



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“Caracterización de proteína(s) cinasas en la vía de señalización PDK/TOR/S6K en
Arabidopsis thaliana”**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS EN

BIOLOGIA EXPERIMENTAL

M.C. María Dolores Vázquez Rivera

Asesores de tesis

D.C. Homero Reyes de la Cruz

D.C. Jesús Campos García

MORELIA, MICHOACÁN. MARZO 2025



El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología Molecular de Plantas, del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la dirección del D. C. Homero Reyes de la Cruz y el D. C. Jesús Campos García con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Número de becario 552872.

DEDICATORIA

Con todo mi cariño para Alexander.....

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor, el D. C. Homero Reyes de la Cruz por la confianza brindada durante estos años, por abrirme las puertas de su laboratorio cuando más lo necesité y aportar las condiciones necesarias para que se llevara a cabo este proyecto de investigación, su enseñanza, consejos y paciencia desde la maestría siempre me acompañarán.

A mi co-asesor, el D. C. Jesús Campos García por siempre brindarme apoyo cuando lo he necesitado, que durante más de 10 años de proyectos juntos sus consejos no solo académicos me han ayudado a ser una mejor persona. ¡¡Infinitas Gracias Doc!!

Al D. C. Jesús Salvador López Bucio por siempre tener tiempo para revisar los experimentos, por aportar nuevas ideas al proyecto y por siempre impulsarme a seguir adelante.

Al D.C. Cesar Arturo Peña Uribe por apoyarme en cada experimento y en cada etapa de este proyecto, sin usted no lo hubiese logrado, gracias por siempre tener tiempo para escucharme.

A mi comité sinodal integrado por el D. C. Ernesto García Pineda y la D. C. Tzvetanka Dimitrova Dinkova por sus aportaciones en este proyecto

Esta tesis la dedico a todos ustedes... ¡Muchas gracias por todo!

Índice

RESUMEN	7
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUCCIÓN	11
2. ANTECEDENTES	14
2.1 <i>Arabidopsis thaliana</i>	14
2.2 Vías de transducción de señales.....	15
2.3 Vía de señalización de TOR en mamíferos	16
2.4 Vía de señalización de TOR en plantas	18
2.5 Cinasa S6K en <i>Arabidopsis</i>	20
2.6 Activación de la proteína cinasa dependiente de fosfoinositoles (PDK) en plantas.	22
2.7 Regulación del ciclo celular en plantas.....	24
2.8 Mecanismos de regulación en las transiciones G1/S y G2/M en condiciones favorables y en situaciones de estrés.....	28
2.9 Cinasa WEE1 en <i>Arabidopsis thaliana</i>	29
3. JUSTIFICACIÓN	33
4. HIPÓTESIS	33
5. OBJETIVOS	34
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	34
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	34
6. MATERIALES Y MÉTODOS	35

6.1 Condiciones de crecimiento de las plantas.....	35
6.2 Análisis de Western blot.....	35
6.3 Inmunoprecipitación.....	36
6.4 Electroforesis bidimensional.....	38
6.5 Cromatografía líquida con espectrometría de masas (LC/MS/MS)	39
7. RESULTADOS	40
7.1 Identificación de Akt en el genoma de <i>Arabidopsis thaliana</i>	40
7.2 Inmunodetección de Akt en extractos de proteína de	41
<i>Arabidopsis thaliana</i>	41
8. CAPITULO ÚNICO	47
9. Supplementary data.....	59
10. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	72
11. Bibliografía.....	77

RESUMEN

La vía de señalización de la proteína diana de la rapamicina (TOR, por sus siglas en inglés) desempeña un papel fundamental en la respuesta de las plantas al estrés, ya que regula el ciclo celular para mantener un equilibrio entre la proliferación y la diferenciación celular. En mamíferos uno de los principales blancos del complejo TOR de mamíferos (mTOR) es la proteína Akt, la cual regula diversos procesos celulares entre los que se encuentra el crecimiento y diferenciación celular. En plantas no se ha reportado una proteína Akt, sin embargo, varios componentes de la vía de señalización de mTOR se conservan en plantas, como es el caso de la proteína cinasa dependiente de 3-fosfoinosítidos 1 (PDK1), un regulador maestro conservado de las cinasas AGC (familias de proteína cinasa A, G y C (PKA, PKC, PKG) en organismos eucariotas. La activación de TOR por PDK1 en plantas no se comprende por completo. En este proyecto, se estudió la participación de algunos elementos de la vía de señalización de TOR en plantas. Como primer enfoque se realizó una búsqueda de proteínas que pudieran cumplir la función de la proteína Akt ya que en el genoma de *Arabidopsis thaliana* no está presente un ortólogo de Akt. Se realizaron inmunoprecipitaciones con anticuerpos monoclonales originados contra Akt, utilizando extractos de proteínas de plantas silvestres del ecotipo Columbia-0 (Col-0). La secuenciación de las proteínas obtenidas de esas inmunoprecipitaciones indicó elementos propios del ciclo celular, interesantemente entre los elementos encontrados está presente la cinasa WEE1 un regulador maestro del sistema de rescate de daños en el ADN en los meristemas, por lo tanto, como segundo enfoque se estudió la participación de dicha cinasa en la vía de señalización de TOR en *A. thaliana*. Para llevar a cabo esta evaluación se utilizó el inhibidor BX517, un inhibidor de PDK1 de mamíferos. La actividad de la proteína TOR y la expresión de WEE1 se analizaron a través de transferencias de proteínas y la actividad del gen reportero, respectivamente. Su relación con la progresión del ciclo celular meristemático se probó a través de análisis genéticos, los cuales demostraron que BX517 redujo la actividad de la cinasa TOR, activando la expresión de WEE1 en los meristemas de los brotes, las raíces y las raíces laterales, e inhibió

la progresión del ciclo celular meristemático en las raíces. Esto sugiere que PDK1 es un elemento crítico para las respuestas de las plantas a los factores mitogénicos a través de la modulación de la actividad de TOR. Nuestros hallazgos sugieren una relación entre un ortólogo de PDK1 con la modulación de la actividad de TOR y la expresión de la cinasa WEE1 para el crecimiento y las respuestas al estrés en las plantas.

Palabras clave

Sucrosa

Proteína PDK1

Proteína TOR

Cinasa WEE1

Promoción del crecimiento en planta

ABSTRACT

The Toll-like protein of rapamycin (TOR) signalling pathway plays a key role in the plant stress response by regulating the cell cycle to maintain a balance between cell proliferation and differentiation. In mammals, one of the major targets of the mammalian TOR complex (mTOR) is the Akt protein, which regulates a variety of cellular processes including cell growth and differentiation. However, several components of the mTOR pathway are conserved in plants, such as 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1), a conserved master regulator of the AGC kinase (protein kinase A, G and C (PKA, PKC, PKG)) families in eukaryotic organisms, which could directly activate the TOR complex, but TOR activation by PDK1 in plants is not fully understood. In this project, the involvement of some elements of the TOR signalling pathway in plants was investigated. The first approach was to search for proteins that could perform the function of the Akt protein, since there is no Akt ortholog in the *Arabidopsis* genome. Immunoprecipitations were performed with monoclonal antibodies against Akt, using protein extracts from wild-type Columbia-0 (Col-0) plants.

Sequencing of the proteins obtained from these immunoprecipitations revealed cell cycle elements; interestingly, among the elements found was the WEE1 kinase, a master regulator of the DNA damage repair system in meristems, so as a second approach the involvement of this kinase in the TOR signalling pathway in *A. thaliana* was studied. The inhibitor BX517, a mammalian PDK1 inhibitor, was used for this evaluation. TOR protein activity and WEE1 expression were analysed by protein transfer and reporter gene activity, respectively.

Their relationship with meristematic cell cycle progression was tested by genetic analysis, showing that BX517 reduced TOR kinase activity, activated WEE1 expression in shoot, root and lateral root meristems, and inhibited meristematic cell cycle progression in roots, suggesting that PDK1 is a critical element in plant responses to mitogenic factors through modulation of TOR activity. Our results

suggest a link between an orthologue of PDK1 with modulation of TOR activity and WEE1 kinase expression for growth and stress responses in plants.

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos sésiles que han adaptado su desarrollo en función de los diversos factores de su entorno, que incluyen cambios en las condiciones ambientales como la luz, la temperatura, la disponibilidad de agua y nutrientes, así como sus interacciones con otros organismos (Jürgens, 2001; Fu et al. 2020). Además, las respuestas al estrés de la planta siempre van acompañadas de extensos cambios transcripcionales, traduccionales y metabólicos para redirigir la energía y los recursos de nutrientes para la adaptación del estrés, en donde la señalización por la vía de TOR (del inglés, Target Of Rapamycin) es esencial en la integración de estímulos ambientales, disponibilidad de nutrientes y energía. La proteína TOR se ha considerado un regulador maestro del mantenimiento de la energía y la homeostasis metabólica en todos los organismos eucariotas (Fu et al. 2020).

En animales y levaduras, la proteína TOR forma dos complejos proteicos llamados TORC1 y TORC2. El primero consiste en la cinasa TOR, LST8 (Lethal with Sec Thirteen8) y RAPTOR (Regulatory Associated Protein of mTOR) que regula el crecimiento celular, la traducción y la autofagia en una manera sensible a la rapamicina. El complejo TORC2, además de la cinasa y LST8, está compuesto por la proteína RICTOR (Rapamycin Insensitive Companion of TOR) y, a diferencia de TORC1, es insensible a la rapamicina. TORC2 regula el crecimiento de células polarizadas, el citoesqueleto y la proliferación celular (Sarbasov et al. 2014). La mutación de cualquiera de los componentes principales de TORC1,2 es letal, lo que desencadena la detención del crecimiento durante el desarrollo embrionario. En 2002, se describió la proteína TOR en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Menand et al. 2002). Hasta ahora, solo se ha identificado un complejo tipo TORC1 en las plantas, ya que no tienen ortólogos para RICTOR.

El complejo TOR de *Arabidopsis* es un centro de integración para señales nutricionales, hormonales y de crecimiento, que traduce esta información a través de sus blancos, lo que permite la adaptación sistémica a los cambios ambientales.

Los principales componentes río arriba de la vía de señalización de TOR no han sido completamente descritos en plantas. Sin embargo, la disponibilidad de genomas secuenciados ha permitido explorar la homología y proponer los componentes río arriba de la vía de señalización en plantas, como es el caso de la cinasa PDK1, que es uno de los componentes principales de la vía de señalización de TOR. PDK1 es una proteína cinasa de serina/treonina conservada en eucariotas (Xiao y Offringa, 2020), conocida por su papel clave como activador de otras cinasas AGC que desempeñan funciones celulares cruciales en levaduras, humanos y ratones. En *Arabidopsis*, PDK1 se une a una amplia gama de fosfolípidos, específicamente fosfoinosítoles, cuya abundancia está controlada por la fosfatasa PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome) (Yang et al. 2013). *Arabidopsis* tiene dos genes PDK1 homólogos, AT5G04510 (ATPDK1.1) y AT3G10540 (ATPDK1.2), a diferencia de las levaduras y animales, las mutantes de PDK1, PDK2 con pérdida de función en *Arabidopsis* son viables (Xiao y Offringa, 2020). Las mutantes con pérdida de función muestran defectos de desarrollo severos, incluidos los cotiledones fusionados, una raíz primaria corta, una estatura enana y defectos en la fertilidad masculina (Xiao y Offringa, 2020), destacando el papel crucial de la proteína PDK en el crecimiento de las plantas. Sin embargo, existe evidencia escasa sobre el papel de las proteínas PDK1 en la señalización de TOR en las plantas.

La vía de señalización TOR tiene una función vital en permitir que las plantas se adapten al estrés regulando el ciclo celular para mantener el equilibrio entre la proliferación celular y la diferenciación (Anthony et al. 2014). Por ejemplo, la distribución del azúcar en las plantas promueve las transiciones del ciclo celular G2 a M y S-fase (Anthony et al. 2014) y activa la cinasa TOR para controlar la proliferación celular. Además, PDK1 se expresa de manera ubicua en todos los tejidos vegetales, es abundante en órganos de rápido crecimiento y células divisorias y se activa durante el reingreso de las células en el ciclo celular en la fase G1 después de la inanición del azúcar, lo que indica que la activación de PDK1 tiene un papel fundamental en el crecimiento y la división celular (Anthony et al. 2014).

La regulación del ciclo celular en el meristemo juega un papel crítico en el patrón de las plantas, el crecimiento y el desarrollo en condiciones normales y de estrés (Ko et al. 2018). Al igual que en otros organismos eucariotas, el ciclo celular en las plantas está compuesto por tres fases preparatorias durante la interfase, G1, S y G2, seguido de mitosis y citocinesis (Adachi et al. 2011).

Los dos puntos de control clave G1/S y G2/M en el ciclo celular eucariota representan umbrales para el inicio de la replicación y la mitosis, respectivamente (Zhao et al. 2012). En cada punto de control, un complejo protein-cinasa dependiente de ciclina (CDK) controla el ciclo celular fosforilando un conjunto diferente de proteínas (De Schutter et al. 2007; Dissmeyer et al. 2007, 2009; Harashima et al. 2007). Las plantas poseen la activación transcripcional de la cinasa reguladora del ciclo celular WEE1, que en *Arabidopsis* ocurre en respuesta a los agentes que dañan el ADN (por ejemplo, irradiación y zeocina). Además, recientemente Pan et al. 2021 han reportado una nueva vía de señalización para WEE1 en donde indican que esta cinasa de *Arabidopsis* interactúa directamente con la ubiquitina ligasa E3 FBL17 que promueve la degradación de los inhibidores de CDK. En mamíferos la cinasa WEE1 también fosforila y desestabiliza la protección equivalente a FBL17, indicando que esto es un mecanismo conservado (Pan et al. 2021). Además, se ha reportado que, en los metazoarios, la regulación de WEE1 por la señalización de TOR es un mecanismo conservado que ayuda a acoplar los controles del ciclo celular y el crecimiento (Atkin et al. 2014), sin embargo, cómo las plantas integran PDK1, TOR y la señalización de WEE1 en la cascada de división celular permanece desconocido.

2. ANTECEDENTES

2.1 *Arabidopsis thaliana*

En las últimas tres décadas, *A. thaliana* ha sido el modelo vegetal más usado para el estudio de procesos genéticos, fisiológicos, moleculares y del desarrollo vegetal. Dentro de las características que presenta se encuentra que es una planta dicotiledónea nativa de Europa y Asia que pertenece a la familia Brassicaceae, es usada ampliamente en el campo de la investigación científica; en parte, porque se adapta bien a las condiciones de crecimiento del laboratorio, su germinación in-vitro dura 2 días, tiene una alta tasa de autofertilización y su tamaño de planta adulta es de alrededor de 30cm (Woodward y Bartel, 2018). Su desarrollo comienza con la protrusión de la radícula, el hipocótilo y los cotiledones, estructuras primordiales del sistema radicular y el follaje (Sliwinska et al., 2009). Durante el crecimiento vegetativo, *Arabidopsis* desarrolla una roseta basal de donde surgen los tallos florales. En la etapa de reproducción, de las flores hermafroditas emergen frutos alargados llamados silicuas que pueden contener de 30-50 semillas. Finalmente, alcanza su maduración y senescencia hasta las 6-8 semanas de edad cuando crece en fotoperíodo largo (Krämer, 2015).

Las características principales de esta planta modelo que han favorecido su uso son: Tiene uno de los genomas vegetales más pequeños, el cual está completamente secuenciado y anotado (Nature, 408:796-815; 2000). Su ciclo de vida corto, de entre 6 a 8 semanas desde la germinación hasta la producción de semillas y la planta adulta es pequeña, aproximadamente 30 cm, por lo que se puede cultivar y manipular fácilmente en condiciones de laboratorio (Krämer, 2015). Además, muestra una alta eficiencia para la transformación genética.

Los ecotipos Columbia (Col-0 – Col-8), Wassilewskija (Ws-0 – Ws-4) y Landsberg erecta (Ler-0 y Ler-1) han sido los fondos genéticos más populares debido a que se cuenta con numerosas líneas mutantes generadas mediante el uso de métodos tradicionales como el tratamiento con metanosulfonato de etilo e irradiación gamma

(Maple y Møller, 2007). Incluso, pueden ser transformadas por la bacteria patógena *Agrobacterium tumefaciens*, la cual es capaz de integrar ADN de transferencia (T-ADN) al genoma para formar líneas mutantes y reporteras que proveen información sobre los patrones de expresión y los mecanismos moleculares de regulación genética (Hwang et al., 2017).

2.2 Vías de transducción de señales

En los organismos, la percepción correcta de los cambios en las condiciones variantes de su entorno es un importante mecanismo de supervivencia que involucra una amplia gama de vías de transducción de señales, las cuales cobran mayor importancia en las plantas dada su naturaleza sésil (Heyman et al., 2013).

De manera general, una vía de transducción de señales involucra a receptores, típicamente anclados a la membrana plasmática, aunque también pueden localizarse libres en el citoplasma o en el núcleo. Cuando un receptor interacciona con su ligando, ocurre un cambio conformacional que altera su actividad y el reconocimiento de los blancos proteínicos con los que interactúa, en consecuencia, se puede inducir la producción intracelular de segundos mensajeros como el calcio, el inositol 3 fosfato y las especies reactivas de oxígeno (ROS), que amplifican y transducen la actividad sensorial hacia efectores membranales o citoplásmicos.

En plantas se han identificado diversos tipos de modificaciones postraduccionales entre las que destacan los procesos de sumoilación, acetilación, glucosilación, ubiquitinación y fosforilación (De la Fuente van Bentem et al., 2007; Piquerez et al., 2014). Específicamente el proceso de fosforilación es llevado a cabo por proteínas con función cinasa (“protein kinases”), que catalizan la adición de grupos fosfato en residuos de aminoácidos específicos (generalmente serina, treonina o tirosina).

Estas reacciones de fosforilación desempeñan un papel fundamental en las vías de señalización, ya que además de ser un proceso rápido, es reversible por la acción

de enzimas con actividad de fosfatasa que remueven el grupo fosfato. De esta manera, la actividad coordinada de cinasas y fosfatasa es muy útil para regular la amplitud, la especificidad y la duración de una señal determinada de manera eficiente y sutil, además es uno de los mecanismos más estudiados para el control de los procesos celulares (Mishra et al., 2006; De la Fuente van Bentem et al., 2007; Piquerez et al., 2014). Las más de 1500 cinasas anotadas en el genoma de *A. thaliana*, se han clasificado en familias y subfamilias en función de su similitud con cinasas de otros organismos eucariontes (Lehti-Shiu y Shiu, 2012). Una de las proteínas cinasas de mayor importancia en *A. thaliana* es la proteína blanco de la rapamicina (TOR, por sus siglas en inglés), la cual es una proteína cinasa evolutivamente conservada relacionada a la cinasa de 3-fosfoinositol (PI3K), que controla múltiples procesos celulares como el metabolismo, el ciclo celular, la autofagia y la síntesis de proteínas, bajo varios estímulos intra y extracelulares (Dobrenel et al., 2016; Rexin et al., 2015; Tatebe y Shiozaki, 2017).

2.3 Vía de señalización de TOR en mamíferos

La vía de TOR ha sido ampliamente estudiada, principalmente en mamíferos y levaduras, donde se han encontrado una gran cantidad de componentes de dicha vía. El complejo 1 de mamíferos (mTORC1) puede ser activado por factores de crecimiento (por ejemplo, insulina), nutrientes (como aminoácidos) y por el estado energético (alta disponibilidad de ATP) (Bakshi et al., 2019; Shimobayashi y Hall, 2014). Los factores de crecimiento, como la insulina, activan a mTORC1 a través de la vía PI3K/(PDK1)/AKT, denominada como vía clásica (figura 1). Posteriormente AKT fosforila al complejo 2 de esclerosis tuberosa (TSC2, también llamado tuberina) para inducir la inhibición de TSC1 (también llamado hamartina) por disociación del complejo TSC1/TSC2, este complejo actúa como una proteína activadora de GTPasa (GAP) de la proteína GTP pequeña homologa de RAS enriquecida en cerebro (RHEB) (Shimobayashi y Hall, 2014; Tatebe y Shiozaki, 2017). Al ser parte de la familia de GTPasas Ras, RHEB necesita de la hidrólisis de un fosfato en la

molécula de guanosín trifosfato (GTP), produciendo guanosín difosfato (GDP), para estimular la actividad de mTORC1 al unirse directamente en su dominio cinasa. (Dibble & Cantley, 2015). Una vez activo el complejo mTORC1 interactúa con diversos factores diana, entre ellos se encuentran las proteínas 4E-BPs (proteínas de unión al factor de iniciación de la traducción 4E eucariota, eIF4E), las cuales son fosforiladas permitiendo la liberación de eIF4E y su asociación con eIF4G para estimular el inicio de la traducción (Bjornsti & Houghton, 2004).

El complejo mTORC1 también activa a la cinasa S6K1, la cual interactúa con diversos efectores para el control de la traducción. En S6K1, mTORC1 media la fosforilación de la Thr389 en el motivo hidrofóbico, mientras que PDK1 es responsable de la fosforilación de la Thr229 en el bucle-T. La fosforilación por mTORC1 está auxiliada por RAPTOR, este último media la interacción entre TOR y S6K1. El sitio Thr389 se encuentra conservado en la S6K1 de plantas (Dinkova et al., 2007; Xiong & Sheen, 2015).

Cuando S6K1 se encuentra activa, ésta fosforila a la proteína ribosomal S6 (S6rp) en la subunidad 40S lo que provoca un aumento en la traducción de un conjunto de mARNs que contienen en su extremo 5' un tracto oligopirimidinas (5' TOP). Entre los productos codificados por este tipo de mARNs se encuentran componentes del aparato de la traducción tales como otras proteínas ribosomales y factores de elongación (Wullschleger et al., 2006).

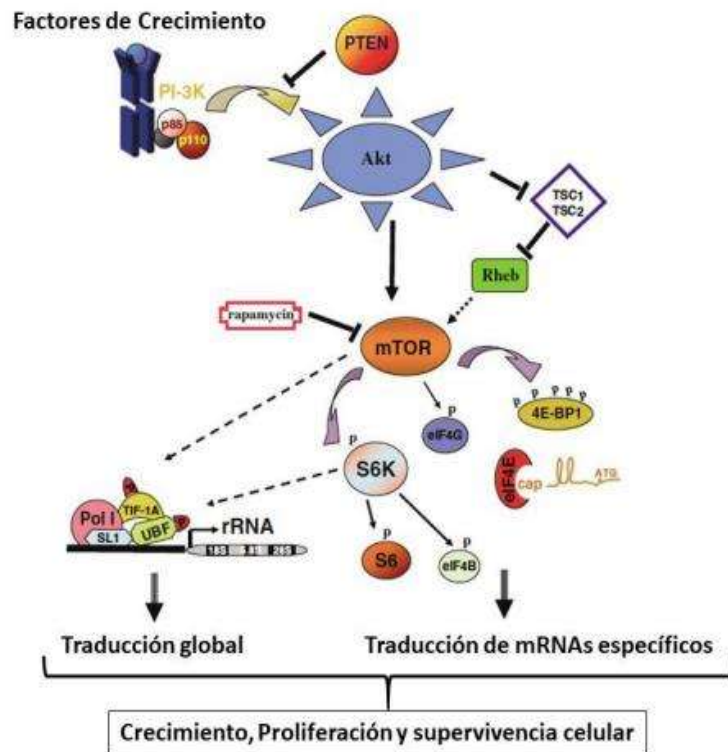


Figura 1. La vía PI3K/Akt/mTOR en mamíferos.

Los factores de crecimiento, una vez reconocidos por su receptor, activan a PI3K y Akt, quien directamente fosforila a mTOR e inhibe a los complejos TSC1/2, propiciando la activación de la vía. Río abajo se lleva a cabo la fosforilación de la cinasa S6K y de 4E-BP lo cual afecta en el equilibrio del crecimiento, proliferación y supervivencia celular. **(Modificado de Ruggero y Sonenberg, 2005).**

2.4 Vía de señalización de TOR en plantas

La vía de TOR es esencial para la regulación del crecimiento y desarrollo, procesos que requieren ser altamente regulados y por lo cual, la vía de TOR participa en todas

las etapas de crecimiento y desarrollo importantes durante el ciclo de vida de las plantas, desde la germinación, el crecimiento vegetativo, la floración, hasta la senescencia (Quilichini et al., 2019). Como se mencionó anteriormente, la mayor parte del conocimiento de la vía de TOR se ha obtenido por el estudio de la vía en mamíferos y levaduras. A pesar de que se han realizado un gran número de investigaciones de la vía en plantas, no se han logrado encontrar ortólogos funcionales para todos los componentes de la vía encontrados en mamíferos y levaduras, por ejemplo, en plantas no se han encontrado proteínas ortólogas para formar un TORC2 (Rexin et al., 2015; Schepetilnikov y Ryabova, 2017). Sin embargo, se han identificado homólogos de los componentes de TORC1, RAPTOR (RAPTOR1 y RAPTOR2) y LST8 (LST8-1 y LST8-2) (Rexin et al., 2015; Schepetilnikov y Ryabova, 2017).

