgaris* root is altered when a defense response is elicited by an oligogalacturonide. *Braz. J. Plant Physiol.* 18: 351-355.

Hernández-Mata G., Mellado-Rojas M. E., Richards-Lewis A., López-Bucio J., Beltrán-Peña E. and Soriano-Bello E. L. 2010. Plant Immunity induced by oligogalacturonide alters root growth in a process involved flavonoid accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Growth Reg.* 29(4): 441-454.

Holz M. K. & Blenis J. 2005. Identification of S6 kinase 1 as a novel mammalian target of rapamycin (mTOR)-phosphorylating kinase. *J Biol Chem* 280(28):26089–26093.

Humphrey T. V., Bonetta D. T., and Goring D. R. 2007. Sentinels at the wall: cell wall receptors and sensors. *New Phytol.* 176: 7-21.

Isotani S., Hara K., Tokunaga C., Inoue H., Avruch J., Yonezawa K. 1999. Immunopurified mammalian target of rapamycin phosphorylates and activates p70 S6 kinase alpha in vitro. *J Biol Chem.* 274(48):34493–34498.

Jacinto E., Loewith R., Schmidt A., Lin S., Ruegg M. A., Hall A., Hall M. N. 2004. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol.* 6: 1122-1128.

Jackson R. J., Hellen C. U. T., Pestova T. V. 2010. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10: 113-127.

Jastrzebski K., Hannan K., Tchoubrieva E. B., Hannan R. D., Pearson R. B. 2007. Coordinated regulation of ribosome biogenesis and function by the ribosomal protein S6 kinase, a key mediator of mTOR function. *Growth factors.* 25(4): 209-226.

Jefferies HB, Reinhard C, Kozma SC, Thomas G. 1994. Rapamycin selectively represses translation of the “polypyrimidine tract” mRNA family. *Proc Natl Acad Sci.* 91(10):4441–4445.

John J. Siekierka Shirley H. Y. Hung Martin Poe C. Shirley Lin and Nolan H. 1989. Sigal. A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin. *Nature* 341: 755 – 757.

Kapp L. D. & Lorsch J. R. 2004. The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Ann. Rev. Biochem.* 73: 657-704.

Krieg J., Hofsteenge J., Thomas G. 1988. Identification of the 40 S ribosomal protein S6 phosphorylation sites induced by cycloheximide. *J Biol Chem* 263(23):11473–11477.

Krizek B. A. 2008. Making bigger plants: key regulators of final organ size. *Curr Opin Plant Biol.* 12: 1-6.

Lamb C. J., Lawton M. A., Dron M., and Dixon R. A. 1989. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell.* 56: 215-224.

Lastick S. M., Nielsen P. J., McConkey E. H. 1977. Phosphorylation of ribosomal protein S6 in suspension cultured HeLa cells. *Mol Gen Genet.* 152(3):223–230.

Lorenz M. C. and Heitman J. 1995. TOR mutations confer rapamycin resistance by preventing interaction with FKBP12-rapamycin. *J. Biol. Chem.* 270: 27531-27537.

Maag, D., Algire, M. A. & Lorsch, J. R. 2006. Communication between eukaryotic translation initiation factors 5 and 1A within the ribosomal pre-initiation complex plays a role in start site selection. *J. Mol. Biol.* 356, 724–737.

Maag, D., Fekete, C. A., Gryczynski, Z. & Lorsch, J. R. 2005. A conformational change in the eukaryotic translation preinitiation complex and release of eIF1 signal recognition of the start codon. *Mol. Cell* 17: 265–275.

Mann M. & Jensen O. N. 2003. Proteomic análisis of post-translational modifications. *Nature Biotech.* 21: 255-261.

