



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUIMICOFARMACOBIOLOGÍA

TESIS

**“EFECTO DE LA INSULINA SOBRE LA RUTA DE LAS PROTEÍNAS
CINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS (MAPK) DE *Arabidopsis
thaliana*”**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUIMICO FARMACOBIOLOGO**

PRESENTADO POR:

p.Q.F.B AURELIO JUÁREZ DOMÍNGUEZ

ASESOR DE TESIS:

D. C. ELDA BELTRÁN PEÑA

Morelia, Michoacán Noviembre 2009



INDICE TEMATICO

	Página
Resumen	1
I Introducción	2
1.1 Características de la insulina.	2
1.2 Señalización de la insulina en mamíferos.	2
II Antecedentes de la insulina en plantas.	6
III Cascada de señalización de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK del inglés Mitogen-Activated Protein Kinases)	8
3.1 MAPK en eucariontes	8
3.2 MAPK en plantas	9
3.3 MAPK en el desarrollo de plantas	15
IV Arabidopsis como modelo de estudio	17
4.1 Etapas de desarrollo de las plantas de Arabidopsis	18
4.2 Arquitectura de la raíz	20
4.2.1 Zona meristemática o de división	21
4.2.2 Zona de elongación	22
4.2.3 Zona de diferenciación	23
4.2.4 Pelos radiculares	23
4.2.5 Raíces laterales	23
V Análisis de la expresión génica	24
5.1 Sobreexpresión de una proteína	26

	5.2 Inactivación de genes por RNA de interferencia	30
VI	Uso de mutantes y líneas de sobreexpresión de <i>A. thaliana</i>	33
VII	Hipótesis y objetivos	33
	7.1 Hipótesis.	33
	7.2 Objetivo	34
	7.3 Objetivos específicos	34
VIII	Materiales y métodos.	34
	8.1 Materiales	34
	8.1.1 Semillas y reactivos utilizados	34
	8.1.2 Equipo	35
	8.2 Métodos.	35
	8.2.1 Desinfestación de semillas	35
	8.2.2 Preparación del medio de cultivo	36
	8.2.3 Evaluación del crecimiento de la raíz primaria y número de raíces laterales.	36
	8.2.4 Diseño de oligonucleótidos.	37
	8.2.5 Extracción de RNA	38
	8.2.6 Amplificación de los transcritos por RT-PCR	40
IX	Resultados.	41
	9.1 Arquitectura radicular de las líneas de sobreexpresión Atmapk3.	41
	9.2 Efecto de insulina en plántulas que sobreexpresan el gen Atmapk3	42

	9.3 Efecto de insulina a nivel de germinación	46
	9.4 Efecto de insulina en líneas con disminución de la expresión del gen Atmapk3	47
	9.5 Diseño de oligonucleótidos	49
	9.6 Extracción del RNA	50
	9.7 Análisis del nivel de transcrito en gen Atmapk3 en las líneas MAPK3-1, MAPK3-2, OvMAPK3 y RNAiMAPK3	51
	9.8 Análisis de la expresión del transcrito de los genes Atmapk3 y Ats6k en plántulas silvestres de <i>A. thaliana</i> por efecto de la insulina	52
X	Discusión	53
XI	Conclusión	56
XII	Perspectivas	56
XIII	Bibliografía	57

ÍNDICE DE FIGURAS	Página
Figura. 1. Cascada de transducción de señales disparada por insulina	3
Figura. 2. Ruta de transducción de señales PI3K-mTOR	5
Figura. 3. Cascada MAP cinasa.	9
Figura. 4. Función básica de la ruta de señalización MAPK.	10
Figura. 5. Posibles funciones de la cascada de señalización de MPK6.	12
Figura. 6. Modelo de la señalización del sistema inmune innato activado por receptores LRR en Arabidopsis	14
Figura. 7. Ruta de MAP cinasa que regula la citocinesis en plantas.	16
Figura. 8. A. Etapas de desarrollo de Arabidopsis	19
Figura. 9. Zonas de la raíz principal de Arabidopsis	21
Figura. 10. Organización radial de la raíz	22
Figura. 11. Mecanismo de la reacción de polimerización en cadena (PCR)	26
Figura. 12. Plásmido TIF y la transformación de plantas por <i>A. tumefaciens</i>	30
Figura. 13. Mecanismo del RNAi	32
Figura. 14. Arquitectura radicular de las líneas de sobreexpresión del gen MAPK3 de <i>A. thaliana</i>	42
Figura. 15. Evaluación de parámetros de la arquitectura de la raíz de plántulas Wt y plántulas que sobreexpresan el gen Atmapk 3 de <i>A. thaliana</i> en medio suplementado con insulina 200 µU/ml.	44

Figura. 16. Efecto de insulina sobre el crecimiento de plantulas de Arabidopsis que sobreexpresan el gen Atmapk3	45
Figura. 17. Efecto de la insulina a 2000 μ U/ml sobre el crecimiento de las que sobreexpresan el gen Atmapk3 de <i>A. thaliana</i>	45
Figura. 18. Efecto de insulina sobre el crecimiento de plántulas de Arabidopsis que sobreexpresan el gen Atmapk3	46
Figura. 19. Efecto de diferentes concentraciones de insulina sobre la arquitectura radicular de <i>A. thaliana</i> y líneas de sobre- expresión del gen Atmapk3	47
Figura. 20. Efecto de la insulina en plántulas de la línea RNAiAtMAPK3	48
Figura. 21. Efecto de insulina sobre el crecimiento de plántulas de Arabidopsis que disminuyen la expresión del gen Atmapk3.	49
Figura. 22. Secuencia del gen Atmapk3	50
Figura. 23. Integridad del RNA extraído de diferentes tipos de plántulas	51
Figura. 24. Expresión del gen Atmapk3	52
Figura. 25. Expresión del Atmapk3 y s6k por efecto de la insulina	53

A MIS PADRES.

Por el constante apoyo incondicional y amor que me han brindado, por los consejos y valores que me inculcaron y por creer en mí.

A MIS HERMANOS Y HERMANAS

Por toda su ayuda y consejos que me han brindado, y por todos los momentos que hemos compartido.

AGRADECIMIENTOS

A MI ASESORA

Por el apoyo, la confianza que deposito en mí, por los consejos y conocimientos que me proporciono, así como también por la paciencia que me brindo durante el desarrollo del presente trabajo.

A la doctora Mary por su ayuda, consejos y paciencia que me brindo.

A mis sinodales

Al D.C. Homero por la ayuda otorgada y revisión de la tesis.

Al D.C. Ernesto por el apoyo y cooperación en la revisión de la tesis.

Al D.C. Rafael por el tiempo y aporte brindado en la revisión de la tesis.

A la Mtra. Ruth Calderón por la confianza que me otorgo, el apoyo que me dedico, sus enseñanzas y por la amistad.

A mis compañeros de laboratorio

Rocio, Grisel, Mónica, Sandra, Chucho, Ricardo por la compañía, ayuda y por hacer más agradable la estancia en el laboratorio.

A Georgina por compartir los conocimientos y ayuda.

Al D.C. Josué Altamirano por la ayuda y facilidades prestadas en el análisis estadístico.

Al D.C. Angel Guevara por facilitarnos las semillas.

A Angélica por todo su apoyo incondicional y comprensión que me ha dado en todo este tiempo.

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL
LABORATORIO DE TRANSDUCCION DE SEÑALES DEL
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS
DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO BAJO LA ASESORÍA DE LA D.C. ELDA BELTRÁN
PEÑA.

ESTE TRABAJO FUE APOYADO POR EL CONSEJO
ESTATAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA.

RESUMEN

Desde el descubrimiento de la insulina en 1921 por Banting y colaboradores, esta hormona ha sido objeto de un gran número de investigaciones. Además de su papel de hormona clásica asociada con el metabolismo de glucosa, la insulina también ha sido involucrada en procesos de crecimiento, reproducción y longevidad en metazoarios. Se ha demostrado que insulina y factores de crecimiento parecidos a insulina disparan dos cascadas de transducción de señales, la de la cinasa del fosfatidilinositol 3 fosfato (PI3K) y la de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK). Varios de los componentes de las rutas de señalización disparadas por la insulina han sido identificados, pero un total entendimiento de esta ruta está lejos de ser completo. Con relación a su efecto en plantas, la adición a maíz de insulina y “glucocinina” (molécula extraída de plantas, parecida a insulina) en altas concentraciones retardó el crecimiento; mientras que concentraciones bajas lo estimularon. Estudios posteriores en ejes de maíz en germinación, mostraron el efecto de la insulina en la síntesis de proteínas ribosomales. Por otra parte, se ha reportado que la cascada de fosforilación de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) es una ruta conservada evolutivamente entre los organismos eucariontes. Típicamente la cascada MAPK consiste de tres tipos de proteínas cinasas: cinasa de MAP (MAPK), cinasa de MAPK (MAPKK), y cinasa de MAPKK (MAPKKK). La cascada MAPK juega un papel crítico en la expresión de genes comprendidos en el metabolismo, muerte, proliferación y diferenciación celular en mamíferos y levaduras en respuesta a estímulos externos. En plantas, la cascada MAPK está involucrada en varias respuestas a estreses biótico, abiótico, hormonas y en procesos de división y desarrollo celular. Por lo antes mencionado, la finalidad de este trabajo consistió en determinar si la insulina ejerce un efecto sobre la ruta MAPK alterando así el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*; para ello contamos con plántulas que sobreexpresan la proteína MAPK3 (MAPK 3-1, MAPK 3-2 y OvMAPK3) y otra que disminuye la expresión (RNAi MAPK3). Los resultados obtenidos nos indican que insulina incide sobre la ruta MAPK en *Arabidopsis* puesto que en plántulas que sobreexpresan el gen *Atmapk3* la longitud de la raíz principal aumenta y este efecto se ve inhibido en las plántulas que reprimen dicho gen.

I INTRODUCCIÓN

1.1 Características de la insulina

La insulina es una hormona de naturaleza proteica con un peso aproximado de 6 KDa, que en mamíferos es segregada por las células β de Langerhans del páncreas en respuesta a altos niveles de glucosa en sangre. Las células capaces de responder a insulina poseen un receptor en la superficie, el cual es una proteína transmembranal compuesta de dos cadenas polipeptídicas α y dos polipéptidos β (Karp, 1998). La insulina es ampliamente conocida por su papel en la regulación de los niveles de glucosa en sangre, aumentando la captación de glucosa en el músculo y tejido adiposo; incrementando la síntesis de ácidos grasos y triacilgliceroles en hígado y tejido adiposo; inhibiendo la gluconeogénesis en hígado y aumentando la síntesis de glucógeno tanto en hígado como en músculo. Otro efecto de la insulina consiste en el incremento de la captación de aminoácidos en el músculo con la consiguiente activación de la síntesis de proteínas musculares y la inhibición de la degradación proteica (Saltiel y Khan, 2001).

1.2 Señalización de la insulina en mamíferos

La insulina circulante alcanza rápidamente sus tejidos blanco donde interactúa con el receptor (IR). El IR es una cinasa de tirosina transmembranal, en configuración $\alpha_2\beta_2$ (Ullrich et al., 1985). La insulina, al unirse a las regiones específicas de la subunidad α , da lugar a un cambio configuracional en el receptor que ocasiona la autofosforilación de los residuos tirosina específicos en la región intracelular de las subunidades β . La autofosforilación del receptor permite la activación de la tirosina cinasa del receptor (Lee et al., 1997). Entre los blancos de la proteína cinasa del receptor de insulina (IR) se han identificado proteínas como la Shc, los sustratos del receptor de insulina (IRS), y Gab-1 entre otras. Estas últimas proteínas se enganchan directamente al receptor de insulina, proporcionando un área física de acoplamiento para los sustratos encargados de transmitir la señalización del receptor hacia el interior del citosol (Fig. 1). Las proteínas sustrato del receptor de insulina contienen un dominio PH conservado localizado en su extremo amino terminal y cuya función es mantener al IRS unido en

proximidad al receptor (Haslam et al., 1993, Voliovitch et al., 1995). La región COOH-terminal de las proteínas IRS se encuentra pobremente conservada y contiene múltiples motivos de fosforilación en tirosina, cuya función serviría como sitios de acoplamiento para proteínas con dominios SH2 (Src Homology 2), como son: la subunidad reguladora p85 α de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI-3K), y el receptor del factor de crecimiento de la proteína-2 de unión (Grb2) entre otras, todas ellas intervienen como mediadoras en las funciones metabólicas y de crecimiento (Cheatham y Khan, 1995).

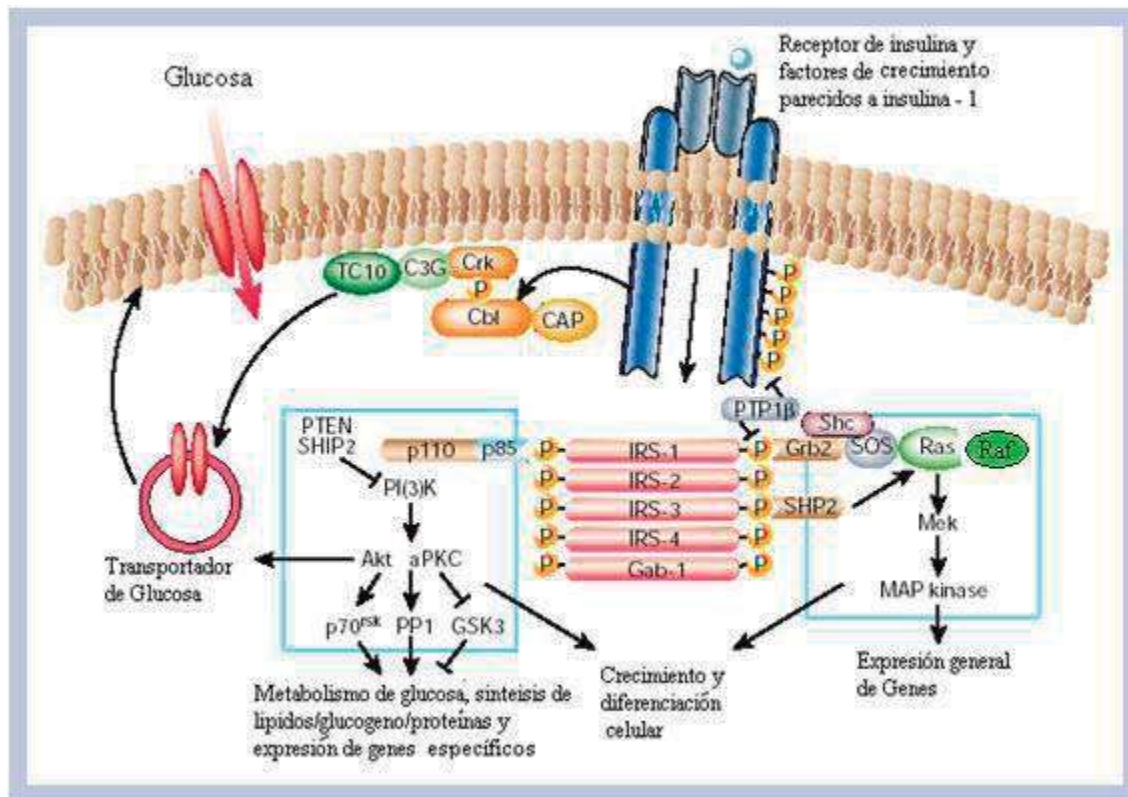


Figura 1. Cascada de transducción de señales disparada por insulina. El receptor de insulina es una tirosina cinasa, que al experimentar una autofosforilación, cataliza la fosforilación de proteínas celulares tales como IRS, SHC Y CBI. Después de la fosforilación de tirosina, esas proteínas interactúan con moléculas de señalización a través de sus dominios SH2, resultando en una serie diversa de rutas de señalización. Estas rutas de señalización incluyen la activación de PI-3K y cascada abajo: la producción de PtdIns (3, 4, 5) P_3 , las rutas de las RAS y MAP cinasa; Cbl/CAP y la activación de TC10. Las cascadas antes mencionadas actúan de manera concertada para coordinar la regulación del tráfico de vesículas, síntesis de proteínas, activación e inactivación de enzimas y expresión de genes dando como resultado la regulación del metabolismo de glucosa, lípidos y proteínas. (Modificado de Saltiel y Khan, 2001).

La señalización del receptor de insulina involucra dos cascadas principales: la de la fosfatidilinositol-3-OH cinasa (PI-3K) conocida también como ruta metabólica y la de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) denominada como cascada mitogénica (Fig. 1). Aunque estas rutas son descritas en un contexto lineal, debe tenerse en cuenta que cada una de ellas podría, bajo ciertas circunstancias, activar a la otra y viceversa. La ruta de las MAPK (motivo del presente estudio) es activada cuando se une Grb2 a Shc a IRS vía el dominio SH2. A su vez, Grb2 se encuentra ligada a una proteína de intercambio de nucleótidos denominada Son of Sevenless o mSOS en mamíferos, esta última cataliza el intercambio de GDP por GTP de una pequeña proteína GTPasa denominada Ras, resultando en su activación. La proteína Ras activada se une a la parte interna de la membrana plasmática reclutando y uniéndose a esta membrana, la región NH₂-terminal de otra proteína denominada Raf. La interacción Ras-Raf desplaza las proteínas que están ligadas a Raf y permite la fosforilación de Raf por cinasas Ser/Tr, desinhibiendo y liberando de esta manera la cinasa Raf (Roy et al., 1998). Raf-1 activada fosforila dos residuos regulatorios, una cinasa de especificidad dual, la MEK1. Asimismo, MEK1 activa otras dos cinasas reguladoras de señales extracelulares denominadas ERK-1 y ERK-2 al fosforilar los residuos regulatorios tirosina y treonina (Marshall, 1995). Este último paso es sumamente importante, ya que las señales ERK activadas son las mediadoras de los efectos mitogénicos y anabólicos de la insulina, induciendo la fosforilación de factores de transcripción nucleares y con ello la expresión de genes que da lugar a la proliferación y diferenciación celular. El bloqueo de esta vía MAPK con mutantes o inhibidores farmacológicos impide y previene la estimulación del crecimiento y diferenciación celular inducido por la insulina, pero no tiene ningún efecto en las acciones metabólicas de la hormona. Por otra parte, la respuesta metabólica a la insulina es mediada principalmente por la vía PI-3K (Fig. 2). La secuencia de eventos moleculares de la cascada antes mencionada inicia con la asociación del complejo de proteínas de la PI-3K con el sustrato receptor de Insulina (IRS). La activación de PI-3K estimula la producción de (PIP₃), activando a su vez a la cinasa dependiente de fosfoinositol 1 (PDK1) (Czech y Corvera, 1999; Etgen et al., 1999). Esta última fosforila y activa a la proteína Akt. Akt activada fosforila a la cinasa blanco de rapamicina de

mamíferos (mTOR) a través de proteínas intermediarias (complejos TSC1 y TSC2). Una vez activada mTOR fosforila a sus blancos: la proteína cinasa de S6 (S6K) y la proteína de unión al factor de inicio de la traducción eIF4E (4EBP). S6K fosforila a su vez a la proteína ribosomal S6 de la subunidad pequeña del ribosoma; los ribosomas fosforilados en dicha proteína reclutan transcritos específicos que presentan trectos de polipirimidina en el extremo 5' terminal (5' TOP). Interessantemente, estos mRNAs codifican para proteínas ribosomales y factores de elongación (Reiling y Sabatini, 2006).

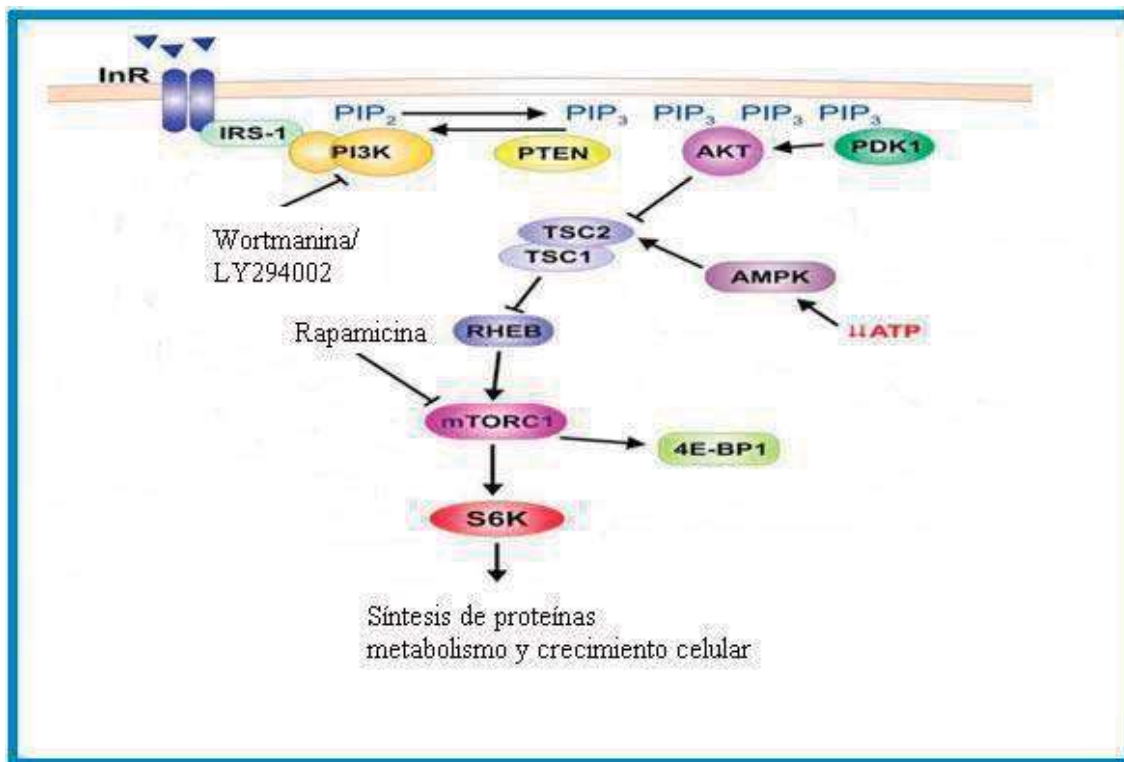


Figura 2. Ruta de transducción de señales PI3K-mTOR. En esta ruta la fosfatasa PTEN regula negativamente la reacción de PIP₂ a PIP₃. Rio abajo AKT fosforila a mTOR a través de los intermediarios (complejo de esclerosis tuberosa TSC1/ TSC2 y el homólogo de Ras, RHEB). Por otro lado, observamos que la cascada puede activarse a través de AMPK la cual censa los bajos niveles de energía fosforilando al complejo TSC1/TSC2. Para el estudio de esta ruta se cuenta con inhibidores químicos que actúan en distintos puntos; Wortmanina y LY294002 que inhiben a la cinasa PI3K. Por otra parte, mTOR es inhibida por el inmunosupresor rapamicina. (Modificado de Jastrzebski et al., 2007).

