

20 00381



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

"AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE UNA PROTEINA SEMEJANTE A INSULINA, PRESENTE EN TEJIDOS DE MAIZ, Y SU RELEVANCIA EN LA GERMINACION Y EL DESARROLLO"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

M. en C. CRISTINA GARCIA FLORES

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ESTELA SANCHEZ QUINTANAR

MEXICO, D. F.

MAYO 2002

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mami Colo y papá Juanito

A Juanito

Con mucho cariño

AGRADECIMIENTOS

Alas siguientes instituciones por haber hecho posible la realización de este trabajo

Facultad de Ciencias, UNAM

Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM

**Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA):
Proyectos IN202900 y IN 201398**

Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) por la beca otorgada desde febrero de 1997 a julio de 2000

Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado (PADEP)

Proyecto: "Aislamiento y Caracterización de una Proteína Semejante a Insulina, Presente en Tejidos de Maíz." PADEP 003373 y 002357

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Estela Sánchez Quintanar y aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Doctora en Ciencias Biológicas (Biología Celular) por el siguiente jurado:

PRESIDENTE:	DRA. GUADALUPE JUDITH MARQUEZ GUZMÁN
PRIMER VOCAL:	DRA. ALICIA ENRIQUETA BRECHU FRANCO
SEGUNDO VOCAL:	DRA. MARÍA ELENA ALVAREZ-BUYLLA ROCES
TERCER VOCAL:	DRA. ESTELA SÁNCHEZ QUINTANAR
SECRETARIO:	DR. MANUEL BENIGNO AGUILAR RAMÍREZ
SUPLENTE:	DR. GUILLERMO LAGUNA HERNÁNDEZ
SUPLENTE:	DRA. ALMA DELFINA LUCÍA OROZCO SEGOVIA

ABREVIATURAS

- ARNm** – ácido ribonucleíco mensajero
- ARNt** – ácido ribonucleíco de transferencia
- ARNr** – ácido ribonucleíco ribosomal
- CAP** – 7mGpppG; nucleótido modificado en el extremo 5' de ARNm
- Cdk** – cinasas dependientes de ciclinas
- DAPI** - 4,6-diamidino-2-fenil indol
- DTT** - ditioneitol
- eIF** - factor de iniciación eucarionte
- eEF** - factor de elongación eucarionte
- eRF** - factor de terminación eucarionte
- IGF-I** - insulin growth factor tipo I
- IGF-II** - insulin growth factor tipo II
- ISR** – receptor unido a su sustrato
- IRES** – sitio interno de entrada del ribosoma
- IGFBP** proteína de unión para IGFs
- PKB** proteína cinasa B
- PDGF** - factores de crecimiento derivados de plaquetas
- PABP** – proteína que une a poliA
- PAGE** – electroforesis en gel de poliacrilamida
- pr S6** – proteína ribosomal S6
- p70^{S6k}** – cinasa que fosforila a la proteína ribosomal S6
- PI-3K** - fosfatidilinositol-3-cinasa
- rap** – rapamicina
- SDS** – dodecil sulfato de sodio
- TOP** – secuencia de oligopirimidinas
- 5'UTR** – región 5' no traducible
- Zm-IGF** – insulin-like growth factor of maize

CONTENIDO

	Página
1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- ANTECEDENTES	4
2.1.- Aspectos Generales de la Germinación	4
2.1.1.- Semilla de maíz	4
2.1.2.- Germinación	5
2.1.3.- Eventos Moleculares Durante la Germinación de Cereales	7
2.2.- Características Generales del Ciclo Celular	13
2.2.1.- Fases del Ciclo Celular	14
2.2.2.- Ciclo Celular en Plantas	20
2.2.3.- Regulación del Ciclo Celular	21
2.3.- Aspectos Generales de la Síntesis de Proteínas en Eucariontes	24
2.3.1.- Características de los Ribosomas en Eucariontes	24
2.3.2.- Mecanismos de Control Traduccional	27
2.3.3.- Síntesis de Proteínas en Plantas y su Regulación	32
2.3.4.- Regulación de la Síntesis de Proteínas Durante la Germinación de maíz	36
2.4.- Aspectos Generales de la Insulina	39
2.4.1.- Biosíntesis de la Insulina	39
2.4.2.- Mecanismos de Acción de la Insulina	42
2.4.3.- Factores de Crecimiento Insulin-like (IGF-I e IGF-II)	43
2.4.4.- Mecanismos de Acción de los Factores IGF-I e IGF-II	44
2.4.5.- Regulación Traduccional por la Insulina y Factores de Crecimiento (IGF-I e IGF-II)	45
2.5.- Proteínas Similares a Insulina en Plantas	48
3.- JUSTIFICACIÓN	50
4.- HIPÓTESIS	52
5.- OBJETIVOS	52
6.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	54
7.- MATERIALES Y MÉTODOS	55
7.1.- Obtención de Material Biológico	56
7.2.- Tratamiento de Desinfección de las Semillas de Maíz	56
7.3.- Incorporación de ³ [H]-timidina en Ejes Embrionarios de Maíz	56
7.4.- Aislamiento de Núcleos	57
7.5.- Extracción de DNA a Partir de Núcleos Aislados	57
7.6.- Monitoreo de Órganos y Tejidos de Maíz Para la Detección del factor Zm-IGF	58

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7.7.- Inmunocitoquímica del factor Zm-IGF	59
7.8.- Análisis del factor Zm-IGF Purificado	61
7.9.- Efecto de la Insulina en las Curvas de Germinación y Desarrollo de Plántulas	61
7.10.- Elaboración de una Curva Patrón de Insulina	62
8.- RESULTADOS	63
8.1.- Detección del Factor Zm-IGF en Órganos y Tejidos de Maíz	63
8.2.- Estrategias Para la Extracción y Purificación del Factor Zm-IGF	66
8.3.- Efecto Fisiológico del factor Zm-IGF y la Insulina Durante la Germinación	69
8.4.- Evaluación del Efecto del factor Zm-IGF en la Incorporación de Marca Radioactiva en Proteínas Durante la Germinación	70
8.5.- Efecto del Factor Zm-IGF en la Síntesis de DNA Durante la Germinación	71
8.6.- Artículo Publicado: "A maize insulin-like growth factor signals to a transduction pathway that regulates protein synthesis in maize".	83
9.- DISCUSIÓN	89
10.- CONCLUSIONES	96
11.- BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA	97
12.- APÉNDICE	117

Abstract

Protein synthesis in eucaryotic organisms is a complex process, which involves the requirement of many factors and appears highly regulated during development. Insulin and other insulin-like (IGF-I and IGF-II) growth factors modulate protein synthesis in several animal tissues by stimulating a signal transduction pathway that induces S6 rp phosphorylation on the 40S ribosomal subunit. As a result, selective translation of characteristic mRNAs containing a poly pyrimidine-rich sequence at their 5' UTR, (5' TOP mRNAs) has been demonstrated.

Previous reports in spinach and *Lemna* have shown the presence in these plants of a peptide that is recognized by insulin antibody. However, functional role has not been investigated. During the first hours of maize germination, protein synthesis is based on the set of mRNAs synthesized during maturation and stored in the seed. The effect of insulin in maize germination has been studied at physiological and biochemical levels. Insulin showed stimulatory effect on germination and seedling growth. At the molecular level, insulin-stimulated maize axes showed enhancement of ribosomal proteins synthesis and increased S6 ribosomal protein phosphorylation on the 40S ribosomal subunit, suggesting that maize plants might have a growth-factor-induced signal transduction pathway similar to those known in animals.

In the present study, the purification of a maize (*Zea mays* L) insulin-like growth factor (Zm-IGF) with IGF activity was undertaken. Maize embryonic axes from germinating seeds were used as source for Zm-IGF purification. G-50 Sephadex fractionation of axes extracts, followed by affinity chromatography through a bovine insulin antibody-sepharose column yielded a 20 kDa protein (Zm-IGF). This protein proved to speed up maize germination and seedling growth. At molecular level, Zm-IGF enhanced ^3H -thymidine incorporation into cellular DNA. Further, Zm-IGF stimulated phosphorylation of S6 rp on the 40S ribosomal subunit as well as ^{35}S -methionine incorporation into ribosomal proteins. Rapamycin, a specific inhibitor of the insulin-stimulated signal transduction pathway, prevented both the enhancement of S6 rp phosphorylation and the specific synthesis of rps in maize axes. Either incubation with anti-insulin antibody, heat treatment (60 °C) or trypsin digestion of the 20 kDa peptide abolished the Zm-IGF effects. It is concluded that Zm-IGF is a plant growth factor of peptide nature that elucidates a biochemical response similar to that insulin/IGFs generates in animal tissues.