La vía de señalización de TOR en plantas responde a señales como la luz, estrés biótico y abiótico, disponibilidad de energía (ATP), nutrientes (como aminoácidos), factores de crecimiento (similares a insulina) y hormonas (como auxinas) (Xiong y Sheen, 2014). Además de la glucosa, otros nutrientes funcionan como reguladores de la vía de TOR, por ejemplo, en mamíferos, la leucina y arginina activan la vía por diferentes sensores, pero convergen en la activación de GTPasas RAG heterodiméricas para reclutar a TORC1 a la membrana lisosomal, donde las GTPasas RAG se asocian con el complejo Regulador, v-ATPasa y RHEB, por lo que actúan como activador de mTOR. Aunque, las plantas carecen de estos sensores de aminoácidos de mamíferos y RAGs, los aminoácidos pueden activar la señalización de TOR en plantas (Shi et al., 2018; Tatebe y Shiozaki, 2017).

Además, los niveles de otros nutrientes como nitrógeno, fosfato y azufre funcionan como reguladores de la actividad de TOR en plantas (Shi et al., 2018; Wu et al., 2019). A pesar de que varios componentes de la vía en plantas están ausentes, existe una gran conservación de las proteínas blanco de TOR, por lo que dicha vía de señalización participa en la regulación de procesos similares a los reportados en levaduras y mamíferos.

En plantas no se han reportado homólogos para la principal cinasa productora de PI3P de animales (una PI3K de clase I), sin embargo, está presente la proteína Vps34 (vacuolar protein sorting 34), una PI3K de clase III, la cual cataliza la formación de PI3P a partir de fosfatidilinositol y tienen secuencias homólogas en plantas (Rexin et al., 2015). Estas cinasas se relacionan con el tráfico vesicular, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y respuesta a estrés. Dentro de la vía de señalización de TOR, la cinasa PDK de *Arabidopsis* se une a una amplia gama de fosfolípidos, específicamente a fosfoinositoles, cuya abundancia es controlada por la fosfatasa PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10). Sin embargo, la función de estas proteínas en la señalización hacia TOR no se ha comprobado aún en plantas. En células animales, en respuesta a altos niveles de nutrientes se produce ácido fosfatídico (PA) que activa TOR a través de su unión al dominio FRB. En plantas, se ha propuesto que la señalización por fitohormonas induce la producción de ácido fosfatídico derivado de PI3P por la enzima fosfolipasa D (PLD) (Bögre et al., 2013), lo cual podría contribuir a la activación de TOR (Rexin et al., 2015), como se muestra en la figura 2. En plantas dentro de las señales que activan a TOR río arriba se encuentran la disponibilidad de nutrientes (luz, azúcares) y la presencia de hormonas vegetales como las auxinas (ácido indolacético y análogos) o el ácido abscísico (ABA) (Bögre et al., 2013).

2.5 Cinasa S6K en *Arabidopsis*

En mamíferos río debajo de TOR se encuentra una cinasa Ser/Thr denominada p70S6K, para la cual en *Arabidopsis* se descubrieron dos ortólogos, AtS6K1 y AtS6K2, que tienen una gran similitud en su secuencia. Por splicing se pueden producir dos isoformas de cada una, p70 y p85 de S6K1; p54 y p56 de S6K2 (Turck, 2004; Yaguchi et al., 2020). De estos, AtS6K1 presenta mayor similitud con p70S6K. Para *Arabidopsis*, se ha descrito la interacción entre RAPTOR, TOR y S6K1. La

manera en la que TOR regula la traducción en las plantas es a través de S6K1, ya que no se han observado ortólogos para las proteínas 4E-BPs (Rexin et al., 2015).

Las S6Ks de mamíferos contienen cuatro dominios, el dominio amino terminal, el dominio cinasa, la región enlazadora y el dominio carboxilo terminal. Las S6Ks de plantas, comparadas con mamíferos, contienen un dominio amino terminal más largo, no contienen un dominio carboxilo terminal, pero conservan una alta identidad en el dominio cinasa y conservación en los tres sitios importantes de fosforilación, el sitio T-loop, el sitio TM y el sitio HM (Yaguchi et al., 2020).

La fosforilación del sitio HM es mediada por TOR y la fosforilación del sitio T-loop es mediada por PDK1 y se considera que la fosforilación en el sitio TM es mediada por TOR, aunque aún no se conoce a detalle (Yaguchi et al., 2020). La fosforilación ocurre en orden jerárquico, ocurriendo primero la fosforilación en TM y después puede ser fosforilado el sitio T-loop (Turck, 2004). Una vez que S6K es fosforilada, se considera que está completamente activa y desarrolla su actividad cinasa sobre varias proteínas blanco, de las cuales, la que fue descubierta primero y ha sido más estudiada es la proteína ribosomal S6 (S6RP) que es fosforilada en S240 por S6K. Una vez que S6RP es activada induce la síntesis de proteínas, por la traducción de ARNm que poseen una región no traducida (uORF) en su extremo 5' (5' UTR) (Schepetilnikov y Ryabova, 2017).

Se ha descrito que aminoácidos, auxinas e infecciones virales promueven que TOR fosfore a S6K1, quien a su vez induce la hiperfosforilación de S6rp y la fosforilación de eIF3h, resultando en la traducción selectiva de mRNAs 5'TOP o con uORF (marco de lectura abierto ascendente), cuyos productos son necesarios para el crecimiento celular (Schepetilnikov y Ryabova, 2017).

La función de la vía en la regulación traduccional también se conserva en plantas, donde se ha descrito su importancia para la biogénesis ribosomal y la traducción de mRNA específicos (Dinkova et al., 2007; Schepetilnikov & Ryabova, 2018; Xiong & Sheen, 2015).

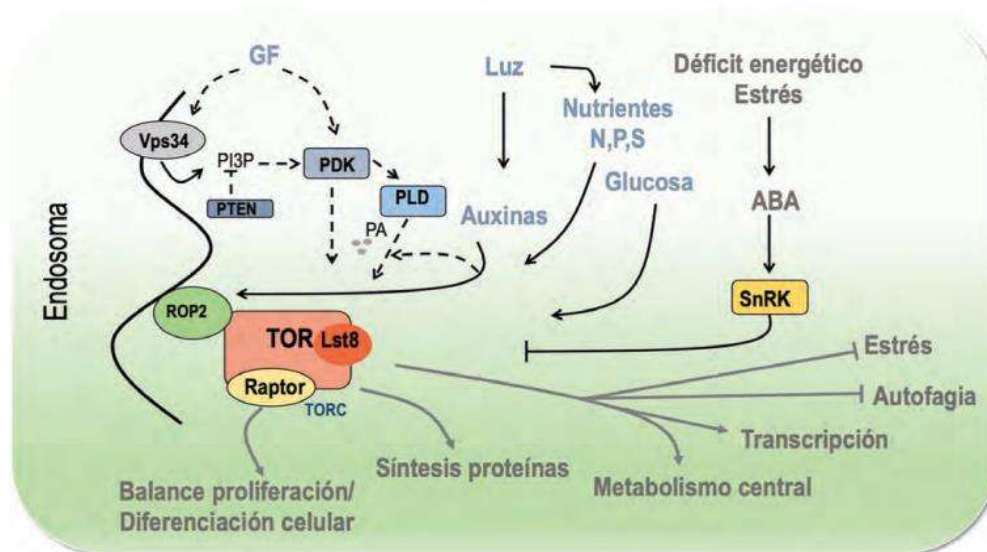


Figura 2. Vía de señalización de TOR en plantas.

TORC recibe las señales relacionadas con la disponibilidad de nutrientes, energía, factores de crecimiento (GF) y condiciones de estrés en la célula y mediante el control de la actividad de sus proteínas blanco regula la expresión génica, el metabolismo, la proliferación celular y la adaptación a estrés en las plantas. PDK podría activar directamente al complejo TORC, o a través de la producción de ácido fosfatídico (PA), un activador directo de TOR en animales, por la enzima fosfolipasa-D (PLD). La activación de TORC por auxinas permite la activación por la pequeña GTPasa ROP (proteína similar a Rho) en respuesta a la hormona vegetal. En condiciones de déficit energético y estrés otra fitohormona, ácido abscísico (ABA), activa la cinasa SnRK (cinasa similar a Snf1) que fosforila a Raptor e inhibe la formación del complejo y su actividad. Modificado de (Salazar y Dinkova 2021).

2.6 Activación de la proteína cinasa dependiente de fosfoinositoles (PDK) en plantas.

En las células animales, PDK1 es un integrador central para la señalización de eventos río debajo de varios receptores que estimulan a PI3K, y por lo tanto regula procesos entre los cuales se encuentran el mantenimiento del equilibrio entre el

crecimiento, la división celular y la apoptosis (Alessi, 2001). En plantas, es incierto cómo se regula la actividad de PDK1 y cómo es que se modifica su localización, activación, y estabilidad (Storz y Toker, 2002). Se ha identificado un homólogo funcional de PDK1 de mamíferos en *Arabidopsis*, llamado AtPDK1, el cual se demostró que complementa a PDK1 de mamíferos y activa a cinasa PKB in vitro (Deak et al, 1999). La PDK1 de *Arabidopsis* se une a una amplia gama de fosfolípidos, específicamente a fosfoinosítoles, cuya abundancia es controlada por la fosfatasa PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10). Sin embargo, la función de estas proteínas en la señalización hacia TOR no se ha comprobado aún en plantas. En células animales, en respuesta a altos niveles de nutrientes se produce ácido fosfatídico (PA) que activa TOR a través de su unión al dominio FRB. En plantas, se ha propuesto que la señalización por fitohormonas induce la producción de ácido fosfatídico derivado de PI3P por la enzima fosfolipasa D (PLD) (Bögre et al., 2013), lo cual podría contribuir a la activación de TOR (Rexin et al., 2015). El sitio de fosforilación de TOR se conserva en los homólogos de la cinasa S6K de *Arabidopsis*, al igual que el sitio de fosforilación de PDK1. Al igual que en los mamíferos, PDK1 fosforila directamente la AtS6K (Otterhag et al., 2006), una de las principales dianas de TOR. En mamíferos, la activación completa de p70S6K por TOR, que se ha utilizado como indicador de la actividad de TOR, se lleva a cabo por fosforilación del residuo Thr-389 después de la fosforilación de Thr-229 por PDK1 (Bögre et al., 2017). En plantas, se ha sugerido que la cinasa PDK1 activa a la AtS6K1 en los residuos de S290 y S431 para activar a S6rp y la traducción de mRNA (Bögre et al., 2017) (figura 3), sin embargo, existe escasa evidencia sobre el papel de la proteína PDK1 en la señalización de TOR en estos organismos.

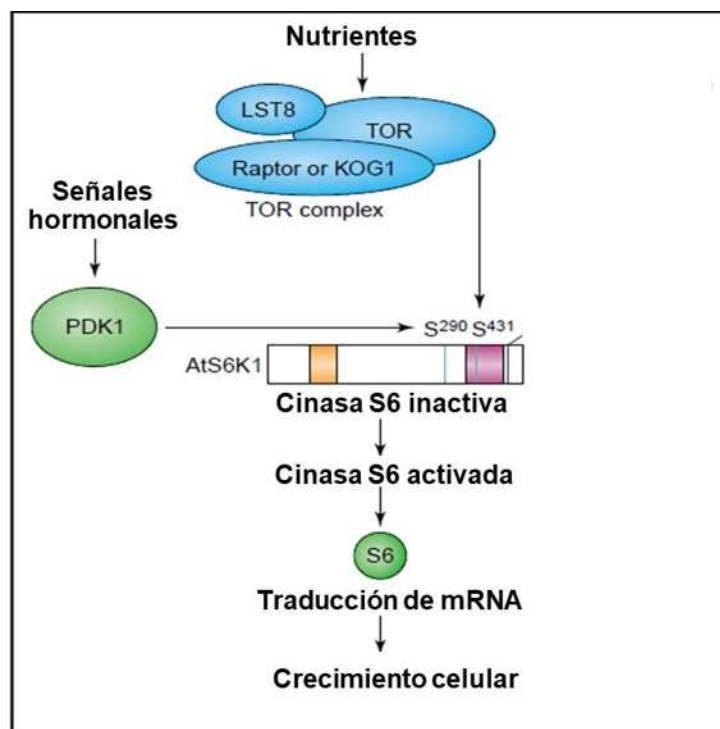


Figura 3. Activación de la cinasa AtS6K.

Se muestra la activación de AtS6K1, la cual probablemente requiere una variedad compleja de fosforilaciones concurrentes separadas, de múltiples sitios, catalizados por varias proteínas cinasas, incluidas PDK1 y TOR. Estas cinasas río arriba están activadas por una variedad de factores de crecimiento que incluyen hormonas y nutrientes. S6rp activada media la traducción río abajo de 50 ARNm específicos para llevar a cabo el crecimiento celular (Modificado de Bögre et al., 2017).

2.7 Regulación del ciclo celular en plantas

En organismos multicelulares; incluyendo humanos, hongos y plantas, el ciclo celular se constituye por las fases Gap1 (G1), S, Gap2 (G2), mitosis (M) y citocinesis. En la fase S, el genoma de las células se duplica mediante la replicación del ADN promovida por las enzimas ADN polimerasas (Bryant, 2014). Por otra parte, la mitosis marca los pasos de segregación del genoma y el núcleo al pasar por la profase, metafase, anafase y telofase. La formación del huso mitótico es esencial para la mitosis debido a que interviene en el alineamiento y la segregación de cromátidas de los cromosomas replicados (Bannigan et al., 2007; Herrmann et al.,

2020). Finalmente, en la citocinesis el citoesqueleto y las vesículas de membrana promueven la separación del citoplasma y la fusión de las membranas para formar dos células hijas (Jürgens, 2005).

Las fases G1 y G2 funcionan como fases de preparación y contienen puntos de control que retrasan la progresión del ciclo celular hasta que las condiciones ambientales, energéticas y de proteínas sean las adecuadas para el crecimiento, la replicación y la mitosis (Jones et al., 2017). Alternativamente, las células pueden escapar del ciclo celular convencional y entrar a la fase G0 o a la endorreplicación. La fase G0 es una forma de arrestar al ciclo celular en la fase G1 durante un periodo de tiempo indefinido, manteniendo de esta forma a las células en reposo o quiescentes (Velappan et al., 2017), mientras que durante la endorreplicación las células incrementan los niveles de ploidía mediante la replicación del ADN sin entrar a la mitosis. En la raíz se ha relacionado a la fase G0 y la endorreplicación con el desarrollo y la tolerancia al estrés (Heyman et al., 2013; Bhosale et al., 2018).

La progresión del ciclo celular depende de la actividad coordinada de las cinasas Ser/Thr CYCLIN-DEPENDENT KINASES (CDKs) y de las proteínas transitorias CYCLIN (CYC), las cuales interactúan y controlan la activación de las CDK. La quiescencia celular es regulada por las proteínas RETINOBLASTOMA RELATED1 (RBR1) que reprimen y secuestran a los factores de transcripción E2F (Desvoves et al., 2005; Park et al., 2005; Wildwater et al., 2005). Los factores E2F son esenciales para el ciclo celular debido a que forman dímeros con las proteínas DIMERISATION PARTNERS (DP) y activan la expresión de genes asociados con la fase S y la replicación del ADN (Inzé y Veylder, 2006; Magyar et al., 2012). No obstante, la decisión de comenzar con un nuevo ciclo celular depende de las proteínas CYCD. *Arabidopsis* cuenta con siete miembros conservados de CYCD (CYCD1-7) que interactúan con las proteínas cinasas CDKA (Menges et al., 2007; Tank y Thaker, 2011). El heterodímero formado por CDKA-CYCD fosforila al represor RBR1, causando la liberación del factor E2F y la progresión de la fase G1 a S (Nakagami et al., 2002; Menges et al., 2006; Collins et al., 2015).

Las proteínas CYCA/B y las cinasas CDKA/B controlan la transición de la fase G2/M (De Veylder et al., 2007). Durante esta fase, las células evalúan la integridad de los cromosomas y activan mecanismos que reparan el daño y los errores en el ADN (Weimer et al., 2016). Además, se marcan las pautas para continuar con la mitosis o la endorreplicación, los cuales dependen de la acumulación de las proteínas CYCA, CYCB y CDKB (Boudolf et al., 2009). En este mismo sentido, se ha observado que la endorreplicación está controlada por el complejo ANAPHASE PROMOTING COMPLEX/CYCLOSOME (APC/C), el cual es una ubiquitina E3 ligasa que promueve la degradación de las proteínas CYCA y CYCB en la fase G2 y M (profase) como se muestra en la figura 4 (Willems et al., 2020; Saleme et al., 2021).

La actividad de las CDKs se regula por sus niveles de síntesis (regulación transcripcional), fosforilaciones, interacción con ciclinas y con otras proteínas. La activación de la CDK se produce por un cambio conformacional que le permite la unión al sustrato tras la fosforilación de la treonina 160. Este proceso está mediado por cinasas activadoras de CDKs (CAKs). Existen dos tipos de CAKs en *Arabidopsis*, una CAK dimérica relacionada con la CDK7 de humanos que se une a la ciclina H, que es la CDKD1;3 y otra CAK monomérica que es la CDKF (Umeda et al., 1998; Vandepoele *et al.*, 2002). En *Arabidopsis* la regulación negativa por fosforilación de residuos sobre los complejos CDKs-ciclinas se lleva a cabo por los inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (KRPs/ICKs) (Umeda et al., 1998; Vandepoele *et al.*, 2002).

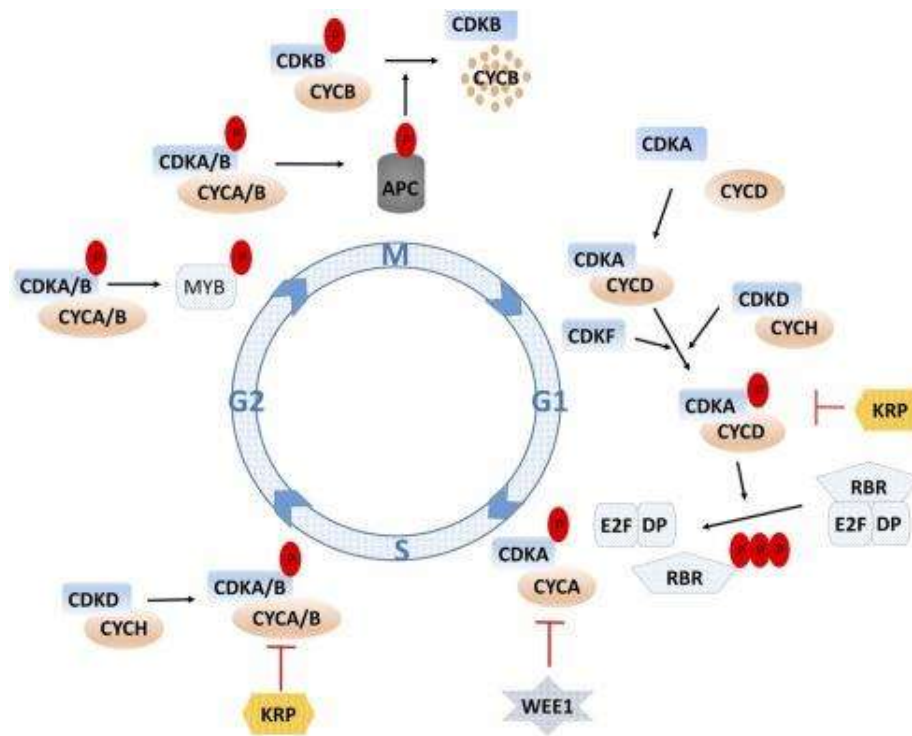


Figura 4. Regulación del ciclo celular en plantas (acorde al modelo de *Arabidopsis thaliana*).

Dependiendo de la actividad que se lleva a cabo en el proceso, se divide en 4 etapas clave (G1, S, G2, M). El complejo CDKF o CDKD/CYCH activa el complejo CDKA/CYCD para iniciar el evento. La activación de la transcripción de diferentes CYCD depende de la clave mitótica. Tras la activación, el complejo CDKA/CYCD disocia dos factores de transcripción E2F, DP de su pareja represora RBR, mediante hiperfosforilación de RBR. Una vez libre E2F, DP junto con diferentes proteínas necesarias para la replicación del ADN también transcribe CYCA. En la fase G1-S, el CYCA reemplaza a CYCD y gobierna la fase S. Desde la fase M media hasta la tardía, CDKB y CYCB se unen al proceso. Todos juntos guían el proceso a través de G2 tras la finalización exitosa de la síntesis de ADN. En la fase M, el complejo CDKA/B y CYCA/B activa el complejo APC/C mediante fosforilación. El APC/C gobierna los diferentes eventos de la fase M. Una de las funciones del APC/C es degradar CYCB para completar con éxito la fase M y lograr el evento del ciclo celular. En el evento completo, diferentes proteínas inhibidoras del ciclo celular

regulan estrechamente el proceso. Las KRP, un grupo de inhibidores de CDK, inhiben CDKA en situaciones desfavorables (Modificado de Banerjee et al., 2020).

2.8 Mecanismos de regulación en las transiciones G1/S y G2/M en condiciones favorables y en situaciones de estrés

Se ha demostrado que la subunidad CKS se une a las CDKs, teniendo un importante papel en la interacción de la CDK con reguladores positivos o negativos en la regulación del ciclo celular (Bourne *et al.*, 1996). La CDK activa es capaz de llevar a cabo varias funciones imprescindibles para la división celular y, en general, para la actividad proliferativa de la célula, tales como fosforilar la histona 1 en los cromosomas mitóticos, fosforilar componentes del citoesqueleto y del retinoblastoma (Rb), así como puede mediar la destrucción de componentes celulares utilizados en etapas anteriores por la vía de la ubiquitina (King *et al.*, 1996).

El hecho más destacado en la regulación de la transición G1/S en condiciones favorables de crecimiento, en presencia de factores que estimulan la división celular como son auxinas, azúcares, citoquininas, etc., es la inducción de la síntesis de ciclinas tipo D, y su unión a la proteína CDK correspondiente. Este complejo es inactivo y necesita ser activado por CAKs, permitiéndose así la expresión de factores de transcripción (E2F), necesarios para la fase de síntesis (replicación del DNA). Este mecanismo se lleva a cabo gracias a la destrucción de la proteína inhibidora de retinoblastoma (Rb), mediada por la activación de CDKs (Figura 5). En cambio, en condiciones desfavorables de crecimiento, causantes de situaciones de estrés, como por ejemplo el frío, se activan las proteínas KRP ó ICKs, inactivando el complejo CDKciclina, e impidiendo la progresión del ciclo celular (Inze y De Veylder, 2006).

2.9 Cinasa WEE1 en *Arabidopsis thaliana*

La cinasa Wee1 (Umeda *et al.*, 1998), proteína descrita en animales y en levaduras, tiene actividad de fosforilación inhibitoria para la CDKA en la transición de G2/M. Aunque se ha identificado la proteína WEE1 en plantas, no está clara su implicación en la regulación del ciclo celular en plantas del mismo modo que sus presuntos homólogos de animales y levaduras, debido a que también se ha detectado expresión de *WEE1* en condiciones favorables de crecimiento (Dissmeyer *et al.*, 2009; Malladi y Johnson, 2011).