II ANTECEDENTES DEL EFECTO DE INSULINA EN PLANTAS

La insulina pancreática fue descubierta por F. Banting en 1921-1922 (Banting et al., 1922). Después de este descubrimiento, Collip reportó la presencia de sustancias parecidas a la insulina en las puntas verdes de cebollas, en hojas de lechuga, raíces de cebada y de betabel entre otras. Collip encontró que tanto en plantas como en levadura existía una proteína con estructura similar a la producida por el páncreas de mamíferos y sugirió el nombre de “glucocinina” para esta hormona (Collip, 1923). En ese mismo año se descubrieron moléculas parecidas a la insulina, presentes en germinados de papa y arroz (Best y Scott, 1923). Al siguiente año Best y colaboradores (1924) reportaron que extractos de remolacha disminuían los niveles de azúcar en la sangre de mamíferos como lo hace la insulina.

Trabajos posteriores al descubrimiento de la insulina reportaron su acción en la germinación de maíz; mostrando que altas concentraciones de insulina retardaban el crecimiento de las plantas en tanto que bajas lo estimulaban (Ellis y Eyster, 1923). No hay registro de resultados de la acción de insulina o glucocinina en plantas en los años siguientes, fue hasta 1970 cuando Khanna y colaboradores divulgaron la presencia de insulina en plantas (Khanna et al., 1974). Estos autores extrajeron una proteína con etanol ácido como lo había reportado el grupo de Banting 50 años atrás, a la cual nombraron v-insulina, polipéptido-p o p-insulina. Dicha proteína presentó actividad hipoglucémica pero mostró propiedades diferentes a la insulina, como la no inmunoreactividad con el anticuerpo contra insulina bovina y secuencia de aminoácidos diferente de la insulina animal (bovina). Posteriormente Collier y su grupo publicaron en 1987 que aislados proteicos de centeno etiolado, hojas de espinacas y *Lemna gibba* tenían propiedades similares a la insulina de animales; ellos obtuvieron para una de las proteínas aisladas la misma masa molecular (6 Kd) reportada para la insulina y bioactividad semejante a la insulina humana. En los años siguientes se reportó que la insulina y factores parecidos a insulina I y II (IGF-I e IGF-II); aceleraban el desarrollo postgerminativo de semillas de girasol, sandía y pepino (almacenadoras de grasa). En este reporte, los autores también midieron la actividad enzimática para la conversión de grasas a carbohidratos (Goodman y Davis, 1993). En

estudios más recientes, Sánchez de Jiménez y colaboradores en 1997 reportaron por efecto de insulina el reclutamiento a polisomas del transcrito de la proteína ribosomal S6 y la fosforilación incrementada de esta última durante la germinación de maíz (Sánchez de Jiménez et al., 1997). En ese mismo, año Beltrán-Peña reportó la presencia de dos péptidos identificados por Western Blot con anticuerpos de insulina bovina de 24 kDa y 8 kDa en extracto de maíz germinado por 46 horas (Beltrán Peña, 1997). Sánchez de Jiménez y colaboradores encontraron que la adición de 200 μ U/ml de insulina en maíz (*Zea mays* L. cv. Chalqueño) aceleraba la germinación y el crecimiento de las plántulas y, a nivel molecular estimulaba la fosforilación de la proteína S6 aumentando con ello la síntesis de proteínas ribosomales en ejes embrionarios de maíz en germinación (Sánchez de Jiménez et al., 1999). Por otra parte, García Flores y colaboradores en el 2001 reportaron el aislamiento de una proteína de 20 Kd de ejes embrionarios de maíz que a nivel fisiológico y molecular presentaba un efecto similar al que promovía la insulina bovina cuando era aplicada en ejes de maíz durante la germinación.

Ensayos en frijol (*Phaseolus vulgaris*) indicaron que concentraciones crecientes de insulina bovina incrementan la masa y tamaño de los epicotilos y raíces de frijol, así como el número de raíces laterales (Santos, 2003).

En el 2007, Ortega Domínguez reportó que insulina a bajas concentraciones mostraba los siguientes efectos sobre el crecimiento y arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana*: estimulaba el incremento en la longitud de la raíz principal, inducía la formación de nuevos primordios de raíces laterales, y promovía el alargamiento en la longitud de los pelos radiculares.

III CASCADA DE SEÑALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS CINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS (MAPK)

3.1 MAPK en Eucariontes.

La cascada MAPK es una ruta conservada evolutivamente entre los organismos eucariontes y consiste típicamente en tres tipos de proteínas cinasas: cinasa de MAP, cinasa de MAPK (MAPKK), y cinasa de MAPKK (MAPKKK) (Chen et al., 2001) (Fig. 3). En respuesta a estímulos externos la cascada MAPK es disparada promoviendo así, la expresión de genes que regulan: metabolismo, muerte, proliferación y diferenciación celular en mamíferos y levadura (Widmann et al., 1999; Chen et al., 2001). La cascada de las MAPKs también responde a estrés físico y químico, controlando así la adaptación y supervivencia celular.

Los mamíferos expresan al menos cuatro grupos distintos de MAPKs: cinasa relacionada a la señal extracelular (ERK)-1/2; cinasas Jun amino terminal (JNK 1/2/3); proteína p38 (p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$) y ERK 5. Estas diferentes MAPKs son activadas por las MAPKKs específicas: MEK1/2 para ERK1/2, MKK3/6 para p38, MKK4/7 (JNKK 1/2) para Jnks y MEK 5 para ERK 5 (Fig.3) Cada una de las MAPKKs sin embargo, pueden ser activadas por más de una MAPKKKs incrementando así la complejidad y diversidad de la señalización de MAPKs.

Una de las funciones más exploradas de la cascada de señalización de las MAPKs es la regulación de la expresión de genes en respuesta a un estímulo externo, otra de las funciones estudiadas es su papel en regulación de la proliferación así como también en el control de la supervivencia celular (Chang y Karin, 2001).

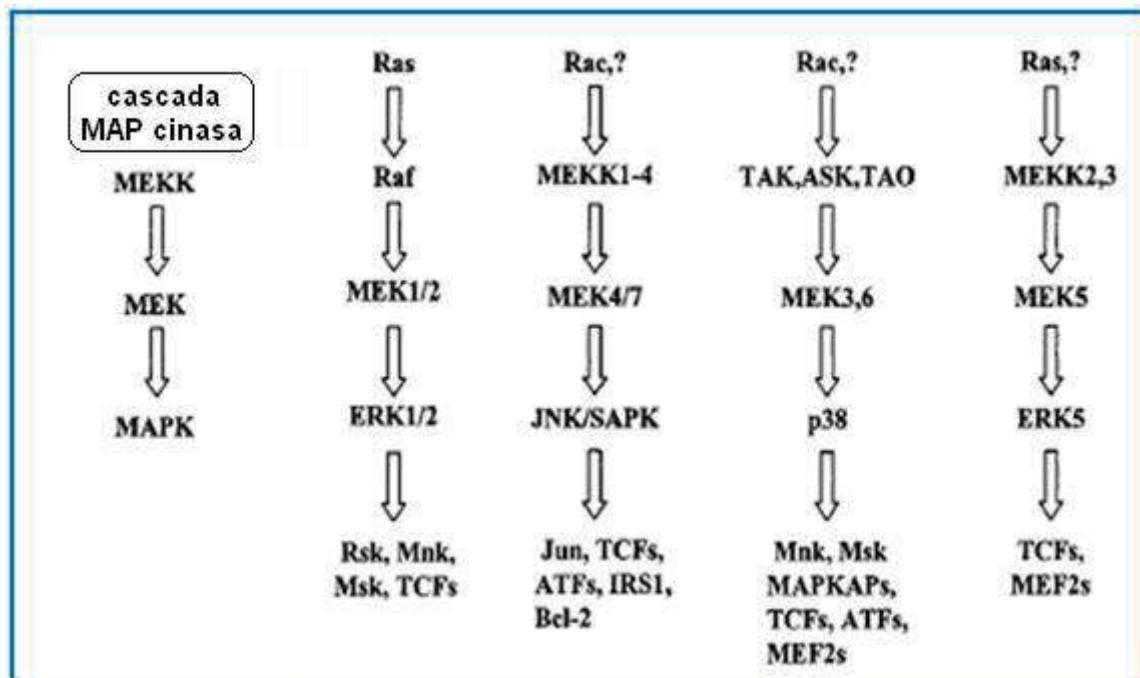


Figura 3. Cascada MAP cinasa. Las enzimas de las cascadas mostradas son descritas en el texto. Abreviaciones: ERK, cinasas que regulan señales extracelulares; MEK, cinasa MAP/ERK; MEKK, cinasa de la MEK; TCF, factor de complejo terciario; ATF, factor que activa la transcripción; IRS1, sustrato receptor de la insulina; Rsk, cinasa de la proteína ribosomal s6; Mnk, cinasa que interactúa con la MAP cinasa; Msk proteínas cinasas activadas por estrés y mitógenos; MAPKAP, proteínas cinasa activadas por MAP cinasa (modificado de Chen et al., 2001).

3.2 MAPK en plantas

En plantas, la cascada MAPK está involucrada en varias respuestas a estrés biótico y abiótico, a hormonas y también está comprendida en los procesos de división y desarrollo celulares (Nakagami et al., 2005). La secuenciación completa del genoma de *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) ha revelado que la familia de las MAPKs consiste de más de 80 genes que codifican para las MAPKKK, 10 genes para las MAPKK y 20 genes para las MAPK (Fig. 4) (Ichimura et al., 2002). Las MAPKs están agrupadas dentro de 4 subfamilias (A-D); las proteínas de los grupos A-C tienen un motivo de fosforilación TEY en el sitio activo; mientras que las del grupo D, presentan un motivo TDY.

A pesar del gran número de MAPKS, solamente tres de ellas (MAPK3, MAPK4 y MAPK6) han sido estudiadas en detalle. Recientemente, aproximaciones de genética reversa han sido usadas para elucidar la función de dichas MAPK en plantas. Se

encontró que MAPK4 es un regulador negativo de la resistencia sistémica adquirida y un regulador positivo de la expresión de PDF1.2 (gen de defensa en plantas) a través de las proteínas EDS1 y PAD4 (PHYTOALEXIN DEFICIENT 4), componentes esenciales de la respuesta de defensa mediada por ácido salicílico (Petersen et al., 2000; Brodersen et al., 2006). La proteína sustrato de MAPK4 es MKS1 (Andreasson et al., 2005). Varios estudios sugieren que MKK1 es también un factor cascada arriba de MPK4 y media señales de elicitores bacterianos, daño y síntesis de peróxido de hidrogeno (Huang et al., 2000; Matsuoka et al., 2002; Teige et al., 2004).

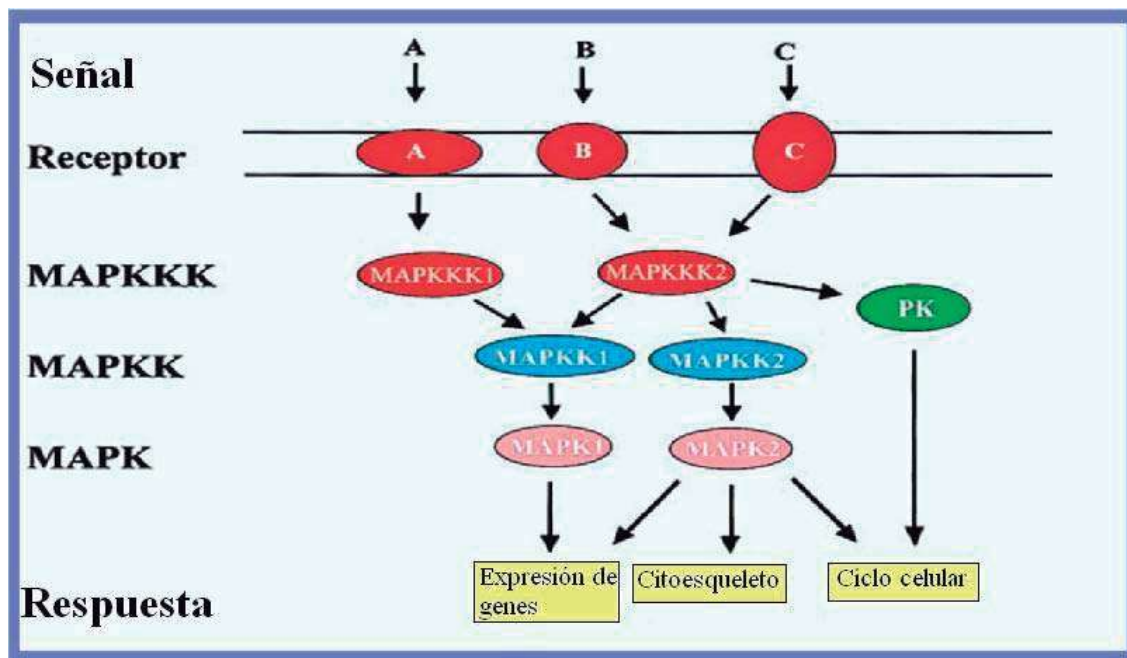


Figura 4. Función básica de la ruta de señalización MAPK. Los receptores censan estímulos extracelulares específicos (denotado por A, B y C) y activan a las MAPKKKs. Este paso usualmente comprende otros factores, tales como las proteínas G o proteínas cinasas. La activación de MAPKKKs resulta en la activación y fosforilación de MAPKKs, algunas MAPKKK son capaces de activar proteínas cinasas de otras familias (PK) y de otras rutas. Las MAPKKs activan su vez a las MAPKs. Diferentes sustratos son blancos de las MAPKs, incluyendo factores de transcripción, proteínas del citoesqueleto, u otras cinasas o fosfatasas las cuales están directamente relacionadas con las respuestas celulares involucradas al ciclo celular. Las flechas indican la activación de los blancos (Miles et al., 2005).

MPK3 está involucrada en la disminución del crecimiento postgerminativo inducido por ácido absícico (ABA), se sabe que, el ABA media las respuestas al estrés del medio ambiente en las plantas. Durante la germinación, el embrión emerge de la dormancia y las concentraciones de ABA declinan. La exposición a ABA exógeno

durante la germinación disminuye el desarrollo rápida y reversiblemente, permitiendo a las plántulas soportar el estrés temprano a agua, sin perder la viabilidad. La degradación proteolítica postgerminativa del factor de transcripción ABI5, es interrumpido por la percepción de un incremento del nivel de la concentración de ABA, seguido de la acumulación y reactivación del gen ABI5. La mutante de Arabidopsis hipersensible a ABA (*hyl1*) mostró que la señal de ABA es transmitida al aparato transcripcional a través de la señalización de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (Lu et al., 2002).

El ácido jasmónico (JA) juega un papel clave en las respuestas a estrés del medio ambiente y procesos de desarrollo de plantas. JIN1 es el principal regulador positivo de la expresión de genes inducida por JA y esencial para procesos de desarrollo inducido por JA en *A. thaliana*. Takahashi y colaboradores en el 2007 llevaron a cabo un estudio que se realizó con plántulas mutantes Knock-Out y plantas MAPKK transgénicas activadas constitutivamente, identificaron la cascada MKK3-MPK6 en Arabidopsis. Cuatro MAPKKs MKK2, MKK4, MKK5 y MKK3, activan a la MPK6 en Arabidopsis. Identificando la cascada MAPKs compuesta por: MAPK CINASA 3 (MKK3)- MAPK6 (MPK6), la cual es activada por JA en Arabidopsis. Dichos autores también mostraron que JA controla negativamente la expresión de ATMYC2/JIN1. Los autores proponen un modelo explicando como MPK6 está comprendida en distintas señales: JA, patógenos y estrés por frío/sal, en tres respuestas diferentes en Arabidopsis (Takahashi et al., 2007) (Fig. 5).

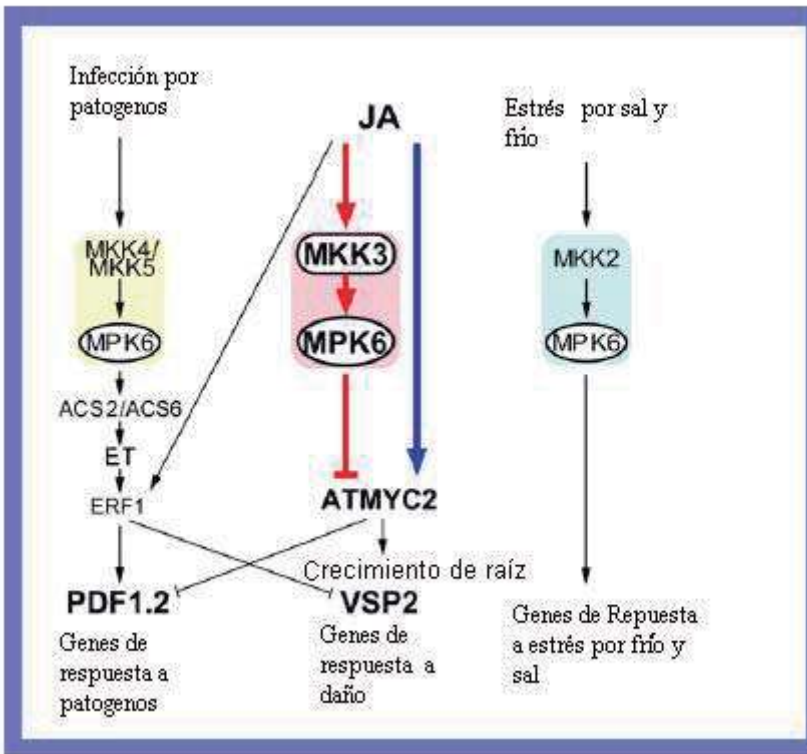


Figura 5. Posibles funciones de la cascada de señalización de MPK6. Al menos tres cascadas MKK2-MPK6, MKK4/MKK5-MPK6 y MKK3-MPK6 funcionan en Arabidopsis. Cada una de las cascadas juega un papel específico en respuesta a diferentes estímulos, y las cascadas transducen su señal para adaptarse a varios cambios ambientales por cruzamiento de señales una con otra. La cascada MKK2-MPK6 regula los genes de respuesta a estreses por sal y frío, la cascada MKK4/MKK5-MPK6 regula los genes de respuesta a patógenos activando la biosíntesis de Etileno y la nueva cascada MKK3-MPK6 regula la señalización por JA. La señal MKK3-MPK6 activada por JA regula negativamente la ruta de JA y afecta la expresión de genes dependiente de JA y sensibilidad del crecimiento de la raíz a través de ATMYC2. (Takahashi *et al.*, 2007).

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa inducida contra enfermedades infecciosas. Una función clave de la inmunidad innata es la detección de PAMPs (**patrones moleculares asociados a patógenos**) producidos por los agentes infecciosos. En insectos y mamíferos el reconocimiento de PAMPs es a menudo mediado por proteínas TLRs (Toll and TOLL-like receptor). En plantas los dominios LRR (**receptores ricos en leucina**) se encuentran también en los productos de genes de resistencia a enfermedades, los cuales son receptores importantes para la inmunidad innata (Asai *et al.*, 2002).

Se sabe que la flagelina bacteriana es un PAMP y es reconocido por el sistema inmune innato en diversos organismos incluyendo insectos, mamíferos y plantas. En *Arabidopsis* el receptor LRR: FLS2 es requerido para la señalización de flagelina; estudios en *A. thaliana* utilizando un sistema de expresión transitoria de protoplastos permitieron identificar una ruta completa de la cascada MAPK en plantas (MEKK1, MKK4/MKK5 y MAPK3/MAPK6) y WRKY22/WRKY29, siendo estos últimos factores de transcripción que encienden genes cuando la ruta de señalización es activada por flagelina. La activación de esta cascada de MAPK confiere resistencia a bacterias y a hongos patógenos, sugiriendo que los eventos de señalización iniciados por diversos patógenos convergen todos en una sola cascada MAPK (Asai et al., 2002) (Fig. 6).