Resumen

La síntesis de proteínas en organismos eucariontes es un proceso complejo y altamente regulado que involucra la participación de muchos factores.

Insulina y otros factores de crecimiento "insulin-like" (IGF-I e IGF-II) modulan la síntesis de proteínas en tejidos animales por medio de la estimulación de una ruta de transducción de señales que involucra la fosforilación de la proteína ribosomal S6 (pr S6) en la subunidad 40S. Esto provoca la traducción selectiva de mARNs que contienen una secuencia rica en pirimidinas en el extremo 5' UTR (5'TOP mRNAs). Estudios previos han reportado que en espinaca y en *Lemna gibba* existe un péptido que es reconocido por anticuerpos contra insulina, sin embargo su papel funcional no ha sido investigado.

Durante las primeras horas de germinación de maíz, se reactiva la síntesis de proteínas a partir de los mensajes sintetizados y almacenados durante el proceso de maduración en la semilla. Trabajos previos en el laboratorio indican que la insulina estimula tanto la germinación como el crecimiento de la plántula, a nivel molecular incrementa la síntesis de proteínas ribosomales y la fosforilación de la pr S6 del ribosoma.

En el presente trabajo se purificó un factor de crecimiento "insulin-like" de maíz (Zm-IGF), el cual mostró actividad de IGF. Para la purificación de Zm-IGF se utilizaron ejes embrionarios de semillas germinadas de maíz. El extracto de ejes se pasó por una columna de Sephadex G-50 y posteriormente por medio de una cromatografía de afinidad en la cual el anticuerpo contra insulina estuvo unido a la sepharosa, se obtuvo una proteína de 20 kDa (Zm-IGF). Esta proteína incrementa la germinación y el crecimiento de la planta. A nivel molecular Zm-IGF favorece la incorporación de $^3\text{[H]}$ -timidina en el DNA celular. También estimula la fosforilación de pr S6 así como la incorporación de $^{35}\text{[S]}$ -metionina en las proteínas ribosomales. La rapamicina, que es un inhibidor específico de la vía de transducción de señales estimulada por insulina, también inhibe tanto la fosforilación de la pr S6 como la síntesis de proteínas ribosomales en ejes de maíz estimulados con Zm-IGF. Los efectos inducidos por Zm-IGF son inhibidos cuando Zm-IGF se incubó con anticuerpo contra insulina, se trató con calor (60°C) o se le digiere con tripsina. Es por todo esto que se concluye que Zm-IGF es un factor de crecimiento en plantas de naturaleza peptídica, el cual regula respuestas bioquímicas en forma similar a como ocurre con insulina/IGFs en animales.

1.- INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es una especie vegetal con un alto grado de domesticación, sin embargo, a pesar de ser uno de los cultivos mejor conocidos su potencial genético no ha sido totalmente explotado y su aprovechamiento es menor de lo que podría esperarse.

En México y el resto de Latinoamérica esta especie es la base de la alimentación de su población y actualmente no es posible satisfacer dicha demanda con los niveles internos de producción, por lo que se deben importar grandes cantidades de este grano. Particularmente en nuestro país, además de que no se satisface la demanda de este recurso, la superficie sembrada con maíz es cada vez menor debido a la modificación del uso del suelo, como consecuencia de la rápida urbanización y el deterioro de los ecosistemas.

La Biotecnología Vegetal ha permitido afrontar parte de la problemática en la producción de esta especie. Por otra parte en la investigación básica también se están abordando aspectos involucrados tanto en la producción como en el rendimiento del maíz.

En el presente trabajo se estudiaron algunos factores que pueden ser relevantes en la regulación del proceso de germinación de la semilla de maíz.

Se sabe que la Insulina y otros factores de crecimiento "insulin-like" (IGF-I e IGF-II), presentes tanto en eucariontes sencillos como en los tejidos de mamíferos (Steller *et al.*, 1995; Rechler y Clemmons, 1998), modulan la síntesis de proteínas por medio de la estimulación de una ruta de transducción de señales que involucra la fosforilación de la proteína ribosomal S6 (pr S6) en la subunidad 40S del ribosoma, (White and Kahn, 1994; Proud, 1994; Meyuhas *et al.*, 1996; Martelli *et al.*, 1999). Esto provoca la traducción selectiva de mRNAs que contienen una secuencia rica en pirimidinas en el extremo 5' UTR (5'TOP mRNAs), y son principalmente mensajes que codifican para

proteínas ribosomales y factores de traducción (Jefferies y Thomas, 1996; Dinkova *et al.*, 2000).

Por otra parte, se sabe que durante la germinación de los ejes embrionarios de maíz se inicia gradualmente la síntesis de proteínas. Esto constituye un sistema en donde se ponen de manifiesto varios de los mecanismos de regulación de la expresión genética, ya que se requiere del control de la expresión de genes específicos involucrados durante la germinación (Bewley, 1997). Este es un proceso altamente regulado cuyo mecanismo no se conoce con claridad.

Uno de los niveles en donde se pone de manifiesto este tipo de control es durante la traducción, ya que en el eje embrionario se almacenan mRNAs maduros con los que se inicia la síntesis de proteínas durante la germinación (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1999).

Trabajos previos en nuestro laboratorio sugieren que en maíz la insulina estimula tanto la germinación como el crecimiento de la plántula. A nivel molecular se encontró que incrementa la síntesis de proteínas ribosomales y del factor de iniciación de la traducción iso4E (Dinkova *et al.*, 2000), así como la fosforilación de la pr S6 del ribosoma (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1999), esto implica que en las plantas de maíz existe una ruta de transducción de señales inducida por un factor de crecimiento similar a los que se conocen en animales.

En plantas no hay reportes que indiquen la existencia de factores de crecimiento del tipo IGF-I o IGF-II, ni de las vías de transducción que estos factores pudieran regular. Sin embargo, algunos estudios previos indican la presencia de péptidos semejante a IGFs en diferentes plantas (Collier *et al.*, 1987; Hirano *et al.*, 1995; Ilgoutz *et al.* 1997 y Oliveira *et al.*, 1999), sin embargo, hasta el momento no se ha logrado determinar alguna función de regulación a nivel fisiológico en sus plantas de origen.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En este trabajo se realizó la purificación de un péptido denominado Zm-IGF (insulin-like growth factor of maize) a partir de ejes embrionarios de maíz germinados y se demostró su acción biológica a nivel fisiológico y bioquímico. Los resultados indican que es posible que en tejidos de maíz existe un factor de crecimiento que regula la síntesis de proteínas ribosomales, a través de la estimulación de una vía de transducción de señales, en la cual se fosforila a la pr S6.

2.- ANTECEDENTES

2.1.- Aspectos Generales de la Germinación

2.1.1. Semilla de maíz

Las semillas son estructuras biológicas sumamente complejas. Están formadas por un tejido alimenticio de reserva, de un embrión en el cual el crecimiento está detenido y de una cubierta protectora (Kigel y Galili, 1995). El desarrollo de los embriones de angiospermas está dividido en tres etapas:

I.- Histodiferenciación: una célula cigótica sufre divisiones mitóticas que dan como resultado células diferenciadas que forman el cuerpo del embrión (eje embrionario y cotiledones).

II.- Maduración: es la etapa en la que ya no hay divisiones celulares y se caracteriza por la expansión celular y deposición de reservas en los tejidos de almacenamiento que pueden ser cotiledones o endospermo.

III.- Deseccación: pérdida de agua que trae como consecuencia una reducción gradual en el metabolismo. El embrión pasa a un estado quiescente, metabólicamente inactivo.

El maíz (*Zea mays* L.) es una planta que pertenece a la familia de las gramíneas en el grupo de monocotiledóneas. La semilla agrícola de esta planta es un fruto, sin embargo para los fines de este trabajo se mencionará como semilla, no obstante de ser en realidad una carióspside.