La transición G2/M también está regulada por la activación/inactivación del complejo CDK-ciclina. El mecanismo de acción y de regulación por las proteínas activadoras e inhibitoras es igual al anterior. Sin embargo, en este punto parecen tener importancia en la regulación dos proteínas adicionales, WEE1 (mencionada anteriormente) y CDC25, presumibles homólogas de las proteínas del mismo nombre de animales y levaduras, bien caracterizadas en cuanto a su estructura y función en estos grupos taxonómicos (Ferreira *et al.*, 1991; Inze y De Veylder, 2006; Francis, 2007). El gen de la cinasa WEE1 se activa transcripcionalmente en respuesta a daños en el DNA o ante situaciones de estrés con consecuencias en la replicación fosforilando la CDKA en el denominado *P-loop* (Thr-14 y Tyr-15), y otras CDKs (Shimotohno *et al.*, 2006), y bloqueando la progresión del ciclo celular en fase G2, hasta que se complete la replicación o se repare el daño en el DNA. La proteína CDC25 es capaz de desfosforilar los residuos fosforilados por WEE1, permitiendo la entrada en mitosis (Figura 7).

Sin embargo, la regulación de CDKs por las proteínas WEE1 y CDC25 (mecanismo de fosforilación/ desfosforilación de la treonina 14 y tirosina 15) no está clara en *Arabidopsis*. Se ha encontrado una proteína homóloga a CDC25, la cual ha perdido el dominio regulador N-terminal y no es capaz de complementar mutantes *cdc25* de levaduras; sin embargo, es capaz de activar la CDK de *Arabidopsis in vitro* (Landrieu *et al.*, 2004). Experimentos llevados a cabo por Dissmeyer *et al.* (2009), demostraron que la actividad CDKA, promovida por la fosforilación en el *T-loop* (Thr-

161), era similar y comparable a la encontrada en animales y levaduras, pero la regulación por fosforilación/desfosforilación del *P-loop*, donde están implicadas las proteínas WEE1 y CDC25, no es relevante en plantas para el mantenimiento de la función CDKA-ciclina. Esto indicaría la no implicación directa de estas proteínas en la regulación del ciclo celular, una característica que sería exclusiva de plantas. Líneas mutantes para estos dos genes (*wee1* y *cdc25*) mediante el mecanismo de inserción por T-DNA, dieron resultados similares, en cuanto a la no implicación de estas dos proteínas en el mecanismo de regulación en la transición G2/M del ciclo celular (Boudolf *et al.*, 2006). La falta de regulación por estas dos proteínas podría ser sustituida por la CDKB (Andersen *et al.*, 2008).

En líneas celulares BY-2 de tabaco se ha visto que la sobreexpresión de CDKB2 puede estimular la entrada en mitosis, indicando que la regulación transcripcional de ciclinas mitóticas podría modular en parte la transición G2/M (Weingartner *et al.*, 2003). En la misma línea se ha detectado que la CDKB1 reprime la salida del ciclo celular y la endoreduplicación (o, lo que es lo mismo, estimula la división celular) mediante la fosforilación de la proteína ICK2/KRP2; en estado desfosforilado, ICK2/KRP2 es capaz de inhibir la actividad de CDKA, pero la fosforilación de esta proteína por CDKB1 la marca para su destrucción (figura 5; Boudolf *et al.*, 2006). Así pues, sería la inhibición/desinhibición de CDKA mediante ICK2/KRP2, y no la fosforilación/desfosforilación por WEE1/CDC25, el factor clave de la regulación de la entrada en mitosis en plantas (Boudolf *et al.*, 2006; Dissmeyer *et al.*, 2009).

Recientemente (Francis, 2011) ha postulado una interpretación de la regulación de la transición G2/M que trata de conciliar los resultados previos, aparentemente divergentes. Este autor destaca el hallazgo de la sobreexpresión de *WEE1* y del incremento de la actividad cinasa de WEE1 en condiciones de estrés inducido que afectan a la replicación del DNA, las cuales resultan en la parada del ciclo antes de la entrada en mitosis por la no superación del *checkpoint* de integridad del DNA (De Schutter *et al.*, 2007; Lentz-Gronlund *et al.*, 2009). En lo relativo a CDC25, el mutante *knockout cdc25* es hipersensible a la hidroxiiurea, un inhibidor de

replicación, indicando que la fosfatasa CDC25 está efectivamente implicada en el *checkpoint* de integridad de DNA previo a la mitosis (Spadafora et al., 2011).

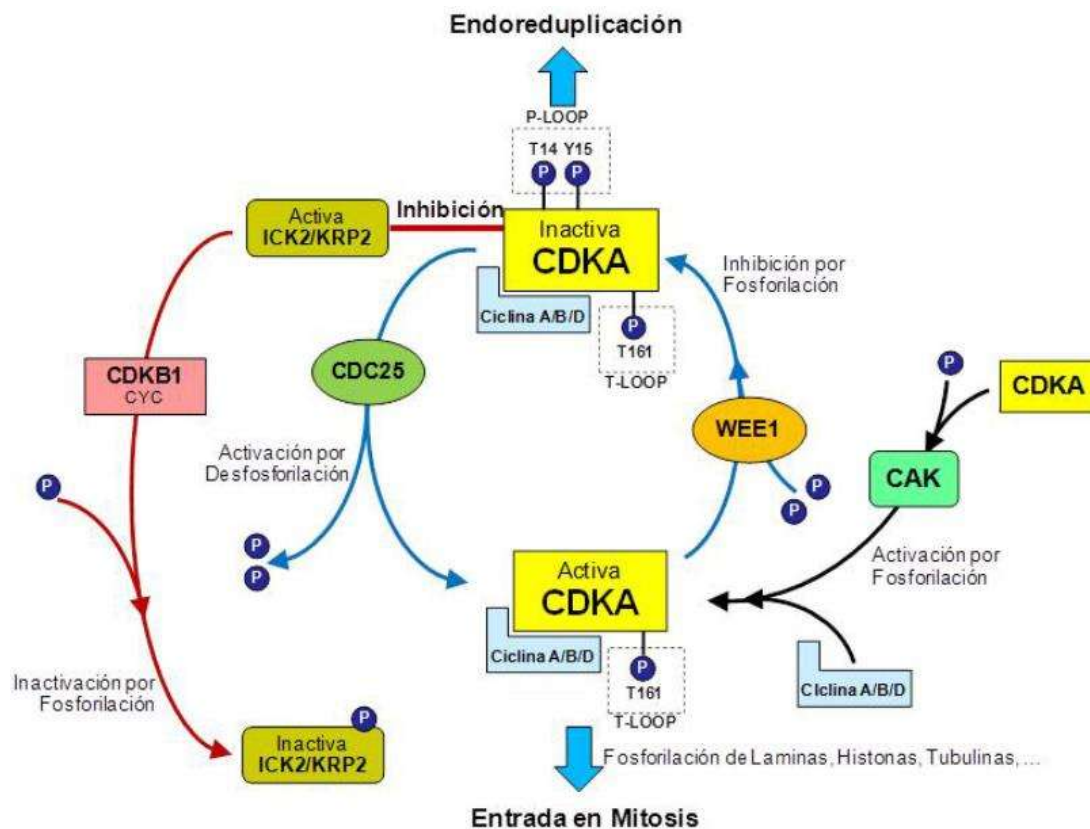


Figura 5. Representación gráfica de la regulación del ciclo en las transiciones G1/S (A) y G2/M (B). A) En condiciones favorables de crecimiento la CDKD se une al complejo CDK-ciclina activando la progresión del ciclo, mediante la destrucción de la proteína del retinoblastoma (Rb) y permitiendo la transcripción génica. B) La fase de transición G2/M está regulada por la activación/inactivación del complejo CDKA-ciclina, donde existen varias teorías de regulación, una idéntica a la de animales basada en la regulación complejo CDK-CDC25-WEE1 (flechas en azul) ó mediante la actividad de la CDKB (flechas en rojo). Modificado de Francis, 2007.

En *Arabidopsis*, la cinasa WEE1 controla la progresión de la fase S en respuesta a estrés de replicación transitorio y genotóxico mediante la fosforilación de las proteínas CDK y las ligasas de ubiquitina (Cools et al., 2011; Ko et al., 2018; Pan et al., 2021).

En células de mamíferos, la activación de mTOR y WEE1 contribuye sinérgicamente a reprimir el crecimiento de tumores ováricos, mientras que la inhibición de TOR condujo a niveles reducidos de WEE1 en células de levadura y mamíferos (Li et al., 2020), lo que sugiere un vínculo entre ambas cinasas para acoplar el ciclo celular con el control del crecimiento (Atkin et al., 2014). Además, el control de la proteína SOG1 sobre la división celular ocurre a través de la regulación de las proteínas SIAMESE-RELATED5/7 (SMR5/7), la cinasa WEE1 y los factores de transcripción ANAC044/085, los cuales inhiben la actividad de las cinasas CDK y promueven la acumulación del factor de transcripción MYB3R3 para el arresto del ciclo celular en las fases G2/M (De Schutter et al., 2007; Chen et al., 2017; Bourbousse et al., 2018; Ogita et al., 2018; Takahashi et al., 2019). Las plantas con la pérdida de función de cualquier de estos genes presentan a una respuesta ineficiente ante el daño, por lo que se consideran como genes esenciales que mantienen la integridad celular.

3. JUSTIFICACIÓN

Las vías de señalización consisten, en su mayoría, en una cadena de proteínas que interactúan una con la otra en una secuencia establecida. La vía de señalización PI3K/PDK/Akt/TOR en mamíferos regula una variedad de procesos centrales para las células. Al igual que en otros eucariontes la proteína TOR en plantas también juega un papel central para las células, sin embargo, en estos organismos se desconoce la participación de proteínas efectoras que sean los intermediarios entre PDK1 y la modulación de la actividad de TOR, por lo que es de nuestro interés identificar componentes río arriba de la vía de señalización TOR/S6K en *Arabidopsis*.

4. HIPÓTESIS

En *Arabidopsis thaliana* están presentes proteínas cinasas activadas por PDK1 que regulan la actividad de TOR modificando procesos del desarrollo.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar proteínas cinasa activadas por PDK1 que regulan la actividad de TOR/S6K y que modifican procesos del desarrollo.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar proteínas interactoras a la vía de señalización PDK/TOR/S6K en *Arabidopsis thaliana*.
- Evaluar la participación de las proteínas encontradas en presencia de inhibidores y activadores de la vía de señalización PDK/TOR/S6K en *A. thaliana*.
- Estudiar la participación de las proteínas cinasas encontradas en la vía de señalización PDK/TOR/S6K en *A. thaliana*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Condiciones de crecimiento de las plantas

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 se esterilizaron superficialmente con etanol al 70 % (v/v) durante 5 min y una solución de cloro comercial al 20 % (v/v) durante 5 min. Después de siete lavados con agua destilada estéril, se realizó una vernalización a 4 °C durante 48 h. Las semillas se germinaron y se cultivaron en placas de agar que contenían medio Murashige y Skoog (MS) 0,2x (0,866 g/L de sales carentes de aminoácidos y vitaminas, 10 g/L de fitagar [grado de micropropagación] y 6 g/L de sacarosa). Las plantas se colocaron en una cámara de crecimiento vegetal (Percival Scientific AR-95L, Perry, Iowa, EE. UU.) con un fotoperiodo de 16/8 h de luz/oscuridad (intensidad de luz de 100 $\mu\text{mol m}^2/\text{s}$), 80 % de humedad y temperatura de 22 °C.

6.2 Análisis de proteínas mediante Western blot

Las plántulas de *Arabidopsis thaliana* (50 plantulas) se molieron en nitrógeno líquido y el polvo se transfirió a un tubo que contenía buffer de extracción (σ -vanadato de sodio 1 mM, molibdato de sodio 1 mM, benzamidina 1 mM, fluoruro de sodio 20 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,2 mM, ditioneitol 2 mM, ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etanosulfónico 50 mM, pH 7,6). Después de agitar con vórtex, el homogenado se centrifugó a $9000 \times g$ a 4 °C durante 30 min. Se recuperó el sobrenadante y se cuantificó la proteína utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976). Se utilizó el reactivo comercial BioRad Protein Assay y como proteína para la curva patrón, la albumina sérica bovina (BSA). Los valores de concentración de proteína se obtuvieron por extrapolación de aquellos procedentes de la curva patrón de BSA, en un rango de 0 a 10 $\mu\text{g/ml}$. Posteriormente se realizó el análisis de Western blot, esta técnica permite detectar y comparar entre diferentes extractos proteicos los niveles de una proteína determinada mediante electroforesis en gel de

poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS), la cual se realizó en condiciones desnaturalizantes.

Se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF y sobre ella se llevó a cabo la hidratación con el anticuerpo primario monoclonal de Akt (dilución 1:1000) (Cell Signaling Technology #5G3 2966) durante toda la noche, posteriormente se incubaron con el anticuerpo IgG de cabra anti-ratón (dilución 1:3000) (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EE. UU.) a temperatura ambiente (~25 °C). La reacción de peroxidasa se reveló utilizando luminol y se detectó en un sistema ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad Laboratories, Inc.). El análisis densitométrico de los puntos resultantes se realizó utilizando el software Image Lab (Bio- -Rad Laboratories, Inc.).

6.3 Inmunoprecipitación

Se utilizaron perlas magnéticas de proteína G (ChIP-Grade Protein G Magnetic Beads #9006. Cell signaling) las cuales son una matriz de afinidad para el aislamiento a pequeña escala de inmunoprecipitaciones (ensayos IP). Para iniciar la inmunoprecipitación se realizó una pre-aclaración de las perlas magnéticas con el fin de reducir la unión de proteínas no específicas, se agitó brevemente con vórtex el tubo que contenía las perlas magnéticas, posteriormente se transfirió 20 µl de suspensión de perlas a un tubo limpio. El cual se colocó en una rejilla de separación magnética (3 carriles, tecnología de señalización celular n.º 01923) durante 10 a 15 segundos.

Se retiró con cuidado el buffer una vez que la solución estaba transparente, agregando 500 µl de buffer de lisis celular 1X al sedimento de perlas magnéticas, agitando brevemente para lavar las perlas. Se colocó el tubo nuevamente en la rejilla de separación magnética retirando el buffer una vez que la solución fuese transparente. Repitiendo este paso 2 veces más.

Se agregaron 200 µl de lisado celular a 20 µl de perlas magnéticas prelavadas. La concentración óptima de lisado dependió del nivel de expresión de la proteína de interés. Con una concentración inicial entre 250 µg/ml y 1,0 mg/ml.

Se incubó con rotación durante 20 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se separaron las perlas del lisado utilizando una rejilla de separación magnética, desechando el sedimento de perlas.

Se agregó el anticuerpo primario Akt (dilución 1:1000) (Cell Signaling Technology #5G3 2966) (a la dilución adecuada según lo recomendado en la hoja de datos del producto) a 200 µl de lisado celular, incubando con rotación durante la noche a 4 °C para formar el inmunocomplejo.

Se transfirió la solución de lisado y anticuerpo (inmunocomplejo) al tubo que contiene el pellet de perlas magnéticas prelavadas, con rotación durante 20 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se separaron las perlas con una rejilla de separación magnética, se lavaron los pellets cinco veces con 500 µl de buffer de lisis celular 1X. Manteniendo en hielo entre lavados.

El análisis se realizó mediante transferencia por Western blot e inmunodetección.

Las membranas se incubaron con anticuerpo monoclonal anti-Akt (dilución 1:1000) (Cell Signaling Technology #5G3 2966) o anticuerpo monoclonal anti-P-Akt/1/2/3 (dilución 1:1000) (Santa Cruz Biotechnology #L1520) a 4 °C durante la noche. Luego, las membranas se incubaron con anticuerpo IgG de cabra anti-ratón (dilución 1:3000) (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EE. UU.) a temperatura ambiente (~25 °C). La reacción de peroxidasa se reveló utilizando luminol y se detectó en un sistema ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad Laboratories, Inc.). El análisis densitométrico de los puntos resultantes se realizó utilizando el software Image Lab (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

6.4 Electroforesis bidimensional

Para este ensayo se utilizó el producto de inmunoprecipitación anteriormente obtenido, el cual se transfirió a un tubo que contenía un buffer de extracción (fenol 50 % [v/v], EDTA 10 mM, sacarosa 900 mM, β -mercaptoetanol 0,4 % [v/v], σ -vanadato de sodio 5 mM, fluoruro de sodio 5 mM, β -glicerofosfato de sodio 25 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 8,8), se homogeneizó y se centrifugó a $9000 \times g$ a 4 °C durante 15 min. La fase orgánica se recuperó y se lavó con este buffer de extracción. A continuación, se añadió solución de precipitación (acetato de amonio 100 mM sobre metanol) en una proporción de 1:4 y se dejó la precipitación durante la noche a -20 °C. Posteriormente, se obtuvo un pellet por centrifugación a $9000 \times g$ a 4 °C durante 15 min. El pellet se lavó tres veces con solución de precipitación y se realizó un lavado final con acetona fría al 80 %. Después del lavado, se realizó una centrifugación a $9000 \times g$ a 4 °C durante 10 min. El pellet resultante se disolvió en tampón de isoelectroenfoque (urea 8 M, CHAPS 4 % [p/v], ditiotretitol 7 mM, anfolitos 2 % pH 3-10 [p/v]) y las proteínas se cuantificaron de acuerdo con las especificaciones del 2-D Quant Kit (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, Pennsylvania, EE. UU.). Para la rehidratación nocturna de tiras de 13 cm, se utilizaron 200 μ g de cada muestra de proteína con un gradiente de pH inmovilizado de 3 a 10 (IPG DryStrip pH 3-10 NL, 13 cm, GE Healthcare Life Sciences). Se realizó un enfoque isoeléctrico hasta alcanzar 18 000 Vh en una unidad de enfoque isoeléctrico Ettan IPGphor 3 para la separación en primera dimensión. Posteriormente, las tiras se sometieron a SDS-PAGE al 12 % para la separación en segunda dimensión, para poder visualizar las proteínas obtenidas se realizó una tinción del gel, con Coomassie G-250 o coloidal.

Los spots obtenidos fueron recortados y enviados para su secuenciación mediante cromatografía líquida con espectrometría de masas.

6.5 Cromatografía líquida con espectrometría de masas (LC/MS/MS)

Los spots de gel en 2D se colocaron en tubos eppendorf de 1,5 mL con 1 mL de agua durante 30 min. Se eliminó el agua y se añadieron 50 μ L de bicarbonato de amonio 250 mM. Para la reducción, se añadieron 5 μ L de solución de 1,4-ditiotreitol (DTT) 45 mM y las muestras se incubaron a 50 °C durante 30 min. Las muestras se enfriaron a temperatura ambiente de 25 °C y luego, para la alquilación, se añadieron 5 μ L de solución de yodoacetamida 100 mM y se dejó reaccionar durante 30 min.

Los spots del gel se lavaron dos veces con alícuotas de 1 mL de agua. Se eliminó el agua y se colocó 1 ml de bicarbonato de amonio 50 mM:acetonitrilo (50:50) en cada tubo y las muestras se incubaron a temperatura ambiente de 25 °C durante 1 h. Luego se eliminó la solución y se agregaron 200 μ L de acetonitrilo a cada tubo, momento en el que los cortes de gel se volvieron blancos opacos. Se eliminó el acetonitrilo y las manchas de gel se secaron aún más en un Speed Vac. Las manchas de gel se rehidrataron en 50 μ L de 2 ng/ μ L de tripsina (Sigma) en 0,01 % de surfactante ProteaseMAX (Promega): 50 mM de bicarbonato de amonio. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 21 h. Luego se eliminó el sobrenadante de cada muestra y se colocó en un tubo Eppendorf de 1,5 mL por separado. Las manchas de gel se deshidrataron aún más con 100 μ L de acetonitrilo:1% de ácido fórmico (80:20). El extracto se combinó con los sobrenadantes de cada muestra.

Las muestras se disolvieron en 16 μ L de acetonitrilo al 5% en ácido trifluoroacético al 0,1% antes de la inyección en LC/MS/MS.

7. RESULTADOS

7.1 Identificación de Akt en el genoma de *Arabidopsis thaliana*

Se han identificado diferentes isoformas de Akt en vertebrados e invertebrados debido a que la estructura de Akt muestra una alta conservación molecular y funcional (Gonzalez y McGraw, 2009); es por ello que en este estudio realizamos una comparación *in silico* de la proteína Akt (1, 2, 3) de mamíferos en *A. thaliana*, donde se encontraron 7 secuencias con un porcentaje de identidad de 28 a 40%, dichas secuencias pertenecen al igual que la proteína Akt de mamíferos a la familia de cinasas AGC (Fig. 5 A), sin embargo ninguna de ellas presenta el dominio de homología de pleckstrina (dominio PH) (Fig 5B), además varían entre los 600 y 900 aminoácidos, lo cual difiere de Akt que presenta alrededor de 500 aa, con estos resultados se indica que en cuanto a secuencia no se encuentra presente ninguna proteína homóloga a la cinasa Akt en el genoma de *A. thaliana*.

Sin embargo, no se descarta que pudiese estar presentes algunas proteínas que cumplan dicha función de Akt en plantas, debido a que esta proteína se encuentra involucrada en la vía de señalización de TOR, la cual está altamente conservada en eucariontes y es un eje central que percibe el estatus de la célula y en respuesta regula la expresión génica, la distribución de recursos energéticos, nutricionales y permite la adaptación del organismo (Salazar y Dinkova 2021). En este trabajo se realizó la inmunodetección de la proteína con anticuerpos monoclonales Anti-Akt de mamífero, obteniendo como resultado un reconocimiento del anticuerpo demostrado con la presencia de dos bandas una de 50 y otra de 37KDa en extractos de proteína de *A thaliana* (Fig. 5 A).

7.2 Inmunoetección de Akt en extractos de proteína de

Arabidopsis thaliana

Con la finalidad de aislar y concentrar la proteína obtenida de *A. thaliana*, realizamos una inmunoprecipitación con perlas magnéticas y anticuerpos monoclonales Akt de mamíferos, obteniendo como resultado la identificación de una proteína de 50 KDa, la cual corresponde al peso de Akt en mamíferos (Fig 5B). Debido a que existe la posibilidad de que se estén enmascarando algunas isoformas o restos de anticuerpo, se realizó una electroforesis en segunda dimensión (2D) de la inmunoprecipitación ya obtenida anteriormente, lo cual permite separar las proteínas en una primera dimensión mediante isoelectroenfoque (IEF), donde se separa según su punto isoeléctrico (pI) y en una segunda dimensión, se separa por su peso molecular en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE. La proteína se tiñó con Coomassie G ya que es de mayor sensibilidad, con lo cual se obtuvo como resultado 5 señales diferentes (spots) con un punto isoeléctrico que se encuentra entre 5 y 6 de pH (Fig. 5C). Los spots obtenidos fueron recortados y enviados para su secuenciación mediante Cromatografía líquida con espectrometría de masas (LC/MS/MS), interesantemente en los resultados obtenidos por la LC/MS/MS (Tabla 1) se identificaron cinasas involucradas en el ciclo celular, como es el caso de la cinasa WEE1 y la proteína F-box de acuerdo con el papel de WEE1 en la detención del ciclo celular en respuesta al estrés de replicación, se ha descubierto que WEE1 forma parte del mecanismo que acopla el inicio de la mitosis con la finalización de la reparación del ADN en células que han sufrido daño del ADN (Chen et al., 2017; Bourbousse et al., 2018)

Las proteínas F-box regulan diversos procesos celulares, incluida la transición del ciclo celular, la regulación transcripcional y la transducción de señales (Kuroda et al., 2002)

Estos resultados sugieren la presencia de una y/o algunas proteínas cinasas involucradas en la vía de señalización PDK1/TOR debido a que el resultado de la inmunoprecipitación fue realizado con el anticuerpo de Akt y dicha proteína se encuentra involucrada en la vía de señalización PDK/TOR directamente en crecimiento celular lo cual, sugiere que los elementos encontrados en la LC/MS/MS (Tabla 1) podrían estar relacionados con la vía de señalización de TOR en *A. thaliana*.