Por otra parte se sabe que las plantas para poder defenderse del ataque de patógenos sintetizan sustancias como las fitoalexinas que son compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular, producidos después del ataque de patógenos. En *A. thaliana* MAPK3 (MAPK) y MPK6 (MAPK), son activadas después del tratamiento con moléculas asociadas a patógenos. La activación de la cascada MAPK3/MAPK6 regula rápida y coordinadamente múltiples genes que codifican para enzimas que se encuentran en la ruta de la biosíntesis de camalexina (principal fitoalexina en *Arabidopsis*). Mutaciones en MAPK3 y MAPK6 comprometen la acumulación de camalexina inducida por *B. cinérea* la cual es asociada con la reducción de la resistencia, soportando así la evidencia del papel positivo de la cascada MAPKs en la señalización de la biosíntesis de camalexina en el ataque a plantas por patógenos (Ren et al., 2008).

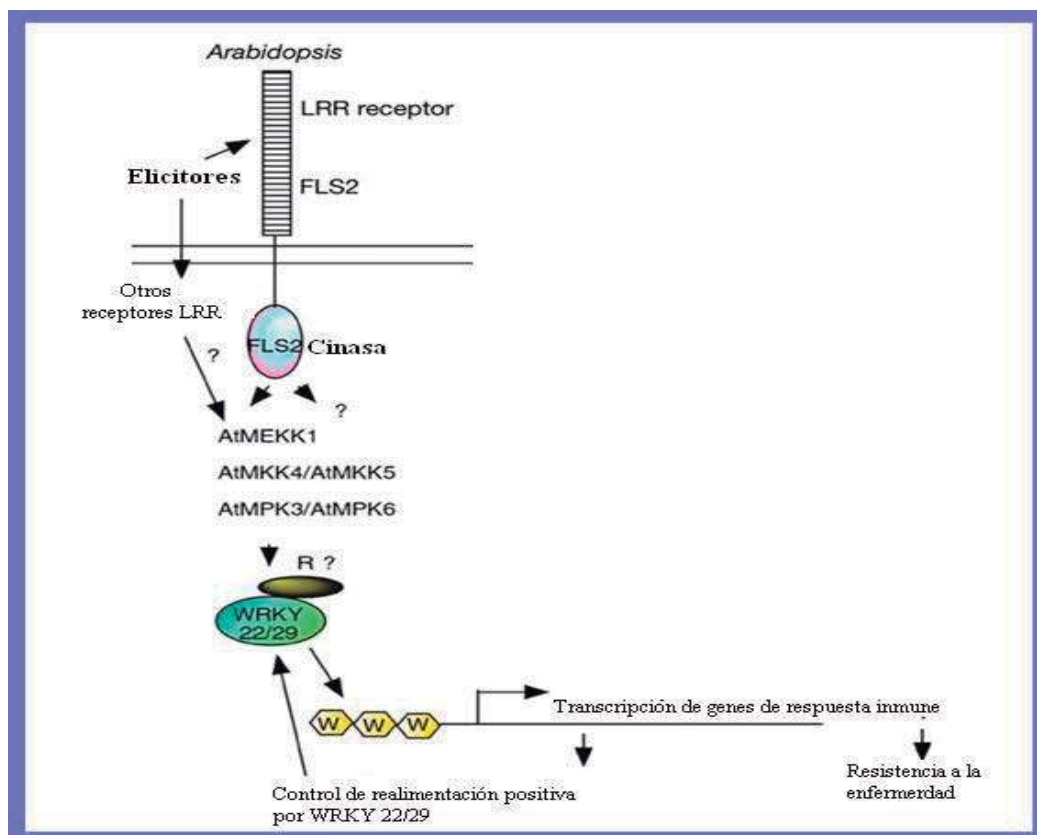


Figura 6. Modelo de la señalización del sistema inmune innato activado por receptores LRR en *Arabidopsis*. Un supuesto receptor (R) podría controlar la actividad de WRKY22 y WRKY29 esto se sugiere porque su sobreexpresión evita el requerimiento de elicitores. La ruta de señalización es conservada para las respuestas inmunes innatas en animales (modificado Asai et al., 2002).

Por otra parte, ejemplo de la activación de las dos rutas (PI3K y MAPK) por un mismo estímulo fue el reportado por Mizoguchi y colaboradores (1996), usando como modelo de estudio a *A. thaliana*. Ellos encontraron que los niveles de transcritos de tres proteínas cinasas AMEKK1 (MAPKKK), ATMAPK3 (MAPK) y ATPK19 (proteína relacionada a p70 y p90 de la cinasa S6) incrementaron marcada y simultáneamente cuando las plantas fueron expuestas a temperaturas bajas, daño y estrés salino. Estos resultados sugieren que las proteínas involucradas en varias rutas de transducción de señales, pueden ser reguladas tanto a nivel transcripcional como postraduccionally en plantas superiores.

3.3 MAPK en el desarrollo de plantas.

Aunque esta ruta se ha estudiado principalmente en respuestas de defensa, existen reportes de estudios de la misma en procesos de desarrollo y división celular. Un ejemplo es el reportado por Suzuki y Machida en 2008, en células de tabaco en donde encontraron que NPK1 (miembro de la familia de las MAPKKK), fue activado principalmente en ápices de brotes y raíz de plantas de tabaco. La cantidad de proteína NPK1 declinó marcadamente al final de la citocinesis; sugiriendo que NPK1 juega un papel importante en la formación de pared celular. Los autores también reportaron que los homólogos de NPK1 en Arabidopsis (*ANP1*, *ANP2*, *ANP3*) al mutarse dos de ellos (*ANP2* y *ANP3*) causaban enanismo en las plantas y defecto débil en citocinesis. Mientras que la triple mutante (*ANP1*, *ANP2*, *ANP3*) fue gametofíticamente letal. Por otra parte, también elucidaron la cascada de las MAPK abajo de las MAPKKK, en tabaco constituidas por NPK1/NQK1/NRK1. Mientras que la cascada para Arabidopsis estaba formada por *ANP3/AtMKK6/AtMAPK4*. La activación de la ruta en tabaco fue observada solamente en fase M tardía del ciclo de división celular y las cantidades de las proteínas NPK1 no cambiaron. Se identificaron dos proteínas que activaron a NPK1 llamadas NACK1 y NACK2. Se sabe, que NACK1 es requerida para una adecuada localización y activación de NPK1 en una región limitada y es importante para la citocinesis mediada por fragmoplastos (Suzuki y Machida en 2008).

La cascada MAPK formada por NPK1/NQK1/NRK1 y activada por NACK1 fue denominada como NACK-PQR y parece estar también altamente conservada en Arabidopsis; en tabaco se identificó un blanco para esta ruta que fue una MAP65, un miembro de la familia de proteínas asociadas a microtubulos (Fig. 7).

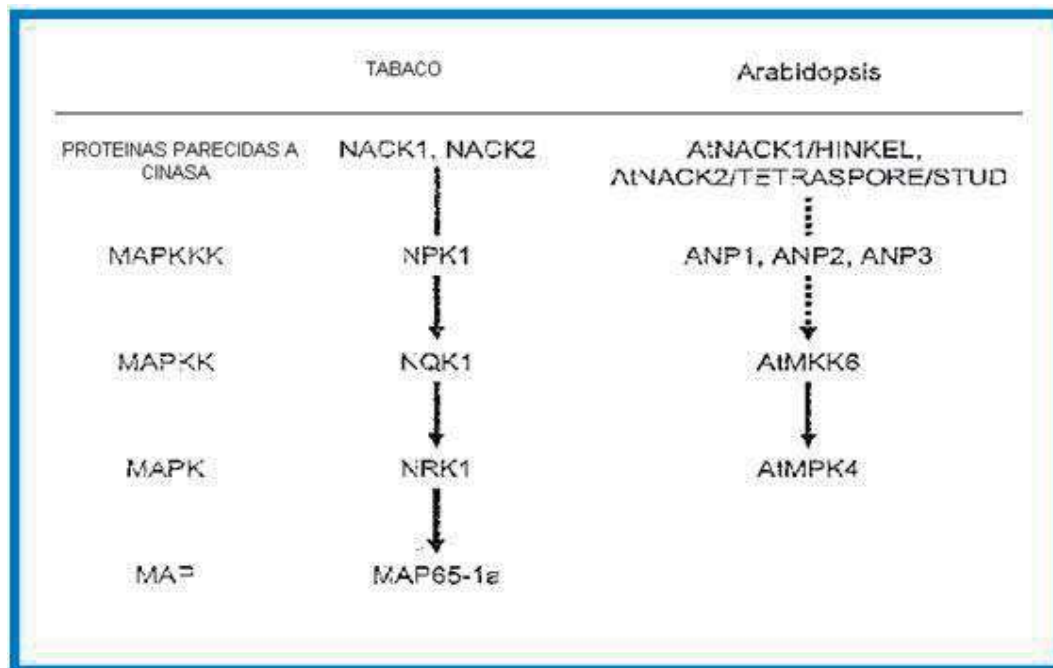


Figura 7. Ruta de MAP cinasa que regula la citocinesis en plantas. Se indican todos los componentes de la ruta MAP cinasa que regulan la expansión de fragmoplastos en tabaco y Arabidopsis. Cada línea indica la unión proteína-proteína entre dos componentes y cada flecha indica la fosforilación por la cinasa de arriba. Las rutas se confirmaron con experimentos bioquímicos y son mostradas como líneas sólidas y flechas. Rutas no confirmadas se marcan con líneas punteadas y flechas (Suzuki y Machida, 2008).

Otro ejemplo de la ruta MAPK involucrada en el desarrollo celular es el reportado por Samaj y colaboradores en el 2002. Los autores analizaron la función de la MAPK SIMK de alfalfa durante la formación de pelos radiculares. En células epidermales, SIMK es predominantemente nuclear. Durante la formación de los pelos radiculares, SIMK fue activada y redistribuida del núcleo a las extremidades de crecimiento de pelos radiculares donde se ensamblaron en una red densa de F-actina. La despolarización de actina por la trunculina B resultó en la recolocación de SIMK en el núcleo. Inversamente, la estabilización de la actina por jasplacínolido, provocó que SIMK colocalizara con las hebras densas de actina en el citoplasma. Importantly, la trunculina B y jasplacínolido, activaron a SIMK en un cultivo celular derivado de raíz. La pérdida de SIMK enfocada a la extremidad de pelos radiculares y de actina se indujo por el inhibidor específico de MAPKs (UO 126) y resultó en la formación de pelos radiculares aberrantes. UO 126 inhibió los blancos de las vesículas de tráfico y polarizó el crecimiento de pelos radiculares. En contraste la sobreexpresión de SIMK indujo

crecimiento rápido de las puntas de los pelos radiculares; estos datos indican que SIMK juega un papel crucial en el crecimiento de pelos radiculares (Samaj et al., 2002).

IV. ARABIDOPSIS COMO MODELO DE ESTUDIO

Arabidopsis es una planta de la familia Brassicaceae, varias especies comprenden al género de Arabidopsis, la más conocida y extensamente usada en investigación es *A. thaliana*. La planta de Arabidopsis presenta hojas de roseta de aproximadamente de 2-4 centímetros de diámetro de la cual se desprende un tallo floral y puede alcanzar una altura de 20 a 70 cm. Arabidopsis se encuentra en todas las regiones de Europa, Asia y en el norte de África y ha sido introducida a otras áreas incluyendo Norteamérica y Australia. Su hábitat natural es suelo arenoso. Las ventajas de usar Arabidopsis en investigación es que, en comparación con otras angiospermas su genoma es pequeño y está totalmente secuenciado. Dicho genoma está constituido de 125 millones de bases y se predice que contiene aproximadamente 25 000 genes, que no es poco si se compara con los genes que tiene la mosca de la fruta (13 600), la razón principal por la cual el genoma de Arabidopsis es pequeño es que contiene poco DNA repetitivo, y alrededor del 60 % del DNA nuclear codifica para proteínas funcionales. Esto último es extremadamente importante cuando se adoptan estrategias de saturación mutagénica, o de clonación basadas en el mapa genético. Esta planta es fácil de cultivar, de crecimiento rápido, ya que completa su ciclo vital en 6 a 8 semanas, produciendo miles de semillas. El crecimiento no depende de ninguna época del año y por lo tanto varias generaciones pueden ser producidas en un año, lo cual permite el análisis genético rápido. Además se conocen más de 50 000 mutantes lo que facilita las investigaciones destinadas a individualizar los genes y conocer su función.

Otra característica de Arabidopsis es que es un organismo diploide (cromosoma haploide número $n=5$). Además de ser fácilmente transformada por *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*). Presenta la capacidad de autofertilizarse lo cual permite

el mantenimiento de líneas homocigas, y esto permite la realización de cruzas cuando se requieran (Wilson, 2000).

4.1 Etapas de desarrollo de la planta de Arabidopsis

A los dos días de germinación se pueden observar dos cotiledones que están sostenidos a un hipocotilo y una raíz primaria. El número de hojas producidas en roseta varían de cinco a más de treinta dependiendo del genotipo de la planta y condiciones de crecimiento (Fig. 8, A). El crecimiento vegetativo de Arabidopsis consiste de una roseta de hojas de aproximadamente de 2-5 cm de diámetro y de un tallo de 20-70 cm de longitud como se observa en la Fig. 8, B. Las flores de esta planta son de aproximadamente 3 mm de longitud y 1 mm de ancho y se producen en intervalos formando una inflorescencia o racimo. Las flores están formadas de cuatro sépalos, cuatro pétalos, seis estambres (cuatro largos y dos cortos), y un gineceo (Fig. 8, C). Cada estambre se caracteriza por dos regiones: filamento y anteras. Exteriormente el gineceo está dividido dentro de tres regiones: ovario, estigma y estilo. El ovario consiste en dos carpelos que al madurar pueden ser vistos separados por un falso tabique (Fig. 8 D).

La planta de Arabidopsis se autofertiliza, produciendo vainas que están compuestas de dos carpelos separados por un falso tabique (Fig.8, E); las vainas maduras y secas cambian de color verde a amarillo/café y las semillas son liberadas para permitir su distribución (Fig.8, F) (Wilson, 2000)

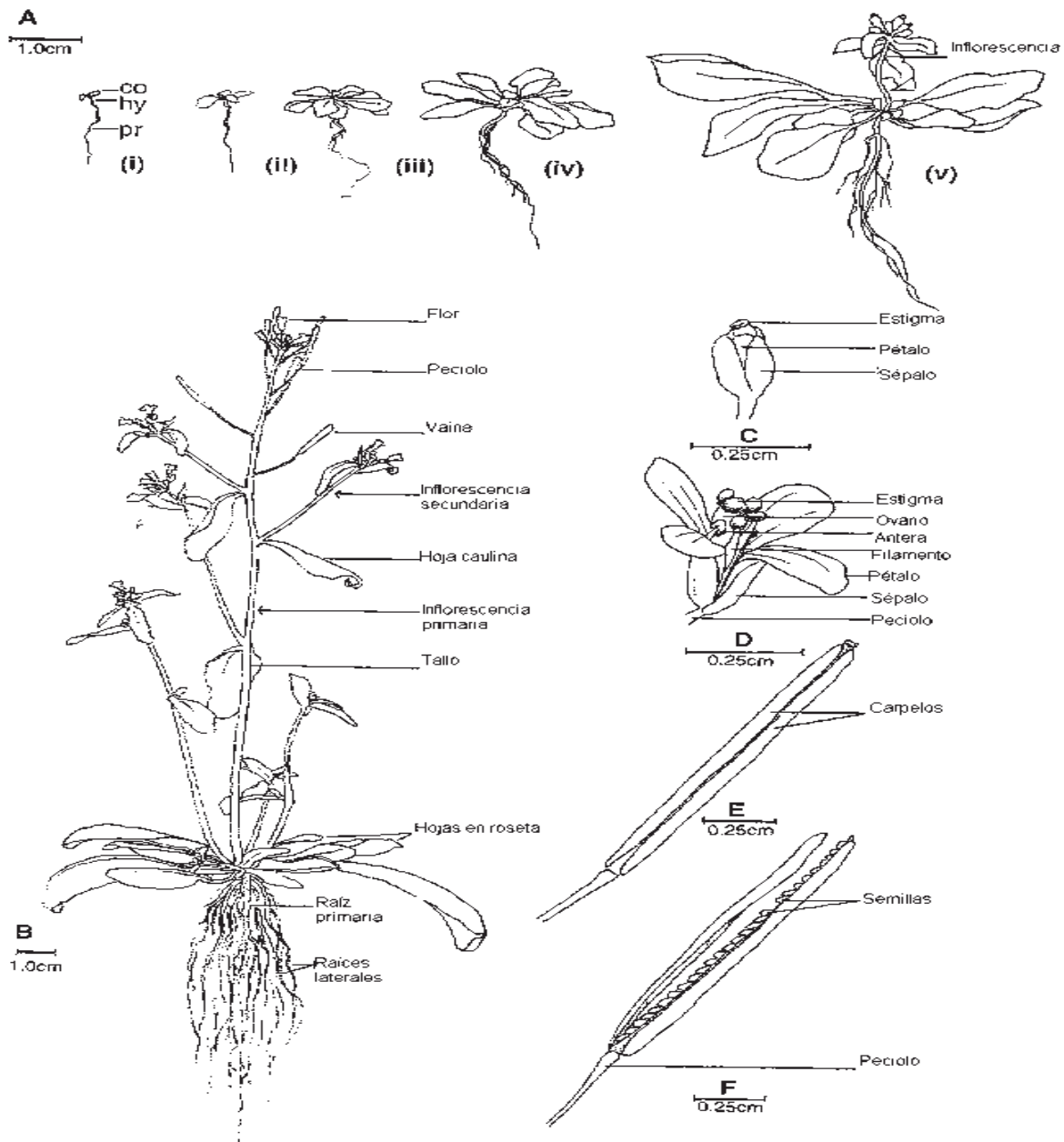


Figura 8. A. Etapas del desarrollo de Arabidopsis. Planta crecida a 25°C con un fotoperiodo de 20 horas de luz. Etapas (i) a (v) representan a la plántula crecida por 2 y 21 días después de germinar. La transición a la fase reproductiva de crecimiento (v) está caracterizada por elongación de los internodos en la inflorescencia. **B.** Planta madura de Arabidopsis a 35 días de germinada aquí observamos los diferentes órganos que la conforman. **C-F** características de las partes aéreas de la planta. Los diagramas muestran con detalle la estructura de las flores y frutos de esta planta (Wilson, 2000).

4.2. Arquitectura de la raíz

La raíz realiza una variedad de funciones, como mantener a la planta vertical y participan también en la absorción de nutrientes y agua, y constituye un órgano importante de almacenamiento de nutrientes en algunas especies. También, las raíces producen reguladores del crecimiento como las auxinas, citocininas y metabolitos secundarios como flavonoides y alcaloides los cuales participan en la defensa contra patógenos (López- Bucio et al., 2005).

La raíz de *Arabidopsis* tiene varias características adicionales que la hacen un buen sistema modelo para estudiar procesos del desarrollo vegetativo; su estudio ha contribuido al entendimiento de varios aspectos en el proceso de desarrollo vegetal. Las características de la raíz, que la han llevado a ser un excelente sistema de estudio se debe en gran parte a su invariable ontogenia y organización celular fija. La diferenciación celular continúa en la región meristemática de la raíz permitiendo monitorear el desarrollo en los procesos después de la embriogénesis. La simplicidad en la organización celular de la raíz, junto con la disponibilidad de varias clases de mutantes y la identificación de genes han permitido el entendimiento de procesos de desarrollo a nivel celular (Scheres y Wolkenfelt., 1998). La raíz de la planta de *Arabidopsis* es un órgano relativamente sencillo que consiste de una raíz principal, pelos radiculares y raíces laterales. El crecimiento continuo de la raíz se da a través de la actividad proliferativa del meristemo apical de la raíz. En tanto que los procesos de diferenciación producen los diferentes tipos de tejidos y células presente en la raíz madura (López- Bucio et al., 2005). Así mismo, la raíz de *Arabidopsis* presenta una morfología característica que se divide en diferentes zonas: división, elongación, diferenciación y maduración celular (Fig. 9) (Montiel et al., 2004).

El meristemo de la raíz provee de nuevas células, las cuales se añaden a las filas preexistentes extendiéndose hacia la raíz madura. Arriba del meristemo radicular se localiza la zona de elongación en la cual se añaden nuevas células en división (menos frecuente que en el meristemo) y después se expanden totalmente diferenciadas en la zona de maduración (Casson y Lindsey, 2003). Bajo condiciones ambientales

favorables, la formación de pelos radiculares ocurre en la zona de diferenciación de la raíz primaria (López- Bucio et al., 2005).