En la semilla de maíz, existe un único embrión rodeado por un tejido de reserva llamado endospermo. El embrión está formado por el eje embrionario y el escutelo que lo rodea. El eje embrionario se divide en coleoptilo, mesocotilo (el cual está unido al escutelo) y radícula (Figura. 1). El término mesocotilo se refiere al primer internodo, localizado abajo de la plúmula, entre el nudo del coleoptilo y el nudo escutelar, y es una característica única de las gramíneas (Bewley y Black, 1994).

2.1.2. Germinación

La germinación en las semillas puede definirse como la serie de cambios morfológicos y bioquímicos que conllevan a la transformación de un embrión en una plántula, para lo cual debe pasar por dos etapas:

- 1.- La iniciación del metabolismo activo en el embrión, seguido rápidamente por su crecimiento y diferenciación sostenidos por la utilización del material de reserva.
- 2.- El crecimiento continuo del embrión alimentándose por un flujo continuo de hidrólisis de los cotiledones o reserva alimenticia extra-embionaria, tal como el endospermo o el perispermo. Esta etapa continúa hasta que la planta se establece como un organismo fotosintético o bien muere cuando se agotan las reservas alimenticias (Figura 1).

Durante la imbibición de la semilla de maíz, el agua entra principalmente a través del pericarpio. La semilla se hincha rápidamente y las primeras células en reactivarse son las del meristemo de la raíz primaria y la coleoriza. Después protuye la coleoriza en crecimiento a través del pericarpio, el cual a su vez es penetrado por la radícula reactivada. Posteriormente la mitosis y el alargamiento celular comienzan en la radícula aproximadamente 24 h después de haberse iniciado la imbibición y dentro de las 48 h siguientes, el primordio de las raíces laterales se hace evidente. El escutelo permanece embebido en el endospermo y la plúmula emerge en una protusión secundaria: el coleóptilo se eleva hacia la superficie del suelo, debido principalmente a la actividad de la zona meristemática del primer internodo. Finalmente para que la germinación se complete, la radícula debe expandirse y penetrar las estructuras circundantes (Figura 1).

La definición de germinación aceptada para este tipo de semillas indica que inicia a partir de su imbibición en agua y termina con la protrusión de la radícula (principia la elongación del eje embrionario) a través de la cubierta del embrión (Bewley, 1997).

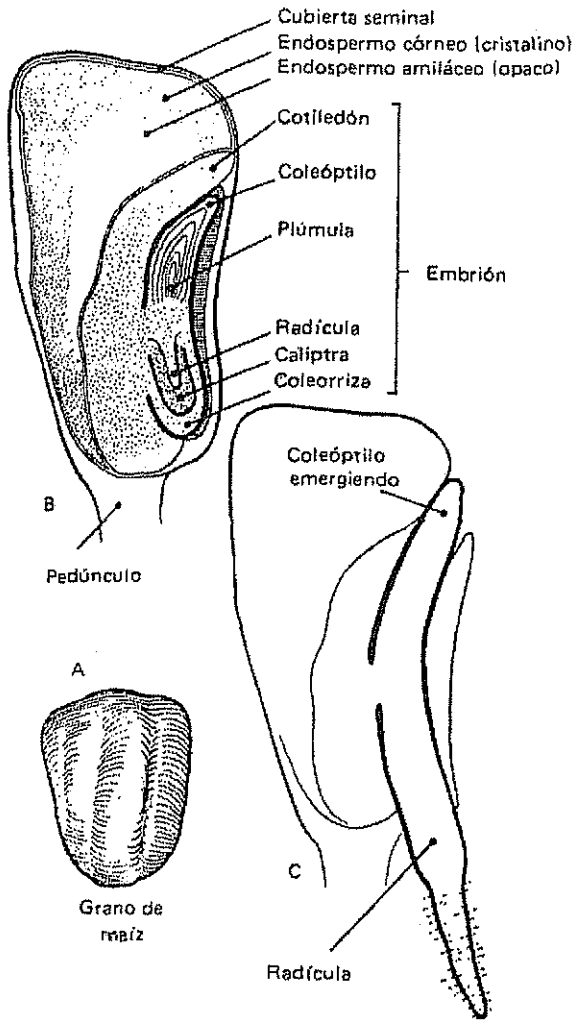
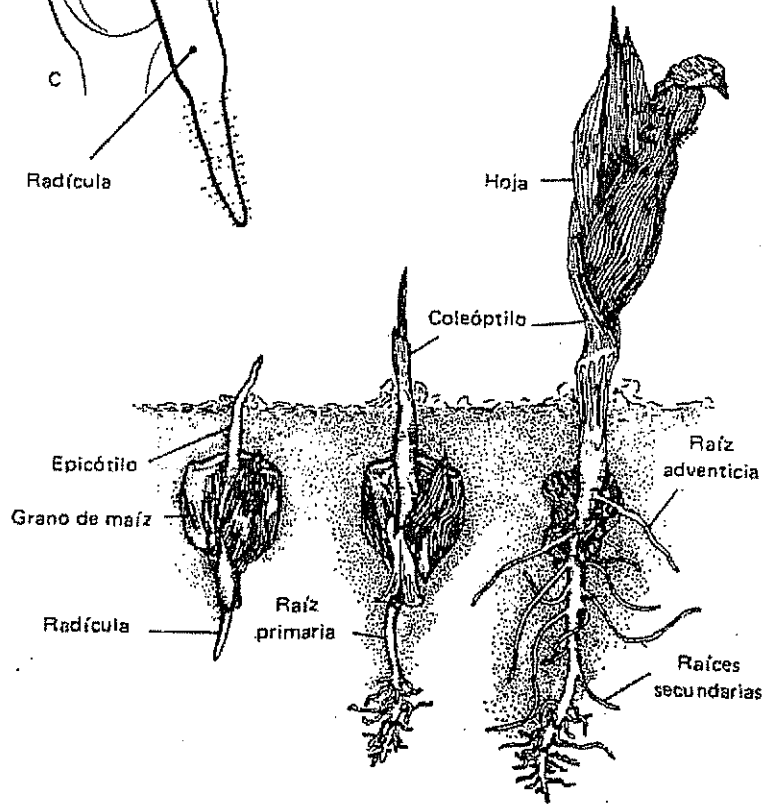


Figura 1. Germinación de una semilla de maíz (monocotiledónea). (De R.H. Arnett, Jr. y D.C. Braungart: An Introduction to Plant Biology, 3ª edición. The C.V. Mosby Co., St.



2.1.3.- Eventos Moleculares Durante la Germinación de Cereales

Las semillas maduras, secas, poseen un mínimo de agua y se encuentran en un estado metabólico prácticamente inactivo. Cuando ocurre la imbibición, la semilla se rehidrata rápidamente y se activa el metabolismo celular que permitirá llevar a cabo la elongación del eje embrionario, la protrusión de la radícula y el posterior establecimiento de la planta (Bradford, 1995). En una etapa temprana de la germinación, inmediata a la imbibición, se producen cambios estructurales como reparación de membranas celulares, abastecimiento energético, respiración mitocondrial (Bewley y Black, 1994), actividad enzimática de organelos, así como la síntesis de RNA y proteínas. Todos estos son eventos celulares fundamentales para completar el evento de germinación y la preparación para el subsiguiente crecimiento de la plántula (Guy y Black, 1998).

Es por esta razón que la mayoría de las investigaciones en la bioquímica de la germinación y del crecimiento se enfocan al estudio de dichos procesos, con el fin de determinar cuales son los eventos claves para que ocurra la germinación de una semilla (Bewley y Black, 1994).

Durante este proceso, son tres rutas metabólicas respiratorias que se activan: glucólisis, ruta de las pentosas y ciclo de Krebs (Botha *et al.*, 1992). Aunque las mitocondrias de las semillas secas y recién embebidas son funcionales y estructuralmente deficientes, se acepta que en dichas estructuras se lleva a cabo la fosforilación oxidativa y que esta ruta metabólica es la fuente principal de ATP al inicio de la imbibición (Ehrenshaft y Brambl, 1990).