A)

Número de acceso	Proteína	% de identidad
AT2G36350	AGC cinasa. No caracterizada.	40.52
AT5G03640	Cinasa AGCVIII involucrada en el fototropismo.	39.87
AT1G79250	AGC cinasa. No caracterizada.	38.96
AT2G26700	Cinasa AGC VIIIA, PINOID2.	33.86
AT1G16440	Cinasa AGC VIIIA.	29.87
AT3G12690	AGC cinasa. Proteína no caracterizada.	28.85
AT3G14370	Proteína relacionada con PINOID.	28.01

B)

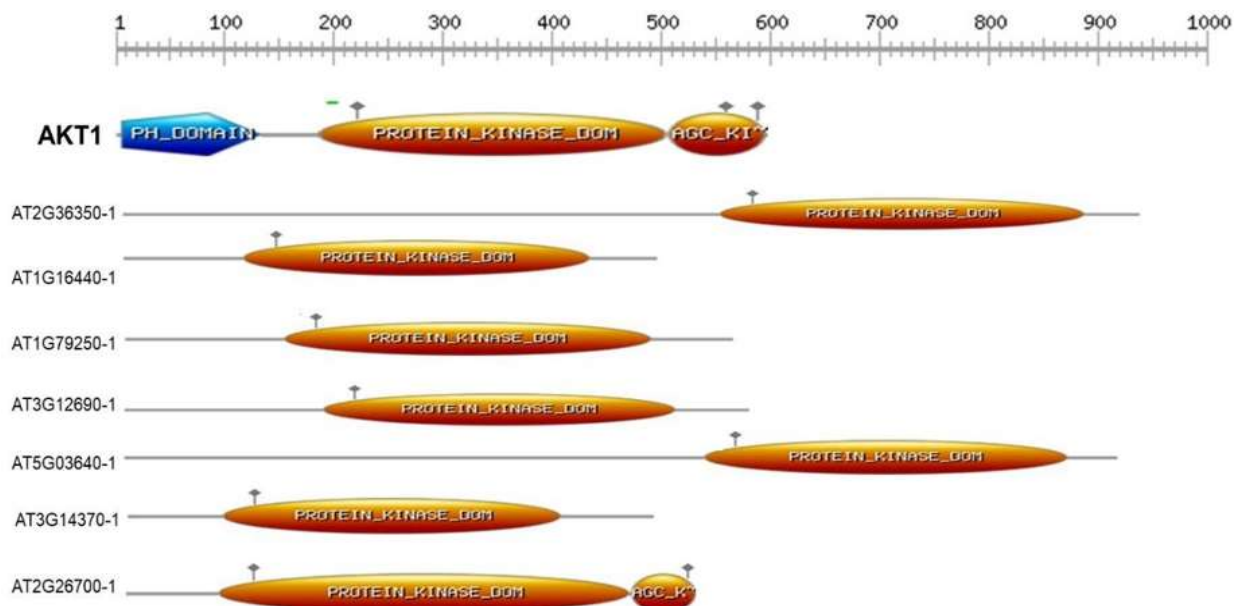


Figura 6. Identificación de proteínas Akt en *A. thaliana*.

A) Comparación *in silico* de la proteína Akt (1, 2, 3) de mamíferos en el genoma de *A. thaliana*. B) Comparación de las secuencias encontradas en el genoma de *A. thaliana*, se muestran las secuencias que presentan mayor porcentaje de identidad comparadas con la proteína Akt de mamíferos, mostrando los dominios que las conforman.

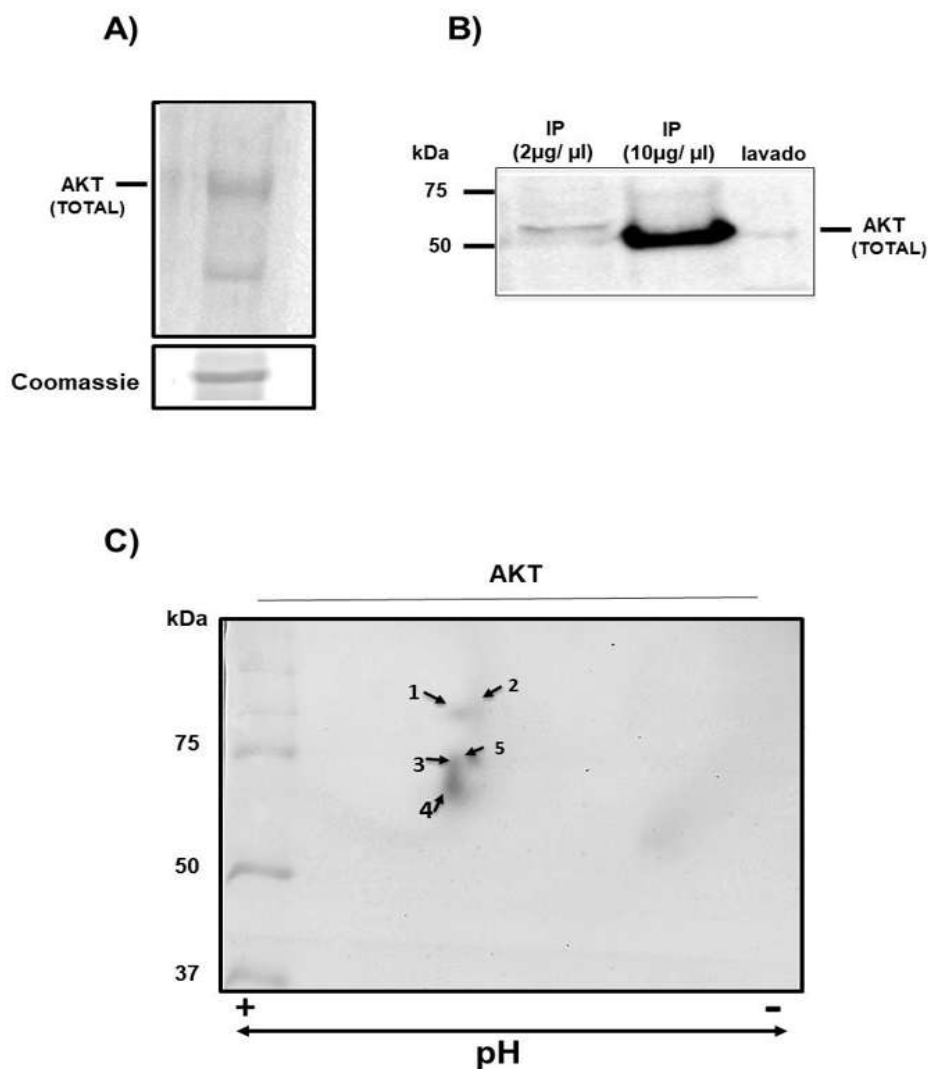


Figura 7. Identificación de Akt en extractos de proteína de *A. thaliana*.

Los extractos de proteínas de plántulas de *A. thaliana* Col 0 de 8 días de edad se resolvieron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS y se analizaron mediante ensayos de transferencia de proteínas utilizando anticuerpos anti-AKT (A). Como control de carga de proteínas, se incluye en (A) (panel inferior) un fragmento de un gel teñido con Coomassie ejecutado en paralelo con el utilizado para el análisis de transferencia de proteínas.

(B) se muestra el resultado de la inmunoprecipitación (IP) realizada con anticuerpos anti AKT y purificada mediante perlas magnéticas, la identificación de proteínas se realizó utilizando anticuerpos anti-Akt de mamíferos. (C) Se muestra el resultado de la electroforesis en 2D posterior a la IP, el gel fue teñido con coomasie G y los spots obtenidos para posterior identificación con las flechas en negro.

Las transferencias de proteínas se realizaron a partir de dos experimentos independientes con resultados similares.

Protein ID	Spot #	Accession	% confidence	Molecular weight (kDa)
Receptor protein kinase	1	ZAR1_ARATH	97	78 kDa
Wee1 Protein Kinase	1	WEE1_ARATH	96	57 kDa
Cyclin D2-1	2	CCD21-ARATH	95	41 kDa
Receptor protein kinase	2	ZAR1_ARATH	98	78 kDa
Wee1 Protein Kinase	2	WEE1_ARATH	96	57 kDa
ATP Syntase subunit beta	2	ATPB_ARATH	95	48 kDa
F-box protein like	2	FBL79_ARATH	96	52 kDa
Wee1 Protein Kinase	3	WEE1_ARATH	96	57 kDa
Cyclin D2-1	5	CCD21-ARATH	95	41 kDa

Tabla 1. Proteínas identificadas en *Arabidopsis thaliana* por LC/MS/MS

Se usaron los algoritmos de búsqueda de la base de datos MASCOT para asignar los resultados; de los cuales, los péptidos encontrados con un porcentaje de confianza >95% fueron aceptados como asignaciones correctas. Porcentaje de cobertura de proteína es aquel identificado por los algoritmos de búsqueda de MASCOT.

8. CAPITULO ÚNICO

Vázquez-Rivera ORCID ID: 0000-



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Plant Physiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jplph

BX517, an inhibitor of the mammalian phospholipid-dependent kinase 1 (PDK1), antagonizes sucrose-induced plant growth and represses the target of rapamycin (TOR) signaling and the cell cycle through WEE1 kinase in *Arabidopsis thaliana*

Dolores Vázquez-Rivera^a, Pedro Iván Huerta-Venegas^b, Javier Raya-González^c, César Arturo Peña-Urbe^a, Jesús Salvador López-Bucio^a, Ernesto García-Pineda^d, José López-Bucio^b, Jesús Campos-García^e, Homero Reyes de la Cruz^{a,*}

^a Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Laboratorio de Biotecnología Molecular de Plantas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ed U3, Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán, Mexico, CP 58030

^b Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Laboratorio de Biología del Desarrollo, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ed A1, Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán, Mexico, CP 58030

^c Facultad de Químico Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Avenida Tzintzuntzan 173 Col. Matamoros, 58240, Morelia, Michoacán, Mexico

^d Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ed A1, Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán, Mexico, CP 58030

^e Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Laboratorio de Biotecnología Microbiana, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ed U3, Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán, Mexico, CP 58030

ARTICLE INFO

Keywords:

Sucrose
PDK1 protein inhibitor
TOR protein
WEE1 kinase
Plant growth promotion

ABSTRACT

The target of rapamycin (TOR) signaling pathway is critical for plant growth and stress adaptation through maintaining the proper balance between cell proliferation and differentiation. Here, by using BX517, an inhibitor of the mammalian phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1), we tested the hypothesis that a plant ortholog of PDK1 could influence the TOR complex activity and its target, the S6 ribosomal protein kinase (S6K) in *Arabidopsis* seedlings. Through locally applying sucrose to leaves, which promotes root growth and plant biomass production via TOR signaling, we could demonstrate the opposite trend upon BX517 treatment, which antagonized sucrose-induced plant growth and overly decreased root development through inhibiting the expression of mitotic cyclins CYCB1 and CYCA3 in root meristems. Evidence was gathered that the WEE1 kinase, a master regulator of the DNA damage rescue system in meristems, operates downstream of a plant BX517 target (s). TOR protein activity and WEE1 expression were analyzed through protein blots and reporter gene activity, respectively, and their relationship with meristematic cell cycle progression was tested through genetic analyses. BX517 reduced TOR kinase activity, activated WEE1 expression in shoot, root, and lateral root meristems, and inhibited meristematic cell cycle progression in roots, suggesting that PDK1 is a critical element for plant responses to mitogenic factors through modulating TOR activity. Our data uncover a relation between a PDK1 ortholog with TOR activity and the expression of WEE1 kinase for growth and stress responses in plants.

1. Introduction

Plants, as sessile organisms, adapt to biotic and abiotic stimuli through dynamic cell responses orchestrated by signal transduction pathways, which coordinate environmental stresses with gene

expression (Fu et al., 2020). Extensive transcriptional and/or translational reprogramming are tightly linked to metabolic cell conditions closely depending on sugar availability.

The target of rapamycin (TOR) kinase is considered a key regulator of metabolic homeostasis and energy maintenance in eukaryotic

* Corresponding author.

E-mail address: homero.reyes@umich.mx (H. Reyes de la Cruz).

<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2024.154386>

Received 24 May 2024; Received in revised form 22 November 2024; Accepted 23 November 2024

Available online 28 November 2024

0176-1617/© 2024 Elsevier GmbH. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

organisms (Fu et al., 2020; Xiong et al., 2013). In yeast and animal cells, it forms two protein complexes called TORC1 and TORC2, the former in association with Lethal with Sec Thirteen 8 (LST8) and Regulatory Associated Protein of mTOR (RAPTOR), which regulates cell growth, translation, and autophagy in a rapamycin-sensitive manner. The TORC2 complex, besides TOR and LST8, recruits Rapamycin Insensitive Companion of TOR (RICTOR), and unlike TORC1, it is insensitive to rapamycin (Henriques et al., 2022; John et al., 2011). TORC2 plays a role in polarized cell growth, configuration of the actin cytoskeleton, and cell proliferation (Sarbasov et al., 2004; Thorner, 2022). Mutation of any of the main components of TORC1/2 triggers growth arrest during embryonic development. Although TOR protein was described more than twenty years ago in *Arabidopsis thaliana* (Menand et al., 2002), so far, only a TORC1-like complex has been identified in plants, which lacks orthologs for RICTOR (Henriques et al., 2022).

The TORC1 complex of *Arabidopsis* integrates nutritional, hormonal, and growth signals, allowing adaptation to environmental changes. However, upstream elements of the TOR signaling have been poorly characterized in plants. In yeast and mammals, the phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1), a conserved protein serine/threonine kinase, is one of the main components of the TOR signaling pathway. It activates cAMP-dependent, cGMP-dependent, and protein kinase C (AGC) kinases for basal cellular functions (Xiao and Offringa, 2020). An *Arabidopsis* ortholog of PDK1 binds to phosphatidylinositol (PI), whose abundance is controlled by the Phosphatase and Tensin (PTEN), a protein showing lipid phosphatase activity (Yang et al., 2013). *Arabidopsis* has two highly homologous *PDK1* genes, At5g04510 (*PDK1*) and At3g10540 (*PDK2*), and the corresponding *pdk1 pdk2* double mutants are viable but displayed growth and developmental defects (Xiao and Offringa, 2020).

Interestingly, the fact that either PDK1 or PDK2 proteins can complement a yeast *pdk1* mutant suggests ubiquity for substrate recognition. Thus, their downstream targets may determine specificity in regulating cellular functions (Xiao and Offringa, 2020). PDK1 loss-of-function mutants show fused cotyledons, short primary roots, male infertility, and reduced height (Xiao and Offringa, 2020), highlighting its crucial role in growth. As in mammals, PDK1 phosphorylates the AtS6k (Otterhag et al., 2006), another main TOR target, and full activation of p70S6K by TOR, which has been used as an indicator of TOR activity, is carried out by phosphorylation of Thr-389 residue upon the phosphorylation of Thr-229 by PDK1, both these residues are conserved in the plant S6K proteins (Turck et al., 1998; Reyes de la Cruz et al., 2004). Nevertheless, scarce evidence exists about the role of PDK1 protein in TOR signaling in plants.

TOR signaling enables stress adaptation by regulating the cell cycle to maintain the balance between cell proliferation and differentiation. For example, sugar sink to source distribution from leaves to roots promotes the transition from G2 to M and S-phases in root meristem cells (Kircher and Schopfer, 2012; MacGregor et al., 2008; Skylar et al., 2011) and activates TOR kinase to control cell proliferation (Van Leene et al., 2019). Moreover, PDK1 is ubiquitously expressed in all plant tissues, becoming particularly abundant in fast-growing organs and dividing cells. Furthermore, it is activated upon nutritional recovery from sugar starvation during the re-entry of cells into the cell cycle (Anthony et al., 2006).

Cell cycle maintenance in the root meristem is critical for patterning, growth, and development under normal and stressful conditions (Harashima and Schnittger, 2010; Jakoby and Schnittger, 2004; Ko et al., 2018; Zhao et al., 2012). In response to DNA-damaging agents (i.e., γ -irradiation and zeocin) or replication-blocking agents (i.e., hydroxyurea (HU) and aphidicolin) a DNA-damage rescue system is activated to protect highly dividing cells from passing mutations to their progeny (Adachi et al., 2011; Fulcher and Sablowski, 2009; Furukawa et al., 2010; Ko et al., 2018). In *Arabidopsis*, the WEE1 kinase controls S-phase progression in response to genotoxic and transient replication stresses by phosphorylating cyclin-dependent protein kinases (CDKs)

and ubiquitin ligases (Cools et al., 2011; Ko et al., 2018; Pan et al., 2021).

In mammalian cells, activation of mTOR and WEE1 synergistically contributes to repressing ovarian tumor growth, whereas TOR inhibition led to reduced WEE1 levels in yeast and mammal cells (Li et al., 2020), suggesting a link for both kinases to couple the cell cycle with growth control (Atkin et al., 2014). However, possible relations among PDK1, TOR, and WEE1 with the regulation of root architecture, plant biomass production, or cell division in plants remain unknown. In the present work, we aimed to advance into these important issues using BX517, a potent inhibitor of PDK1 in mammals, to assess their effects in *Arabidopsis*. Our data show the relation of a BX517 target, probably a PDK1 ortholog, with TOR activity and WEE1 kinase expression, which may be necessary for plant growth and stress responses.

2. Materials & methods

2.1. Chemicals

BX517 (10 mM 1 mL) Cat. # HY-13842/CS-6066 from Med Chem Express was dissolved in dimethyl sulfoxide. AZD8055 Base Cat. # A-2345 from LC Laboratories was dissolved in dimethyl sulfoxide. Hydroxyurea Cat. # 40046 was purchased from Sigma and dissolved in water or dimethyl sulfoxide. PF4708671, Cat. # PZ0143 from Sigma-Aldrich was dissolved in dimethyl sulfoxide. N-(1-naphthyl)phthalamic acid (NPA) 10 mM 1 mL. Cat. # 33371 was purchased from Sigma-Aldrich and dissolved in dimethyl sulfoxide. In control treatments, the solvents were used in equal amounts as present in the greatest concentration of each compound tested.

2.2. Plant treatment and growth conditions

Arabidopsis thaliana (Col-0, *wee1-2*, and *wee1-3* mutants, transgenic *CycB1::uidA*, *CYCA3;1pro::CYCA3;1-GUS*, *DR5::GUS* and *WEE1::GUS* lines) seeds were disinfected upon treatment with 70 % (v/v) ethanol for 5 min and 20 % (v/v) commercial bleach solution for 5 min. After seven washes with sterile distilled water, vernalization at 4 °C was performed for 48 h. The seeds were germinated and grown on agar plates containing 0.2X Murashige and Skoog (MS) medium (0.866 g/L of salts lacking amino acids and vitamins, 10 g/L phytagar [micropropagation grade], and 6 g/L sucrose) (standard medium). Plants were placed in a plant growth chamber (Percival Scientific AR-95L, Perry, Iowa, USA) with a photoperiod of 16/8 h light/darkness (light intensity of 100 mmol m²/s), 80 % humidity and temperature of 22 °C.

For the sucrose treatments, *Arabidopsis* seedlings were grown as indicated above. After 4 days of growth, the plantlets were transferred to fresh MS medium without sucrose, and the sucrose (6.0, 4.8, and 9.6 %) treatments were applied to a droplet maintained in contact with the shoot. On the other hand, a different set of plantlets was transferred to a standard MS medium (0.6% sucrose), and different concentrations of BX517 (2, 4, and 8 μ M) were added in a droplet over the aerial tissue. In both cases, the seedlings were grown in the same conditions as above for 8 days, and then the primary root length and the root and shoot fresh weight were registered, and gene expression was analyzed for transgenic plants harboring reporter genes.

For treatments on liquid MS medium, *Arabidopsis thaliana* lines (Col-0, *wee1-2* and *wee1-3* mutants, transgenic *CycB1::uidA*, *CYCA3;1pro::CYCA3;1-GUS* and *WEE1::GUS*) were disinfected, germinated and grown as described above. After 4 days of growth, seedlings were transferred to fresh liquid MS medium containing 0.6% sucrose supplemented with 3 μ M AZD8055, 9.6% sucrose, 8 μ M BX517, or 10 μ M hydroxyurea. Seedlings were grown at 16/8 h light/darkness photoperiod (light intensity of 100 mmol/m²/s), 80% humidity, and a temperature of 22 °C for 12, 24, and 48 h. Analysis of gene expression in the transgenic plants and protein assays by protein blotting in the Col-0, *wee1-2*, and *wee1-3* mutant lines were performed. *DR5::GUS* plants were grown in the same

conditions for 8 days and then incubated in liquid MS medium supplemented with 8 μ M BX517, 2 μ M NPA, 1 μ M PF4807671, or 3 μ M AZD8055 for 48 h.

2.3. Transgenic plant analyses

Transgenic *A. thaliana* *CycB1::uidA* (Colón-Carmona et al., 1999), *WEE1::GUS* (De Schutter et al., 2007), *CYCA3::pro::CYCA3::1-GUS* (Bulankova et al., 2013), and the *DR5::GUS* (Ulmasov et al., 1997) that express the *uidA* reporter gene (Jefferson, 1989) were incubated into 0.1 % 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-Gluc) dissolved in phosphate buffer (0.1 M NaH_2PO_4 , 0.1 M Na_2HPO_4 , pH 7) and supplemented with 2 mM potassium ferrocyanide ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) and 2 mM potassium ferricyanide ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) for 18 h at 37 °C. Plants were cleared and fixed as previously described (Malamy and Benfey, 1997). At least 10 transgenic plants were analyzed for each marker line and each treatment.

2.4. Protein gel blot analyses

50 seedlings from each treatment were ground in liquid nitrogen using a mortar. The powder was placed in an extraction buffer (1 mM sodium ortho-vanadate, 1 mM sodium molybdate, 1 mM benzamide, 20 mM sodium fluoride, 0.2 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 2 mM dithiothreitol, and 50 mM 4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethane sulfonic acid; pH 7.6). The homogenate was centrifuged (9000 $\times$ g, 30 min at 4 °C), the supernatants were collected, and the protein content was quantified using the Bradford method (BioRad). Protein extract samples (10 μ g) were resolved by 12 % SDS-PAGE and blotted on polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Millipore, Burlington, MA, USA). Membranes were incubated with anti-ZmS6K polyclonal antibody (1:5000 dilution) (Abbiotec) or anti-phospho-p70S6K monoclonal antibody (1:5000 dilution) (Santa Cruz Biotechnology SC-8416 B0717) at 4 °C overnight. For S6 ribosomal protein (S6rp) blot analyses, membranes

were incubated with anti-S6rp polyclonal antibody (1:1000 dilution) (Santa Cruz Biotechnology, SC-20085) or anti-phosphorylated (Ser 235/236) S6rp polyclonal antibody (1:1000 dilution) (Santa Cruz Biotechnology SC-54279-R) at 4 °C overnight. Then, the membranes were washed and incubated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (1:10000 dilution) (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) at room temperature (~25 °C) for 2 h. The peroxidase reaction was revealed using luminol and detected in a ChemiDoc™ XRS + system (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

3. Results

3.1. Leaf-applied sucrose promotes plant growth

In Arabidopsis seedlings, TOR is mainly expressed in root meristems, which support root growth (Díaz-Granados et al., 2020; Montané and Menand, 2013). Sucrose was applied owing its reported effects as growth promoter activating TOR in meristems and promoting the cell cycle (Raya-González et al., 2017; Van Leene et al., 2019), following the procedure described by Raya-González et al. (2017), which consists of growing Arabidopsis seedlings in agar plates with MS medium without sucrose and supplementing low (0.6%), mild (4.8%) or a high (9.6%) sucrose concentration in an agar droplet to support shoot growth for several days. Fig. 1A shows representative photographs of seedlings grown in the different treatments. As expected, increasing sucrose into the droplets promoted primary root growth, lateral root formation, and shoot and root biomass production of seedlings (Fig. 1B–E). These data show that supplementing sugar as the energy source to leaves drives overall growth throughout the plant.