A continuación se describe con detalle la arquitectura de las diferentes partes de la raíz:

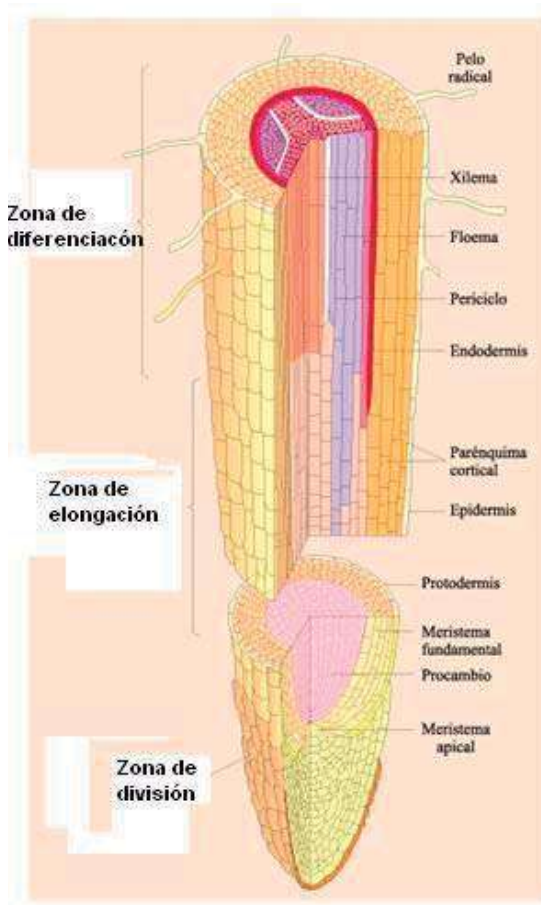


Figura 9. Zonas de la raíz principal de Arabidopsis.

4.2.1 Zona meristemática o de división

Los tejidos de la raíz primaria de Arabidopsis se organizan en capas concéntricas; en la Fig. 10, se muestran los anillos concéntricos de células que van del exterior al interior: epidermis, cortex, endodermis, periciclo y haz vascular; conteniendo este último las células vasculares internas. En la Fig. 10 se representa la zona meristemática de la raíz; donde observamos una región central de células mitóticamente inactivas llamado centro quiescente (QC), cuya función consiste en inhibir la diferenciación del grupo de

células iniciales (Clowes, 1954). En *A. thaliana*, el QC está compuesto de cuatro células (Baum et al., 2002).

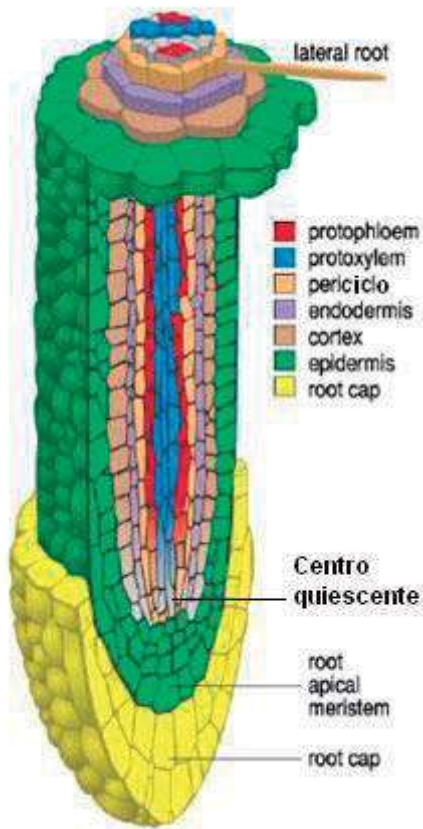


Figura 10. Organización radial de la raíz. Se compone de filas de células diferenciadas que llevan a cabo funciones específicas.

4.2.2 Zona de elongación

El meristemo de la raíz provee nuevas células, las cuales se añaden a filas pre-existentes que se extienden a la raíz madura. Arriba del meristemo de la raíz, llamada también zona de elongación se añaden las nuevas células formadas, las cuales se expanden totalmente para diferenciarse en la zona de maduración en varios tipos celulares de la raíz (Casson y Lindsey, 2003).

4.2.3 Zona de diferenciación

En la zona de diferenciación se forman dos órganos importantes para la raíz: los pelos radiculares más próximos a la zona de elongación y las raíces laterales.

4.2.4 Pelos radiculares

Los pelos radiculares se presentan dependiendo de la especie y de factores ambientales (disponibilidad de nutrientes, pH del suelo y/o presencia de microorganismos) en la zona de diferenciación de la raíz primaria. Bajo condiciones ambientales favorables, la formación del pelo radicular toma lugar en la raíz en la zona de diferenciación y crecen a partir de la epidermis iniciando como una protuberancia tubular perpendicular a la superficie epidérmica (Montiel et al., 2004).

En *Arabidopsis*, los pelos radiculares son de aproximadamente 10 μm de diámetro y pueden crecer hasta 1 mm o más en longitud. Las funciones principales de los pelos radiculares consisten en incrementar la superficie total de absorción en el sistema de raíz y participar en la distribución de nutrientes y agua, así como interactuando con microorganismos. En *Arabidopsis*, las células epidermales que producen pelos radiculares (tricoblastos) están intercaladas entre células que carecen de pelos radiculares (atricoblastos) (Grierson y Schiefelbein, 2002).

4.2.5 Raíces laterales

Estudios histológicos han mostrado, en angiospermas, que las raíces laterales son derivadas del periciclo, la capa profunda de los tejidos de la raíz principal. También se han encontrado algunas contribuciones de células endodermales en algunas monocotiledóneas. La iniciación de las raíces laterales ocurre en la zona de diferenciación de la raíz en donde las células del periciclo no se están dividiendo activamente. Las células maduras del periciclo, una vez estimuladas por auxinas, se desdiferencian y proliferan formando un primordio de la raíz lateral (LRP). Dicho primordio crece a través de las capas sobrepuestas de la célula de la raíz madre y eventualmente surge rompiendo la epidermis. Las células del periciclo que se convierten en las células fundadoras del LRP se localizan en los polos del xilema, es

difícil predecir qué células del periciclo serán las seleccionadas para la formación de las raíces laterales (Malamy y Benfey, 1997).

V ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

La expresión de genes se puede analizar a nivel transcripcional o traduccional. En este último nivel se evalúan las proteínas por Western blot e inmunoprecipitación usando anticuerpos específicos para la proteína de estudio. A nivel transcripcional se analiza el mRNA por varias técnicas, siendo las más usadas el Northern blot y la amplificación del transcrito por RT-PCR.

La técnica de transcriptasa reversa- reacción de polimerización en cadena (RT-PCR) es una adaptación de la Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR) que permite detectar y medir la acumulación de mRNAs escasos en órganos, tejidos o células. Para el análisis por RT-PCR, primero se requiere hacer la extracción de RNA total, el cual posteriormente es copiado a cDNA de una solo hebra, por medio de la transcriptasa reversa. Las moléculas de cDNA entonces, sirven de molde para la reacción de PCR usando un par de oligonucleótidos específicos para el gen estudiado. Los fragmentos de DNA amplificados son visualizados por electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Una de las dificultades de la técnica es la fácil degradación del RNA por contaminación con RNAsas (Tagu y Moussard, 2003).

La PCR es una técnica que permite amplificar secuencias de DNA *in vitro* por repetición de la reacción de elongación a partir de cebadores específicos, con una DNA polimerasa. Esta técnica, pudo desarrollarse gracias al descubrimiento de una eubacteria termófila *Thermus aquaticus* que se encuentra a temperaturas de 70 a 75 °C y cuya DNA polimerasa es estable a temperaturas de hasta 100 °C.

Fundamento

La técnica de amplificación *in vitro* se basa en la repetición de 3 procesos (Fig. 11):

- La desnaturalización de las dos cadenas de DNA a una temperatura elevada (cerca de 95 °C) para producir moléculas de DNA monocatenarias.
- La hibridación (*annealing*) de cebadores, los oligonucleótidos (o *primers*) complementarios a las secuencias de los extremos del DNA a amplificar (para ello se baja la temperatura a valores normalmente comprendidos entre 40 y 65 °C).
- La reacción de elongación a partir de los cebadores usando una DNA polimerasa termoestable (para la *Taq* polimerasa la temperatura optima es de 72 °C).

Los productos de elongación se desnaturalizan de nuevo por calor y se repite el proceso, de manera que a cada ciclo el número de copias de DNA se dobla, obteniéndose 2^n moléculas después de n ciclos.

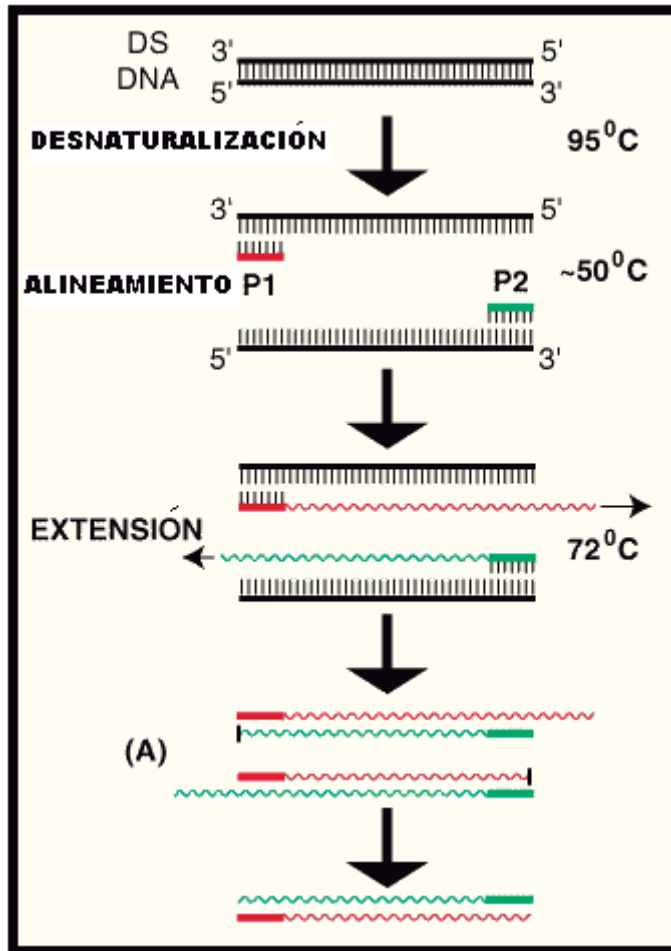


Figura 11. Mecanismo de la reacción de polimerización en cadena (PCR)
(<http://www.flmnh.ufl.edu/cowries/amplify.html>).

5.1 Sobreexpresión de una proteína

La sobreexpresión de una proteína es una herramienta muy útil dentro de la biotecnología ya que con esta técnica es posible obtener grandes cantidades de proteína nativa o mutante tanto para aplicaciones farmacéuticas (por ejemplo, insulina), así como para realizar estudios estructurales de la proteína. Un prerequisite para llevar a cabo la sobreexpresión es el de conocer la secuencia o haber clonado la secuencia del gen de la proteína de interés.

Una de las herramientas más utilizadas de transformación genética vegetal es la que se lleva a cabo por medio de la bacteria *A. tumefaciens*; la cual describiremos a grandes rasgos a continuación:

A. tumefaciens es una bacteria del suelo, responsable de la formación conocida como “cresta de gallo”, enfermedad que se presenta en algunas plantas dicotiledóneas. La infección por dicha bacteria, se manifiesta por una división celular aparentemente anárquica en forma de tumor, conocida como agalla. Durante la infección, la bacteria integra de forma estable un fragmento de DNA en el genoma de células vegetales infectadas. Este proceso ha sido domesticado con fines biotecnológicos. Ha sido adaptado para la transformación de levaduras, hongos filamentosos y células Hela humanas (Tagu y Moussard, 2003).

Descripción del mecanismo natural

El plásmido Ti de *A. tumefaciens* contiene la mayor parte de la información genética necesaria para permitir la transferencia de parte de su secuencia al genoma de la célula huésped (Fig. 12 A). La fracción del plásmido Ti transferido a la célula vegetal se designa como T-DNA. Esta región está delimitada por dos repeticiones directas de 25 pares de bases, los extremos izquierdo y derecho. Entre estos extremos se encuentran; 1) los genes (oncogenes) cuya expresión induce una desregulación del balance hormonal de las células transformadas induciendo el crecimiento del tumor; (ii) genes que controlan la síntesis de opinas, aminoácidos conjugados a un azúcar que pueden ser utilizados únicamente por la bacteria y no por la célula vegetal. Las proteínas encargadas de transferir a la célula vegetal el DNA que se encuentra entre los extremos están codificadas por los genes de virulencia agrupados en la región *vir* del plásmido Ti. Estas proteínas participan en la transferencia del DNA. Aunque el conocimiento de la interacción entre *A. tumefaciens* y las células vegetales ha aumentado rápidamente, todavía no se conocen con precisión los mecanismos moleculares implicados en la transferencia del T-DNA (Tagu y Moussard, 2003).

Utilización biotecnológica de *A. tumefaciens*

La interacción de *A. tumefaciens* y la célula vegetal huésped constituye un mecanismo natural de transferencia génica (Fig. 12 B). Este mecanismo se ha modificado para conseguir una herramienta versátil de transformación génica. Dado que las únicas secuencias de T-DNA indispensables para la transferencia son los extremos derecho e izquierdo, se pueden eliminar las secuencias que se encuentren entre ellas y que incluyen los oncogenes responsables de la inducción de tumores, y sustituirlas por los genes que se desean introducir en el genoma huésped. En la mayoría de los casos el T-DNA modificado se clona en un pequeño plásmido adicional que recibe el nombre de vector binario. En la mayoría de los casos los vectores binarios contienen un origen de replicación (ori) funcional tanto en *E. coli* como *A. tumefaciens*, (Fig. 12 B) marcadores de selección para plantas y bacterias, las secuencias de los extremos del T-DNA y un sitio de clonación múltiple. Por otra parte entre los dos extremos del T-DNA se coloca tanto el gen que se quiere introducir en las células huésped, así como un marcador que permita seleccionar las células transformadas. La transformación puede ser útil para modificar la expresión de un gen endógeno de la planta (Tagu y Moussard, 2003).

Transformación

Las células vegetales o explantes (discos foliares, entrenudos de tallos) ha transformar se ponen en contacto con un cultivo diluido de *A. tumefaciens* en condiciones controladas. En esta etapa de co-cultivo el T-DNA modificado se transfiere a la célula vegetal y se integra en su genoma. El proceso de descontaminación consiste en remover gracias a los enjuagues sucesivos, con lo cual se puede eliminar las bacterias y el tejido vegetal se cultiva en presencia de un antibiótico que permite la selección de las células transformadas genéticamente. Estas células pueden ser multiplicadas y cultivadas en un medio que permite la regeneración de plantas completas, a partir de brotes adventicios o embriones somáticos. Las plantas transgénicas entonces se caracterizan molecularmente; primero se comprueba la integración del T-DNA en el genoma y se estima el número de copias integradas; se corrobora también el nivel de expresión de los genes introducidos y la acumulación de

sus correspondientes proteínas. El fenotipo de las plántulas transgénicas se analiza por comparación con el de las plantas no transformadas (Fig. 12 C). En el caso de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* se ha desarrollado un método de transformación que permite su utilización a gran escala. Esta técnica consiste en sumergir las flores inmaduras de la planta en un cultivo de *A. tumefaciens*, seleccionándose las plantas transgénicas a nivel de germinación a partir de las semillas producidas por estas flores (Tagu y Moussard, 2003).

La obtención de plantas de sobreexpresión de Atmapk3 (usada en este estudio) se realizó amplificando el cDNA del gen por RT-PCR; posteriormente el fragmento amplificado fue clonado en el vector pT-Adv, secuenciado y posteriormente subclonado en el vector binario pFGC1008 entre el promotor CaMV35s y el terminador ocs 3'. Este vector fue transferido por medio de *A. tumefaciens* y esta bacteria fue usada para transformar a la planta de *A. thaliana* y las líneas transformantes fueron verificadas por análisis de PCR (Lu et al., 2002).

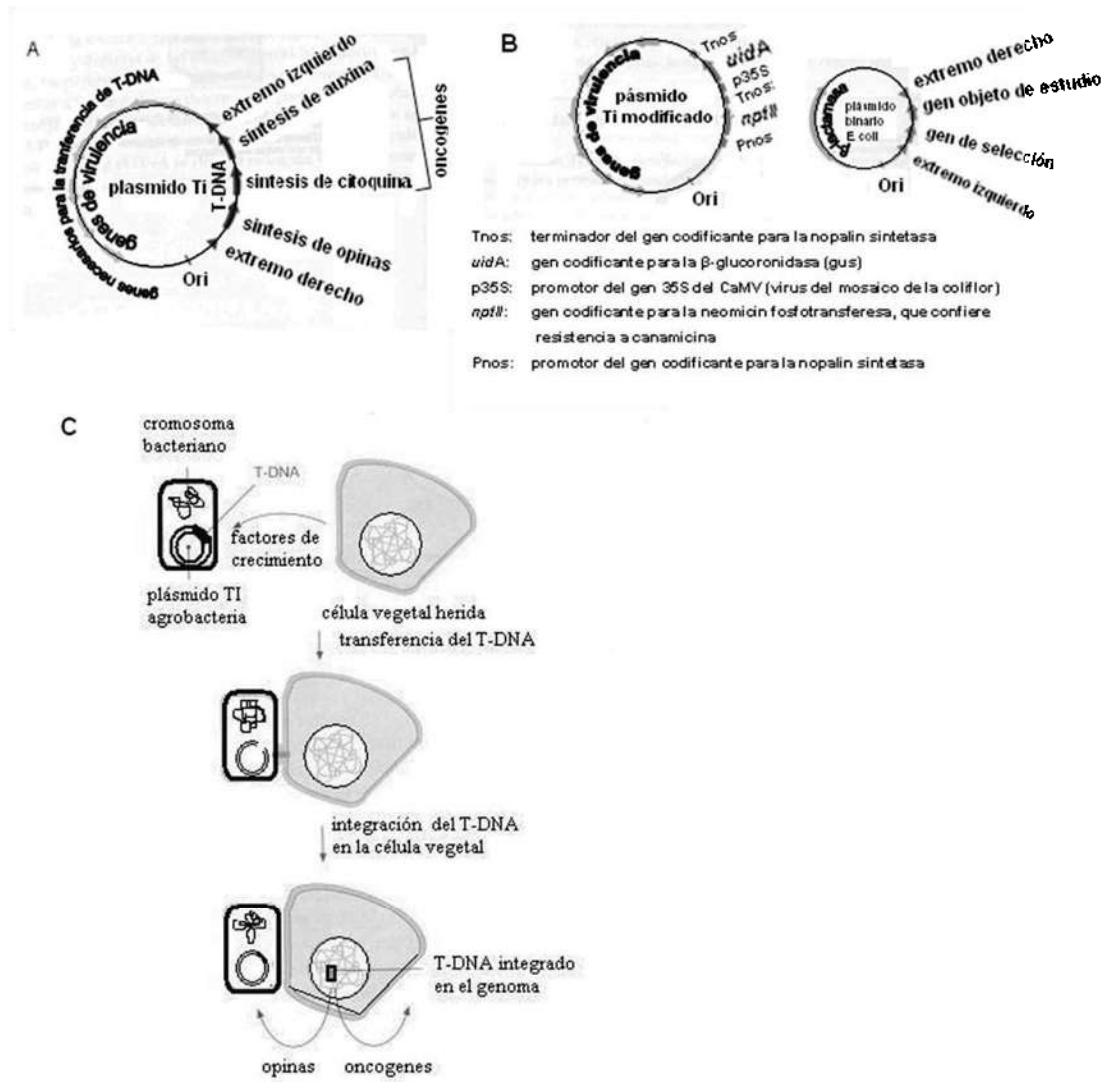


Figura 12. Plásmido TIF y la transformación de plantas por *A. tumefaciens*. A) Plásmidos TIF con sus componentes, B) Plásmidos TIF modificados y el plásmido binario de *E. coli*, C) Transformación con *A. tumefaciens* (Tagu y Moussard, 2003).

5.2 Inactivación de genes por RNA de interferencia.

La utilización de plantas transgénicas permitió, a principios de los años 90, descubrir mecanismos insospechados de inactivación de la expresión genética. Sorprendentemente, la inactivación del gen de interés fue observada en plantas transformadas con construcciones diseñadas para sobre-expresarlo. Parecería que el aporte artificial de copias suplementarias de un gen bloqueaba la expresión endógena de todas las copias de dicho gen. Posteriormente se demostró que el fenómeno detectado tenía lugar post-transcripcionalmente y que podía explicarse por la

degradación de los mRNA homólogos producidos por el gen residente y el transgén. El análisis de este fenómeno, conocido ahora como silenciamiento post transcripcional de genes, PTGS por sus siglas en ingles (*Post-Transcripcional Gene Silencing*), demostró que está asociado a la presencia de RNA de doble cadena (dsRNA). La formación de esta dsRNA desencadenada en algunos casos, por la presencia en el *locus* transgénico de repeticiones invertidas que llevan a la producción de mRNA anti-sentido; mientras que, en otros casos, son la consecuencia, por un mecanismo que permanece todavía inexplicado, de una producción inusualmente alta de un transcrito normal. Por otra parte, en 1998 se mostró que la inyección en *Caenorhabditis elegans* de dsRNA indujo la inactivación de genes endógenos homólogos. Rápidamente se pudo demostrar que este fenómeno, que se denominó como RNA *interferencia* (o RNAi) presenta muchas similitudes con el PTGS. En los dos casos hay (i) intervención de dsRNA en la inactivación de la expresión génica, (ii) semejanza entre las proteínas que controlan ambos procesos, (iii) acumulación de pequeños RNA de 21 a 25 nucleótidos homólogos o complementarios a los mRNA inactivados y (iv) propagación de una señal de inactivación desde el punto de inicio que puede llevar a la inactivación sistémica del gen a la totalidad de la células del organismo (Tagu y Moussard, 2003).