Desde el punto de vista molecular, la síntesis de proteínas es uno de los eventos más importantes y de ocurrencia temprana durante la germinación de las semillas, aún antes de la síntesis de RNAs mensajeros (mRNA) (Spiegel y Marcus, 1975; Sánchez de Jiménez y Aguilar, 1984; Bewley y Marcus, 1990). Hay muchos estudios donde se ha evidenciado que en embriones secos existe la presencia de muchos de los componentes requeridos para el proceso de síntesis de proteínas (Bewley y

Black, 1994). Sin embargo en esta etapa del desarrollo no hay polisomas formados, lo cual indica que no hay actividad de síntesis de proteínas (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1981).

Existe un gran debate sobre si la síntesis de proteínas se inicia al embeberse las semillas, sin que se requiera la síntesis de RNA. Se ha visto que a partir de la inbibición la cantidad de polisomas activos comienza a incrementarse rápidamente (Dommes y Van de Walle, 1990; Pramanick *et al.*, 1992). En esta etapa temprana la traducción tiene lugar a partir de un conjunto de mRNA muy específicos producidos durante la maduración de la semilla y que son almacenados en el eje embrionario en estado quiescente. Se ha considerado por numerosos autores que la traducción de estos mensajes ocurre de manera diferencial ya que algunos de ellos son traducidos en etapas muy tempranas de la germinación (indispensables), otros se traducen de manera más tardía, mientras que algunos no se traducen y son degradados (remanentes del proceso de maduración de la semilla) (Sánchez de Jiménez y Aguilar, 1984; Sánchez-Martínez *et al.*, 1986; Bewley y Marcus, 1990).

Al respecto, investigaciones en embriones de cereales indican que durante la germinación se sintetizan proteínas minutos después de ser colocados en agua a una temperatura apropiada. Esta síntesis se ha observado durante la primera hora de germinación en embriones de centeno y de 15 a 20 minutos en embriones de arroz, (Sen *et al.*, 1975).

Esta síntesis de proteínas casi inmediata durante las primeras horas de germinación se debe a la existencia de un control para la transcripción de genes que codifican para proteínas durante la maduración de las semillas, las cuales serán requeridas durante la germinación. Se ha visto que no hay una correlación entre el nivel del mRNA y la velocidad de transcripción, o entre la cantidad de proteína y el nivel del mensaje. Por ejemplo en embriones de semillas de soya las velocidades de transcripción son diferentes a los niveles de mRNAs, estas deferencias pueden ir de entre 100 a 10 000 veces (Walling *et al.*, 1986). Kuligowski (1991), trabajó con el

helecho *Marsilea vestita* y demostró que durante la embriogénesis temprana, la transcripción ocurre hasta la octava etapa celular. Esto podría explicar porque durante las primeras horas de la germinación los mRNA que fueron almacenados, se traducen para proveer de las proteínas necesarias durante este proceso.

Standart (1993), encontró en embriones de cebada con 4 a 5 horas de germinación, que la síntesis de proteínas ocurre principalmente en el escutelo, hay poca actividad en los componentes del embrión como son la raíz, el nudo o el coleóptilo. Después de este tiempo, se observó un incremento de dicha síntesis en todos los componentes del embrión, registrándose las tasas más altas en el escutelo y en la raíz en desarrollo. Esto se correlaciona con la observación de que la raíz normalmente penetra la cubierta de la semilla después de las 6 horas de imbibición.

Sánchez de Jiménez y colaboradores (1981), reporta que en maíz la síntesis de proteínas ocurre principalmente el eje embrionario, el cual tiene altos niveles de mRNA: sin embargo en el escutelo ocurre lo contrario

Cruz-Álvarez (1991), determina que la estabilidad de un mRNA de zeína en endospermo de semillas de maíz se incrementa de 3 a 5 veces en la línea B55-53, comparado con las líneas W23 o W64A. No obstante sólo se observó un incremento de 1.5 a 2 veces en la velocidad de traducción.

También se tienen antecedentes que en embriones tanto somáticos como cigóticos de alfalfa (*Medicago sativa* L.), se acumulan mRNAs en los cotiledones (Pramanik y Bewley, 1996) y de acuerdo a Gallie y colaboradores (1995), en muchas especies los mRNAs pueden encontrarse en pequeñas cantidades en semillas maduras y ser traducidos en etapas tempranas de la germinación, hasta el momento en que se sintetizan otros transcritos importantes para la germinación; esto implicaría que la expresión genética durante este proceso incluye la traducción de mRNAs almacenados en la semilla.

Se ha propuesto que existen dos clases de mRNAs en los embriones secos de semillas quiescentes:

1.- mRNAs residuales: Los que se sintetizan durante el desarrollo de la semilla y no se destruyen durante la maduración tardía y la desecación. Se piensa que no son esenciales para la germinación y son degradados al principio de la germinación.

2.- mRNAs almacenados o conservados: Estos son sintetizados durante el desarrollo, están disponibles y pueden ser traducidos después de la imbibición, a proteínas que tienen parte funcional en la germinación. De acuerdo a las proteínas que sintetizan, estos transcritos se pueden clasificar en dos grupos: i) enzimas esenciales del metabolismo intermediario y ii) proteínas esenciales para la culminación exitosa del proceso de germinación que termina con la elongación de la radícula.

Los mRNAs de las semillas secas se protegen de la degradación al ser almacenados en el núcleo y en el momento de la imbibición de la semilla, estos mRNAs son liberados a los sitios de síntesis cuando sean requeridos. En semillas arroz y trigo (Bewley y Black, 1994) se ha observado que la acumulación de mRNAs en partículas ribonucleoproteicas, permite que dichos transcritos se asocien con proteínas que los protegen de la degradación.

La transcripción de genes que se inicia después la traducción de los mensajes almacenados, es otro evento molecular temprano de la germinación (Bewley, 1997). Se considera que a medida que avanza el proceso germinativo, la síntesis de proteínas se hace más dependiente de la transcripción *de novo* de mRNA. Algunos de estos nuevos mensajes también pueden codificar las mismas proteínas que los mensajes almacenados, pero muchos codificarán productos diferentes, probablemente esenciales para la división celular y el crecimiento posterior (Guy y Black, 1998).

Dentro de las primeras dos horas una vez iniciada la imbibición, los embriones de centeno y trigo inician la síntesis de rRNA, los cuales se incorporan a los ribosomas

tan pronto como se sintetizan. La maduración de rRNA en embriones de centeno embebidos, también ocurre rápidamente. En estas especies, entre las 5 y 6 horas de imbibición, el procesamiento del rRNA está virtualmente completo y por tanto el embrión presenta grandes cantidades de rRNAs.

En embriones de arroz parece haber un período tardío entre la rehidratación y el inicio de la síntesis de rRNA. En esta especie la síntesis de tRNA se lleva a cabo aparentemente después de las 6 horas, la de rRNA entre las 6 y 12 horas, y la de ARNm entre 12 y 24 horas de germinación (Bhat *et al.*, 1975).

Los tRNAs y sus enzimas de aminoacilación se presentan en semillas secas y puede ser que estos dos tipos de moléculas existan en cantidades suficientes para mantener la síntesis de proteínas durante un período largo de la germinación.

En cebada la síntesis de los diferentes RNAs varía, ya que éstos se sintetizan desde la primera hora de germinación, incrementándose significativamente a partir de las doce horas, tiempo en que se inicia el crecimiento y desarrollo visibles del embrión (Bewley y Black, 1994).

Guilfoyle (1986), reporta que ejes secos de centeno, trigo y soya contienen RNA polimerasas dependientes de DNA. Estas enzimas se encuentran en altos niveles, de tal forma que pueden catalizar la síntesis de los diferentes tipos de RNAs. Sin embargo, en semillas se conoce muy poco acerca de estas polimerasas.

En maíz, conforme la semilla se acerca a su madurez fisiológica, el ciclo celular se detiene, y permanece en una especie de latencia hasta la entrada de agua a la semilla y el restablecimiento de las condiciones metabólicas apropiadas para su reinicio. Este reinicio de la proliferación celular se presenta únicamente en las zonas meristemáticas del embrión, y constituye un evento tardío que ocurre normalmente después del crecimiento por elongación celular y la protrusión de la radícula (Baiza *et al.*, 1989).