-
- Marfá V., Gollin D. J., Eberhard S., Mohnen D., Darvill A., and Albersheim P. 1991. Oligogalacturonides are able to induce flowers to form on tobacco explants. *Plant J.* 1(2): 217-225.
- Mattei B., Galletti R., Manfredini C., Pontiggia D., Salvi G., Spadoni S., Caprari C., Ferrari S., Bellincampi D., Cervone F., De Lorenzo G. 2005. Recognition and signaling in the cell wall: the case of endopolygalacturonase, PGIP and oligogalacturonides. *Plant Biosystems.* 139: 24-27.
- Mattila S. P., Ullman K. S., Fiering S., Emmel E. A., McCutcheon M., Crabtree G. R. and Herzenberg L. A. 1990. The actions of cyclosporine A and FK506 suggest a novel step in the activation of T lymphocytes. *The EMBO journal.* 9(13): 4425-4433.
- Menand B., Desnos., Nussaume L., Berger F., Bouchez D., Meyer C., Robaglia C. 2002. Expression and disruption of the Arabidopsis TOR (target of rapamycin) gene. *Proc Natl Acad Sci.* 99(9): 6422-6427.
- Meyuhas, O., Avni, D., and Shama, S. 1996. Translational Control of Ribosomal Protein mRNAs in Eukaryotes. In *Translational Control*, J.W.B. Hershey, M.B. Mathews, and N. Sonenberg, eds (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 363-388.
- Murashige T., & Skoog C. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay whit tobacco cultures. *Physiol Plant.* 15: 473-479.
- Norman C., Vidal S., Palva T. E. 1999. Oligogalacturonide-mediated induction of a gene involved in jasmonic acid synthesis in response to the cell-wall-degrading enzymes of the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *Mol Plant-Microbe Inter.* 12(7): 640-644.
- Nothnagel E. A., McNeil M., Albersheim P., and Dell A. 1983. Host-Pathogen Interactions: XXII. A Galacturonic acid oligosaccharide from plant cell walls elicits phytoalexins. *Plant Physiol.* 71: 916-926.
- O'Farrell P. H. 1975. High resolution of two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem.* 250: 4007-4021.
- Pearson R. B., Dennis P. B., Han J. W., Williamson N. A., Kozma S. C., Wettenhall R. E., Thomas G. 1995. The principal target of rapamycin-induced p70s6k inactivation is a novel phosphorylation site within a conserved hydrophobic domain. *EMBO J.* 14(21):5279-5287.
- Pestova, T. V. Ivan B. 2000. Lomakin, Joon H. Lee, Sang Ki Choi, Thomas E. Dever & Christopher U. T. Hellen. The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature* 403: 332-335.
- Pestova, T. V., Borukhov, S. I. & Hellen, C. U. T. 1998. Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons. *Nature.* 394: 854-859.
- Pisarev A. V., Hellen C. U. T. & Pestova T. V. 2007. Recycling of eukaryotic posttermination ribosomal complexes. *Cell.* 131: 286-299.
- Raught B., Peiretti F., Gingras A. C., Livingstone M., Shahbazian D., Mayeur G. L., Polakiewicz R. D., Sonenberg N., Hershey J. W. 2004. Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. *EMBO J.* 23(8):1761-1769.

Reyes de la Cruz H., Aguilar R., Sanchez de Jimenez E. 2004. Functional characterization of a maize ribosomal S6 protein kinase (ZmS6K), a plant ortholog of metazoan p70^{S6K}. *Biochemistry*. 43: 533-539.

Reyes de la Cruz H., Soriano Bello E., Richards A., Aguilar R., Sanchez de Jimenez E. 2002. IAA and dOGA induced $[Ca^{2+}]_{cyt}$ elevation in maize (*Zea mays* L.) tissues, however they do not target the same signaling pathway. *TIP*. 5(2): 76-81.

Rossi R., Pester J. M., McDowell M., Soza S., Montecucco A., Lee-Fruman K. K. 2007. Identification of S6K2 as a centrosomelocated kinase. *FEBS Lett*. 581(21):4058-4064.

Ruud A. K., Kuhlman C., Goss J. D., Browning K. S. 1998. Identification and Characterization of a Novel Cap-binding Protein from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol Chem*. 273: 10325-10320.

Ruvinsky I. & Meyuhas O. 2006. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends in Biochem Scies*. 31(6): 342-348.

Sabatini D. M., Pierchala B. A., Barrow R. K., Schell M. J., Snyder S. H. 1995. The Rapamycin and FKBP12 Target (RAFT) Displays Phosphatidylinositol 4-Kinase Activity. *J. Biol. Chem*. 270(36): 20875-20878.

Sabers J. C., Martin M. M., Brunn G. J., Williams J. M., Dumont F. J., Wiederrecht G., and Abraham R. T. 1995. Isolation of a protein target of the FKBP12-Rapamycin complex in mammalian cells. *J. Biol. Chem*. 270(2): 816-822.