Los mecanismos implicados en los fenómenos de PTGS y de RNAi tienen muchas etapas en común. Asimismo, estos fenómenos de PTGS/RNAi existen también en hongos filamentosos (como *Neurospora crassa*), insectos (como *Drosophila*) y mamíferos. El factor que activa el PTGS/RNAi es la presencia de un RNA de doble cadena (dsRNA) del gen a silenciar. Estas moléculas de dsRNA pueden producirse artificialmente en la célula con la ayuda de un transgén o bien inyectándolas directamente. Los dsRNA son entonces digeridos en oligonucleótidos de unos veinte pares de bases llamados siRNA (*small interfering RNA*) por una RNAsa específica de RNA bicatenario (llamada DICER en animales). Los siRNA complementario resultado del corte por la enzima, servirán de guía a un complejo enzimático (*RNA-Induced Silencing Complex, RISC*) que degradará los RNA del gen endógeno correspondiente. Por otra parte, se ha descrito que los siRNA de sentido complementario pueden también servir de molde a una RNA polimerasa RNA dependiente (RdRP) para la síntesis de RNA complementario a partir del mRNA del gen endógeno, aumentando la

cantidad de dsRNA presente en la célula y amplificando la señal de RNAi (Tagu y Moussard, 2003) (Fig. 13).

En plantas se han desarrollado transgenes que permiten una transcripción directamente de un dsRNA. Estos transgenes son muy eficientes para inactivar genes endógenos homólogos, con lo que se consiguen plantas transgénicas cuyo fenotipo modificado puede tener un interés agronómico. Por otra parte, la facilidad de transformación de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* permite utilizar esta técnica para estudios genómicos (Tagu y Moussard, 2003).

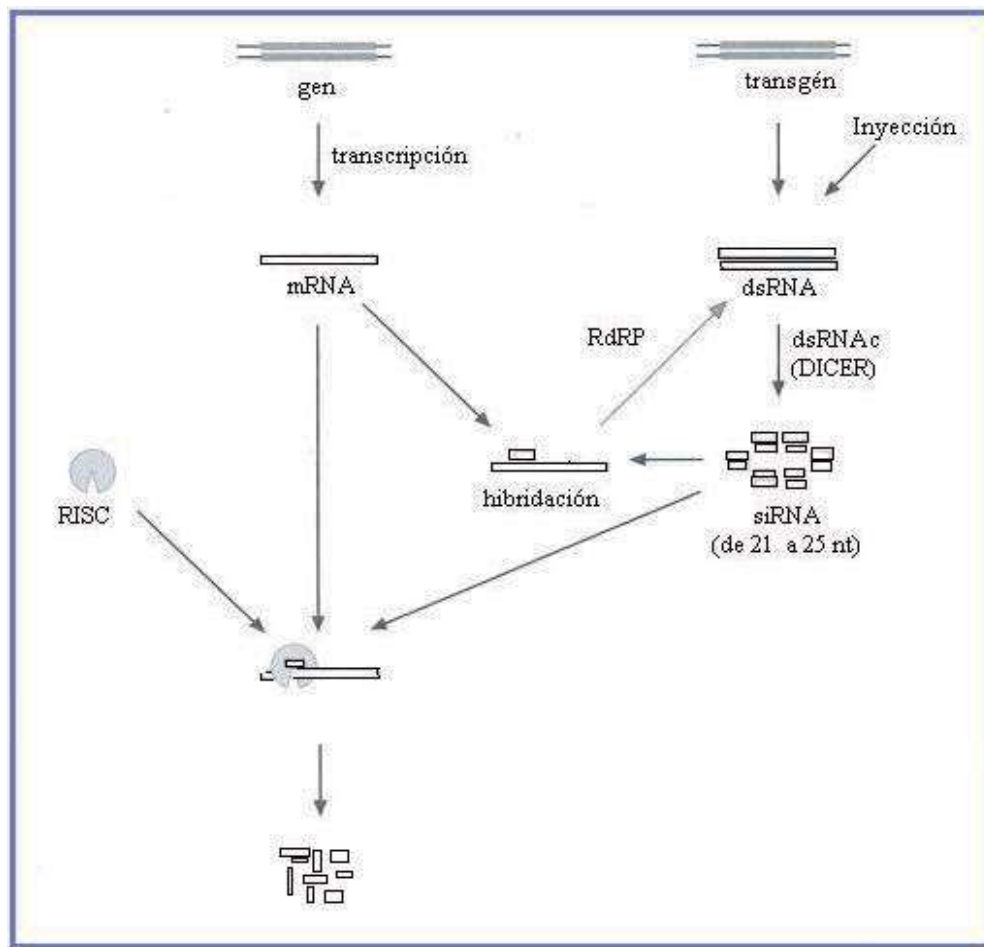


Figura 13. Mecanismo del RNAi (Tagu y Moussard, 2003).

VI USO DE MUTANTES Y LÍNEAS DE SOBREEXPRESIÓN DE *A. THALIANA*

Un ejemplo del uso de plantas transgénicas de sobreexpresión y de mutantes que inhiben la expresión de un gen es el reportado por Xing y colaboradores (2008); donde los autores lograron determinar una cascada de señalización completa, que finaliza con la expresión de CAT1 (isoforma 1 de la catalasa), inducida por ácido abscísico (ABA). La ruta de señalización de las MAPKs descrita está integrada por AtMKK1 (MAPKK) y AtMAPK6 (MAPK); los investigadores utilizaron líneas mutantes para los genes AtMKK1 (*mkk1*) y AtMAPK6 (*mapk6*) en las cuales se reprime la expresión de dichos genes. Por otra parte obtuvieron líneas de sobreexpresión para los mismos genes (MKK1OE y MAPK6 OE). Los autores demostraron que bajo condiciones normales de crecimiento las plántulas *mkk1* exhibieron una velocidad de crecimiento similar a las silvestres. Sin embargo, en respuesta a ABA, la velocidad de germinación en las líneas silvestres disminuyó considerablemente, mientras que las plantas *mkk1* mostraron una alta velocidad de germinación comparadas con las silvestres. En contraste, la línea que sobreexpresan a AtMKK1 (AtMKK1OE) presentó una inhibición mayor que la silvestres, comparadas con las plantas *mkk1* (Xing et al., 2008). Como podemos observar en el ejemplo anterior el uso de líneas mutantes y de sobreexpresión permite obtener fenotipos contrastantes.

Con base a lo antes mencionado, en el presente estudio se determinó si el efecto de insulina en plantas de *Arabidopsis* involucra a la ruta MAPKs.

VII HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

7.1 Hipótesis:

La respuesta de *Arabidopsis thaliana* a la insulina comprende la ruta de señalización de las proteínas cinasas activadas por mitógenos.

7.2 Objetivo

Determinar el efecto de diferentes concentraciones de insulina sobre la arquitectura de la raíz en plántulas que sobreexpresan y disminuyen la expresión de la proteína AtMAPK3.

7.3 Objetivos específicos

1.- Determinar la respuesta a la insulina de plántulas de *Arabidopsis* silvestre (Wt) y de líneas de sobre expresión MAPK3-1, MAPK3-2 y OvMAPK3; así como también de plántulas transgénicas RNAiMAPK3 crecidas en medio control y suplementado con insulina a 200 y 2000 μ U/ml. Los parámetros a evaluar son:

A. Longitud de la raíz principal (RP), B. Número de raíces laterales (RL) y

C. Densidad de raíces laterales (DRL).

2.- Diseño de oligonucleótidos para la amplificación del gen Atmapk3.

3.- Confirmación de la sobreexpresión y la represión de la expresión génica de Atmapk3 por análisis de RT-PCR.

4.- Análisis de la expresión de los genes Atmapk3 y Ats6k en plántulas silvestres (Wt) tratadas con insulina.

VIII MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Materiales:

8.1.1 Semillas y reactivos utilizados

Se usaron semillas de plantas Wt (Col-0) y de las líneas de sobreexpresión del gen Atmapk3 (MAPK3-1, MAPK 3-2 y OVMAPK3) así como también semillas de plantas transgénicas de RNAi: RNAimpk3, donadas amablemente por el Dr. Ángel Guevara del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Los reactivos usados fueron grado analítico y marca Sigma: sales del medio Murashige y Skoog (MS), Tiamina, Piridoxina, Ácido Nicotínico, Insulina porcina, agua grado biología molecular, Inhibidor de RNAasa, Agarosa, Gel rite, Bromuro de Etidio y Dodecil Sulfato de Sodio (SDS). La Sacarosa fue marca Bioxon. Solución comercial de hipoclorito de sodio (cloralex) al 8 % de Cloro libre. Marca Invitrogen: Reactivo TRIZOL, Kit: SuperScript. III One-Step RT-PCR System with Platinum® *Taq* DNA Polymerase. Cloroformo, alcohol isopropílico y etanol al 75 % fueron marca JT Baker. Marcador de Peso Molecular fue marca Chimex.

8.1.2 Equipo

Potenciometro: Daigger, mod: 6173; Placa de Agitación: Torey pines, mod:1010.1; Balanza Analítica: OHAUS, mod: GA110; Termociclador: Perkin Elmer, mod: 2400; Centrifuga Refrigerada: Hermle-labor technik, mod: 2400k; Microcentrifuga: Labnet, mod: 16 M; Nanocentrifuga: labnet, mod: SN04061572; Vortex-Genie 2: Sientific industries, mod: G-650; Baño seco digital: ACCBLOCK; Micropipetas: RAININ, mod: pipet-lite, BIOMIT, mod:6070026; "Cámara para el corrimiento de geles sumergidos": OWL, mod: B1A; Fuente poder: BIO-RAD; mod: power pactm basic sistema Documentador de geles: mod It 50 módulo integrado de cámara digital de alta resolución 5.0 megapixeles; Cámara de crecimiento con temperatura controlada (25 °C) y un fotoperiodo de 16 hrs luz y 8hrs oscuridad; campana de flujo laminar: Thermoelectron Corporation, mod 1839; Iroscope ES-24; Autoclave: Felisa; Balanza Granataria: Sartorius, mod TE612; Espectrofotómetro: Beckman, mod 640.

8.2 Métodos:

8.2.1 Desinfestación de semillas

Las semillas se desinfestaron añadiendo a un lote de ellas 1 ml de agua tridestilada estéril (tde) y dejando reposar por 10 minutos con agitación ocasional, Después se les dio un pulso en una nanocentrífuga se eliminó el agua, y adicionó un ml de etanol absoluto, se agitó perfectamente, se dio un pulso y se eliminó el etanol. En seguida se agregó 1 ml de solución desinfestante (cloro 5 %, SDS 1%), se agitó perfectamente

por 5 minutos se dio un pulso y se eliminó la solución. Después de 7 lavados con agua, se incubaron en 1 ml de agua por 48 hrs a 4 °C antes de ser sembradas.

8.2.2 Preparación del medio de cultivo y condiciones de crecimiento.

Para llevar a cabo todos los experimentos, las plántulas de *Arabidopsis* se crecieron en medio MS 1 X, 1 % de sacarosa suplementado con insulina a 0, 200 y 2000 μ U/ml. El medio se preparó de la siguiente forma:

Se disolvieron 10 g de sacarosa y 4.3 g de sales de MS en un litro de agua tridestilada; se ajustó el pH a 5.7 con una solución de KOH 1 M. Antes de esterilizar, se agregaron 8 g de gelrite. La esterilización se efectuó a 121 °C por 21 minutos. Finalmente, al medio tibio se le agregó 200 μ l/l de una solución stock de vitaminas MF (Tiamina 1 mg/ml, Piridoxina 5 mg/ml, Ácido Nicotínico 5 mg/ml), y la Insulina adicionada en una cantidad correspondiente a la concentración de 200 y 2000 μ U/ml a partir de una solución stock preparada con insulina liofilizada a 1405 μ U/ml, ambas soluciones stock (vitaminas e insulina) se esterilizaron por filtración (filtro millipore Millex GS 0.22 μ m).

Después de desinfectadas, se sembraron diez semillas por caja Petri con medio MS 1 X, 1 % de sacarosa y 0.8 % de gelrite, suplementados con diferentes concentraciones de insulina (0, 200 y 2000 μ U/ml). Las cajas se incubaron en una cámara con fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, y una temperatura de 22 °C a 25 °C, en forma vertical para que las raíces de las plántulas crecieran sobre el medio. A los 13 días de sembradas se evaluaron los siguientes parámetros:

- a) Longitud de la raíz principal (RP).
- b) Determinación del número de raíces laterales (RL).
- c) Determinación de la densidad de raíces laterales (DRL).

8.2.3 Evaluación del crecimiento de la raíz primaria y número de raíces laterales

Las observaciones del sistema radicular de las plántulas de *A. thaliana* se hicieron con un estéreo microscopio (Iroscope ES-24). Las raíces laterales que emergieron de la

raíz principal se observaron con el objetivo 4X y se obtuvo el número total de las raíces de cada una de las plántulas. La longitud de la raíz principal de cada una de las plántulas se determinó midiéndola con una regla. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa statistic 8, realizando un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una comparación de medias (LSD) con diferencia mínima significativa.

8.2.4 Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron oligonucleótidos del gen Atmapk3 para ello se buscó la secuencia de dicho gen en una base de datos: <http://www.ncbi.com>; posteriormente se diseñaron dos pares de oligonucleótidos para el gen Atmapk3 para lo cual se tomaron en cuenta los siguientes parámetros:

1. Tamaño del oligonucleótidos de 20 a 30 nucleótidos
2. Aproximadamente el mismo número de nucleótidos para cada oligonucleótido.
3. Evitar secuencias repetitivas o regiones conteniendo el mismo nucleótido.
4. Evitar la presencia de 3 o más guaninas o citocinas en el extremo 3' terminal.
5. Los oligonucleótidos no deben formar estructuras secundarias debido a la complementariedad interna.
6. No contener secuencias en el extremo 3' terminal que permitan la hibridación entre ellas mismas o cualquier otro "primer" que pueda ser acoplado con un PCR, puede dar lugar a dímeros de oligonucleótidos.

Después de seleccionar las secuencias de los oligonucleótidos, estos se analizaron por medio del programa: [www.idtdna /analizer/application](http://www.idtdna.com/analizer/application). Obteniendo las siguientes secuencias:

Oligonucleótidos para amplificar el gen completo de Atmapk3.

Sentido: **5'- CTC TGC TCA ATC CTC AAT CTC AG -3'**

Antisentido: **5'- TGG AGC TAC ACT TAA TCA CTA GC -3'**

Oligonucleótidos para amplificar solo la secuencia codificante del gen Atmapk3.

Sentido: **5'- AAC TCA CGG AGG ACA GTT CAT AAG -3'**

Antisentido: **5'- GCA ATT TAG CAA GGT ACT GGT GAT -3'**

Los oligonucleótidos para amplificar el gen Ats6k, fueron donados por el DC. H. Reyes de la Cruz del IIQB de la UMSNH:

Sentido: **5' CGGGATCCCGATAARGCWGCYGACTGGTGGAG 3'**

Antisentido: **5' GGAATTCCGCCTCCAGCTTCYTCCAGTTKAT 3'**

Finalmente la secuencia de los oligonucleótidos para amplificar la Ubiquitina fueron obtenidos de Ping et al., 2006.

Sentido: **5' -GGAAGAAGAAGACTTACACC- 3'**

Antisentido: **5'-AGTCCACACTTACCACAGTA- 3'**

8.2.5 Extracción de RNA

Se extrajo RNA de plántulas silvestres y plántulas transgénicas que disminuyen la expresión del gen Atmapk3: RNAiMAPK3 y plántulas que la sobreexpresan: MAPK 3-1, MAPK3-2 y OvMAPK3 crecidas en medio MS 1X, 1% de sacarosa, suplementado con Insulina a 0, 200 y 2000 µU/ml, de 13 días después de sembradas. La extracción se llevó a cabo con el reactivo de TRIZOL, a continuación se describe la técnica:

1 Homogenización

Se molieron 50 a 100 mg de tejido de muestras congeladas con nitrógeno líquido, el polvo se transfirió a un tubo eppendorf al cual se adicionó un ml de TRIZOL. Se homogenizó la muestra agitando con la mano.

2 Fase de separación

Las muestras homogenizadas se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la completa disociación de los complejos de nucleoproteínas. Se adicionaron 0.2 ml de cloroformo, seguida de agitación vigorosa con la mano por 15 segundos, e incubación a temperatura ambiente por 2 a 3 minutos. Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Después de la centrifugación se separan dos fases, una fase orgánica y una fase acuosa. Se toma la fase acuosa.

3 Fase de precipitación

La fase acuosa se transfiere a un tubo eppendorf nuevo, donde se precipita el RNA al adicionar 0.5 ml alcohol isopropílico. Se Incuba la muestra a temperatura ambiente por 10 minutos y se centrifuga a 12000 rpm a 4 °C; el precipitado de RNA a menudo es imperceptible antes de la centrifugación.

4 Lavado del RNA

Después de remover el sobrenadante, se lava la pastilla de RNA con 1 ml de etanol al 75 % y agitación de la pstilla en un vortex, finalmente se centrifuga a 7500 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente.

5 Resuspensión del RNA

Al final del proceso, se seca la pastilla con aire, se resuspende el RNA en agua libre de RNasa se incuba la solución por 10 minutos a 60 °C. A la solución de RNA se añade 0.5 µl de inhibidor de RNasa y se almacena a - 20 °C.

Para analizar la integridad del RNA obtenido, se toma una alícuota de las muestras, se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 1% con 1-2µl de bromuro de etidio. El gel se observa en un transiluminador con luz UV. Por otra parte, se cuantifica el RNA midiendo una alícuota de la solución en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm.

Para determinar la cantidad de RNA se utiliza la siguiente fórmula:

$$\mu gRNA/\mu l = (Abs_{260 \text{ nm}})(45)(1000/5)$$

8.2.6 Amplificación de los transcritos por RT-PCR

Todas las reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo con el kit SuperScript. III One-Step RT-PCR System with Platinum® *Taq* DNA Polymerase de invitrogen, de acuerdo al protocolo siguiente:

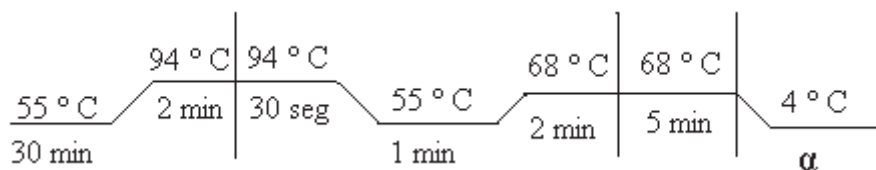
- 1 Se adicionan los siguientes componentes a un tubo eppendorf de 0.2 ml para PCR.

Componente	Volumen
2X reaction mix	12.5 µl
RNA (1µg)	1 µl
Oligonucleótidos sentido (10 µM)	1 µl
Oligonucleótidos antisentido (10 µM)	1 µl
SuperScript. III RT/ Platinum <i>Taq</i> Mix*	1 µl
Agua destilada estéril, llevar a	25 µl

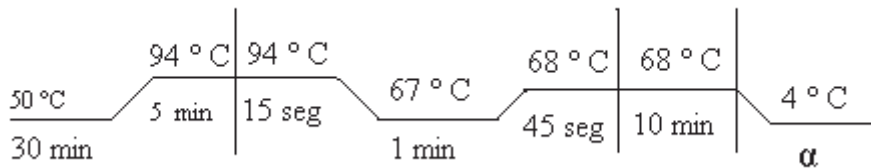
- 2 Mezclar suavemente para asegurar que todos los componentes que están en el fondo del tubo se homogenicen

Colocar la mezcla de la reacción en el termociclador programado con las siguientes condiciones:

Para el gen *Atmapk3* con 40 ciclos:



Para el gen de Ubiquitina y s6k con 35 ciclos:



Al final cargamos 5 µl de la reacción más 2 µl de buffer de carga, en un gel de agarosa al 1 % con Bromuro de Etidio.

IX RESULTADOS

9.1 Arquitectura radicular de las líneas de sobreexpresión Atmapk3.

Para determinar el fenotipo de las líneas de sobreexpresión MAPK3 -1, MAPK 3-2, OvMAPK3 comparadas con las silvestres, las semillas se sembraron en medio MS 1X y 1 % de sacarosa. Como se observa en la Fig. 14 las plántulas MAPK 3-1 y OvMAPK3 presentaron una disminución de la longitud de la raíz principal. En tanto que, MAPK3-2 no mostró diferencia respecto a las plántulas Wt. En relación al número de raíces laterales no observamos diferencia entre las líneas de sobreexpresión y las plántulas silvestres. Respecto a la densidad de raíces laterales sólo se diferenció en la línea MAPK 3-1 mostrando un aumento significativo en este parámetro.