En estas semillas, gran parte de las células que constituyen al embrión se encuentran bloqueadas en la fase G_1 del ciclo celular. Datos recientes han demostrado que durante las 4 primeras horas de germinación, ocurre una sincronización celular en la fase G_1 , pero sólo parte de esta población entra a la fase S entre 12 y 15 horas después de iniciarse la imbibición. Se ha estimado que sólo el 20-30 % de todas las células entran a la fase S durante la etapa inicial de la germinación, pero la población que lo hace se encuentra altamente sincronizada (Georgieva *et al.*, 1994). La síntesis de DNA de tipo replicativo y la división celular son eventos tardíos durante la germinación. La expansión de la radícula dentro de la semilla ocurre inicialmente por elongación celular y la emergencia puede o no estar acompañada de división celular (Baiza *et al.*, 1989; Bewley y Black, 1994).

En conclusión, en la semillas de maíz la replicación inicia alrededor de las 15 horas de germinación, precediendo la protrusión de la radícula ya que la germinación no es producto de la división celular, lo cual sugiere que el papel de la replicación de DNA es garantizar el crecimiento y desarrollo de los tejidos en una etapa pos-germinativa (Cruz-García *et al.*, 1998).

Estas características de las semillas permiten que la germinación sea un modelo apropiado para el estudio de la reactivación y el control de la proliferación celular en vegetales, es decir, permite investigar los mecanismos que regulan la reactivación del metabolismo a partir de un estado quiescente de la semilla hasta un estado metabólico totalmente restaurado, por otra parte desde un punto de vista molecular permite elucidar cuales son los factores que controlan el proceso de proliferación celular en plantas.

2. 2.- Características Generales del Ciclo Celular

El ciclo de división celular en eucariontes constituye una serie de procesos interrelacionados que se han desarrollado para crear dos células hijas genéticamente idénticas de una célula madre. La función principal de este ciclo es la replicación fiel del genoma y su empaquetamiento en los cromosomas.

La división celular es una de las propiedades fundamentales de la célula y se realiza a través de eventos específicos que se encuentran comprendidos en lo que se conoce como ciclo celular. En este mecanismo se involucran aspectos como: crecimiento celular, duplicación de DNA y división celular.

El ciclo de vida de una célula comprende dos ciclos que interactúan entre sí. El ciclo cromosómico, que consiste en la duplicación y la distribución de los cromosomas y el ciclo de crecimiento, que comprende la duplicación en el tamaño de la célula con todos sus componentes (Mitchison, 1971).

Los procesos involucrados en el ciclo celular pueden distinguirse estructural y bioquímicamente en fases de actividad reconocidas como periodos del ciclo celular. En 1953, Howard y Pelec propusieron cuatro fases que bien podrían considerarse como una fase de duplicación del material genético o fase **S (síntesis)** y una fase de repartición equitativa de éste entre las dos células hijas denominada **M**, separadas ambas por dos fases, **G₁** y **G₂**. De esta forma, la interfase está compuesta de **G₁**, **S** y **G₂** y comprende normalmente 90% o más del tiempo total de ciclo celular. Investigaciones al respecto proponen que cuando en una célula se ha iniciado el camino hacia la proliferación, la entrada a la fase **G₁** se da a partir de un estado celular denominada fase **G₀** que es un estado de reposo total, en el cual la célula no se divide. Sin embargo se ha demostrado que esta fase mantiene altos niveles de viabilidad por largos periodos de tiempo (Yanishevsky y Stein, 1981)

La duración promedio del ciclo celular varía de un tipo celular a otro, y aún dentro del mismo tipo celular, esto se debe a que las células se dividen a diferentes velocidades. La diferencia principal entre las células que se dividen lenta o rápidamente, está dada por la duración o el tiempo en que la célula permanezca en la fase G_1 (Cheatham *et al.*, 1995). Por otro lado, el tiempo que tarda el ciclo celular a partir del inicio de la fase S hasta la mitosis es constante, independientemente de la velocidad de división de la célula (Baserga, 1985).

2.2.1.- Fases de Ciclo Celular

Fase G_0

Se ha definido como un estado en el que las células se encuentran quiescentes o durmientes. En esta fase se sintetizan algunas variantes de histonas (Wu *et al.*, 1982), el complemento de los ribosomas y el contenido de mRNAs es diferente. Además, se ha detectado que el grado de condensación de la cromatina es mayor en esta etapa, e incluso se ha propuesto la existencia de una fase G_{02} (Sans *et al.*, 1980).

Para que las células salgan de esta fase se requiere la síntesis de diferentes polipéptidos, por ejemplo, una proteína de 29 kDa (Pledger *et al.*, 1982), dos polipéptidos nucleares (O'Farrell y Dixon, 1986) y la síntesis de la proteína p53 (Mercer *et al.*, 1984), así como la fosforilación de algunas proteínas (Chambard *et al.*, 1983).

En condiciones específicas las células en fase G_0 requieren de la adición de componentes exógenos como factores de crecimiento o bien nutrientes en el medio de cultivo para propiciar el paso a la siguiente etapa. Este paso requiere de un tiempo extra ya que esencialmente las células necesitan reactivar su maquinaria de

síntesis de proteínas debido a que G_0 es un estado celular discreto y separado, con un patrón metabólico único (Baiza *et al.*, 1989).

Fase G_1

En algunos casos, G_1 es la diferencia en tiempo entre el ciclo cromosómico y el ciclo de división celular, mientras que en otros G_1 involucra procesos esenciales específicos para el inicio de la fase **S** (Epifanova *et al.*, 1986).

La duración de esta etapa es muy variable. Existen líneas celulares (células en las primeras divisiones de embriones de diversas especies vegetales) las cuales no tienen un periodo G_1 que se pueda detectar fácilmente (Hunter, 1993).

Dentro de la fase G_1 se encuentra una etapa temprana en la que se revisa el estado metabólico general de la célula, antes de avanzar hacia una etapa tardía en la cual se presentan mecanismos reguladores que permitirán el inicio de la duplicación de DNA. Esto implica que en dicha fase, los eventos tempranos están separados de los tardíos por el punto de restricción **R**; ya que este punto marca el límite después del cual la célula está comprometida a completar íntegramente el ciclo celular.

En general una célula en división puede abandonar el ciclo celular hacia un estado de desarrollo vegetativo o de diferenciación, y la determinación ocurre en la fase G_1 . Al parecer, el punto de restricción en esta fase funciona como un punto de bifurcación: antes de consumir la ejecución de **R** la célula puede emprender el camino hacia diferentes estados celulares como la quiescencia, la diferenciación o la meiosis; mientras que la conclusión de **R** obliga a la célula a cumplir con un riguroso programa de división celular.

La determinación del camino que una célula debe seguir, está regulado en parte por diversos factores externos como hormonas, circunstancias nutricionales, así como por diferentes tipos de estrés; sin embargo, estos factores afectan a la fase G_1 antes

del punto **R**, por lo que ya no tienen efectos reguladores cuando este punto se ha completado. En células animales, el punto **R** se localiza 2 horas antes de la fase **S**; ya que primero se requieren de transcripción, una rápida síntesis de proteínas y un factor de crecimiento para iniciar la síntesis de DNA.

Investigaciones al respecto indican que la síntesis *de novo* de varias enzimas como la timidilato sintetasa y la timidina cinasa ocurre después del punto **R** y aparentemente está bajo el mismo control que el inicio de la síntesis del DNA (Pardee, 1987).

En general se puede decir que la fase **G₁** se encuentra entre el punto **R** y el inicio de la fase **S** y en este periodo se organiza la maquinaria para la síntesis del DNA; una vez que termina esta fase, las demás continúan independientemente de los controles fisiológicos externos.

Durante la fase **G₁** se inicia el crecimiento de la célula, lo cual se caracteriza por un aumento en el tamaño del núcleo, el número de ribosomas, el metabolismo del rRNA, la síntesis de otros tipos de RNAs y en los niveles de las diferentes polimerasas. También se incrementa la actividad de síntesis de proteínas, entre las que se encuentran: la calmodulina, la ornitina descarboxilasa (cuyos mRNAs alcanzan altos niveles en esta fase), la proteína p53, proteínas citoplásmicas, así como diferentes enzimas que intervienen en la duplicación de DNA, síntesis de histonas y la fosforilación de la histona H₁

Durante **G₁** hay cambios muy evidentes en la morfología de la célula, los cuales continúan durante todo el ciclo celular.