3.2. Mammalian PDK1 inhibitor BX517 represses plant growth and antagonizes sucrose-induced plant growth

PDK1 is an upstream effector of TOR in animals and yeasts. To gain

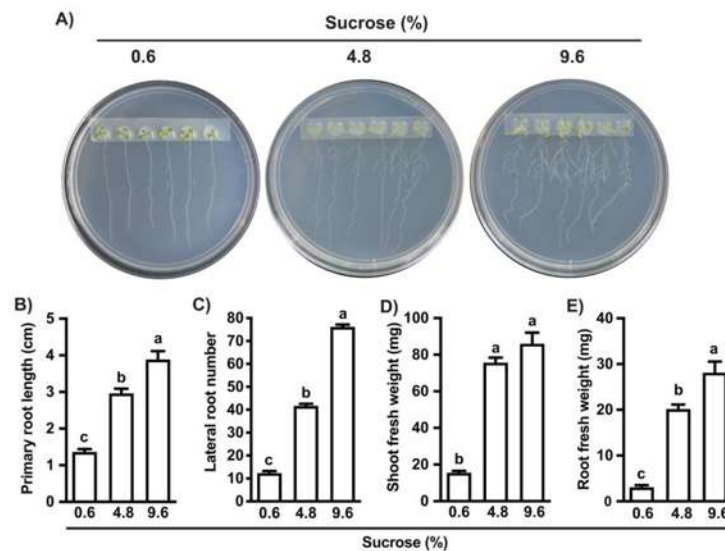


Fig. 1. Effect of sucrose on *A. thaliana* development

(A) Photographs of *A. thaliana* Col-0 plants transferred to agar plates with 0.2X MS medium without sucrose. The indicated sucrose concentrations (0.6, 4.8, and 9.6%) were added in droplets on the seedling's aerial tissue and grown for 8 days. Quantitative data of primary root length (B), lateral root number (C), shoot fresh weight (D), and root fresh weight (E) were recorded. Data present the means $\pm$ SE ($n = 10$). Different letters represent statistically different means in a one-way ANOVA, with a posthoc Tukey test ($P < 0.05$). The experiment was repeated three times, with similar results.

insight into the direct regulation of TOR activity by PDK1 in Arabidopsis, we used BX517, a potent inhibitor that binds to the ATP-binding pocket of mammalian PDK1. To establish whether plant homologous of PDK1 could orchestrate the beneficial effects of sucrose for growth, Arabidopsis seedlings were placed on standard MS medium, and 0, 2, 4, and 8 μM of BX517 were added to the agar droplets and plants allowed to grow. An additional treatment combining 9.6% sucrose and 8 μM BX517 was included to analyze potential synergic or antagonistic activities. Noteworthy, BX517 affected all physiological parameters measured in a dose-dependent manner, being the greatest concentration (8 μM) the most inhibitory; 4 μM significantly reduces the root fresh weight and the lateral root number, whereas 2 μM only reduces the lateral root number (Fig. 2A–E). Indeed, the plant growth promotion by 9.6% sucrose (Fig. 1) was antagonized by 8 μM BX517 in the combined treatment (Fig. 2). These results indicate that BX517 probably targets a PDK1 ortholog, which mediates sucrose growth responses in plants.

3.3. BX517 represses the expression of plant mitotic cyclins CYCB1;1 and CYCA3;1 and antagonizes sucrose-induced cyclin gene expression

Cell division and elongation are two key determinants for root growth. The cell division domain within the root meristem is also the major TOR expression zone greatly influenced by sucrose and BX517

(Raya-González et al., 2017; Van Leene et al., 2019). To establish whether the growth reduction observed upon BX517 application involves the cell cycle downregulation, the expression of the mitotic cyclin B1;1 was analyzed in six-day-old Arabidopsis seedlings expressing the *CycB1::uidA* gene construct (Colón-Carmona et al., 1999). For this purpose, the transgenic plants expressing the construct were incubated in a medium with sucrose as a TOR inducer for 96h or treated with BX517. As expected, 9.6% sucrose promoted *CycB1* expression in the root meristem compared to control plants (Fig. 3A). In contrast, 8 μM BX517 substantially decreased *CycB1* expression alone or combined with 9.6% of sucrose abrogating the growth-promoting effects of the sugar.

Cyclin A3;1 (CYCA3;1) is another mitotic cyclin closely related to cyclin B that accumulates at the G1/S phase of the cell cycle in meristematic tissues (Takahashi et al., 2010). To analyze whether the decrease in cyclin B expression by the mammalian PDK1 kinase inhibitor also affects CYCA3;1, we tested the change in GUS expression pattern in response to 9.6% sucrose or 8 μM BX517. Our results showed an induction of CYCA3;1 expression by sucrose and repression by BX517, respectively, when compared to the controls, and the inhibitor antagonized sucrose when applied in combination (Fig. 3B). Collectively, these data suggest that the mammalian PDK1 inhibition affects the expression of mitotic cyclins in plants.

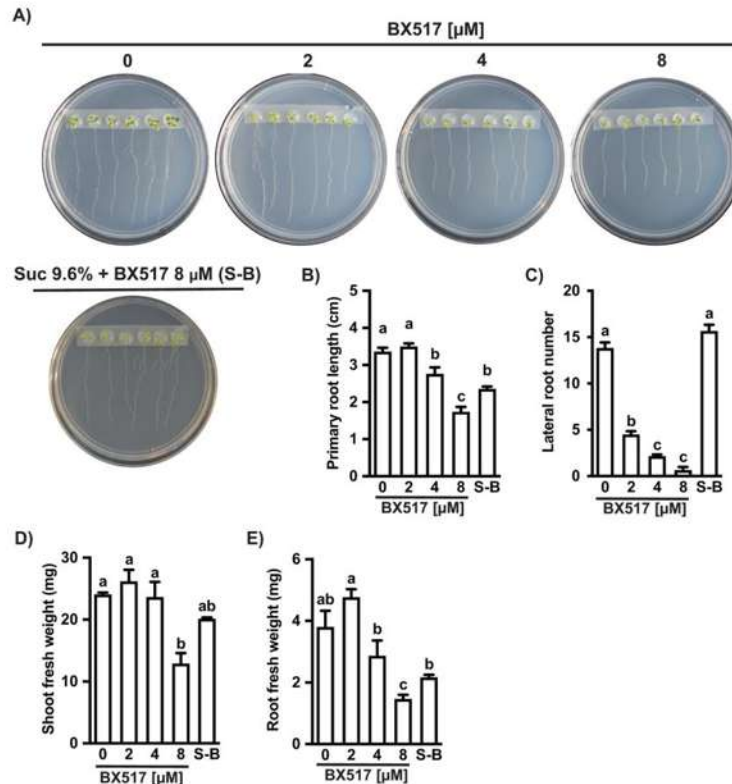


Fig. 2. Effect of BX517 on *A. thaliana* development

(A) Photographs of *A. thaliana* Col-0 plants transferred to agar plates with 0.2X MS standard medium (with sucrose 0.6%). The indicated BX517 concentrations (0, 2, 4, and 8 μM) were added in droplets on the seedling's aerial tissue and grown for 8 days. A combined treatment was included in which sucrose 9.6% plus BX517 8 μM were added to the droplet (S-B). Quantitative data of primary root length (B), lateral root number (C), shoot fresh weight (D), and root fresh weight (E) were recorded. Data are presented as mean $\pm$ SE ($n = 10$). Different letters represent statistically different means in a one-way ANOVA, with a posthoc Tukey test ($P < 0.05$). The experiment was repeated three times, with similar results.

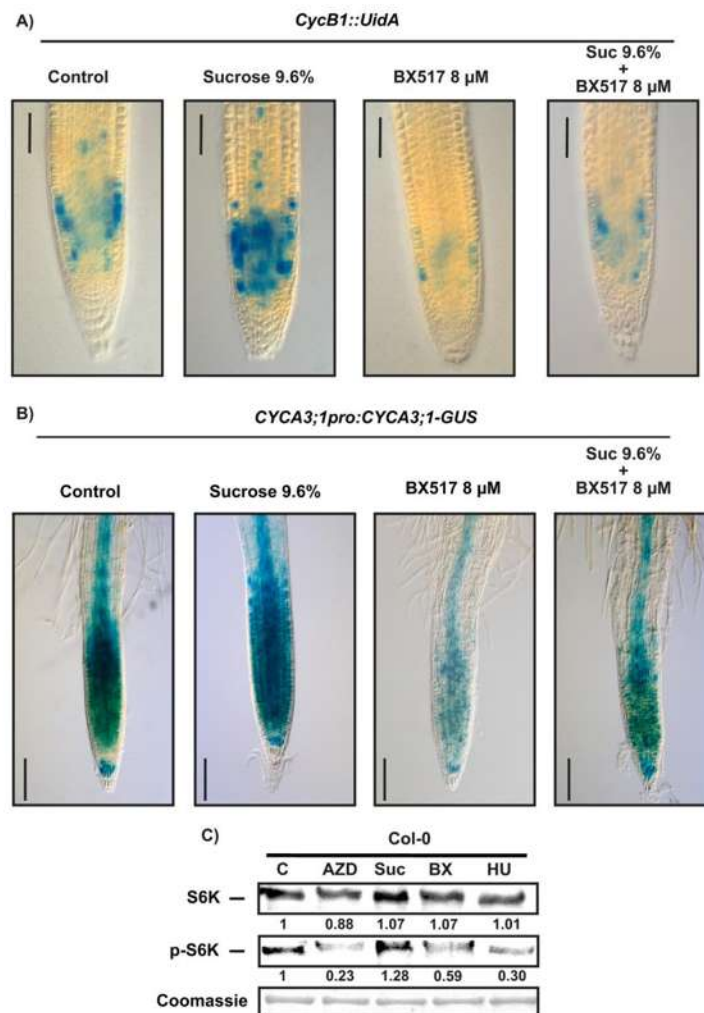


Fig. 3. Effect of sucrose or BX517 on *CycB1*, and *CycA3* expression, and TOR protein activity

Representative photographs of (A) *CycB1::uidA* or (B) *CYCA3;1pro:CYCA3;1-GUS* marker expression of 6-day-old seedling roots treated for 96 h with BX517 8 μ M or sucrose 9.6% or both compounds. The scale bar in (A) represents 50 μ m, and in (B), 100 μ m. Images are representative of 10 seedlings per treatment. (C) Protein extracts from 6-day-old *A. thaliana* Col-0 seedlings treated with AZD8055 3 μ M (AZD), sucrose 9.6% (Suc), BX517 8 μ M (BX), or hydroxyurea 10 μ M (HU) were resolved by SDS-PAGE and analyzed by protein blots assays using anti-ZmS6K (S6K) or anti-phospho p70S6K (Thr 449) (p-S6K) antibodies. As a protein loading control, a fragment of a Coomassie-stained gel run in parallel with that used for protein blot analysis is included in (C) (lower panel). The protein blots were performed from two independent experiments with similar results. Densitometric analysis was performed using the ImageJ software (number under blots).

3.4. BX517, AZD8055 and hydroxyurea comparatively reduce S6K phosphorylation

To determine whether the effect of BX517 could affect the TOR pathway, Arabidopsis seedlings were treated with this compound and analyzed through S6K phosphorylation assays. Different sets of Arabidopsis seedlings were supplemented with 9.6% sucrose; 3 μ M of the specific TOR inhibitor AZD8055, or 10 μ M hydroxyurea (HU), which stops the cell cycle while inducing DNA damage response (Ko et al., 2018).

Sucrose-induced TOR activity, as observed by an increased S6K phosphorylation at Thr-449 (Fig. 3C). In contrast, a decrease in the S6K phosphorylation was observed in the treatment with AZD8055 or with BX517, suggesting that the activation of TOR occurs downstream of PDK1 (Fig. 3C). HU also reduced the S6K phosphorylation, suggesting a negative loop between WEE1 activation and TOR inhibition.

3.5. BX517 reduces *DR5::GUS* expression and *S6rp* phosphorylation

Genetic analysis points to PDK1 as a crucial factor in polar auxin

transport (PAT) (Xiao and Offringa, 2020). To understand in more detail how BX517 modulates the PDK-TOR-S6K pathway, its effect was compared with that of PF4708671, a S6K1 protein inhibitor (Ye et al., 2022), the auxin transport inhibitor N-1-naphthylphthalamic acid (NPA), or with the TOR inhibitor AZD8055 on the auxin response using the *Arabidopsis DR5::GUS* transgenic line (Ulmasov et al., 1997). BX517 strongly reduced the auxin response in root tips and leaves, even more markedly than NPA. The S6K1 inhibitor shows DR5 expression comparable to the control. On the other hand, AZD8055 also strongly inhibited the expression of the reporter gene, more than NPA, in a different way than PF4708671 and similarly to BX517, further suggesting that TOR acts downstream of PDK1. Next, the effects of PF4708671 on plant growth and S6 ribosomal protein (S6rp) phosphorylation were analyzed in WT (Col-0) plants. The inhibition of primary root growth and lateral number was observed upon PF4708671 treatment (Fig. 4B), as well as a

decrease in S6rp phosphorylation (Fig. 4C). Interestingly, the decrease in S6rp phosphorylation was also evident with BX517, suggesting that the PDK1 inhibition affects S6K kinase activation, therefore reducing S6rp phosphorylation levels.

3.6. BX517 induces *WEE1::GUS* expression in shoot and root meristems and emerging lateral roots

To determine whether the WEE1 kinase is involved in the reduction of plant growth and development observed upon BX517 treatment, six-day-old *Arabidopsis WEE1::GUS* transgenic seedlings were treated with sucrose, BX517, AZD8055, or hydroxyurea to analyze changes in gene expression. The seedlings were grown in MS medium with 0.6% sucrose for 4 days and then treated with the compounds for 12, 24, and 48 h. HU induced *WEE1* expression in the apical meristem and primary roots after

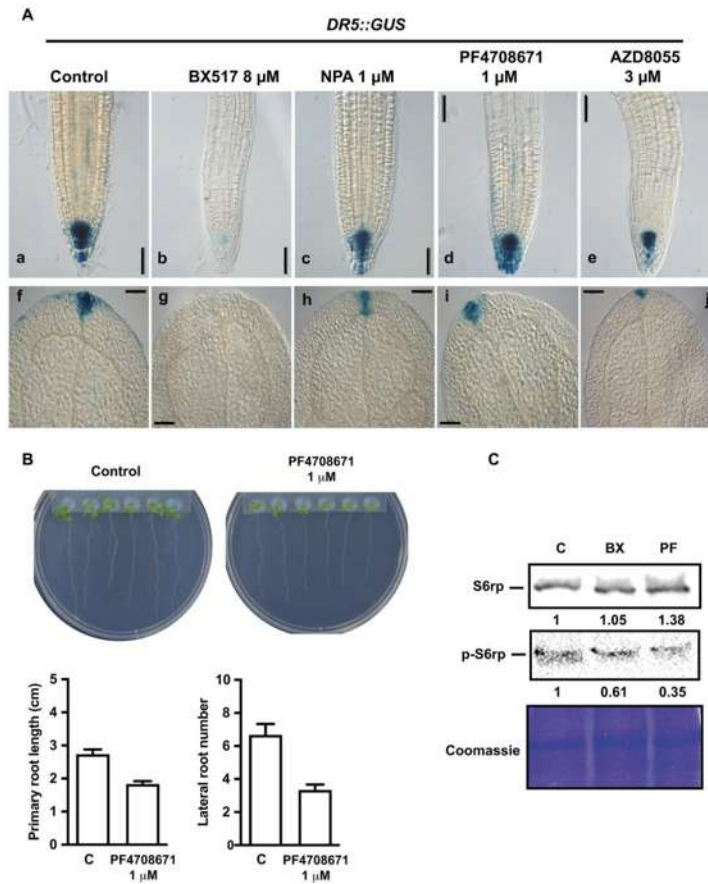


Fig. 4. Effect of BX517 on auxin response. (A) Representative photographs of *DR5::GUS* marker expression in roots and leaves of 8-day-old transgenic plants grown for 48 h in control liquid MS medium (a, f) or supplemented with BX517 8 μ M (b, g), NPA 1 μ M (c, h), PF4708671 1 μ M (d, i) or AZD8055 3 μ M (e–j). Images are representative of 10 seedlings per treatment. Scale bars a–e 50 μ m, f–j 200 μ m. (B) Photographs of *A. thaliana* Col-0 plants transferred to agar plates with 0.2X MS standard medium (with sucrose 0.6%). Plants were grown with PF4708671 1 μ M added in droplets on the aerial tissue for 8 days. Graphics representing quantitative data of primary root length and lateral root number. Data are presented as mean $\pm$ SE ($n = 10$). Asterisk represent statistically different means in a one-way ANOVA, with a posthoc Tukey test ($P < 0.05$). The experiment was repeated three times, with similar results. (C) Protein extracts from 6-day-old *A. thaliana* Col-0 seedlings treated with BX517 8 μ M, and PF4708671 1 μ M were resolved by SDS-PAGE and analyzed by protein blots assays using anti-S6rp or anti-phospho-S6rp (Ser 235/236) antibodies. A fragment of a Coomassie-stained gel run in parallel with that used for protein blot analysis was included as a protein loading control. The protein blots were performed from two independent experiments with similar results. Densitometric analysis was performed using the ImageJ software (number under blots).

12 h of treatment. No differences were observed with sucrose, AZD8055, or BX517 compared with the control at this time (Fig. 5A). However, both HU and BX517 could induce *WEE1* expression in the apical meristem, primary roots, and leaf vasculature at 24 h (Figs. 5B) and 48 h (Fig. 6). Surprisingly, sucrose induced *WEE1* expression only in the shoot but not in the root system at 24 or 48 h (Figs. 5B and 6), an effect observed in HU and BX517 treatments in the meristem of the lateral root at 48 h (Fig. 6). Likewise, *WEE1* expression influenced by AZD8055 was comparable to the control in the roots and reduced in the shoot. These results indicate that BX517 is an inducer of *WEE1* expression and the link with PDK1.

3.7. BX517 did not change S6K1 phosphorylation in two *Arabidopsis* *wee1* mutants

To gain insight into the role of *WEE1* kinase in modulating TOR activity by PDK1, we monitored the activation of the TOR pathway by analyzing the S6K1 phosphorylation in two *Arabidopsis* *wee1* mutants treated with TOR inhibitors or inducers for 48 h, a time by which BX517

clearly induced *WEE1*. With this aim, two mutant alleles were employed, namely *wee1-2*, which has a T-DNA insertion in the first exon of the *WEE1* gene that eliminates most of the protein, and *wee1-3*, which has a deletion of 112 amino acids in the kinase domain (De Schutter et al., 2007).

The results showed no significant changes in S6K protein phosphorylation levels with any treatment in both *WEE1*-related mutants (Fig. 7) and no changes in total S6K protein levels were observed. These results indicate that the TOR inhibition or activation requires the presence of a functional *WEE1* kinase. Moreover, in the presence of BX517, the growth of both mutants is similar to that of control plants (Fig. S1), further indicating that a functional *WEE1* kinase is required for the effects of PDK1 inhibition on plant growth.

4. Discussion

Sucrose, one of the main products of photosynthesis, provides energy and acts as an essential signal molecule for regulating growth and development (Aluko et al., 2021). Raya-González et al. (2017) showed

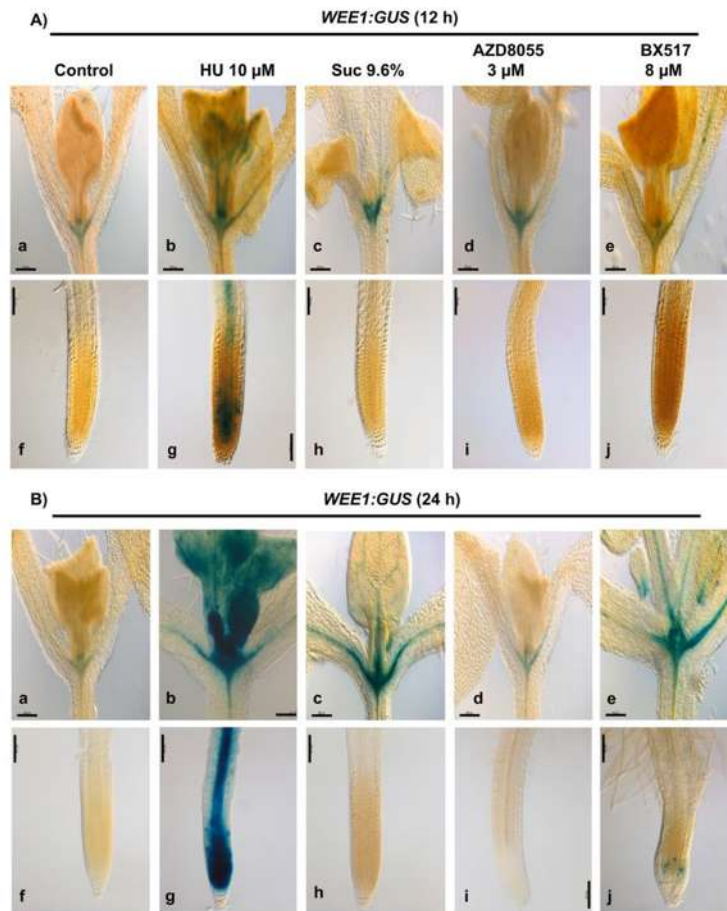


Fig. 5. Effect of sucrose and BX517 treatment on *WEE1:GUS* expression. Photographs of the *WEE1:GUS* marker expression in the shoot apical meristem (a–e) and primary root (f–j). *WEE1:GUS* expression was analyzed in transgenic plants growing in control liquid media or in transgenic lines treated with hydroxyurea 10 μ M, BX517 8 μ M, AZD8055 3 μ M, or sucrose 9.6%, (A) for 12 h, or (B) for 24 h in liquid MS medium. The images are representative of 10 seedlings per treatment. Scale bars a–e 200 μ m, f–j 100 μ m.

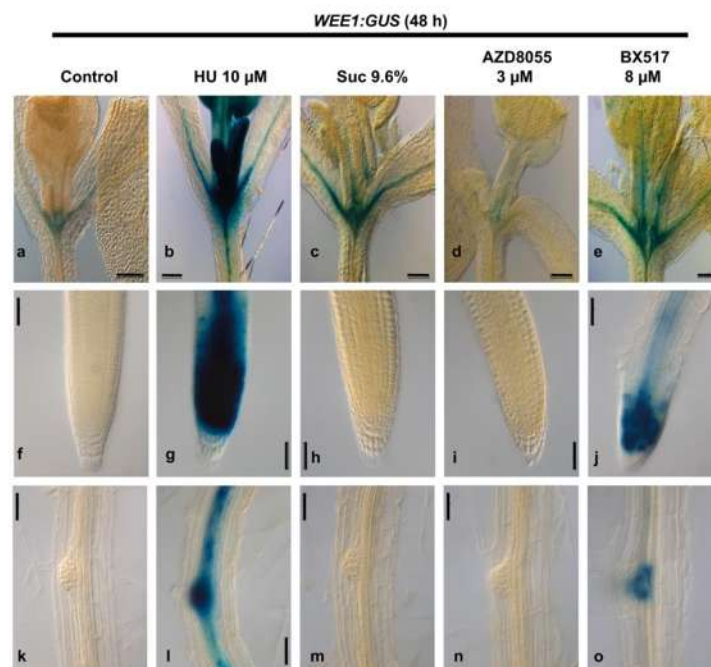


Fig. 6. Effect of 48 h of sucrose and BX517 treatment on *WEE1:GUS* expression. Photographs of the *WEE1:GUS* marker expression in the shoot apical meristem (a–e), primary root (f–j), and lateral root primordium (k–o). *WEE1:GUS* expression was analyzed in transgenic plants growing in control liquid media or in transgenic lines treated with hydroxyurea 10 μ M, BX517 8 μ M, AZD8055 3 μ M, sucrose 9.6%, for 48 h in liquid MS medium. The images are representative of 10 seedlings per treatment. Scale bars a–e 200 μ m, f–j and k–o 50 μ m.

that increasing sucrose levels in the shoot promotes growth and root branching triggering the emergence of lateral roots, which leads to a highly modified root system architecture (Raya-González et al., 2017). Our findings are consistent with this report since the promotion of lateral root formation by sucrose already occurred in our experiments, even though the sucrose treatments were applied to agar droplets that supported the growth of the shoot system (Fig. 1). Clearly, plant growth and development can be regulated by the availability of sucrose in the medium.

It has been proposed that environmental stimuli (i.e., light), nutrient availability (i.e., sugars), or treatment with plant hormones such as auxins promote the localized production of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP3) by vacuolar protein sorting-34 (Vps34), which activates the PDK1 (Xiong and Sheen, 2015). It activates AGC kinases that play crucial cellular roles in yeast and multicellular (human/mouse) eukaryotes (Xiao and Offringa, 2020). In this context, the Arabidopsis PDK1 kinase shares a high percentage of homology with its mammalian counterpart and activates human protein kinase B (PKB/AKT) in the presence of PIP3. It, in fact, represents the second plant protein reported to possess a pleckstrin homology domain and the first plant protein shown to bind 3-phosphoinositides (Deak et al., 1999; Dittrich and Devarenne, 2012). In mammals, BX517 is a potent and selective inhibitor of PDK1 that binds to the ATP binding pocket of the protein (Islam et al., 2007). BX517 blocks the activation of AKT in tumor cells (Islam et al., 2007). To the best of our knowledge, our study is the first one introducing BX517 to potentially inhibit plant PDK1 (Fig. 2), opening the possibility for the extended use of this inhibitor to dissect plant biological responses associated with this pathway. This compound disrupted root development, inhibiting primary root growth and lateral root formation (Fig. 2) and meristematic cell cycle activity through

repression of *CycB1* and *CycA3* expression (Fig. 3). It is tempting to speculate that such alterations arose through the inhibition of a plant PDK1 ortholog. On the other hand, sucrose stimulated both the plant growth and cell cycle progression in the root meristem, and the BX517 treatment noticeably reverts this phenotype, suggesting a crucial role of PDK1 in plant growth-promoting responses driven by sucrose.