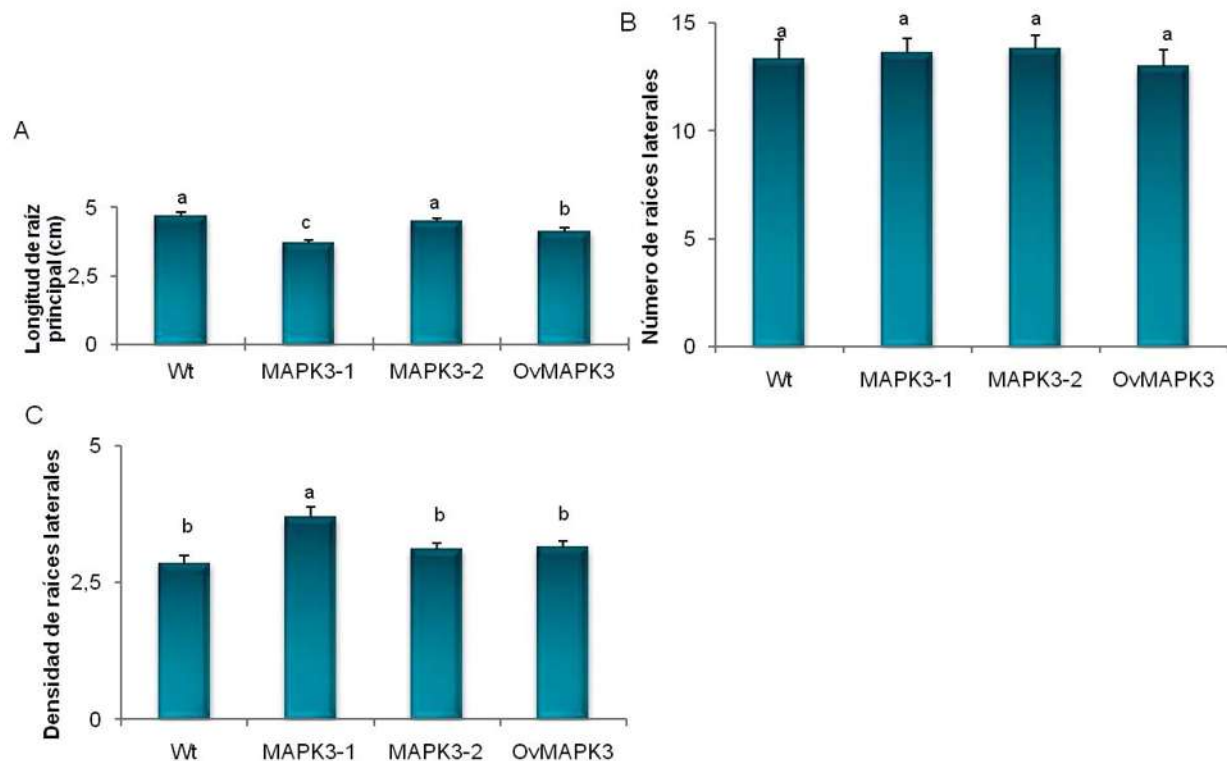


Figura 14. Arquitectura radicular de las líneas de sobreexpresión del gen *Atmapk3* de *A. thaliana*. Las semillas de *Arabidopsis* se sembraron y crecieron en medio MS 1X, 1% de sacarosa. A) Longitud de la raíz principal; B) Número de raíces laterales; C) Densidad de raíces laterales. Los valores son el promedio de al menos 15 plántulas de tres ensayos diferentes ($\pm$ EE) ($P < 0.05$). Las letras indica diferencia significativa obtenidas por un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una comparación de medias (LSD) diferencia mínima significativa.

9.2 Efecto de insulina en plántulas que sobreexpresan el gen *Atmapk3*.

Para determinar el efecto de la insulina en plántulas que sobreexpresan el gen *Atmapk3* se analizó el crecimiento de la raíz en plántulas silvestres de *A. thaliana* (Wt) y en plántulas de las líneas MAPK3-1, MAPK3-2 y OvMAPK3. Las semillas fueron sembradas en medio MS 1X y 1 % de sacarosa suplementado con insulina a 200 μ U/ml. Como puede observarse en la Fig. 15 A, a los 13 días de crecimiento, la insulina a una concentración de 200 μ U/ml estimuló la longitud de la raíz principal de las plántulas silvestres y en la línea MAPK 3-1 respecto al medio control. En tanto que, las otras dos líneas de sobreexpresión no mostraron diferencia en el crecimiento de la raíz principal en el medio suplementado con insulina a 200 μ U/ml con relación al medio control. El número de raíces laterales mostró un aumento en las plántulas Wt y la línea

MAPK3-1 con el medio suplementado con insulina. Sin embargo, este parámetro no se afectó en las líneas MAPK3-2 y OvMAPK3 (Fig. 15 B). La densidad de las raíces laterales se incrementó solamente en las plántulas silvestres y MAPK3-1 crecidas en el medio suplementado con insulina (Fig. 15 C). En la Fig. 16 se muestran las fotografías de plántulas silvestres y de las líneas de sobreexpresión, sembradas en medio control y suplementado con 200 μ U/ml de insulina. Por lo antes observado, podemos decir que la insulina, como se había reportado previamente en el laboratorio, estimula la longitud de la raíz principal, el número de raíces laterales en las plántulas silvestres y la densidad de raíces laterales (Ortega-Domínguez, 2007). Aquí, se demuestra que dicha estimulación se presentó también en la línea de sobreexpresión MAPK3-1. Posteriormente, se analizó el efecto de la insulina a una concentración de 2000 μ U/ml. Como puede observarse en la Fig. 17 A, la longitud de la raíz principal de las plántulas sembradas en medio suplementado con insulina no mostró diferencia en ninguna de las líneas de sobreexpresión respecto al control. En el número de raíces laterales tampoco se obtuvieron diferencias significativas entre las plántulas silvestres y las líneas de sobreexpresión MAPK3-1, MAPK3-2 y OvMAPK3 en el medio con insulina a una concentración de 2000 μ U/ml. Al no obtener variaciones tanto en la longitud de la raíz principal como en el número de raíces laterales, el parámetro de la densidad de las raíces laterales tampoco se vio afectado. La Fig. 18 muestra las fotos de las plántulas sembradas en medio suplementado con insulina a 2000 μ U/ml. Podemos concluir que la insulina a concentraciones de 2000 μ U/ml no altera el crecimiento de las líneas de sobreexpresión de Atmapk3.

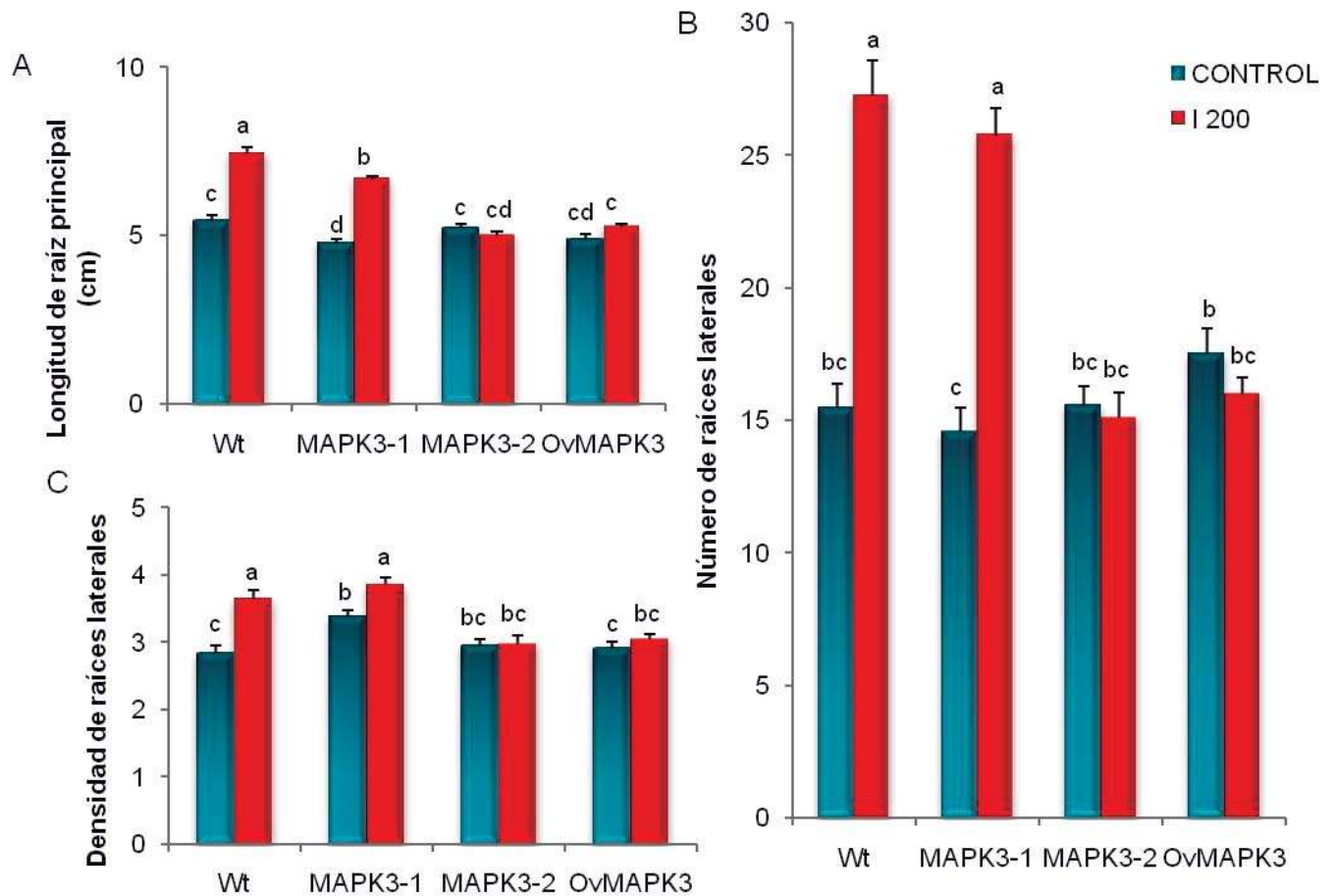


Figura 15. Evaluación de parámetros de la arquitectura de la raíz de plántulas Wt y plántulas que sobreexpresan el gen *Atmapk3* de *Arabidopsis thaliana* en medio suplementado con insulina 200 μ U/ml. Las semillas de *Arabidopsis* se sembraron y crecieron en medio MS 1X, 1% de sacarosa suplementado con insulina a concentraciones de 0 y 200 μ U/ml. A) Longitud de raíces principales; B) Número de raíces laterales c) Densidad de raíces laterales. Los valores promedio de al menos 15 plántulas en ensayos por triplicado ($\pm$ EE) ($P < 0.05$). Las letras indican diferencia significativa obtenidas por un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una comparación de medias (LSD) diferencia mínima significativa.

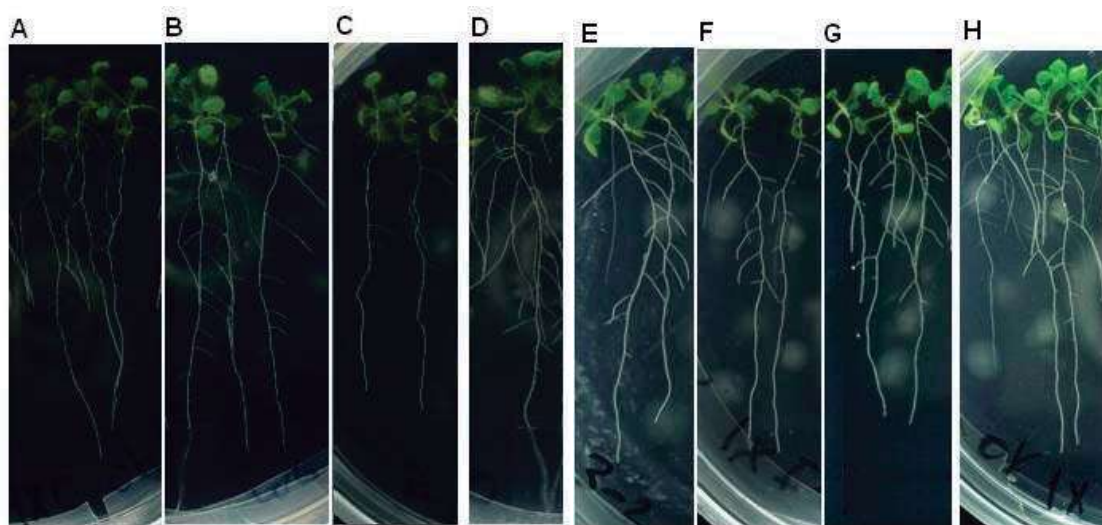


Figura 16. Efecto de insulina sobre el crecimiento de plántulas de *Arabidopsis* que sobreexpresan el gen *Atmapk3*. Fotografías representativas de plántulas de 13 ddc sembradas en medio MS 1X 1% de sacarosa suplementado con insulina a 0 y 200 µU/ml. A) Wt Control; B) Wt I 200; C) MAPK 3-1 Control; D) MAPK 3-1 I 200; E) MAPK 3-2 Control; F) MAPK 3-2 I 200; G) OvMAPK3 Control; H) OvMAPK3 I 200.

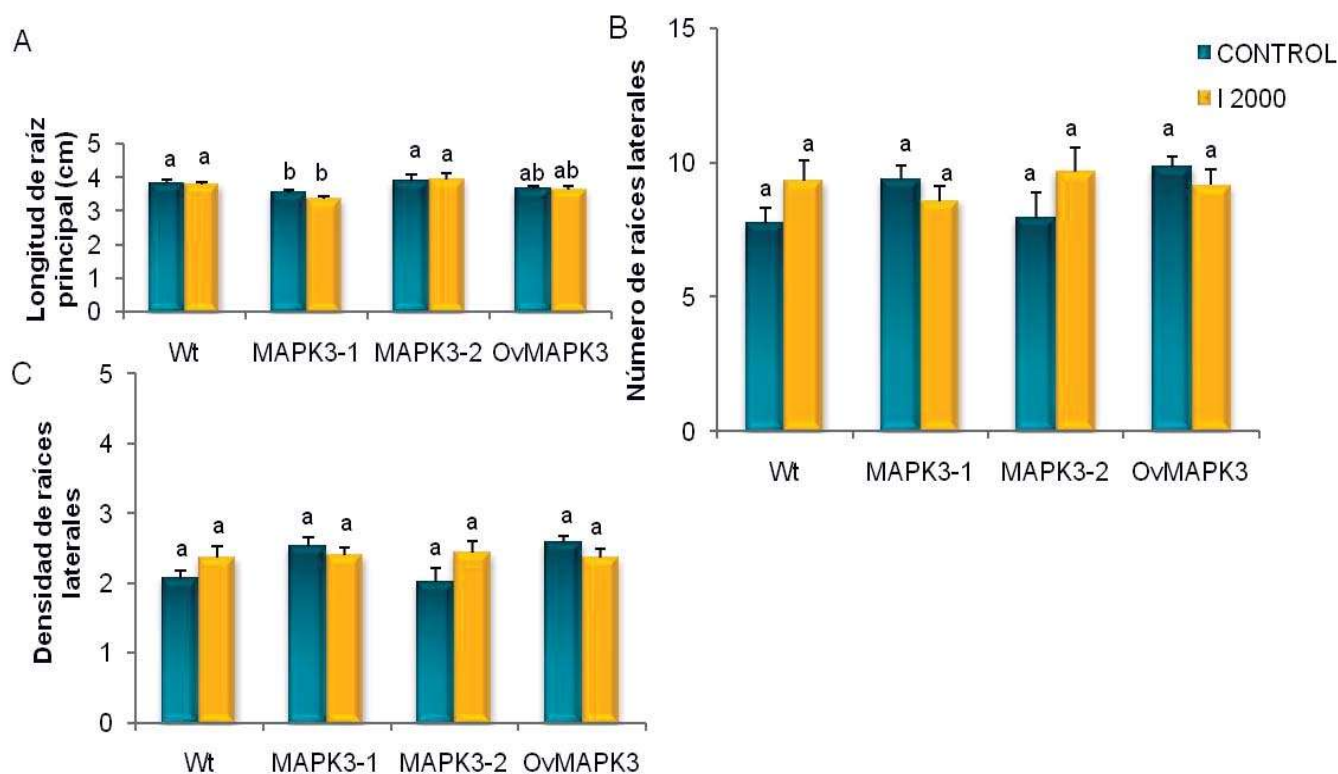


Figura 17. Efecto de la insulina a 2000 µU/ml sobre el crecimiento de las líneas que sobreexpresan el gen *Atmapk3* de *A. thaliana*. Las semillas de *Arabidopsis* se sembraron y crecieron en medio MS 1X, 1% de sacarosa suplementado con insulina a concentraciones de 0 y 2000 µU/ml. A) Longitud de raíces principales; B) Número de raíces laterales c) Densidad de raíces laterales. Los valores promedio de al menos 15 plántulas en tres ensayos diferentes ($\pm$ EE) ($P < 0.05$). Las letras indican diferencia significativa obtenidas por un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una comparación de medias (LSD) diferencia mínima significativa.

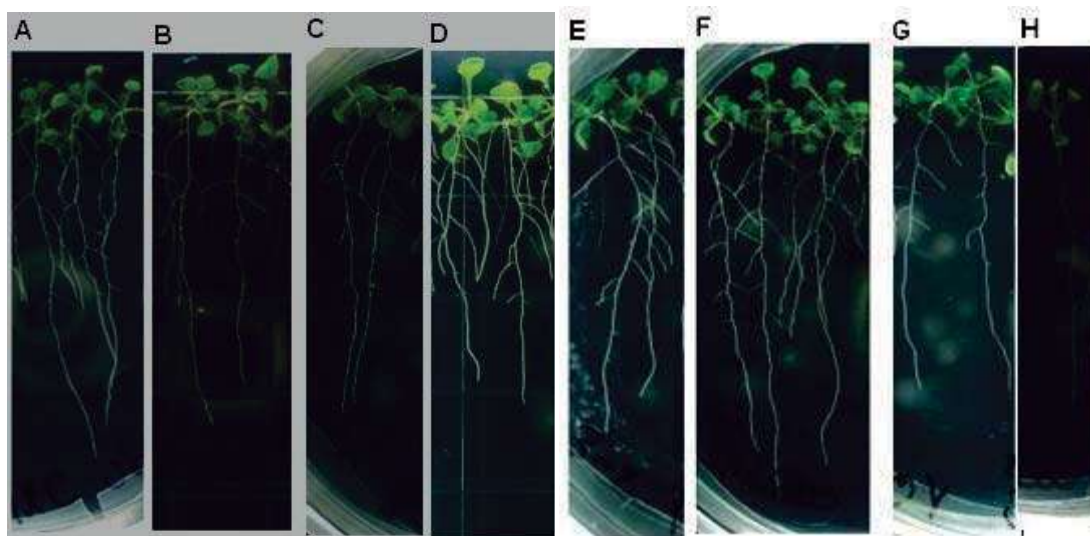


Figura 18. Efecto de insulina sobre el crecimiento de plántulas de *Arabidopsis* que sobreexpresan el gen *Atmapk3*. A) Wt Control; B) Wt I 2000; C) MAPK 3-1 Control; D) MAPK 3-1 I 2000; E) MAPK 3-2 Control; F) MAPK 3-2 I 2000; Plántulas de 13 días sembradas en medio MS 1X, 1 % de sacarosa, suplementado con diferentes concentraciones de insulina: 0, 2000 μ U/ml.