Schreiber S. L. 1991. Chemistry and biology of immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science*. 251(4991): 283-287.

Simpson S. D., Ashford D. A., Harvey D. J., Bowles D. J. 1998. Short chain oligogalacturonides induce ethylene production and expression of the gene encoding aminocyclopropane 1-carboxylic acid oxidase in tomato plants. *Glycobiology*. 8(6): 579-583.

Somerville C., Bauer S., Brininstool G., Facette M., Hamann T., Milne J., Osborne E., Paredez A., Persson S., Raab T., Vorwerk S., Youngs H. 2004. Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science*. 306: 2206-2211.

Spiro R. G. 2002. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptides bonds. *Glycobiology*. 12(4): 43-56.

Stan R., McLaughlin M. M., Cafferkey R., Johnson R. K., Rosenberg M., Livi G. P. 1994. Interaction between FKBP12-rapamycin and TOR involves a conserved serine residue. *J. Biol. Chem*. 269: 32027-32030.

Stevenson M. J., Perera Y. I., Heilmann I., Persson S., Boss F. W. 2000. Inositol signaling and plant growth. *Trends Plant Sci*. 5(6): 1360-1385.

Sugimoto-Shirasu K & Roberts K. 2003. "Big it up": endoreduplication and cell-size control in plants. *Curr Opin Plant Biol*. 6: 544-553.

Tang H., Hornstein E., Stolovich M., Levy G., Livingstone M., Templeton D., Avruch J., Meyuhas O. 2001. Amino acid-induced translation of TOP mRNAs is fully dependent on phosphatidylinositol 3-

kinase-mediated signalling, is partially inhibited by rapamycin, and is independent of S6K1 and rpS6 phosphorylation. *Mol Cell Biol.* 21(24):8671–8683.

Turck F., Kozma S. C., Thomas G., Nagy F. 1998. A heat-sensitive *Arabidopsis thaliana* kinase substitutes for human p70^{S6K} function in vivo. *Mol & Cell Biol.* 18(4): 2038-2044.

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

Turck F., Zilbermann F., Kozma S. C., Thomas G., Nagy F. 2004. Phytohormones participate in an s6 kinase signal transduction pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 134: 1527-1535.

Unbehaun, A., Borukhov, S. I., Hellen, C. U. T. & Pestova, T. V. 2004. Release of initiation factors from 48S complexes during ribosomal subunit joining and the link between establishment of codon-anticodon basepairing and hydrolysis of eIF2-bound GTP. *Genes Dev.* 18: 3078–3093.

Valovka T., Verdier F., Cramer R., Zhyvoloup A., Fenton T., Rebholz H., Wang M. L., Gzhegotsky M., Lutsyk A., Matsuka G., Filonenko V., Wang L., Proud C. G., Parker P. J., Gout I. T. 2003. Protein kinase C phosphorylates ribosomal protein S6 kinase betall and regulates its subcellular localization. *Mol Cell Biol.* 23(3):852–863.

Vezina C., Kudelski A., Sehgal S. N. 1975A. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *The journal of antibiotics*28(10):721-726. Sehgal S. N., Baker H., Vezina C. 1975B. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic II. Fermentation, isolation and characterization. *The journal of antibiotics.* 28(10):727-732.

Wang X., Li W., Williams M., Terada N., Alessi D. R., Proud C. G. 2001. Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *EMBO J.* 20(16):4370–4379.

Weng Q. P., Andrabi K., Klippel A., Kozlowski M. T., Williams L. T., Avruch J. 1995. Phosphatidylinositol 3-kinase signals activation of p70 S6 kinase in situ through site-specific p70 phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci.* 92(12):5744–5748.

Woodward E. W. & Bartell B. 2005. Auxin: Regulation, action, and interaction. *Annals of Botany.* 95: 707-735.

Wullschleger S., Loewith R., Hall M. N. 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell.* 124: 471-484.

Zhang S. H., Lawton M. A., Hunter T., Lamb C. J. 1994. atpk1, a novel ribosomal protein kinase gene from *Arabidopsis*, I. isolation, characterization, and expression. *J. Biol Chem.* 269: 17586-17592.