Fase S

En esta fase se realiza la duplicación del genoma y su duración parece estar determinada por el número de sitios de iniciación que operan. Existe un orden

temporal de duplicación dentro de los diferentes segmentos de un solo cromosoma, el cual se conserva a través de las divisiones sucesivas. Se sabe que en células de eucariontes el punto de inicio para la duplicación es fijo y constante y siempre procede con el mismo orden. A su vez, los patrones de duplicación secuencial se correlacionan con el contenido de bases, ya que las regiones eucromáticas ricas en G-C se duplican durante la **S** temprana y aquellas heterocromáticas ricas en A-T lo hacen durante la **S** tardía (Waterborg y Shall, 1985).

La maduración del DNA cromosómico es un proceso único en eucariontes. Se ha demostrado que la cantidad de timidina endógena en células en **S** es un factor responsable de dicha maduración (Schvartzman *et al.*, 1984).

Las enzimas necesarias para la síntesis de DNA son diversas y algunas como la timidina kinasa, ribonucleótido reductasa y DNA polimerasa incrementan sus niveles en el límite **G₁/S**.

Por otra parte la síntesis de histonas (con algunas excepciones) está restringida a la fase **S** y sólo durante esta etapa las secuencias del mRNA para histonas se encuentran en cantidades significativas en el núcleo y en el citoplasma; lo cual implica que hay una síntesis activa de dichos mRNA. Por otra parte se ha demostrado que la expresión de genes para histonas depende de la entrada de las células a la fase **S**; además se tienen reportes que indican que la fosforilación de histonas es un proceso continuo, relacionado con la síntesis de DNA durante la fase **S**, (Marks *et al.*, 1973) y con la condensación cromosómica (Gurley *et al.*, 1978).

Fase G₂

Esta fase representa el tiempo que la célula necesita para sintetizar los elementos necesarios para la condensación cromosómica y la formación del aparato mitótico.

El paso de células a través de G_2 puede bloquearse en diferentes tipos de células de animales y vegetales, lo que demuestra que esta fase presenta un punto en el cual el ciclo celular puede ser interrumpido sin alterar la viabilidad de la célula.

Existen reportes que han confirmado que los inhibidores de la síntesis de RNA y proteínas detienen la progresión de las células en esta fase, ya que la transcripción de RNA se requiere al menos dentro de G_2 medio y tardío o incluso en la profase temprana (Baserga, 1985). También en esta fase se sintetizan proteínas específicas para la condensación cromosómica, formación y funcionamiento del aparato mitótico, lo cual es necesario para que la célula entre en división. A estas proteínas se les denominó "factores mitóticos" y se caracterizan por tener afinidad por la cromatina y son del tipo de las no histonas.

Existen genes que deben expresarse para la progresión a través de la fase G_2 , dicha expresión genética es una respuesta a señales que indican el cumplimiento de requisitos para la mitosis; tal es el caso de la fosforilación de proteínas para que se pueda formar el huso acromático, la condensación cromosómica y la entrada de los núcleos a mitosis.

Bajo ciertas condiciones experimentales, en células vegetales se ha logrado acortar la fase G_2 hasta en un 70 % de su duración, acompañado de un alargamiento de la fase S precedente. Esta relación entre alargamiento de S y acortamiento de G_2 sugiere que los ciclos cromosómico y de crecimiento están interconectados en la fase G_2 , y esto es lo que se ha propuesto para vegetales (Navarrete *et al.*, 1983; Cuadrado *et al.*, 1985).

La duración de la fase G_2 puede estar regulada por el tamaño de la célula, y este tipo de control opera durante el crecimiento de la célula, lo cual contribuye a mantener la variabilidad del tamaño celular (Navarrete *et al.*, 1987),.

Mitosis

Una vez terminada la fase G_2 , las células entran a la fase de **mitosis**, en donde sufren grandes cambios estructurales. En dicha fase el aparato mitótico asegura la separación equitativa de los cromosomas, también, se requiere de factores relacionados con la condensación y descondensación de la cromatina y con la retracción y reestructuración de la envoltura nuclear.

La tasa de síntesis de proteínas se reduce a un 20 % durante la mitosis con respecto a la tasa que se detecta en células en interfase. Aparentemente la disminución se debe a una inhibición en la iniciación de la traducción, de tal manera que los ribosomas no pueden unirse al mRNA. Sin embargo las proteínas cromosómicas no histonas son una excepción, ya que su síntesis continúa durante la mitosis en una proporción similar a la de interfase (Baserga, 1985). Esta reducción en la transcripción probablemente refleja dos cambios que pueden seguirse morfológicamente: la condensación cromosómica, relacionada con la inactivación de la cromatina y la desaparición del nucleolo, indicando la suspensión de la síntesis del rRNA.

Es importante mencionar que durante la **mitosis**, la histona H_1 es fosforilada adicionalmente, mientras que la histona H_3 se fosforila por primera vez durante el ciclo celular (Gurley *et al.*, 1978).

In vivo la mayoría de las células quiescentes tienen un contenido de DNA correspondiente a la fase G_1 . En cultivo, las células normales se detienen en esta fase bajo una variedad de condiciones que impiden o disminuyen la proliferación, tales como: privación de nutrientes, alta densidad celular y parcial inhibición de la síntesis de proteínas. Como se mencionó anteriormente este punto de detención se conoce como punto de restricción o punto R (Pardee, 1987). Las células regresan al estado de proliferación una vez que se les proporciona un medio de cultivo completo.

2.2.2.- Ciclo Celular en Plantas

El análisis del ciclo celular y su regulación en plantas superiores no está tan avanzado como en animales y microorganismos.

Ensayos inmunológicos utilizando un anticuerpo contra p34^{cdc2}, indican la presencia de una proteína de 34 kDa en el alga verde *Chlamidomona*, así como en *Arabidopsis* y avena (John y Lee, 1989). Esta fue la primera evidencia de la existencia de un homólogo de p34^{cdc2} en plantas superiores. Más recientemente, se han identificado y aislado proteínas homólogas en maíz, alfalfa, chícharo, zanahoria (Colasanti *et al.*, 1991; Feiler y Jacobs, 1990; Ferreira *et al.*, 1991; Hirt *et al.*, 1991), las cuales se catalogaron como homólogos funcionales.

También se han realizado estudios para determinar en qué momento ocurre la división celular durante la germinación y se ha visto que en semillas de lechuga tanto la división como el alargamiento celular se llevan a cabo entre las 12 y las 14 horas después de la imbibición.

En semillas de maíz la mayor parte de las células embrionarias están bloqueadas en la fase **G₁** del ciclo celular (Deltour y Jacquard, 1974), y aún después de 12 horas del inicio de la imbibición, la mayoría de las células (75 %) permanecen en fase **G₁**. Aún cuando un porcentaje importante de células se empieza a mover hacia la fase **S**, a este nivel no se detectan células en mitosis (Baíza *et al.*, 1989; Georgieva *et al.*, 1994a).

Esto implica que en semillas de maíz el alargamiento precede a la división celular. Sin embargo en otras semillas, la diferencia en tiempo entre la división y el alargamiento es cercana, pero no existen evidencias fuertes que confirmen que la división anteceda al alargamiento (Vázquez-Ramos, 2000).

Por otra parte ya es bien sabido que los reguladores de crecimiento vegetal como auxinas y citocininas intervienen en el ciclo celular, por lo que tienen una función importante en la regulación del desarrollo y crecimiento vegetal (Grost *et al.*, 1991). En maíz se han hecho estudios del ciclo celular durante la germinación, utilizando marcadores proteicos y fitorreguladores como citocininas y ácido abscísico (ABA), lo cual ha permitido determinar que la semilla seca cuenta con niveles basales de proteínas tales como: DNA polimerasas, la cinasa p34^{cdc2}, ciclina B, ciclina C, cinasa cdk, proteína p53 y E2F, y los niveles de estas proteínas varía durante la germinación (Vázquez-Ramos, 2000).

Al determinar los niveles de citocininas (zeatina y ribosil-zeatina) durante el ciclo celular en células de tabaco, se encontró que su cantidad y actividad aumenta de cuatro a cinco veces entre las fases **G₂** y **M**. Debido a que este incremento no se presenta en otras fases del ciclo celular, se piensa que las citocininas aplicadas exógenamente ejercen sus efectos específicos en la fase **G₂**. Sin embargo, aunque ya existen algunos avances relevantes, todavía no se sabe con claridad como es que los reguladores de crecimiento participan en la regulación del ciclo celular en plantas.