9.3 Efecto de insulina a nivel de germinación.

Para establecer si el efecto de la insulina sobre las líneas de sobreexpresión es a nivel germinativo o postgerminativo; se sembraron plántulas de las líneas MAPK3-1, MAPK3-2 y OvMAPK3, en medio control (MS 1X, 1 % de sacarosa) y 9 días después se trasplantaron a medio suplementado con insulina a 200 μ U/ml y 2000 μ U/ml. Las plántulas se analizaron a los 13 días de edad. En la Fig. 19 A, observamos que no se presentó ninguna variación en la longitud de la raíz principal de las plántulas silvestres trasplantadas al medio con insulina en ambas concentraciones. De igual forma, las líneas transgénicas trasplantadas al medio con insulina en las dos concentraciones, no alteraron su crecimiento en relación al tamaño de la raíz con el control respectivo. Por otra parte el número de raíces laterales en las plántulas silvestres y las líneas MAPK3-1 y MAPK3-2 se vio disminuido en ambas concentraciones de insulina pero no significativamente, mientras que en la línea OvMAPK3 no observamos variación en ninguna concentración de insulina. La densidad de raíces laterales no mostró variación en las plantas silvestres y en las líneas de sobre y baja expresión. Los resultados antes mencionados sugieren que el efecto de la insulina es a nivel germinativo y no a nivel post germinativo

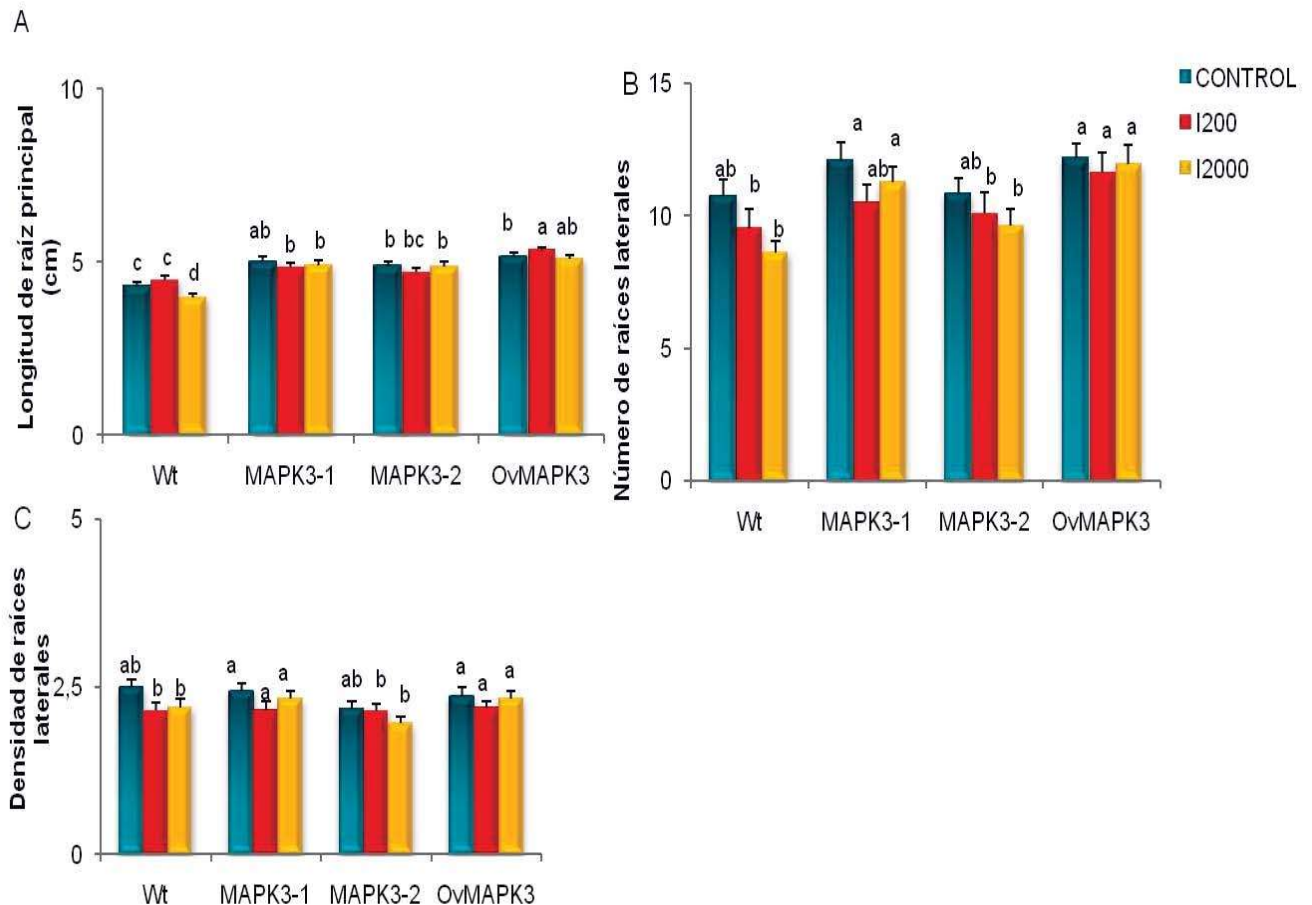


Figura 19. Efecto de diferentes concentraciones de insulina en la arquitectura radicular de *A. thaliana* y líneas de sobreexpresión del gen *Atmapk3*. Las semillas de *Arabidopsis* se sembraron y crecieron en medio MS 1 X, 1 % sacarosa y a los 9 dds se trasplantaron a medio MS 1 X, 1 % sacarosa suplementado con 0, 200 y 2000 μ U/ml de insulina. A) Longitud de raíces principales; B) Número de raíces laterales c) Densidad de raíces laterales. Los valores promedio de al menos 15 plántulas ($\pm$ EE) ($P < 0.05$). Las letras indican diferencia significativa obtenidas por un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una comparación de medias (LSD) diferencia mínima significativa.

9.4 Efecto de insulina en líneas con disminución de la expresión del gen *Atmapk3*.

Aquí se analizaron las plántulas de la línea MAPK3 que reprimen la expresión del gen *Atmapk3* (RNAiMAPK3). La Fig. 20 A, muestra que en las plántulas Wt se estimuló el crecimiento de la raíz principal en medio con insulina a 200 μ U/ml en tanto que en la concentración de 2000 μ U/ml no varió con respecto a su control.

Por otra parte en la línea RNAiMAPK3 se observó una disminución del crecimiento de la raíz principal en medio con insulina a 2000 μ U/ml, mientras que a la concentración de 200 μ U/ml no presentó diferencia. Con relación al número de raíces laterales, las plántulas Wt mostraron un aumento a I 200 μ U/ml, y ninguna diferencia

significativa a $1\ 2000\ \mu\text{U/ml}$. En cambio, la línea RNAiMAPK3 crecida en medio con insulina $2000\ \mu\text{U/ml}$, produjo una disminución del número de raíces laterales y con $1\ 200\ \mu\text{U/ml}$ no mostró diferencia significativa (Fig. 20 B). En las plántulas RNAiMAPK3 crecidas a diferentes concentraciones de insulina la densidad de raíces laterales no mostró diferencia (Fig. 20 C).

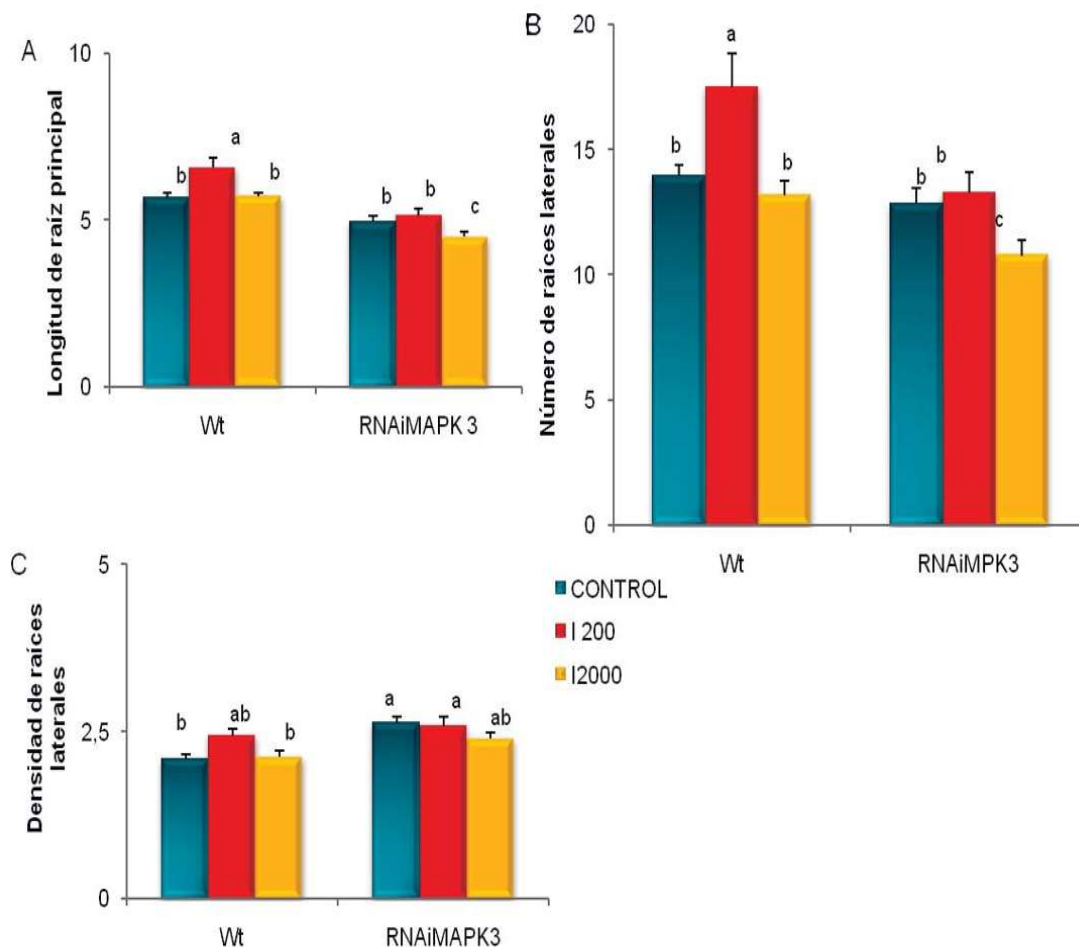


Figura 20. Efecto de la insulina en plántulas de la línea RNAiAtMAPK3. Las semillas de Arabidopsis se sembraron y crecieron en medio MS 1 X, 1 % sacarosa suplementado con 0, 200 y $2000\ \mu\text{U/ml}$ de insulina. A) Longitud de raíces principales; B) Número de raíces laterales c) Densidad de raíces laterales. Los valores promedio de al menos 15 plántulas ($\pm$ EE) ($P < 0.05$). Las letras indican diferencia significativa obtenidas por un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una comparación de medias (LSD) diferencia mínima significativa.

En la Fig. 21 se muestran las fotografías de plántulas representativas crecidas en medio suplementado con Insulina. Por los resultados antes mencionados podemos decir que la insulina a bajas concentraciones estimula el crecimiento del sistema

radicular en las plántulas silvestres como previamente lo habíamos reportado, mientras que la línea RNAiMAPK3 que disminuye la expresión del gen *Atmapk3*, no mostró ningún efecto.

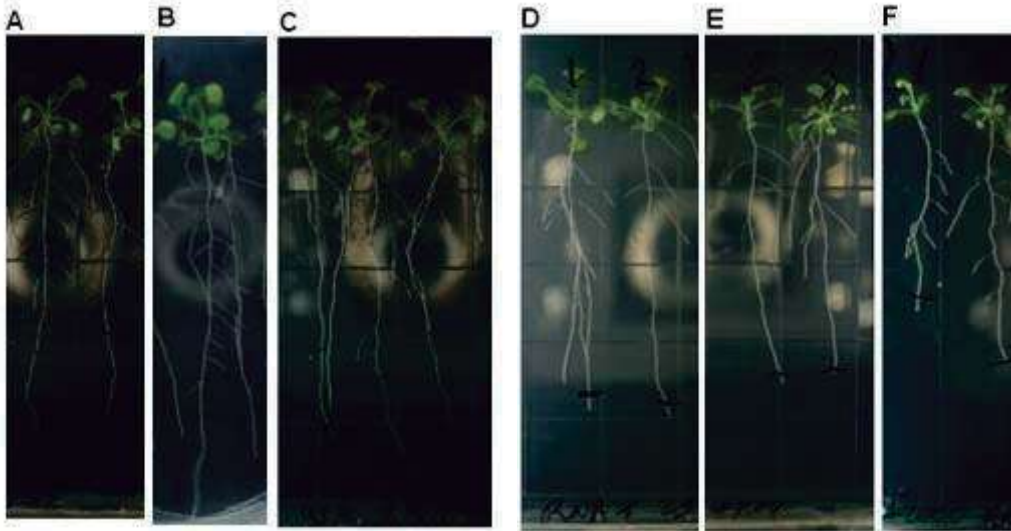


Figura 21. Efecto de insulina sobre el crecimiento de plántulas de *Arabidopsis* que disminuyen la expresión del gen *Atmapk3*. A) Wt Control; B) Wt I 200; C) Wt I 2000; D) RNAiMAPK3 control; E) RNAiMAPK3 I200; F) RNAiMAPK3 I2000. Todas estas plántulas se sembraron en medio MS 1X, 1 % de sacarosa, suplementado con diferentes concentraciones de insulina: 0, 200 y 2000 μ U/ml. las fotografías fueron tomadas a los 13 días después de sembradas.

9.5 Diseño de oligonucleótidos

Detectar los niveles del gen *Atmapk3*, nos servirá en primer lugar para corroborar la expresión de este gen en las líneas de sobreexpresión (*MAPK3-1*, *MAPK3-2* y *OvMAPK3*) y de baja expresión (*RNAiMAPK3*). Por otro lado, evaluaremos también la expresión del gen *Atmapk3* en plantas tratadas con insulina y así poder determinar si esta hormona altera la expresión de dicho gen. Para esto el primer par de oligonucleótidos diseñados incluiría la mayor parte del gen localizado antes del codón de inicio y después del codón de terminación. También se diseñó otro par de oligonucleótidos que incluyó solamente la región codificante del gen (Fig. 22). Este último par fue elegido para los siguientes experimentos, debido a que se realizaron ensayos de RT-PCR y los únicos que mostraron amplificación fueron los antes mencionados.

```

accgcgaaaa ctcatctctg ctcaatcctc aatctcagtc tctctgttga ctccgactgt tatataaaac
catacaaata ccttcagatt cactacttca aacctcaaag caaccactga atctcgactt tgatcaattg
agagagaaaat gaacaccggc ggtggccaat acacggattt tccggcggtg gaactcacg gaggacagtt
cataag ttac gatatcttcg gtagtttatt cgagatcaca tctaagtatc gtccctccgat tataccaatt
ggtcgtggag cttatggaat cgtttggtat gtttccttct ctgagctttt tcttaagttt tattctttga
gatcggagtt ttttaatttct ggattttgat tttgtgaagc tctgtgttgg atacggagac gaacgagcta
gtagcgatga agaagatagc taatgctttt gataatcata tggatgctaa gcgtacgctt cgtgagatca
agcttcttcg tcatcttgat catgaaaacg ttagtgtttt tgttcgattt tgtgaaatat ctgtagaaat
tagtaaataa atcatgatta gggttttttg atttggtatt gcaacagatt atagctataa gagatgttgt
tccaccacca ctaagaagac agttcagtga tgtttatatc tctactgaat taatggatac tgatcttcat
caaatcatca gatctaacca gagtttatca gaagaacact gtcaggtaaa ctaaaaactg ttcttggtctt
ttttctggga tttatatattg atagaagaga catgaaactg atacttgatt tgggtgtttt gttgtcatgg
aaacagtact tcttgtacca gctacttcga ggactgaagt atatccactc agctaacatt attcataggg
atttaaagcc gagcaatctt ctgttgaacg cgaattgcga tttaaagatt tgtgatttcg gtcttgctag
acctacttca gagaatgatt ttatgactga gtatgttggt acgagatggg atagagcacc tgagcttctg
ttgaactctt cagattacac agctgctatt gatgtttggt ctgttggttg tatctttatg gagcttatga
atagaaagcc tttgttccct ggtaaagacc atgttcatca aatgcgctta ttgacagagg taaaatattt
tagagagtta tgtaatttta gcatggttta aagattctgc cttttcacgg aatatgtgat gaatttggtt
gaatcttgca gttgcttggc acaccgacag aatctgatct cggttttact cacaatgagg atgcgaaaag
atacatccgg caacttccca acttcccacg tcagccctta gctaaacttt tctctcatgt taacccaatg
gccattgatc ttgttgacag aatgttgacg tttgaccca acagaagaat cactggtaag tttcatacat
gttctctggtt ggtttttctt accatcacta tgttttgatt aaaaactgaa aataccatct
tgtgcagttg aacaagctct gatcaccag taccttgcta aattgcacga cccgaatgat gagccaatct
gtcaaaagcc attctctttt gagttcgaac aacagcctct ggatgaggaa cagataaaag agatgatcta
ccaagaagcc atagcactca atccaacata cgggtagaag tgcagcagcc ccgtgaatgc ctggtattac
ccaataacca tccgaatggc tacttagtat ctttgccctgt tcttttatct atgtacttct tccacatatg
taatcttgta acttttatatt gtttgttcat gttatttact gctagtgtatt aagtgtagct ccaatgtaaa
gtactccagt tattaaagaa tatctataga cttttttact tcacatact

```

Figura 22. Secuencia del gen Atmapk3. Tomada de la página WWW.NCBI.com, identificando los sitios de localización de los oligonucleótidos diseñados así como el codón de iniciación y el codón de terminación.

9.6 Extracción del RNA

Para realizar las reacciones de RT-PCR se extrajo el RNA de plántulas silvestres de 13 días de edad, así como también de plántulas que sobre expresan el gen Atmapk3 (MAPK 3-1, MAPK 3-2 y OvMAPK3) y de plántulas que disminuyen su expresión,

RNAiMAPK3 crecidas en medio control (Fig. 23 A). De igual forma, de las plántulas silvestres crecidas en medio suplementado con Insulina a 200 μ U/ml y 2000 μ U/ml (Fig. 23 B). Como se observa en la Fig. 23 todos los RNA están íntegros y por lo tanto son adecuados para el análisis de RT-PCR.

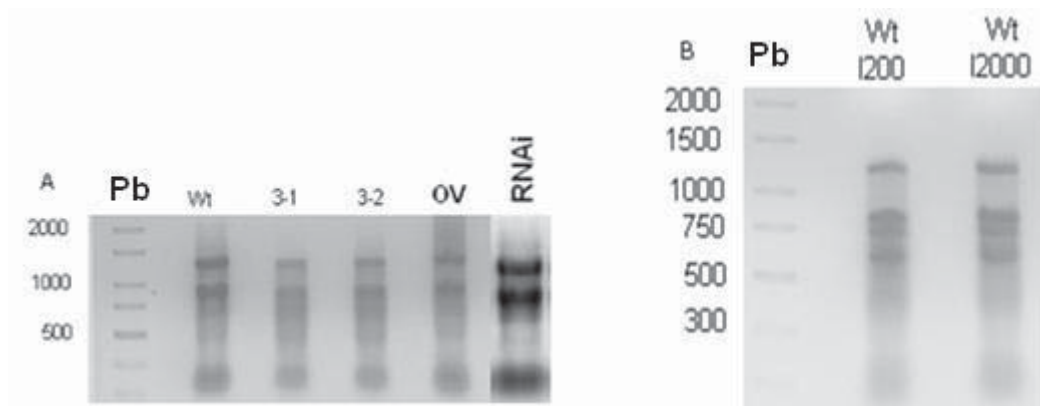


Figura 23. Integridad del RNA extraído de diferentes tipos de plántulas. A) RNA de plántulas Wt, de sobreexpresión y, represora del gen Atmapk3, crecidas en medio control. B) RNA de plántulas Wt crecidas en medio suplementado con insulina a 200 y 2000 μ U/ml respectivamente.

9.7 Análisis del nivel de transcrito del gen Atmapk3 en las líneas MAPK 3-1, MAPK3-2, OvMAPK3 y RNAiMAPK3.

Para detectar la expresión del transcrito Atmapk3 y corroborar su sobreexpresión y represión en las líneas MAPK3-1, MAPK3-2, OvMAPK3 y RNAiMAPK3 respecto a la planta silvestre, se llevó a cabo un RT-PCR de RNA extraído de plántulas con 13 días de edad. En la Fig. 24 se observa la expresión del gen en las plántulas silvestres y en las líneas de sobreexpresión (MAPK3-1, MAPK3-2 y OvMAPK3), corroborando que el nivel de transcrito es mayor con respecto a la Wt. En contraste se encontró que la línea RNAiMAPK3 presenta como se esperaba una disminución de la expresión del gen Atmapk3. Los resultados antes mostrados permitieron corroborar la sobre y baja expresión en las líneas usadas en los experimentos anteriores.

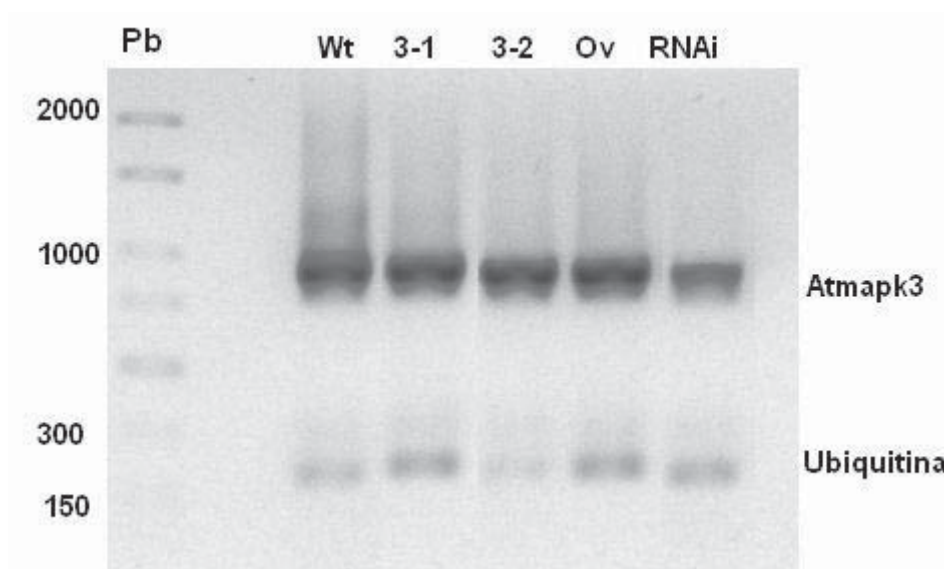


Figura 24. Expresión del gen Atmapk3. Líneas que sobreexpresan junto a la línea que disminuye la expresión el gen Atmapk3. RT-PCR de plántulas con 13 días de crecimiento en medio MS 1X y 1 % de sacarosa.

9.8 Análisis de la expresión del transcrito del gen Atmapk3 y s6k en plántulas silvestres de *Arabidopsis thaliana* por efecto de la insulina.

Mizoguchi y colaboradores reportaron que las proteínas involucradas en varias rutas de transducción de señales, pueden ser reguladas a nivel transcripcional en respuesta a un estímulo dado (Mizoguchi y colaboradores, 1996). Para determinar si esto pudiera estar sucediendo en plántulas tratadas con insulina; se realizó un RT-PCR para determinar los niveles de expresión de los genes Atmapk3 y Ats6k del RNA extraído de plántulas silvestres en medio suplementado con insulina a concentraciones de; 200 y 2000 $\mu\text{U/ml}$. Como se observa en la Fig. 25, la expresión del gen Atmapk3 no se ve alterada con relación al control. Mientras que en la expresión de s6k, se encontró que insulina a 200 $\mu\text{U/ml}$ la aumenta ligeramente. En tanto que, como se puede observar, el control de carga para insulina a una concentración de 2000 $\mu\text{U/ml}$ está disminuido, pero la expresión de Ats6K significativamente incrementada.