The TOR protein is mainly expressed in meristems, where it promotes cell division and avoids differentiation, which would arrest root growth, thus compromising surveillance (Kircher and Schopfer, 2012; Skylar et al., 2011). Accordingly, decreased TOR activity reduces meristem size and root hair growth and changes mitosis to differentiation (Díaz-Granados et al., 2020). Cell division and elongation in Arabidopsis roots involve the TOR signaling pathway; accordingly, sucrose and PDK1 are involved in the TOR protein activation (Dittrich and Devarenne, 2012; Liu et al., 2020). BX517 has been reported to inhibit the activation of PDK1-TOR signaling, arresting the cell cycle in the G0-G1 phase, mainly affecting cyclin D1, CDK4, and CDK6 in non-small lung cells (Liu et al., 2020).

In response to growth stimuli, such as plant hormones or sugar availability, an increased abundance of G1 cyclins fine-tunes auxin sensitivity and distribution in plants, promoting G2 to M and S-phase cell cycle transitions (Kircher and Schopfer, 2012; MacGregor et al., 2008; Skylar et al., 2011), and activate TOR to control cell proliferation through the PDK1 (Kircher and Schopfer, 2012). In this context, cellular responses such as repression of root growth observed in BX517-treated plants correlated with repression of *CycB1* and *CycA3* (Fig. 3), suggesting a role of PDK1 for cell cycle regulation. In addition, the expression of *CycB1* and *CycA3* induced by sucrose was antagonized by BX517 treatment (Fig. 3), thus implying that a plant PDK1 ortholog leads to cell cycle arrest in proliferative tissue. A *pdk1* loss-of-function

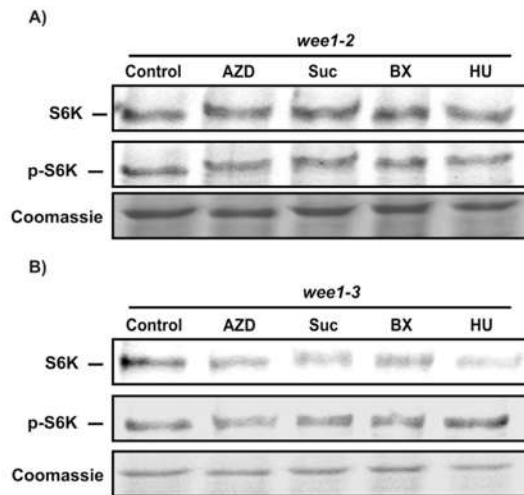


Fig. 7. Effect of sucrose and BX517 on TOR activity in *wee1* mutants. Protein extracts (10 µg) from 6-day-old *A. thaliana* *wee1-2* (A) or *wee1-3* (B) mutant seedlings untreated (control), or treated with AZD8055 3 µM (AZD), sucrose 9.6% (Suc), BX517 8 µM (BX), or Hydroxyurea 10 µM (HU), were resolved by SDS-PAGE and analyzed by protein gel blot assays using anti-S6K or anti-phospho-p70S6K (Thr 449) antibodies. As a protein loading control, a fragment of a Coomassie-stained gel run in parallel with that used for protein blot analysis is included (lower panel) in each set of blots. The protein blots were performed from two independent experiments with similar results.

mutant revealed a role for PDK1 in polar auxin transport (PAT) and activation of AGC1 clade kinases (Xiao and Offringa, 2020). The fact that S6K1 belongs to the family of AGC protein kinases raises the possibility that the effects observed by treating plants with BX517 are also due to non-specific inactivation of S6K1. To elucidate whether BX517 could inhibit PDK1, PAT was examined in the *DR5::GUS Arabidopsis* transgenic line, where it strongly reduced the expression of the auxin response marker, even more than NPA, indicating its involvement in the regulation of an as-yet-unidentified mechanism that keeps plant auxin homeostasis.

In contrast, in plants treated with an S6K1 inhibitor, the *DR5* reporter gene expression was similar to control plants (Fig. 4A). The expression of the auxin response marker was also drastically reduced by the TOR inhibitor AZD8055, suggesting that TOR, but not S6K1, participates downstream of PDK1 in the auxin response regulation, probably involving PAT. The fact that S6K1 inhibition does not affect the *DR5::GUS* expression suggests that the S6K1 inhibitor does not have activity in plants. However, plants treated with the S6K1 inhibitor showed reduced primary root growth and lateral root development (Fig. 4B). S6rp is the substrate of S6K, and its phosphorylation in plants mainly depends on the TOR-S6K and PDK1 (Meyuhas, 2015). PF4708671, the inhibitor of S6K, strongly decreased the S6rp phosphorylation (Fig. 4C). Additionally, S6rp phosphorylation was also reduced with BX517, suggesting that the PDK1 inhibition affected the S6K kinase activity, reducing S6rp phosphorylation.

A key aspect of replication stress responses involves the activation of cell cycle checkpoints, which trigger cell cycle arrest and allow cells to have enough time to clear these perturbations (Pan et al., 2021). The kinase WEE1 is located within the checkpoints and is ubiquitously present throughout plant development, particularly under genotoxic stresses, and its phosphorylation negatively regulates the cell cycle. However, its analogies in controlling the human cell cycle by tyrosine phosphorylation of cyclin-dependent kinases (CDKs) have been

questioned (Détain et al., 2021). *WEE1* transcripts are upregulated by replication-inhibiting drugs (De Schutter et al., 2007). Indeed, we found that BX517 treatment induces *WEE1* expression in proliferative tissue (Figs. 5 and 6), suggesting that WEE1 influences primary root growth and lateral formation upon PDK1 inhibition as a response to environmental cues such as drought, salinity, or DNA damage agents. TOR activity inhibition was observed by hydroxyurea treatment, an inducer of WEE1 expression that arrests the cell cycle; concomitant effects were observed in the plant response to BX517 (Fig. 3C), which suggests the involvement of WEE1 expression in TOR activity. Studies in ovarian cancer lines reported that a dual WEE1/mTOR inhibition induced massive DNA replication stress, leading to fork stalling and DNA damage rescue system activation (Li et al., 2020).

The growth of *WEE1 Arabidopsis* mutants treated with BX517 was similar to that of untreated plants (Fig. S1), suggesting that WEE1 is required for PDK1 function. On the other hand, a reduction in *WEE1* levels upon acute TORC1 inhibition was observed in yeast and human cells (Atkin et al., 2014). Protein blot analysis of *WEE1* mutants revealed that WEE1 protein is required for TOR activation or inhibition (Fig. 7). Thus, although plants evolved particular mechanisms to control the cell cycle, central protein players like PI3K, PDK1, TOR, S6K, WEE1, and cyclins among others, are involved in regulating this process to ensure plant growth and stress adaptation.

5. Conclusions

This study presents evidence suggesting that a plant ortholog of PDK1 is involved in plant growth promotion by sucrose. The mammalian PDK1 inhibitor BX517 antagonized sucrose-induced plant growth, diminished TOR activity, cyclin B1 and A3 expression, and cell cycle progression, and activated the expression of the master regulator of DNA damage response *WEE1*. Taken together, these results suggest a role of plant PDK1 in modulating checkpoints that lead to cell cycle progression in plant growth-stimulating conditions. In mammals and yeasts, acute TOR inhibition leads to reduced WEE1 expression, and the fact that in the present work, we found that the BX517 treatment induces WEE1 expression and TOR inhibition and that the TOR inhibition or activation requires WEE1, the possibility is open that an interaction between TOR and WEE1 protein could be important for growth.

Funding

This research was funded by CONAHCYT (106567), FOMIX-CO1-117130, C.I.C. 2020-2023/UMSNH, ICTI PICIR-009 and ICTI FCC HT22 ME029 grants. VR-D received a scholarship from CONAHCYT.

CRediT authorship contribution statement

Dolores Vázquez-Rivera: Writing – original draft, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Pedro Iván Huerta-Venegas:** Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation. **Javier Raya-González:** Methodology, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **César Arturo Peña-Urbe:** Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation. **Jesús Salvador López-Bucio:** Writing – original draft, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Ernesto García-Pineda:** Writing – review & editing, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **José López-Bucio:** Writing – review & editing, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Jesús Campos-García:** Writing – review & editing, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Homero Reyes de la Cruz:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Project administration, Funding acquisition, Formal analysis, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2024.154386>.

Data availability

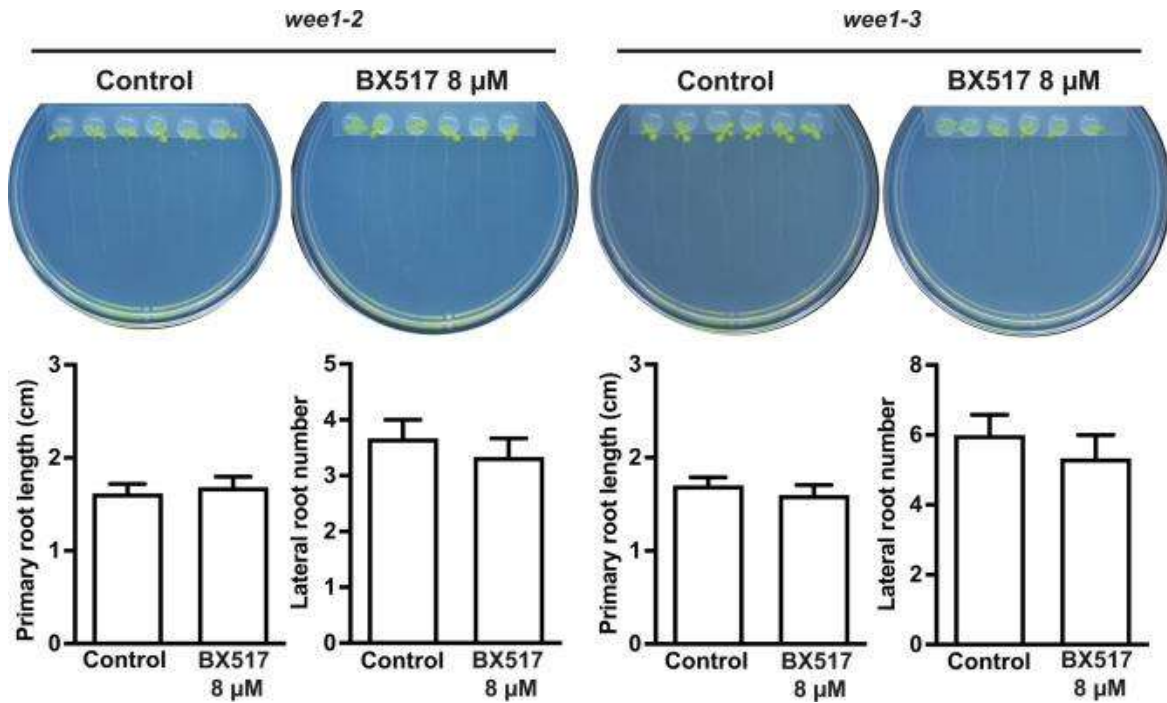
Data will be made available on request.

References

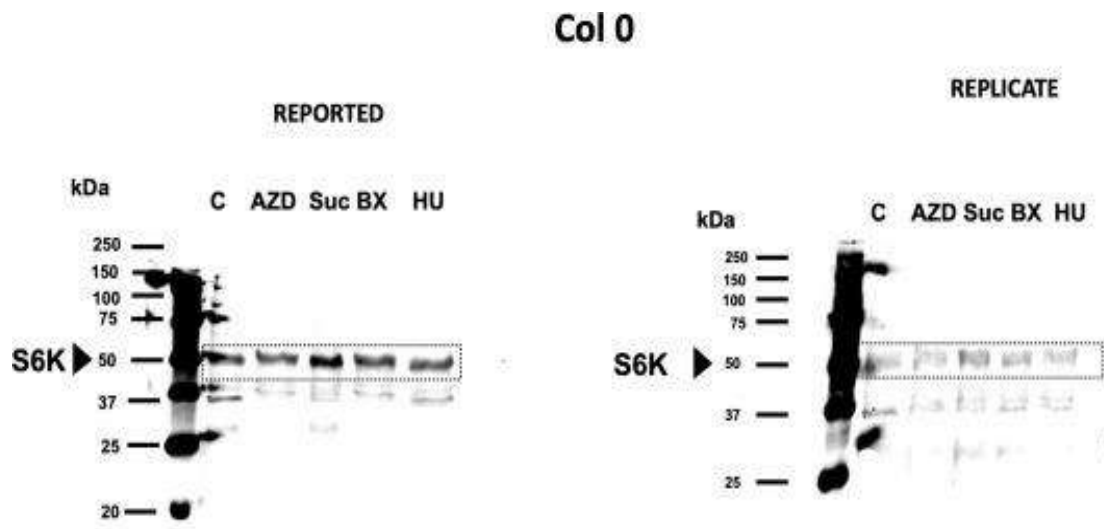
- Adachi, S., Minamisawa, K., Okushima, Y., Inagaki, S., Yoshiyama, K., Kondou, Y., Kaminuma, E., Kawashima, M., Toyoda, T., Matsui, M., Kurihara, D., Matsunaga, S., Umeda, M., 2011. Programmed induction of endoreduplication by DNA double-strand breaks in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108 (24), 10004–10009. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103584108>.
- Aluko, O.O., Li, C., Wang, Q., Liu, H., 2021. Sucrose utilization for improved crop yields: a review article. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (9), 4704. <https://doi.org/10.3390/ijms22094704>.
- Anthony, R.G., Khan, S., Costa, J., Pais, M.S., Bögre, L., 2006. The *Arabidopsis* protein kinase PTII-2 is activated by convergent phosphatidic acid and oxidative stress signaling pathways downstream of PDK1 and OX1. *J. Biol. Chem.* 281 (49), 37536–37546. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607341200>.
- Atkin, J., Halova, L., Ferguson, J., Hitchin, J.R., Lichawska-Cieslar, A., Jordan, A.M., Pines, J., Wellbrock, C., Petersen, J., 2014. Torin1-mediated TOR kinase inhibition reduces Wee1 levels and advances mitotic commitment in fission yeast and *Hela* cells. *J. Cell Sci.* 127 (Pt 6), 1346–1356. <https://doi.org/10.1242/jcs.146373>.
- Bulanikova, P., Akimicheva, S., Fellner, N., Riha, K., 2013. Identification of *Arabidopsis* meiotic cyclins reveals functional diversification among plant cyclin genes. *PLoS Genet.* 9 (5), e1003508. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003508>.
- Colón-Carmona, A., You, R., Haimovitch-Gal, T., Doerner, P., 1999. Technical advance: spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant J.* 20 (4), 503–508. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113.1999.00620.x>.
- Cools, T., Iantcheva, A., Weimer, A.K., Boens, S., Takahashi, N., Maes, S., Van den Daele, H., Van Isterdael, G., Schnitger, A., De Veylder, L., 2011. The *Arabidopsis thaliana* checkpoint kinase WEE1 protects against premature vascular differentiation during replication stress. *Plant Cell* 23 (4), 1435–1448. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.082768>.
- De Schutter, K., Joubès, J., Cools, T., Verkest, A., Corellou, F., Babychuk, E., Van Der Schueren, E., Beekman, T., Kishir, S., Inzé, D., De Veylder, L., 2007. *Arabidopsis* WEE1 kinase controls cell cycle arrest in response to activation of the DNA integrity checkpoint. *Plant Cell* 19 (1), 211–225. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.045047>.
- Deak, M., Casamayor, A., Currie, R.A., Downes, C.P., Alessi, D.R., 1999. Characterisation of a plant 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 homologue which contains a pleckstrin homology domain. *FEBS Lett.* 451 (3), 220–226. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00556-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00556-6).
- Détain, A., Redeker, D., Leborgne-Castel, N., Ochatt, S., 2021. Structural conservation of WEE1 and its role in cell cycle regulation in plants. *Sci. Rep.* 11 (1), 23862. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03268-x>.
- Díaz-Granados, V.H., López-López, J.M., Flores-Sánchez, J., Olguín-Alor, R., Bedoya-López, A., Dinkova, T.D., Salazar-Díaz, K., Vázquez-Santana, S., Vázquez-Ramos, J.M., Lara-Núñez, A., 2020. Glucose modulates proliferation in root apical meristems via TOR in maize during germination. *Plant physiology and biochemistry: Plant Physiol. Biochem.* 155, 126–135. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.07.041>.
- Dittrich, A.C., Devarenne, T.P., 2012. Perspectives in PDK1 evolution: insights from photosynthetic and non-photosynthetic organisms. *Plant Signal. Behav.* 7 (6), 642–649. <https://doi.org/10.4161/psb.20038>.
- Fu, L., Wang, P., Xiong, Y., 2020. Target of Rapamycin signaling in plant stress responses. *Plant Physiol.* 182 (4), 1613–1623. <https://doi.org/10.1104/pp.19.01214>.
- Fulcher, N., Sablowski, R., 2009. Hypersensitivity to DNA damage in plant stem cell niches. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106 (49), 20984–20988. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909218106>.
- Furukawa, T., Curtis, M.J., Tominey, C.M., Duong, Y.H., Wilcox, B.W., Aggoune, D., Hays, J.B., Britt, A.B., 2010. A shared DNA-damage-response pathway for induction of stem-cell death by UVB and by gamma irradiation. *DNA Repair* 9 (9), 940–948. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.06.006>.
- Harashima, H., Schnitger, A., 2010. The integration of cell division, growth and differentiation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13 (1), 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.11.001>.
- Henriques, R., Calderan-Rodrigues, M.J., Luis Crespo, J., Baena-González, E., Caldana, C., 2022. Growing of the TOR world. *J. Exp. Bot.* 73 (20), 6987–6992. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac401>.
- Islam, I., Brown, G., Bryant, J., Hrvatin, P., Kochanny, M.J., Phillips, G.B., Yuan, S., Adler, M., Whitlow, M., Lentz, D., Polokoff, M.A., Wu, J., Shen, J., Walters, J., Ho, E., Subramanyam, B., Zhu, D., Feldman, R.L., Arnaiz, D.O., 2007. Indolizone based phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1) inhibitors. Part 2: optimization of BX-517. *Bioor. Med. Chem. Lett.* 17 (14), 3819–3825. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.05.060>.
- Jakoby, M., Schnitger, A., 2004. Cell cycle and differentiation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7 (6), 661–669. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.09.015>.
- Jefferson, R.A., 1989. The GUS reporter gene system. *Nature* 342 (6251), 837–838. <https://doi.org/10.1038/342837a0>.
- John, F., Roffler, S., Wicker, T., Ringli, C., 2011. Plant TOR signaling components. *Plant Signal. Behav.* 6 (11), 1700–1705. <https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17662>.
- Kircher, S., Schopfer, P., 2012. Photosynthetic sucrose acts as cotyledon-derived long-distance signal to control root growth during early seedling development in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109 (28), 11217–11221. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203746109>.
- Ko, K.S., Yoo, J.Y., Ramasamy, N.K., Harmoko, R., Vü, B.N.T., Park, J.Y., Lee, K.O., 2018. Cell cycle arrest mediated by WEE1 is involved in the unfolded protein response in plants. *Plant Biotechnol. Rep.* 12 (5), 315–328. <https://doi.org/10.1007/s11816-018-0496-5>.
- Li, F., Guo, E., Huang, J., Lu, F., Yang, B., Xiao, R., Liu, C., Wu, X., Fu, Y., Wang, Z., Peng, S., Lei, Y., Guo, Z., Li, L., Xi, L., Sun, C., Liu, S., Chen, G., 2020. mTOR inhibition overcomes primary and acquired resistance to Wee1 inhibition by augmenting replication stress in epithelial ovarian cancers. *Am. J. Cancer Res.* 10 (3), 908–924.
- Liu, R., Yu, Z., Chen, Z., Liu, D., Huang, F., Li, Q., Hu, G., Yi, X., Li, X., Zhou, H., Liu, Z., 2020. A novel dual MEK/PDK1 inhibitor 9za retards the cell cycle at G0/G1 phase and induces mitochondrial apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *PeerJ* 8, e9981. <https://doi.org/10.7717/peerj.9981>.
- MacGregor, D.R., Deak, K.L., Ingram, P.A., Malamy, J.E., 2008. Root system architecture in *Arabidopsis* grown in culture is regulated by sucrose uptake in the aerial tissues. *Plant Cell* 20 (10), 2643–2660. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.055475>.
- Malamy, J.E., Benfey, P.N., 1997. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124 (1), 33–44. <https://doi.org/10.1242/dev.124.1.33>.
- Meyuhas, O., 2015. Ribosomal protein S6 phosphorylation: four decades of research. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 320, 41–73. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2015.07.006>.
- Menand, B., Desnos, T., Nussbaum, L., Berger, F., Bouchez, D., Meyer, C., Robaglia, C., 2002. Expression and disruption of the *Arabidopsis* TOR target of rapamycin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99 (9), 6422–6427. <https://doi.org/10.1073/pnas.092141899>.
- Montané, M.H., Menand, B., 2013. ATP-competitive mTOR kinase inhibitors delay plant growth by triggering early differentiation of meristematic cells but no developmental patterning change. *J. Exp. Bot.* 64 (14), 4361–4374. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert242>.
- Otterhag, L., Gustavsson, N., Alsterfjord, M., Pical, C., Lehrach, H., Gobom, J., Sommarin, M., 2006. *Arabidopsis* PDK1: identification of sites important for activity and downstream phosphorylation of S6 kinase. *Biochimie* 88 (1), 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2005.07.005>.
- Pan, T., Qin, Q., Nong, C., Gao, S., Wang, L., Cai, B., Zhang, M., Wu, C., Chen, H., Li, T., Xiong, D., Li, G., Wang, S., Yan, S., 2021. A novel WEE1 pathway for replication stress responses. *Nat. Plants* 7 (2), 209–218. <https://doi.org/10.1038/s41477-021-00855-8>.
- Raya-González, J., López-Bucio, J.S., Prado-Rodríguez, J.C., Ruiz-Herrera, L.F., Guevara-García, A.A., López-Bucio, J., 2017. The MEDIATOR genes MED12 and MED13 control *Arabidopsis* root system configuration influencing sugar and auxin responses. *Plant Mol. Biol.* 95 (1–2), 141–156. <https://doi.org/10.1007/s11103-017-0647-z>.
- Reyes de la Cruz, H., Aguilar, R., Sánchez de Jiménez, E., 2004. Functional characterization of a maize ribosomal S6 protein kinase (ZmS6K), a plant ortholog of metazoan p70S6K. *Biochemistry* 20;43 (2), 533–539. <https://doi.org/10.1021/bi035222z>.
- Sarbasov, D.D., Ali, S.M., Kim, D.H., Guertin, D.A., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Sabatini, D.M., 2004. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr. Biol.* 14 (14), 1296–1302. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.06.054>.
- Skylar, A., Sung, F., Hong, F., Chory, J., Wu, X., 2011. Metabolic sugar signal promotes *Arabidopsis* meristematic proliferation via G2. *Dev. Biol.* 351 (1), 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.12.019>.
- Takahashi, I., Kojima, S., Sakaguchi, N., Umeda-Hara, C., Umeda, M., 2010. Two *Arabidopsis* cyclin A3s possess G1 cyclin-like features. *Plant Cell Rep.* 29 (4), 307–315. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0817-9>.
- Thorner, J., 2022. TOR complex 2 is a master regulator of plasma membrane homeostasis. *Biochem. J.* 479 (18), 1917–1940. <https://doi.org/10.1042/BJC20220388>.
- Turck, F., Kozma, S.C., Thomas, G., Nagy, F., 1998. A heat-sensitive *Arabidopsis thaliana* kinase substitutes for human p70s6k function in vivo. *Mol. Cell Biol.* 18 (4), 2038–2044. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.4.2038>.
- Ulmason, T., Murrett, J., Hagen, G., Guilfoyle, T.J., 1997. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9 (11), 1963–1971. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.11.1963>.
- Van Leene, J., Han, C., Gadeyne, A., Eeckhout, D., Matthijs, C., Cannoot, B., De Winne, N., Persiau, G., Van De Slijke, E., Van de Cotte, B., Stes, E., Van Bel, M., Storme, V., Impens, F., Gevaert, K., Vandepoel, K., De Smet, I., De Jaeger, G., 2019. Capturing the phosphorylation and protein interaction landscape of the plant TOR kinase. *Nat. Plants* 5 (3), 316–327. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0378-z>.