2.2.3. Regulación del Ciclo Celular

En ciertas condiciones, las células no son estimulables y permanecen en un estado de reposo o **G₀**. Para salir de este estado se requiere que sean estimuladas por factores de crecimiento.

Por otra parte la síntesis de macromoléculas como DNA, RNA y proteínas, está regulada de un modo característico durante el ciclo celular. El DNA y las histonas componentes de la cromatina se sintetizan solamente durante la fase **S**. El RNA y las proteínas citoplásmicas se sintetizan continuamente durante toda la interfase. Sin embargo, durante la mitosis disminuye dicha síntesis.

Por otra parte la regulación de la proliferación celular se ha atribuido a la etapa G_1 del ciclo celular (Jones *et al.*, 1999). En los últimos años se ha investigado la importancia de $p70^{S6k}$ durante mitosis. Al respecto se determinó que $p70^{S6k}$ tiene una función esencial durante G_1 , ya que fosforila a la proteína S6 de la subunidad 40 S del ribosoma y esto promueve la síntesis de proteínas durante esta fase, lo cual, es uno de los requisitos determinantes para que la célula pase a la fase **S**. Así entonces, $p70^{S6k}$ además de formar parte de una vía de transducción de señales, también, es un factor que regula la progresión del ciclo celular (Lane *et al.*, 1993).

Estudios recientes han demostrado que la rapamicina inhibe la actividad de $p70^{S6k}$ y sus regiones amino y carboxilo terminales también participan en su regulación (Cheatham *et al.*, 1995). La actividad de $p70^{S6k}$ se incrementa cuando se adicionan factores de crecimiento mediante un mecanismo en el cual participan las proteínas G (Chou y Blenis, 1996; Takuwa *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 1999).

La progresión de las fases del ciclo celular requiere de la acción de diversos factores reguladores que rigen el paso y el tiempo por las diferentes etapas. En estos últimos años, las investigaciones se han concentrado en el estudio de eventos rápidos post-traduccionales, en particular fosforilaciones y desfosforilaciones de proteínas como: ciclinas (Evans *et al.*, 1983), cinasa dependiente de ciclinas (cdk) y los complejos ciclina/cdk (Pines, 1993; Hutchison y Glover, 1995), debido a que son los mecanismos principales que controlan eventos importantes en la interfase y en mitosis.

Estas investigaciones, se han realizado principalmente en *Schizosaccharomyces pombe* (Nurse, 1990) y datos recientes han mostrado la existencia de un mecanismo universal de control común a todas las células de eucariontes. Cuando se determinó que la actividad de las cdks se regula parcialmente por su unión con ciclinas. Pudiendo actuar estas últimas como las subunidades reguladoras que dirigen a la cinasa a sustratos particulares o a compartimientos intracelulares diferentes (Norbury *et al.*, 1991). Las ciclinas B regulan a la cdk1 ($p34^{cdc2}$) en un complejo conocido como

MPF (Mitosis Promoting Factor), cuya actividad se ha descrito como el punto de control maestro para el avance del ciclo celular en la transición **G₂/M**. Una característica de la subunidad catalítica del complejo es un alto grado de conservación entre especies filogenéticamente distantes y el hecho de que la actividad de la cinasa de la fase **M** sea regulada por fosforilación y desfosforilación ha enfocado la atención en un mecanismo de cascada de cinasas y fosfatasas que parecen ser claves en el ciclo celular. Por otra parte las ciclinas A se asocian a cdk1 y cdk2, modulando las funciones de éstas en la fase **S** y en la transición **G₂/M**. Estas actividades, junto con otros factores proporcionan un balance de inductores y activadores para la división celular (Vázquez- Ramos, 2000).

Por otra parte se ha comprobado que los controles regulatorios básicos de la división celular están evolutivamente conservados en plantas y dada la facilidad de generar plantas transgénicas en comparación con la posibilidad de obtener animales transgénicos, las plantas ofrecen un sistema experimental excelente para el estudio del control de la división celular durante el desarrollo de un organismo multicelular.

En resumen existen factores que controlan la proliferación celular, tales como: ATP, AMPc, GMPc, tamaño nuclear y celular, síntesis y cantidad de rRNA, fosforilación de proteínas ribosomales, fosforilación y desfosforilación de histonas, síntesis o fosforilación de no histonas y la presencia de proteínas catalogadas como factores de crecimiento (IGF-I e IGF-II). Todas estas investigaciones se han llevado a cabo en células animales, y aunque en los últimos años la investigación en plantas ha ido en aumento, el avance es hasta el momento muy poco, comparado con los estudios en animales.

2.3.- Aspectos Generales en la Síntesis de Proteínas en Eucariontes

2.3.1.- Características de los Ribosomas en Eucariontes

La función de los ribosomas en todos los organismos eucariontes consiste en ensamblar a los aminoácidos por medio de enlaces peptídicos para formar moléculas proteicas, empleando mRNA como molde.

Los ribosomas constituyen uno de los complejos multimoléculares más grandes presentes en los organismos vivos, y es ahí en donde se lleva a cabo la traducción de los mRNAs. En eucariontes estas estructuras están formadas por dos subunidades que son: la subunidad grande (60S), constituida aproximadamente por 45 proteínas diferentes y tres moléculas de rRNA de 5S, 5.8S y 28S, y la subunidad pequeña (40S), formada por un rRNA de 18S y aproximadamente 30 proteínas diferentes, entre las que se encuentra la proteína S6 localizada en la interfase entre las dos subunidades del ribosoma completo, al parecer haciendo contacto con el rRNA 28S de la subunidad grande. Es en esta región es donde ocurren los procesos elementales para la traducción, tales como: la unión del mRNA y del aminoacil-tRNA y la asociación momentánea de algunos de los factores de iniciación y elongación (Nygard y Nilsson, 1990).

En los últimos años se han realizado muchas investigaciones tratando de abordar diferentes aspectos de la biología del ribosoma tales como: estructura, función durante la síntesis de proteínas, síntesis de sus componentes y la regulación de la síntesis de los mismos. Uno de los temas particularmente interesantes es este último, es decir, cómo la célula es capaz de producir cantidades balanceadas de tRNA y de los componentes proteínicos del ribosoma, y como puede cambiar coordinadamente la producción de todos ellos para ajustar la velocidad de la síntesis de ribosomas, a las necesidades de las células.

Se conoce más acerca de la regulación de la síntesis de los ribosomas en organismos procariontes como *E. coli*, sin embargo, en los sistemas eucariontes se conoce menos, ya que presentan un panorama más complejo en donde varios tipos de control operan simultáneamente a diferentes niveles para responder a señales internas y externas en las células (Pierandrei-Amaldi y Amaldi, 1994).

La síntesis de proteínas es parte integral de la expresión genética y contribuye en la modulación de la activación de genes específicos. Dicho proceso se divide en tres fases: **iniciación**, **elongación** y **terminación**. Cada una de estas fases está caracterizada por una secuencia de eventos que ocurren en la traducción de un RNA mensajero específico y por la participación de diversos factores llamados factores de iniciación (eIF), de elongación (eEF) y de terminación (eRF), los cuales interactúan transitoriamente con los ribosomas, los mRNAs y el aminoacil-tRNA (Merrick y Hershey, 1996).

En organismos eucariontes el número de factores involucrados en la síntesis de proteínas es mucho mayor que en el sistema procarionte, lo cual indica una mayor complejidad en la vía de traducción y la regulación de la misma (Gingras *et al.*, 1999).

Durante el proceso de iniciación ocurre el reconocimiento del RNA mensajero por parte del complejo de traducción. Como primer paso se produce la interacción entre la subunidad ribosomal 40S y los factores eIF-3 y eIF1A; el tRNA portador del primer aminoácido (tRNA-Met) y el factor eIF-2 se unen para formar un complejo el cual interactúa con el extremo 5' del mRNA previamente reconocido por los factores eIF-4 (4F, 4A y 4B); con ayuda de la actividad de helicasa de los factores 4A y 4B el complejo 43S realiza la búsqueda en la región no traducible 5'UTR del mRNA hasta encontrar el codón de iniciación AUG en el contexto apropiado (Kozak, 1991); posteriormente ocurre la liberación de los factores de iniciación y la unión de la subunidad ribosomal 60S para formar el complejo de iniciación 80S (Pain, 1996).