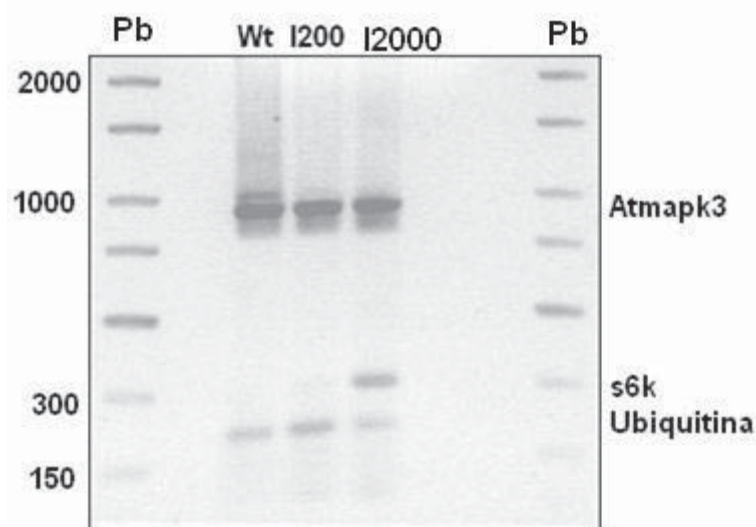


Figura 25. Expresión de Atmapk3 y s6k por efecto de la insulina. A) RT-PCR de RNA extraído de plántulas Wt crecidas en medio MS, 1% de sacarosa y suplementado con insulina a concentraciones de 0, 200 y 2000 μ U/ml. RNA extraído de plántulas Wt crecidas en medio MS, 1% de sacarosa y suplementado con insulina a concentraciones de 0, 200 y 2000 μ U/ml. El RNA fue extraído de plántulas de 13 días de crecimiento.

X DISCUSIÓN

La señalización de insulina y factores de crecimiento parecidos a insulina a través de la ruta MAPK está involucrada en la regulación del crecimiento en sistemas animales (Ingram y Waites, 2006). En plantas la cascada de señalización MAPK se ha estudiado principalmente en las respuesta de defensa por estreses bióticos y abióticos (Nakagami et al., 2005). Recientemente se ha reportado que esta ruta también interviene en procesos de desarrollo y división celular, por ejemplo, la citocinesis en plantas la cual es alcanzada por la creación de paredes celulares desde el interior al exterior durante la anafase. La formación y desarrollo de las placas celulares se lleva a cabo en un aparato específico de la planta llamado fragmoplasto, el cual está compuesto principalmente de microtúbulos cuyos extremos positivos son arreglados cabeza con cabeza sobre el plano ecuatorial y los extremos negativos son dirigidos hacia cada uno de los dos núcleos hijos. Las vesículas conteniendo materiales para la construcción de nuevas membranas plasmáticas y paredes celulares se acumulan en la

placa celular y se funden a la placa celular inmadura preexistente, dando como resultado la expansión de la placa celular.

La participación de la ruta MAPK en la citocinesis de células vegetales ha sido extensamente investigada; estudios genéticos de homólogos de NPK1 (MAPKKK de tabaco) en *Arabidopsis*, han mostrado evidencias directas del papel que juega la MAPKKK en la citocinesis. El genoma de *Arabidopsis* contiene tres genes homólogos de NPK1: ANP1, ANP2 y ANP3. Las plantas de *Arabidopsis* que tienen mutaciones en ambos ANP2 y ANP3 presentan enanismo en el cuerpo de la planta y defectos débiles en la citocinesis, mientras que la presencia de una mutación en los tres genes es gametofíticamente letal.

Para determinar la participación de esta ruta como respuesta a insulina en plantas, en el presente estudio utilizamos líneas de sobreexpresión del gen *Atmapk3* de *A. thaliana*: MAPK3-1, MAPK3-2 y OvMAPK3, así como la línea RNAiMAPK3 con la expresión de dicho gen disminuida. La caracterización fenotípica del sistema radical en las plántulas de estas líneas, mostró que sólo la línea MAPK3-1 tiene una diferencia significativa en la longitud de la raíz principal (reducida) y en la densidad radicular (incrementada) respecto al control de plántulas silvestres.

La adición de 200 μ U/ml de insulina a la línea MAPK3-1, estimuló el crecimiento de la raíz principal y el número de raíces laterales y, por consiguiente la densidad radicular, sin embargo, no se encontró una diferencia significativa con respecto al control (silvestre tratada con insulina). Es decir, en plántulas silvestres y MAPK3-1 se incrementó el sistema radicular en todos sus parámetros por efecto de insulina. Mientras que en la línea RNAimapk3 con 200 μ U/ml de insulina, se inhibió el efecto antes observado.

Por otra parte, los ensayos efectuados en las tres líneas de sobreexpresión con 2000 μ U/ml de insulina mostraron de manera general una aparente inhibición tanto en longitud como en número de raíces laterales; aunque sin una diferencia significativa respecto al control.

Los ensayos efectuados en las líneas de sobreexpresión para determinar si la activación de la ruta MAPK es un proceso germinativo o postgerminativo, mostraron que las plantas crecidas en medio control y transplantadas posteriormente a medios

suplementados con insulina, no mostraban ninguna diferencia en el crecimiento radicular lo cual sugiere que el efecto de la hormona es a nivel germinativo (Fig. 19).

Posteriormente se analizó el nivel de expresión del transcrito del gen *Atmapk3* de las líneas MAPK 3-1, MAPK3-2, OvMAPK3 y RNAiMAPK3 por medio de reacciones de RT-PCR. Cabe mencionar, que cuando fueron donadas las semillas de las líneas MAPK 3-1 y MAPK3-2, aseguraron que eran mutantes en dicho gen. Sin embargo, como observamos en la Fig. 24, en las líneas MAPK 3-1, MAPK3-2, y OvMAPK3 los niveles de transcrito son superiores comparados con la planta silvestre, mientras que, en la línea RNAiMAPK3 se encontró una disminución. Estos resultados corroboran que las líneas usadas en los experimentos anteriores eran las correctas, es decir, tres líneas aumentan la expresión del gen *Atmapk3* y una lo disminuye.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que el efecto de la insulina sobre la arquitectura del sistema radicular de *A. thaliana* podría ser a través de la ruta MAPKs puesto que cuando tenemos una sobreexpresión del gen *Atmapk3* la insulina estimula el crecimiento de la raíz principal y el número de raíces laterales; en cambio, cuando usamos plántulas que reprimen dicho gen, este efecto se ve disminuido. La participación de esta ruta también ha sido demostrada en otros estudios, por ejemplo, Samaj y colaboradores, analizaron la función de MAPK de alfalfa activada por estrés salino (SIMK) y observaron que esta cinasa es activada y redistribuida desde el núcleo al citoplasma en las puntas en crecimiento de los pelos radiculares (Samaj et al, 2002). Por otra parte, Mizoguchi y colaboradores, usando como modelo de estudio *A. thaliana*. para determinar si Insulina activa las dos rutas (PI3K y MAPKs), encontraron que los niveles de transcritos de tres proteínas cinasas AMEKK1 (MAPKKK), AtMAPK3 (MAPK) y AtPK19 (relacionada con una p70 y p90 de la cinasa S6) se incrementaron marcada y simultáneamente cuando las plantas fueron expuestas a bajas temperaturas, daño y estrés salino. Estos resultados sugieren que proteínas involucradas en rutas de transducción de señales, pueden ser reguladas tanto a nivel transcripcional como postraduccional en plantas superiores (Mizoguchi et al., 1996). Por esta razón determinamos el nivel de transcrito de *Ats6k* y de *Atmapk3*, dos proteínas involucradas en las cascadas de señalización disparadas por insulina: PI3K y MAPK respectivamente. Observamos que insulina tanto a 200 como a 2000 μ U/ml no tuvo

efecto alguno sobre el nivel de transcritos del gen *Atmapk3* en ambas concentraciones. Sin embargo, insulina a 2000 $\mu\text{U/ml}$ mostró un incremento significativo de transcritos del gen *Ats6k*, comparado con el tratamiento de 200 $\mu\text{U/ml}$ de insulina y de plántulas silvestres sin insulina.

XI CONCLUSIÓN

El efecto observado de la insulina sobre el fenotipo contrastante de arquitectura radicular en las líneas de sobreexpresión y represión del gen *Atmapk3*, nos permite sugerir que dicha hormona incidiría sobre la cascada de señales de las MAPK de *A. thaliana*, lo cual abre un sinnúmero de puertas para su estudio.

XII PERSPECTIVAS

- Analizar otros parámetros del sistema radicular como son pelos radiculares y las etapas de desarrollo de los primordios de raíces laterales.
- Determinar a qué se debe el incremento en el crecimiento, observado en las líneas silvestres y MAPK3-1, por efecto de insulina a 200 $\mu\text{U/ml}$. Como se sabe el crecimiento puede darse por un incremento en la división celular o por expansión celular. Para ello se deberán realizar cruza de la línea de sobreexpresión MAPK3-1 y la que reprime el gen *Atmapk3* con líneas transgénicas como DR5::uidA, para observar si dicho efecto involucra las auxinas o con CycB1::uidA para determinar si es debido a un incremento en la división celular.
- Probar el efecto de insulina sobre el crecimiento radicular en la arquitectura en mutantes K.O. MAPK3 y MAPK6, así como también en líneas de sobreexpresión de MAPK6.
- Ensayar el efecto de insulina sobre el crecimiento radicular en la arquitectura de líneas mutantes y de sobreexpresión de genes involucrados en la ruta MAPK río arriba (MAPKK y MAPKKK).

XIII BIBLIOGRAFÍA

Andreasson E., Jenkins T., Brodersen P., Thorgrimsen S., Petersen N. J. T., Zhu S., Qiu J. L., Micheelsen P., Rocher A., Petersen M., Newman M. A., Nielsen H. B., Hirt H., Somssich I., Mattsson O. and Mundy J. 2005. The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. *EMBO J.* **24**: 2579–2589.

Asai T., Tena G., Plotnikova J., Willmann M. R., Chiu W. L., Gomez-Gomez L., Boller T., Ausubel F. M. and Sheen J. 2002. MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* **415**:977–983.

Banting F. G., Best C. H., Collip J. B., Campbell W. R. and Fletcher A. A. 1922. Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. Preliminary report. *Can. Med. Assoc. J.* **12**:141-146.

Baum S., Dubrovsky J. E. and Rost T. L. 2002. Apical organization and maturation of the cortex and vascular tissue in Arabidopsis thaliana (Brassicaceae) roots. *Am. F. Bot.* **89**:908-920.

Beltrán Peña E. M. 1997. Expresión genética de las proteínas ribosomales durante la germinación del maíz. Tesis de Doctorado. Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Mexico.

Best C. H. and Scott M. A. 1923. Possible sources of insulin. *J. Metabol. Res.* **3**:177-179.

Best C. H., Smith R. G. and Scott D. A. 1924. An insulin-like material in various tissues of the normal and diabetic animal. *Amer. J. Physiol.* **68**:161-182.

Brodersen P., Petersen M., Nielsen H. B., Zhu S., Newman M. A., Shokat K. M., Rietz S., Parker J., and Mundy J. 2006. Arabidopsis MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylenedependent responses via EDS1 and PAD4. *Plant J.* **47**: 532–546.

Casson S. A. and Lindsey K. 2003. Genes and signaling in root development. *New Phytologist*. **158**:11-38

Chang L. and Karin M. 2001. Mamalian MAP kinase signalling cascada. *Nature*. **410**:37-40.

Cheatham B. and Kahn C. R. 1995. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr. Rev.* **16**: 117-142.

Chen Z., Gibson T. B., Robinson F., Silvestro L., Pearson G., Xu B., Wright A., Vanderbilt C. and Cobb M. H. 2001. MAP kinases. *Chem. Rev.* **101**: 2449–2476.

Clowes F. A. L. 1954. The promeristem and the minimal constructional center in grass root apices. *New Phytol.* **53**:108-16.

Collip J. B. 1923. Glucokinin. A new hormone present in plant tissue. Preliminary paper. *J. Biol. Chem.* **56**:513-543.

Collier E., Watkinson A., Cleland C. F. and Roth J. 1987. Partial purification and characterization of an insulin-like material from spinach and *Lemna gibba* G3. *J. Biol. Chem.* **262**:6238-6247.

Czech M. P. and Corvera S. 1999. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *J. Biol Chem.* **274**: 1865-1868.

Ellis M. M. and Eyster W. H. 1923. Some effects of insulin and glucokinin on maize seedlings. *Science* **58**: 541-542.

Etgen G. J., Valasek K. M. and Broderick C. L. 1999. In vivo adenoviral delivery of recombinant human protein kinase C γ -stimulates glucose transport activity in rat skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **274**: 22139-22142.

García Flores C., Aguilar R., De la Cruz H., Albores M. and de Jiménez E. S. 2001. A maize insulin-like growth factor signals to a transduction pathway that regulates protein synthesis in maize. *Biochem. J.* **358**: 95-100.

Grierson C. and Schiefelbein J. 2002. Root Hairs. *The Arabidopsis Book* American Society of Plant Biologists.

Goodman D. B. P. and **Davis W. L.** .1993. Insulin accelerates the postgerminative development of several fat-storing seeds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **190**:440-446.

Haslam R. J., **Koide H. B.** and **Hemmings B. A.** 1993. Pleckstrin domain homology. *Nature* **363**: 309-310.

Huang Y., **Li H.**, **Gupta R.**, **Morris P. C.**, **Luan S.** and **Kieber, J. J.** 2000. ATMPK4, an Arabidopsis homolog of mitogen-activated protein kinase, is activated in vitro by AtMEK1 through threonine phosphorylation. *Plant Physiol.* **122**: 1301–1310.

Ichimura K., **Shinozaki K.**, **Tena G.**, **Sheen J.**, **Henry Y.**, **Champion A.**, **Kreis M.**, **Zhang S.**, **Hirt H.**, **Wilson C.**, **Heberle-Bors E.**, **Ellis B. E.**, **Morris P. C.**, **Innes R. W.**, **Ecker J. R.**, **Scheel D.**, **Klessig D. F.**, **Machida Y.**, **Mundy J.**, **Ohashi Y.** and **Walker J.C.** 2002. Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: A new nomenclature. *Trends Plant Sci.* **7**: 301–308.

Igram G. and **Waites R.** 2006. Keeping it together: co-ordinating plant growth. *Plant Biol.* **9**: 12-20.

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

Karp G. 1998. *Biología Celular y Molecular*. Pp. 646 - 648. Mc Graw-Hill Interamericana.

Khanna P., **Nag T. N.**, **Jain S. C.** and **Mohan S.** 1974. Extraction of insulin from a plant source. 3rd International Congress on Plant Tissue & Cell Cultures. 21-26th July. Leicester. UK.

Lee J., **Pilch P. F.**, **Shoelson S. E.** and **Scarlata S. F.** 1997. Conformational changes of the IR upon insulin binding and activation as monitored by fluorescence spectroscopy. *Biochem.* **36**: 2701-2708.

López Bucio J., Cruz Ramírez A., Pérez Torres A., Ramírez Pimentel J. G., Sánchez Calderón L. and Herrera Estrella L. 2005. Plant Architecture and its manipulation. *Trinbull C. Balchwell publishing/ Annual*. **177**: 181-206

Lu C. Han M.-H. Guevara-Garcia A. and Fedoroff N. V. 2002. Mitogen-activated protein kinase signaling in postgermination arrest of development by abscisic acid. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **99**: 15812–15817.

Malamy J. E. and Benfey P. N. 1997. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Devel.* **124**:33-44

Marshall C. J. 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* **80**: 179-185.

Matsuoka D., Nanmori T., Sato K., Fukami Y., Kikawa U. and Yasuda T. 2002. Activation of AtMEK1, an Arabidopsis mitogen activated protein kinase kinase, in vitro and in vivo: Analysis of active mutants expressed in *E. Coli* and generation of the active form in stress response in seedlings. *Plant J.* **29**: 637–647.

Miles G. P., Samuel M. A., Zhang Y. and Ellis B. E. 2005. RNA interference-based (RNAi) suppression of AtMAPK6, an Arabidopsis mitogen-activated protein kinase, results in hypersensitivity to ozone and misregulation of AtMAPK3. *Environ. Pollut.* **138**: 230–237.

Mizoguchi T., Irie K., Hirayama T., Hayashida N., Yamaguchi K., Matsumoto K. and Shinozaki K. 1996. A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase is induced simultaneously with genes for mitogen-activated protein kinase and S6 ribosomal protein kinase by touch, cold and water stress in *Arabidopsis thaliana*. 1996. *Plant Biol.* **93**:765-769.

Montiel G., Pascal G., Allemand C. J. and Breton C. 2004. Transcription Factor Networks. Pathways to the Knowledge of Root Development. *Plant Physiol.* **136**: 3478-3485.

Nakagami H., Pitzschke A. and Hirt H. 2005. Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. Trends Plant Sci. **10**: 339–346.

Ortega- Domínguez B. 2007. Efecto de la insulina sobre la arquitectura de la raíz de *A. thaliana*. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Petersen M., Brodersen P., Naested H., Andreasson E., Lindhart U., Johansen B., Nielsen H. B., Lacy M., Austin M. J., Parker J. E., Sharma S. B., Klessig D. F., Martienssen R., Mattsson O., Jensen A. B. and Mundy J. 2000. Arabidopsis MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. Cell **103**: 1111–1120.

Ping, C. Lall, S. Nettleton, D. and Howell, S. H. 2006. Gene Expression Programs during Shoot, Root, and Callus Development in Arabidopsis Tissue Culture. Plant Physiol. **141**: 620-637

Reiling J. H. and Sabatini D. M. 2006. Stress and mTOR signaling. Review, Oncogene **25**: 6373-6383.

Ren D., Liu Y., Yang K-Y., Han L., Mao G., Glazebrook J. and Zhang S. 2008. A fungal-responsive MAPK cascade regulates phytoalexin biosynthesis in Arabidopsis. Proc. Nat. Acad. Sci. **105**: 5638–5643.

Roy S., McPherson R. A., Apolloni A., Yan J., Lane A., Clyde-Smith J. and Hancock J. F. 1998. Facilitates Ras-dependent Raf-1 activation in vitro and in vivo. Mol. Cell Biol. **18**: 3947-3955

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

Samaj J., Ovecka M., Hlavacka A., Lecourieux F., Meskiene I., Lichtscheidl I., Lenart P., Salaj J., Volkmann D., Brögre L., Baluska F. and Hirt H. 2002. Involvement of the mitógeno-activated protein kinase SIMK in regulation of root hair tip growth. EMBO J. **21**: 3296-3306.

Sánchez de Jiménez E., Beltrán-Peña E. and Ortiz-López A. 1997. Translation of ribosomal protein in maize axes. In: Basic and Applied Aspects of Seed Biology. Ellis R. H., Black M., Murdoch A. J. and Hong T. H. (eds) pp 385-394.

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

Santos V.O. 2003. Presencia de insulina en *Phaseolus vulgaris* L. c. v. Carioca. Monograph, Universidade Estadual Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ.

Scheres B. and Wolkenfelt H. 1998. The Arabidopsis root as a model to study plant development. *Plant Physiol.* **36**: 21-32.

Suzuki T. and Machida Y. 2008. MAP Kinase Cascades Controlling Cell Division, Plant Growth and Development. *Plant Cell Monographs*. Serial editor. 261-275.

Tagu D. y Moussard C. 2003. Fundamentos de las técnicas de biología molecular. Editorial Acribia S. A. Francia. pp 86-87, 142-145.

Takahashi F., Yoshida R., Ichimura K., Mizoguchi T., Seo S., Yonezawa M. Maruyama Y., Yamaguchi-Shinosaki K. and Shinozaki K. 2007. The mitogen-activated Protein kinase cascade MKK3-MKK6 is an important part of the jasmonate signal transduction pathway in *Arabidopsis*. *Plant cell* **19**: 805-818.

Teige M., Scheikl E., Eulgem T., Doczi R., Ichimura K., Shinozaki K., Dangl J. and Hirt H. 2004. The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Mol. Cell* **15**: 141–152.

Ullrich A., Bell J. R., Chen E. Y., Herrera R., Petruzzelli L. M., Dull T. J., Gray A., Coussens L., Liao Y. C., Tsubokawa M., Takai T., Noda M., Mishina M., Shimizu S., Furutani Y., Kayano T., Ikeda T., Kubo T., Takahashi H. and Takahashi T. 1985. Human IR and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature* **313**: 756-761.

Voliovitch H., Schindler D. G., Hadari Y. R., Taylor S. I., Accili D. and Zick Y. 1995. Tyrosine phosphorylation of IR substrate-1 in vivo depends upon the presence of its pleckstrin homology region. *J. Biol. Chem.* **270**: 18083-18087.

Xing Y., Jia W. and Zhang J. 2008. AtMKK1 mediates ABA-induced CAT1 expression and H₂O₂ production via AtMPK6-coupled signaling in *Arabidopsis*. *Plant J.* **54**: 440-451.

Widmann C., Gibson S., Jarpe M. B. and Johnson G.L. 1999. Mitogen-activated protein kinase: Conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev.* **79**: 143 180.

Wilson Z. A. 2000. *Arabidopsis*. Editorial Oxford University Press., USA. pp. 1-4.