- Xiao, Y., Offringa, R., 2020. PDK1 regulates auxin transport and Arabidopsis vascular development through AGC1 kinase PAX. *Nat. Plants* 6 (5), 544–555. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0650-2>.
- Xiong, Y., McCormack, M., Li, L., Hall, Q., Xiang, C., Sheen, J., 2013. Glucose-TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature* 496 (7444), 181–186. <https://doi.org/10.1038/nature12030>.
- Xiong, Y., Sheen, J., 2015. Novel links in the plant TOR kinase signaling network. *Curr. Opin. Plant Biol.* 28, 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.09.006>.
- Ye, R., Wang, M., Du, H., Chhajed, S., Koh, J., Liu, K.H., Shin, J., Wu, Y., Shi, L., Xu, L., Chen, S., Zhang, Y., Sheen, J., 2022. Glucose-driven TOR-FIE-PRC2 signalling controls plant development. *Nature* 609 (7929), 986–993. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05171-5>.
- Yang, H., Rudge, D.G., Koos, J.D., Vaidialingam, B., Yang, H.J., Pavletich, N.P., 2013. mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature* 497 (7448), 217–223. <https://doi.org/10.1038/nature12122>.
- Zhao, X., Harashima, H., Dissmeyer, N., Pusch, S., Weimer, A.K., Bramsiepe, J., Bouyer, D., Rademacher, S., Nowack, M.K., Novak, B., Sprunck, S., Schnittger, A., 2012. A general G1/S-phase cell-cycle control module in the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* 8 (8), e1002847. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002847>.

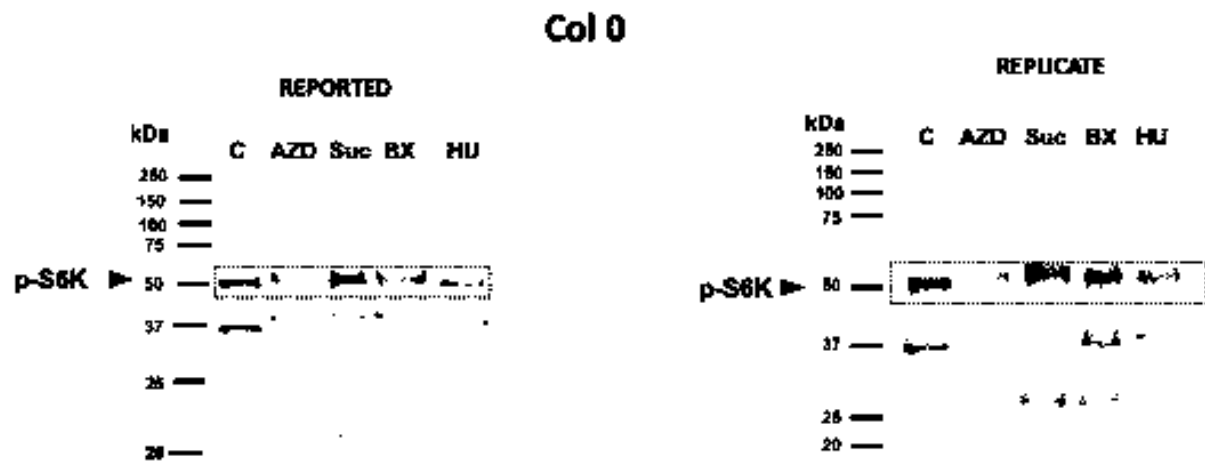
9. Supplementary data



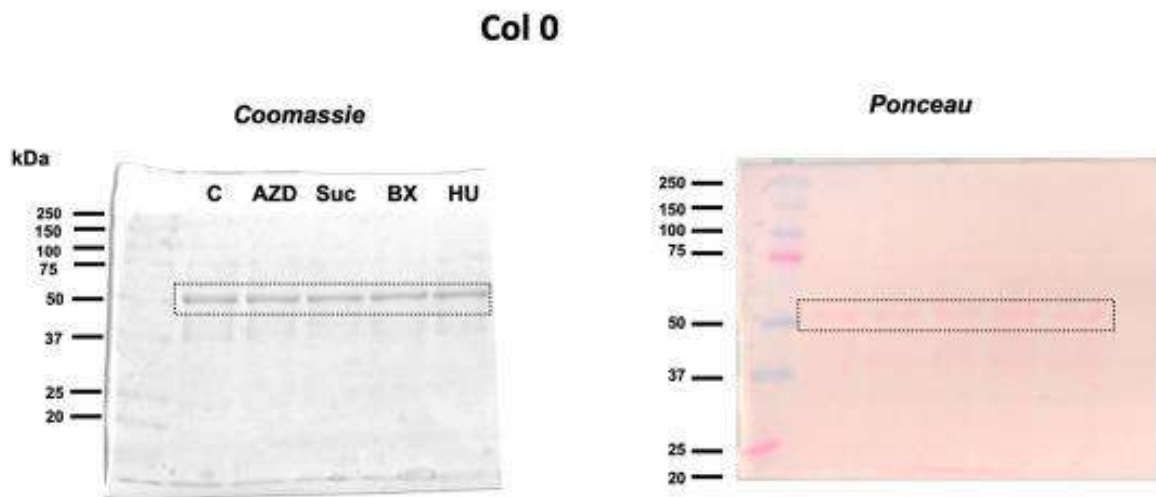
Supplementary Fig. 1. Photographs of *wee1* mutant plants transferred to agar plates with 0.2x standard MS medium (containing 0.6% sucrose). Plants were grown without (Control) or with 8 μM of BX517 added in droplets on the aerial tissue for 8 days. The graphics represent each indicated mutant line's primary root length and lateral root number (*wee1-2*, *wee1-3*). Data are presented as mean ± SE (n = 10). Different letters represent statistically different means in a one-way ANOVA, with a posthoc Tukey test (P < 0.05). The experiment was repeated three times, with similar results.



Supplementary Fig. 2. Uncropped protein blot corresponding to total S6K protein from Col-0 plants treated with the indicated compounds. The dotted box corresponds to the cropped area of the blot in [Fig. 3C](#), upper panel. Reported refers to the blot used in the manuscript. The lines correspond to the molecular weight ladders in kDa.

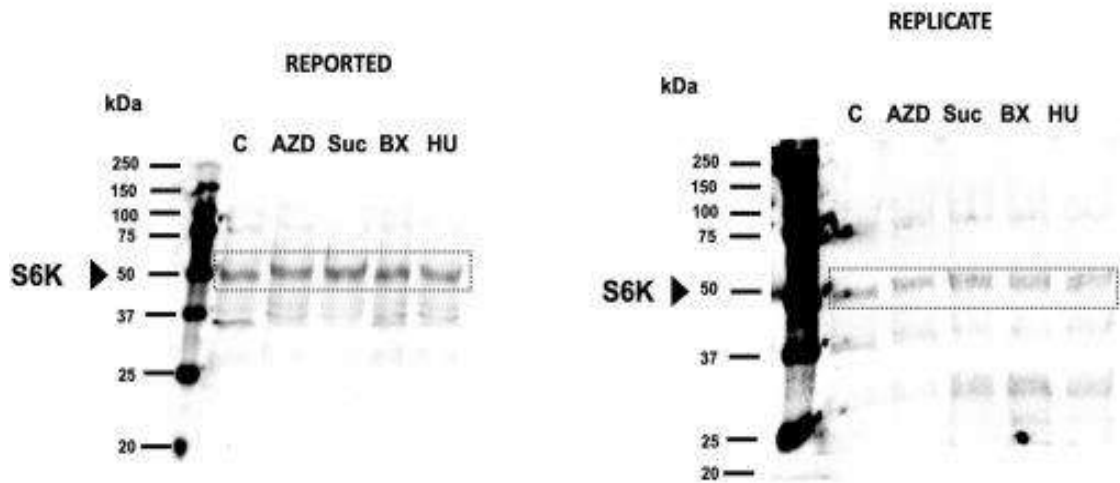


Supplementary Fig. 3. Uncropped protein blot corresponding to the phosphorylated form of the S6K protein (p-S6K). The dotted box corresponds to the cropped area of the blot in [Fig. 3C](#), middle panel. Reported refers to the blot used in the manuscript. The lines correspond to the molecular weight ladders in KDa.



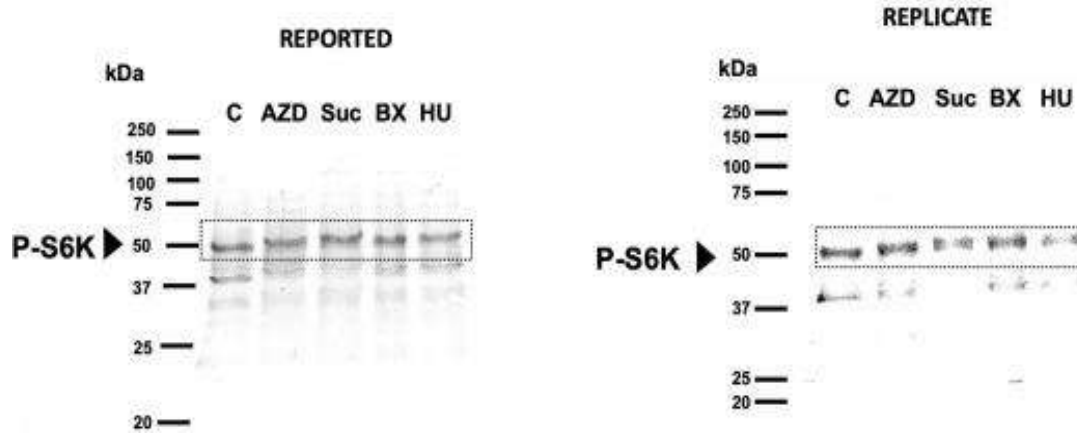
Supplementary Fig. 4. Uncropped Coomassie gel runs in duplicate with the one used for the protein blot. The dotted box corresponds to the cropped area of the gel in [Fig. 3C](#), lower panel. The membrane used for the protein blots was also stained with Ponceau red; similar amounts of protein were observed in each lane. The molecular weight ladders in KDa are indicated.

wee 1-2



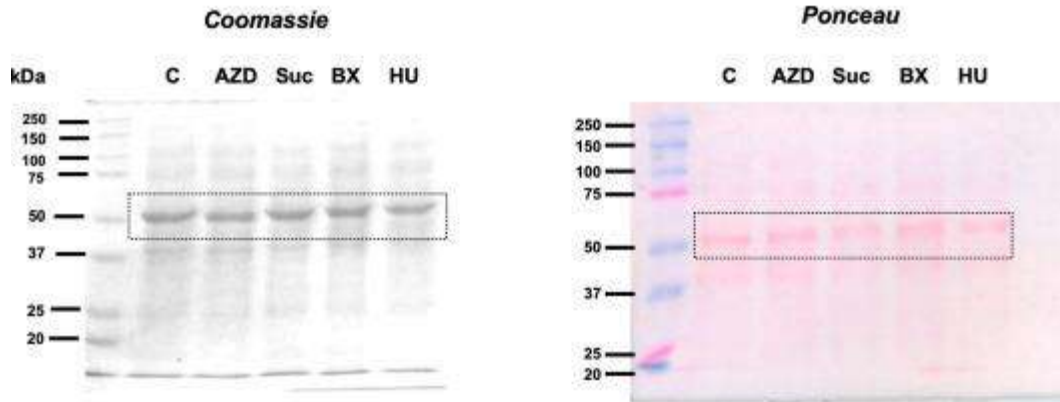
Supplementary Fig. 5. Uncropped protein blot corresponding to total S6K protein from *wee1-2* mutant plants. The dotted box corresponds to the cropped area of the blot in Fig. 7A, upper panel. Reported refers to the blot used in the manuscript. The lines correspond to the molecular weight ladders in KDa.

wee 1-2

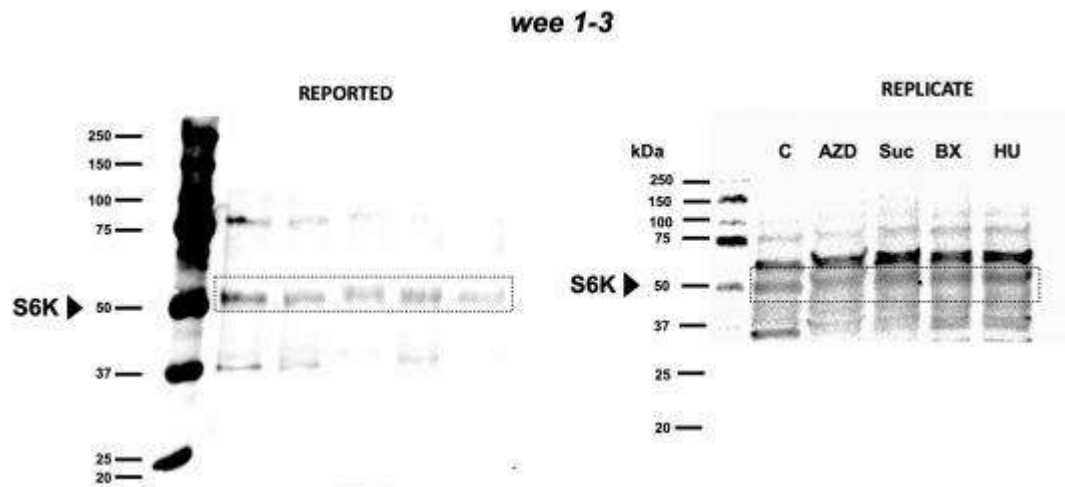


Supplementary Fig. 6. Uncropped protein blot corresponding to the phosphorylated form of the S6K protein (p-S6K) from *wee1-2* mutant plants. The dotted box corresponds to the cropped area of the blot in [Fig. 7A](#), middle panel. Reported refers to the replicated blot used in the manuscript. The lines correspond to the molecular weight ladders in KDa.

wee 1-2

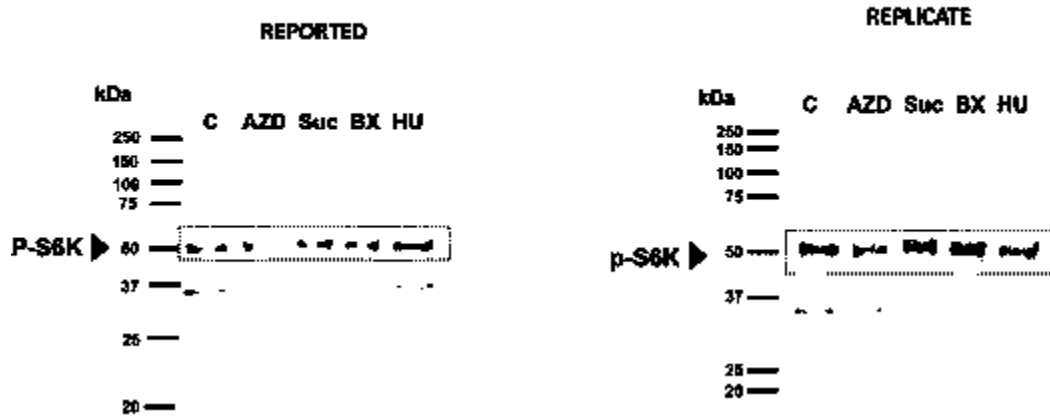


Supplementary Fig. 7. Uncropped Coomassie gel, run in duplicate with that used for protein blots from *wee1-2* mutant plants. The dotted box corresponds to the cropped area of the gel in [Fig. 7A](#), lower panel. The membrane used for the protein blots was stained with Ponceau red, and similar amounts of protein were observed in each lane. The molecular weight ladders in KDa are indicated.



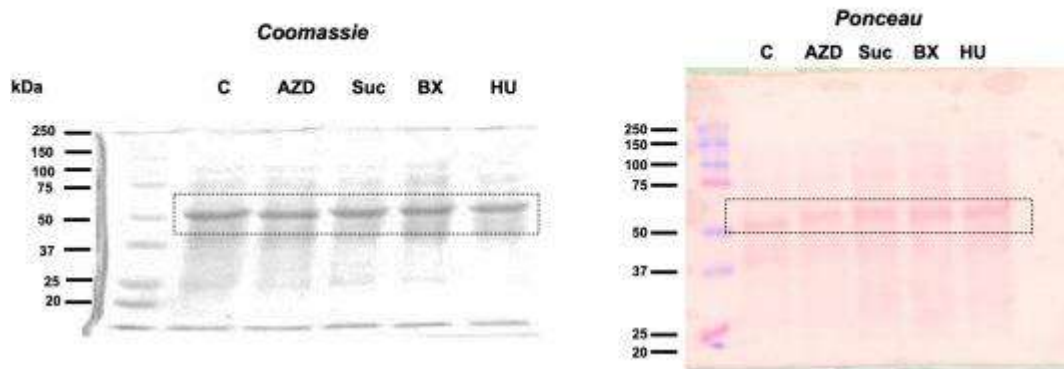
Supplementary Fig. 8. Uncropped protein blot corresponding to total S6K protein from *wee1-3* mutant plants. The dotted box corresponds to the cropped area of the blot in Fig. 7B, upper panel. Reported refers to the blot used in the manuscript. The lines correspond to the molecular weight ladders in KDa.

wee 1-3

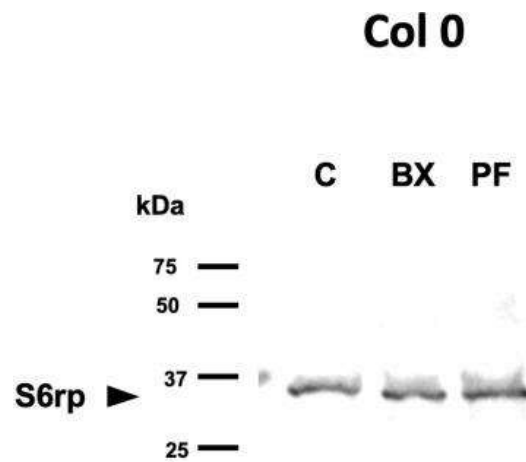


Supplementary Fig. 9. Uncropped protein blot corresponding to the phosphorylated form of the S6K protein from *wee1-3* mutant plants. The dotted box corresponds to the cropped area of the blot in Fig. 7B, middle panel. Reported refers to the blot used in the manuscript. The lines correspond to the molecular weight ladders in KDa.

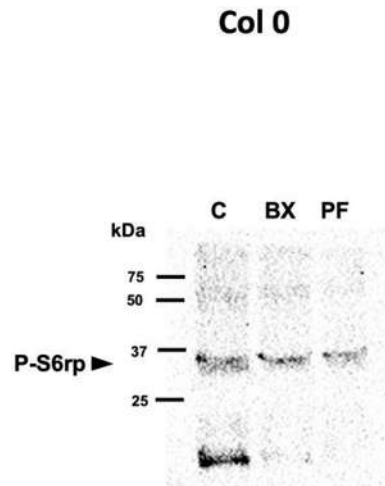
wee 1-3



Supplementary Fig. 10. Uncropped Coomassie gel, run in duplicate with that used for protein blots from *wee1-3* mutant plants. The dotted box corresponds to the cropped area of the gel in [Fig. 7B](#), lower panel. The membrane used for the protein blots was also stained with Ponceau red; similar amounts of protein were observed in each lane. The molecular weight ladders in KDa are indicated.

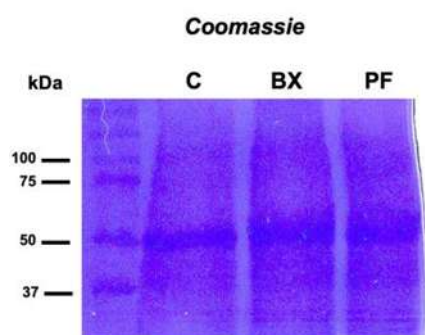


Supplementary Fig. 11. Uncropped protein blot corresponding to total S6rp protein from Col-o plants. The blot corresponds to the upper panel of [Fig. 4C](#). The lines correspond to the molecular weight ladders in KDa.



Supplementary Fig. 12. Uncropped protein blot corresponding to the phosphorylated form of the S6rp protein from Col-0 plants. The blot corresponds to the middle panel of [Fig. 4C](#). The lines correspond to the molecular weight ladders in KDa.

Col 0



Supplementary Fig. 13. This is an Uncropped Coomassie gel run in duplicate with that used for protein blots from Col-0 plants. The figure corresponds to the gel of the lower panel in [Fig. 4C](#). Similar amounts of protein were observed in each lane. The molecular weight ladders in KDa are indicated.

10. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La proteína cinasa Akt (PKB) controla diversas funciones celulares, incluyendo la modulación del crecimiento, la supervivencia, la proliferación y el metabolismo. La familia de las cinasas Akt está compuesta por tres isoformas altamente homólogas: Akt1 (PKB alpha), Akt2 (PKB beta) y Akt3 (PKB gamma) (Gonzalez y McGraw, 2009). Las funciones de las diferentes Akt no se superponen completamente y la señalización específica de la isoforma contribuye a la diversidad de las actividades de Akt (Gonzalez y McGraw, 2009). Se han identificado diferentes isoformas de Akt en vertebrados e invertebrados debido a que la estructura de Akt muestra una alta conservación molecular y funcional; en este estudio la comparación *in silico* de la proteína Akt (1, 2, 3) de mamíferos con *A. thaliana*, mostró un resultado de 7 secuencias con un porcentaje de identidad de entre 28 y 40%. Estos resultados indican que en cuanto a secuencia no se encuentra presente un ortólogo de la proteína Akt en el genoma de *A. thaliana*. Sin embargo, los resultados de la secuenciación obtenida de la inmunoprecipitación realizada con anticuerpos monoclonales contra AKT (Tabla 1), identificaron la presencia de la cinasa WEE1, la cual es clave para reparación del daño al ADN ya que inhiben la actividad de las cinasas CDK para el arresto del ciclo celular en las fases G2/M (De Schutter et al., 2007; Chen et al., 2017; Bourbousse et al., 2018; Ogita et al., 2018; Takahashi et al., 2019). Estos hallazgos llevaron a la hipótesis de si la cinasa WEE1 está involucrada en la vía de señalización de TOR, debido a que dicha vía se expresa principalmente en los meristemos y controla su tamaño regulando el crecimiento celular en la zona de división, el número de células proliferantes y el paso de células a la zona de diferenciación (Skylar et al., 2011; Kircher y Schopfer, 2012).

Los cambios en los niveles de TOR modifican la estructura de la raíz (Xiong y Sheen, 2012; Díaz y Dinkova, 2021) además la actividad disminuida de TOR reduce el tamaño del meristemo y la diferenciación avanzada, y reduce el crecimiento de los

pelos radiculares (Díaz y Dinkova, 2021). González et al. En 2016, demostraron que el aumento de los niveles de sacarosa en los tejidos aéreos y el posterior metabolismo de la sacarosa estimulan la emergencia de las raíces laterales, demostrando que el metabolismo de la sacarosa estimula esa etapa específica de la formación de las raíces laterales y que el aumento del metabolismo de la sacarosa conduce a un cambio de desarrollo para crear una arquitectura del sistema radicular más ramificada. Nuestros hallazgos son consistentes con los reportados por González et al. 2016, mostrando que la formación de raíces laterales en cultivo está fuertemente influenciada por si las hojas absorben o no sacarosa del medio, lo que promueve la proliferación celular, determina el crecimiento y el desarrollo del sistema radicular. TOR actúa como el interruptor molecular central para regular el metabolismo, la proliferación celular y el crecimiento de plántulas y plantas adultas en respuesta a la sacarosa derivada directa o indirectamente de la fotosíntesis. (Wu et al. 2018), Nuestros datos muestran que el crecimiento y desarrollo de las plantas pueden ser regulados por la disponibilidad de sacarosa en el medio, posiblemente influyendo en la actividad de la vía de señalización TOR.

Dentro de la vía de señalización TOR en plantas se encuentra la proteína cinasa PDK1, cuya activación no se conoce en detalle; se ha propuesto que la disponibilidad de nutrientes (luz, azúcares) y la presencia de hormonas vegetales como las auxinas promueven la producción localizada de fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P) por Vps34 (vacuolar protein sorting-34), que activa la proteína cinasa PDK1 (Xiong y Sheen 2015). Es bien conocido por su papel clave como activador de otras cinasas AGC que juegan papeles cruciales en las funciones celulares basales en eucariotas inferiores (levadura) y superiores (humanos/ratones) (Xiao et al. 2020). En este contexto, la cinasa PDK1 de *Arabidopsis* comparte un alto porcentaje de homología con la PDK de mamíferos y la cinasa PDK1 de *Arabidopsis* es capaz de activar la proteína cinasa humana BK (PKB/AKT) en presencia de PtdIns (3,4,5) P3, y es solo la segunda proteína vegetal que se informa que posee un dominio de homología de pleckstrina y la primera proteína vegetal que se ha demostrado que se une a 3-fosfoinosítidos (Deak et al. 1999; Dittrich y Devarenne. 2012), En

mamíferos, BX-517 es un inhibidor potente y selectivo de PDK1 que se une al bolsillo de unión de ATP de la proteína. Además, BX-517 bloquea la activación de Akt en células tumorales (Islam et al. 2007).

Este estudio utilizó el compuesto BX517, el primer informe de su uso en *Arabidopsis*. Nuestros resultados indican que la inhibición de la cinasa PDK1 altera el programa normal de desarrollo de la raíz, lo que resulta en una proliferación reducida y acortamiento de las raíces primarias y laterales, en contraste con el fenotipo inducido por sacarosa. Claramente, las vías de señalización que promueven la división y elongación de las células de la raíz en plántulas de *Arabidopsis* WT, posiblemente en ambos tratamientos esté involucrada la vía de señalización TOR, ya que la sacarosa y la cinasa PDK1 están involucradas en la activación de la vía de señalización TOR en *Arabidopsis*. Se ha informado que el compuesto BX517 inhibe la progresión de la señalización PDK1-TOR, además de detener el ciclo celular en la fase G0-G1, afectando principalmente a la ciclina D1, CDK4 y CDK6 (Liu et al. 2020).

En respuesta a condiciones que estimulan el crecimiento, como las hormonas vegetales o la disponibilidad de azúcares, se observa una mayor abundancia de ciclinas G1, particularmente en los azúcares que afinan la sensibilidad y distribución de las auxinas en las plantas, promoviendo las transiciones del ciclo celular de las fases G2 a M y S (MacGregor et al. 2008; Skylar et al. 2011; Kircher y Schopfer 2012), y activan la cinasa TOR para controlar la proliferación celular a través de la cinasa PDK1 (Kircher y Schopfer 2012), en este contexto, las respuestas celulares al fenotipo de raíz corta de los tratamientos con BX517 mostraron una expresión disminuida de CycB1 y CycA. Esto sugiere que la inhibición de las cinasas PDK1 reduce la capacidad proliferativa de las células, lo que lleva a la detención del ciclo celular. Además, el inhibidor BX517 muestra un efecto competitivo con la sacarosa sobre la expresión de ciclina B1 y ciclina A, ya que se muestra que los niveles de expresión de ciclina se reducen en comparación con los tratamientos con altos niveles de sacarosa. Además, nuestros resultados sugieren que la inhibición de

PDK1 en *Arabidopsis* WT puede causar estrés celular que conduce a la detención del ciclo celular.

Uno de los aspectos clave de las respuestas al estrés de replicación es activar los puntos de control del ciclo celular, que desencadenan la detención del ciclo celular y permiten que las células tengan tiempo suficiente para eliminar estas perturbaciones (Pan et al. 2021). La cinasa WEE1 se encuentra dentro de los puntos de control, es ubicua en el plan El WEE1 vegetal interviene en el desarrollo celular y regula negativamente el ciclo celular a través de su fosforilación. Sin embargo, sus analogías con el control del ciclo celular humano por la fosforilación de tirosina de las cinasas dependientes de ciclina (CDK) son a veces cuestionadas (Détain et al 2021). Las diferencias estructurales, que podrían ser responsables de la pérdida de especificidad entre humanos y plantas, se destacan y sugieren la participación de WEE1 vegetal en más procesos de regulación celular (Détain et al 2021). Con base en nuestros resultados, indicamos que la inhibición de PDK1 por el compuesto BX517 induce la expresión de WEE1 como una posible respuesta al estrés causado por el inhibidor. El mecanismo indirecto sugiere que aguas arriba de WEE1 hay otros pasos reguladores presentes para controlar la progresión del ciclo celular, estos hallazgos muestran una posible actividad dual con TOR, ya que los cambios en los niveles de fosforilación de S6K disminuyen en presencia de BX517, estos resultados están relacionados con estudios en líneas de cáncer de ovario donde se informó que una combinación de WEE1 y mTOR inhibe de manera sinérgica el crecimiento tumoral en líneas celulares de cáncer de ovario y xenoinjerto derivado de pacientes que imitan de cerca la heterogeneidad de los tumores de los pacientes, mecanísticamente, la inhibición dual de WEE1/mTOR indujo un estrés masivo de replicación de ADN, lo que llevó al estancamiento de la horquilla y daño del ADN (Li et al. 2020).

En conclusión, en este estudio indicamos que BX517 redujo la actividad de la cinasa TOR, activó la expresión de WEE1 en los meristemos de los brotes, las raíces y las raíces laterales, e inhibió la progresión del ciclo celular meristemático en las raíces,

lo que sugiere que PDK1 es un elemento crítico para las respuestas de las plantas a los factores mitogénicos a través de la modulación de la actividad de TOR. Nuestros datos revelan una relación entre un ortólogo de PDK1 con actividad TOR y la expresión de la cinasa WEE1 para el crecimiento y las respuestas al estrés en las plantas.

11. BIBLIOGRAFIA

1. Adachi S, Minamisawa K, Okushima Y, Inagaki S, Yoshiyama K, Kondou Y, Kaminuma E, Kawashima M, Toyoda T, Matsui M, Kurihara D, Matsunaga S, Umeda M (2011) Programmed induction of endoreduplication by DNA double-strand breaks in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:10004–10009
2. Andjelković M., Jones P. F., Grossniklaus U., Cron P., Schier A. F., Dick M., et al. (1995). Developmental regulation of expression and activity of multiple forms of the *Drosophila* RAC protein kinase. *J. Biol. Chem.* 270, 4066–4075. 10.1074/jbc.270.8.4066
3. Anna C. Nelson Dittrich N. A. and Devarenne P. T. (2012) Perspectives in PDK1 evolution Insights from photosynthetic and non-photosynthetic organisms. *Plant Signaling & Behavior* 7:6, 642-649.
4. Anthony, R, G., Henriques, R., Helfer, A., Mészáros, T., Rios, G., Testerink, C., Munnik, T., Deák, M., Koncz, C., Bögre L (2004). A protein kinase target of a PDK1 signalling pathway is involved in root hair growth in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 23, 572–581
5. Anthony, R. G., Khan, S., Costa, J., Pais, M. S. & Bögre, L (2006) The *Arabidopsis* protein kinase PTI1-2 is activated by convergent phosphatidic acid and oxidative stress signaling pathways downstream of PDK1 and OXI1. *J. Biol. Chem.* 281, 37536–37546

6. Atkin, J., Halova, L., Ferguson, J., Hitchin, J. R., Cieslar, A. L., Jordan, A. M., Pines, J., Wellbrock, C., Petersen, J (2014) Torin1-mediated TOR kinase inhibition reduces Wee1 levels and advances mitotic commitment in fission yeast and HeLa cells, *J Cell Sci* 1346-1356.
7. Beemster GT, De Vusser K, De Tavernier E, De Bock K, Inze D (2002) Variation in growth rate between *Arabidopsis* ecotypes is correlated with cell division and A-type cyclin-dependent kinase activity. *Plant Physiol* 129:854–864.
8. Benoît Menand, Thierry Desnos, Laurent Nussaume, Frédéric Berger, David Bouchez, Christian Meyer and Christophe Robaglia (2002) Expression and disruption of the *Arabidopsis* TOR (target of rapamycin) gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
9. Biondi, R. M. et al. Identification of a pocket in the PDK1 kinase domain that interacts with PIF and the C-terminal residues of PKA. *EMBO J.* 19, 979–988 (2000).
10. Casamayor, A., Torrance, P. D., Kobayashi, T., Thorner, J. & Alessi, D. R. Functional counterparts of mammalian protein kinases PDK1 and SGK in budding yeast. *Curr. Biol.* 9, 186–197 (1999).
11. Culligan K, Tissier A, Britt A (2004) ATR regulates a G2-phase cell-cycle checkpoint in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16:1091–1104

12. Cools T, Iantcheva A, Weimer AK, Boens S, Takahashi N, Maes S, Van den Daele H, Van Isterdael G, Schnittger A, De Veylder L (2011) The Arabidopsis thaliana checkpoint kinase WEE1 protects against premature vascular differentiation during replication stress. *Plant Cell* 23:1435–1448
13. Colón-Carmona A, You R, Haimovitch-Gal T, Doerner P (1999) Spatiotemporal analysis of mitotic activity.
14. De Jager SM, Scofield S, Huntley RP, Robinson AS, den Boer BG, Murray JA (2009) Dissecting regulatory pathways of G1/S control in Arabidopsis: common and distinct targets of CYCD3;1, E2Fa and E2Fc. *Plant Mol Biol* 71:345–365
15. De Schutter K, Joubes J, Cools T, Verkest A, Corellou F, Babiyshuk E, Van Der Schueren E, Beeckman T, Kushnir S, Inze D, De Veylder L (2007) Arabidopsis WEE1 kinase controls cell cycle arrest in response to activation of the DNA integrity checkpoint. *Plant Cell* 19:211–225
16. Devarenne, T., Ekengren, SL., Pedley, K., Gregory, B. (2006). Adi3 is an AGC kinase that interacts with Pdk1 that negatively regulates the death of plant cells. *The EMBO journal*.
17. Díaz-Granados, V.H., López-López, J.M., Flores-Sánchez, J., Olguin-Alor, R., Bedoya- López, A., Dinkova, T.D., Salazar-Díaz, K., Vázquez-Santana, S., Vázquez-Ramos, J.M., and Lara-Núñez, A. (2020). Glucose modulates proliferation in root apical meristems via TOR in maize during germination. *Plant Physiology and Biochemistry* 155:126–135.
18. Dissmeyer N, Nowack MK, Pusch S, Stals H, Inze D, Grini PE, Schnittger A (2007) T-loop phosphorylation of Arabidopsis CDKA;1 is required for its

function and can be partially substituted by an aspartate residue. *Plant Cell* 19:972–985

19. Dittrich, A. C. N. & Devarenne, T. P. (2012) Characterization of a PDK1 homologue from the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Physiol.* 158, 1018–1033.
20. Dittrich, A. C. N. & Devarenne, T. P. (2012) Perspectives in PDK1 evolution: Insights from photosynthetic and non-photosynthetic organisms. *Plant Signal. Behav.* 7, 642–649.
21. Deak M, Casamayor A, Currie RA, Downes CP, Alessi DR. Characterisation of a plant 3-phosphoinositidedependent protein kinase-1 homologue which contains a pleckstrin homology domain. *FEBS Lett* 1999; 451:220-6.
22. Doerner P, Jorgensen JE, You R, Steppuhn J, Lamb C (1996) Control of root growth and development by cyclin expression. *Nature* 380:520–523
23. Frödin, M. et al. A phosphoserine/threonine-binding pocket in AGC kinases and PDK1 mediates activation by hydrophobic motif phosphorylation. *EMBO J.* 21, 5396–5407 (2002).
24. Francis, D. (2007). The plant cell cycle--15 years on. *New Phytol* 174(2): 261-278.
25. Francis, D. (2011). A commentary on the G/M transition of the plant cell cycle. *Ann Bot* 107(7):1065-1070

26. Fu L, Wang P, and Xiong Y (2020) Target of Rapamycin Signaling in Plant Stress Responses. *Plant Physiology*.
27. Fulcher N, Sablowski R (2009) Hypersensitivity to DNA damage in plant stem cell niches. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:20984–20988
28. Furukawa T, Curtis MJ, Tominey CM, Duong YH, Wilcox BW, Aggoune D, Hays JB, Britt AB (2010) A shared DNA-damage response pathway for induction of stem-cell death by UVB and by gamma irradiation. *DNA Repair* 9:940–948
29. Gonzalez E., McGraw T. E. (2009). The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle* 8, 2502–2508. 10.4161/cc.8.16.9335 [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
30. González E., McGraw T. E. (2009). Insulin-modulated Akt subcellular localization determines Akt isoform-specific signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 7004–7009. 10.1073/pnas.0901933106
31. Harashima H, Schnittger A (2010) The integration of cell division, growth and differentiation. *Curr Opin Plant Biol* 13:66–74
32. Heyman J, Cools T, Vandenbussche F, Heyndrickx KS, Van Leene J, Vercauteren I, Vanderauwera S, Vandepoele K, De Jaeger G, Van Der Straeten D, De Veylder L. 2013. ERF115 controls root quiescent center cell division and stem cell replenishment. *Science*. 342, 860-863

33. Heyman J, Cools T, Canher B, Shavialenka S, Traas J, Vercauteren I, Van den Daele H, Persiau G, De Jaeger G, Sugimoto K, De Veylder L. 2016. The heterodimeric transcription factor complex ERF115-PAT1 grants regeneration competence. *Nat. Plants* 2, 16165.

34. Hirofumi Kuroda, Naoki Takahashi, Hiroaki Shimada, Motoaki Seki, Kazuo Shinozaki, Minami Matsui Classification and expression analysis of Arabidopsis F-box-containing protein genes, *Plant Cell Physiol.* 2002 Oct;43(10):1073-85. doi: 10.1093/pcp/pcf151.

35. Hynes NE, Ingham PW, Lim WA, Marshall CJ, Massagüe J, Pawson T. Signalling change: Signal transduction through the decades. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14, 393-314. 255-65, <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600910>.

36. Hwang, H. H., Yu, M., and Lai, E. M. (2017). Agrobacterium-mediated plant transformation: biology and applications. *Arabidopsis Book* 15, e0186.

37. Hwang, J., Kim, Y. Y., Huh, S., Shim, J., Park, C., Kimm, K., Choi, D. K., Park, T. K., and Kim, S. (2005). The time-dependent serial gene response to Zeocin treatment involves caspase-dependent apoptosis in HeLa cells. *Microbiol Immunol* 49, 331-42.

38. Islam, I., Brown, G., Bryant, J., Hrvatin, P., Kochanny, M. J., Phillips, G. V., Yuan, S., Adler, M., Whitlow, M., Lentz, D., Polokoff, M. A., Wu, J., Shen, J., Walters, J., Ho, E., Subramanyam, B., Zhu, D., Feldman, R. I., Arnaiz, D (2007) Indolinone based phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1) inhibitors. *Plant Cell*

39. Jakoby M, Schnittger A (2004) Cell cycle and differentiation. *Curr Opin Plant Biol* 7:661–669
40. Jürgens, G. (2005). Cytokinesis in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* 56, 281-99.
41. Krämer, U. (2015). Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *Elife* 4.
42. Kircher S, Schopfer P (2012) Photosynthetic sucrose acts as cotyledon derived long-distance signal to control root growth during early seedling development in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:11217–11221
43. Ko, K, S., Yoo, J, Y., Ramasamy, N, K., Harmoko, R., Vű, D, T., Park, J, P., Lee, K, O., (2018) Cell cycle arrest mediated by WEE1 is involved in the unfolded protein response in plants. *Plant Biotechnology Reports* 12:315–328
44. Lawlor, M. A. et al. Essential role of PDK1 in regulating cell size and development in mice. *EMBO J.* 21, 3728–3738 (2002).
45. Li, F., Guo, E., Huang, J., Lu, F., Yang, B., Xiao, R., Liu, C., Wu, X., Fu, Y., Wang, Z., Peng, S., Lei, Y., Guo, Z., Li, L., Xi, L., Sun, C., Si Liu, S., Chen, G., (2020) mTOR inhibition overcomes primary and acquired resistance to Wee1 inhibition by augmenting replication stress in epithelial ovarian cancers. *Am J Cancer Res*, 908-924.
46. Liu R, Yu Z, Chen Z, Liu D, Huang F, Li Q, Hu G, Yi X, Li X, Zhou H, Liu Z (2020) A novel dual MEK/PDK1 inhibitor 9za retards the cell cycle at G0/G1 phase and induces mitochondrial apoptosis in non-small cell lung cancer cells, *PeerJ*, DOI 10.7717/peerj.9981

47. Leroux, A., Schulze, J., Biondi, R. (2017). AGC kinases, mechanisms of regulation and innovative drug developme. *Semin Cancer Biol*, <https://doi:10.1016/j.semcancer.2017.05.011>.
48. Lukowitz W, Mayer U, Jurgens G (1996) Cytokinesis in the Arabidopsis embryo involves the syntaxin-related KNOLLE gene product. *Cell* 84:61–71
49. MacGregor DR, Deak KI, Ingram PA, Malamy JE (2008) Root system architecture in Arabidopsis grown in culture is regulated by sucrose uptake in the aerial tissues. *Plant Cell* 20:2643–2660.
50. Manning, B., Toker, A. (2017). AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell*, 20;169(3):381- 405. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.05.011>
51. Maple, J., and Møller, S. G. (2007). Mutagenesis in Arabidopsis. *Methods Mol Biol* 362, 197-206.
52. Niederberger, C. & Schweingruber, M. E. A *Schizosaccharomyces pombe* gene, *ksg1*, that shows structural homology to the human phosphoinositide-dependent protein kinase PDK1, is essential for growth, mating and sporulation. *Mol. Gen. Genet.* 261, 177–183 (1999).
53. Pearce, L., Komander, D. & Alessi, D. The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 9–22 (2010). <https://doi.org/10.1038/nrm2822>
54. Porceddu A, Stals H, Reichheld JP, Segers G, De Veylder L, Barroco RP, Casteels P, Van Montagu M, Inze D, Mironov V (2001) A plant-specific cyclin-

dependent kinase is involved in the control of G2/M progression in plants. *J Biol Chem* 276:36354–36360

55. Raya-González, J., López-Bucio, J. S., Prado-Rodríguez, J. C., Ruiz-Herrera, L. F., Guevara-García, A. A., López-Bucio J (2016) The MEDIATOR genes MED12 and MED13 control Arabidopsis root system configuration influencing sugar and auxin responses. *Plant Mol Biol* 95:141–156.
56. Rexin, D., Meyer, C., Robaglia, C., Veit, B. (2015). TOR signalling in plants. *Biochemical Journal*, 470, 1–14. <https://doi.org/10.1042/BJ20150505>.
57. Rintelen, F., Stocker, H., Thomas, G. & Hafen, E. PDK1 regulates growth through Akt and S6K in *Drosophila*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98, 15020–15025 (2002).
58. Salazar Díaz, K y Dinkova, T. D., (2021) TOR (target of rapamycin): emperador en la toma de decisiones que regula el crecimiento y desarrollo de las plantas. *Revista de Educación Bioquímica* 100 (REB) 40(3):100-110, 2021
59. Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Kim, D.-H., Guertin, D.A., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr. Biol.* 14:1296–1302.
60. Sliwinska, E., Bassel, G. W., and Bewley, J. D. (2009). Germination of *Arabidopsis thaliana* seeds is not completed as a result of elongation of the radicle but of the adjacent transition zone and lower hypocotyl. *Journal of*

Experimental Botany 60, 3587-3594.

61. Ting Pan, Qi Qin, Chubing Nong, Shan Gao, Lili Wang, Bingcheng Cai¹, Ming Zhang, Chong Wu, Hanchen Chen, Tong Li, Dan Xiong, Guoliang Li, Shui Wang and Shunping Yan (2021) A novel WEE1 pathway for replication stress responses. *Nature Plants* 209-218
62. Trautenberg, L., Prince, L., Maas, C., Beier, N., Honold, F., Michal Brankatschk, B. (2019). Selective Phosphorylation of Akt/Protein-Kinase B Isoforms in Response to Dietary Cues. *Front. Cell Dev. Biol.*, <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00206>.
63. Turck, F. (2004). Phytohormones Participate in an S6 Kinase Signal Transduction Pathway in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 134(4), 1527–1535. <https://doi.org/10.1104/pp.103.035873>.
64. Voordeckers, K. et al. Yeast 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) orthologs Pkh1–3 differentially regulate phosphorylation of protein kinase A (PKA) and the protein kinase B (PKB)/S6K ortholog Sch9. *J. Biol. Chem.* 286, 22017–22027 (2011).
65. Woodward, A. W., and Bartel, B. (2018). Biology in Bloom: A Primer on the Arabidopsis thaliana Model System. *Genetics* 208, 1337-1349.
66. Wullschleger, S., Loewith, S., Hall, N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, [https://doi: 10.1016/j.cell.2006.01.016](https://doi:10.1016/j.cell.2006.01.016).

67. Xiong, Y., McCormack, M., Li, L., Hall, Q., Xiang, C., and Sheen, J. (2013). Glucose-TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature* 496:181–186.
68. Yang, H., Rudge, D.G., Koos, J.D., Vaidialingam, B., Yang, H.J., and Pavletich, N.P. (2013). mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature* 497:217–223.
69. Yao Xiao and Remko Offringa (2020) PDK1 regulates auxin transport and Arabidopsis vascular development through AGC1 kinase PAX. *Nature Plants*.
70. Yue Wu, Lin Shi¹, Lei Li¹, Liwen Fu², Yanlin Liu², Yan Xiong² and Jen Sheen 2018. Integration of nutrient, energy, light, and hormone signalling via TOR in plants. *Proc. Natl Acad. Sci*
71. Zhao X, Harashima H, Dissmeyer N, Pusch S, Weimer AK, Bramsiepe J, Bouyer D, Rademacher S, Nowack MK, Novak B, Sprunck

María Dolores Vázquez Rivera

Caracterización de proteína(s) cinasas en la vía de señalización PDKTORS6K en Arabidopsis thaliana.p

 Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid::3117:438796171

Fecha de entrega

12 mar 2025, 9:35 a.m. GMT-6

Fecha de descarga

12 mar 2025, 10:01 a.m. GMT-6

Nombre de archivo

Caracterización de proteína(s) cinasas en la vía de señalización PDKTORS6K en Arabidopsis thalia....pdf

Tamaño de archivo

2.6 MB

88 Páginas

15,049 Palabras

79,488 Caracteres

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



A quien corresponda,

Por este medio, quien abajo firma, bajo protesta de decir verdad, declara lo siguiente:

- Que presenta para revisión de originalidad el manuscrito cuyos detalles se especifican abajo.
- Que todas las fuentes consultadas para la elaboración del manuscrito están debidamente identificadas dentro del cuerpo del texto, e incluidas en la lista de referencias.
- Que, en caso de haber usado un sistema de inteligencia artificial, en cualquier etapa del desarrollo de su trabajo, lo ha especificado en la tabla que se encuentra en este documento.
- Que conoce la normativa de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en particular los Incisos IX y XII del artículo 85, y los artículos 88 y 101 del Estatuto Universitario de la UMSNH, además del transitorio tercero del Reglamento General para los Estudios de Posgrado de la UMSNH.

Datos del manuscrito que se presenta a revisión		
Programa educativo	Doctorado en ciencias en biología experimental	
Título del trabajo	Caracterización de proteína(s) cinasas en la vía de señalización PDK/TOR/S6K en <i>Arabidopsis thaliana</i>	
	Nombre	Correo electrónico
Autor/es	MARIA DOLORES VAZQUEZ RIVERA	0714408f@umich.mx
Director	HOMERO REYES DE LA CRUZ	delacruz@umich.mx
Codirector	JESUS CAMPOS GARCIA	Jesus.campos@umich.mx
Coordinador del programa	ERNESTO GARCIA PINEDA	egpineda@umich.mx

Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Asistencia en la redacción	NO	

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Traducción al español	NO	
Traducción a otra lengua	SI	Traducción a ingles solo el resumen.
Revisión y corrección de estilo	NO	
Análisis de datos	NO	
Búsqueda y organización de información	NO	
Formateo de las referencias bibliográficas	NO	
Generación de contenido multimedia	NO	
Otro	NO	

Datos del solicitante	
Nombre y firma	MARIA DOLORES VAZQUEZ RIVERA 
Lugar y fecha	MORELIA MICH. 10 MARZO 2025