Recientemente se ha demostrado que durante el proceso de iniciación de la traducción en eucariontes hay un acercamiento entre el extremo 5' (7mGpppG) y el 3' (cola de poliA) del mRNA, implicando una interacción estrecha entre los factores y proteínas que reconocen estos extremos (Tarun *et al.*, 1997; Gallie, 1998).

La fase de elongación ha sido poco estudiada en organismos eucariontes (Merrick y Hershey, 1996). Se considera que ocurre de manera similar a lo que se ha descrito para organismos procariontes, con la participación de los correspondientes factores de elongación eucarióticos eEF1A y 1B y el eEF2 (Merrick, 1992). Esta fase de elongación involucra la adición secuencial de aminoácidos con la formación de enlaces peptídicos, mediante una actividad peptidil transferasa, que puede ser atribuida a una actividad catalítica del rRNA y/o a un grupo de fosfoproteínas ácidas de la subunidad 60S (Möller, 1990; Remacha *et al.*, 1995).

Esta fase se describe como un proceso cíclico, ya que los aminoácidos van siendo adicionados uno por uno al extremo C-terminal de la proteína naciente, lo cual requiere de un gasto importante de energía debido a que el proceso es muy rápido. Se ha estimado que en eucariontes se incorporan más de 6 aminoácidos por segundo y en bacterias se incorporan de quince a dieciocho aminoácidos por segundo (Odom *et al.*, 1990). Es importante resaltar que las dos características claves de este proceso son: la alta fidelidad y la procesividad (Merrick, 1992).

La fase de terminación ocurre cuando aparece el codón de terminación (UAA, UAG o UGA) que no puede ser reconocido por ningún tRNA. En bacteria, estos codones son reconocidos por los factores de terminación (RF1, RF2, RF3 y RF4) y se colocan en lo que se conoce como sitio A del ribosoma. El factor de liberación eRF promueve la ruptura del peptidil-tRNA, liberando a la proteína. El GTP enlazado al factor eRF reconoce al codón de terminación e induce la hidrólisis del aminoacil enlazado, conjuntamente con la hidrólisis del GTP. Finalmente se liberan el péptido, el factor eRF y GDP (Browning *et al.*, 1990).

Al respecto, actualmente se sabe que en organismos eucariontes, se han encontrado sólo dos factores de terminación denominados eRF1 y eRF3, de los cuales eRF1 es capaz de reconocer los tres codones de terminación y eRF3 tiene actividad de GTPasa dependiente de la formación del complejo eRF1/eRF3 (Merkulova *et al.*, 1999).

2.3.2. Mecanismos de Control Traduccional

La expresión de los genes se encuentra regulada tanto a nivel transcripcional como postranscripcional (Tijan, 1995; Hershey, 1991). La regulación de la síntesis proteica está muy estudiada en eucariontes a través de múltiples mecanismos dirigidos a los diferentes componentes y pasos del proceso, siendo la etapa más importante dentro de esta regulación la de iniciación (Hinnebusch, 1994; Pause *et al.*, 1994; Address *et al.*, 1997; Bushell *et al.*, 2000).

En la última década se han realizado numerosas investigaciones relacionadas con los eventos de control traduccional a nivel de iniciación (Mathews *et al.*, 1996; Amaldi, 1997; Gingras *et al.*, 1999; Fumagalli y Thomas, 2000; Bushell *et al.*, 2000; Raught *et al.*, 2000; Dinkova *et al.*, 2000), lo que ha permitido reconocer que este tipo de regulación juega un papel fundamental en los patrones de expresión genética durante el crecimiento, desarrollo y diferenciación celular.

La síntesis de proteínas depende tanto de la maquinaria de traducción como de la cantidad y estructura del mRNA, ya que la cantidad de ribosomas es un indicio de la capacidad de la célula para sintetizar proteína. Por ejemplo el hígado y cerebro, contienen grandes cantidades de ribosomas y factores proteicos solubles asociados. Cuando se adicionan nutrientes, la mayoría de los ribosomas se incorporan al proceso de traducción y como consecuencia la síntesis proteica se incrementa.

Todo esto parecería indicar que el nivel de ribosomas limita la síntesis de proteínas, sin embargo, horas más tarde solamente una fracción de ribosomas está funcionando y esto implica que existen otros componentes que pueden ser los limitantes. (Pain, 1996).

La eficiencia de traducción de un mRNA dado, depende de los elementos estructurales propios de sus regiones 5' y 3' no traducibles (5'y 3'UTR), incluso de su región codificante (elementos cis) que serán reconocidos por factores trans (Pain, 1996; Gingras *et al.*, 1999). Dentro de la región 5'UTR, los elementos importantes son la estructura CAP (Sonenberg, 1996; Raugth *et al.*, 2000), la presencia de estructuras secundarias y la longitud de esta región (Kozak, 1991), la presencia de codones de iniciación "río arriba" de la región codificante (Geballe, 1996) y la presencia de sitios de entrada interna del ribosoma (IRES), característicos de muchos RNA virales (Paestova *et al.*, 1996). Los sitios IRES son capaces de promover la traducción cap-independiente de los RNA mensajeros obviando la participación del factor eIF4E que se une al extremo 5'CAP (Gossert *et al.*, 2000).

Este mecanismo de regulación es el responsable de que durante la infección viral se traduzcan preferencialmente los RNA virales, apagando la traducción de la mayoría de los mRNA celulares que son cap-dependientes. Recientemente se ha descubierto que también algunos mRNA eucarióticos poseen este tipo de estructura y por tanto pueden ser traducidos por una vía cap-independiente (Gan *et al.*, 1998; Stoneley *et al.*, 2000).

Dentro de la región 3'UTR se han encontrado múltiples elementos "cis" que participan en la estabilidad y localización citoplásmica de los mRNAs como mecanismo para su control traduccional (Spirin, 1996; Sacchs *et al.*, 1997; Gallie, 1998). En esta región otro factor importante es la poliadenilación, común a un gran número de mRNA eucarióticos, la cual juega un papel crucial en la estabilización de los mensajes y su movilización a polisomas para su traducción (Stutz *et al.*, 1998).

Además, la cola de poliA localizada en el extremo 3' actúa de manera sinérgica con el extremo 5'CAP para incrementar la eficiencia traduccional del rRNA (Sacchs *et al.*, 1997; Gallie, 1998). Dicha interacción está determinada por la presencia de las proteínas afines a poliA (PABP) que interactúan con algunos de los factores de iniciación presentes en el extremo 5' del mensaje, especialmente con el factor eIF-4G (Hornstein *et al.*, 1999). Existen ejemplos específicos durante el desarrollo de algunos organismos, que demuestran cómo el incremento en la longitud de la cola de poliA es capaz de determinar el momento en el cual un mensaje será traducido (Stutz *et al.*, 1998).

La fosforilación/desfosforilación de numerosos componentes proteicos que forman parte de la maquinaria traduccional juegan un papel importante para controlar la velocidad de síntesis de proteínas en células de mamíferos. Al respecto se han identificado fosfoproteínas tales como: trece subunidades de los factores de iniciación; tres de las cuatro proteínas que comprenden los factores de elongación, proteínas ribosomales y un gran número de aminoacil-tRNA sintetasas.

Estudios recientes demuestran que la fosforilación de algunos de estos componentes se correlaciona con la inhibición de la traducción, mientras que la fosforilación de otros puede causar su estimulación.

Investigaciones en esta área están enfocadas en: la identificación de los sitios precisos de fosforilación *in vivo* y las cinasas y fosfatasa comprendidas en dicho proceso; en demostrar *in vitro* los cambios de actividad en las proteínas debido a la fosforilación y en elucidar como se controla la fosforilación. Para finalmente determinar si dicha fosforilación realmente causa modulación en la velocidad de traducción *in vivo*.

Por otra parte se ha visto que el paso limitante en la síntesis de proteínas en la mayoría de las condiciones fisiológicas se presenta en la fase de iniciación, al respecto se ha descrito que las alteraciones en la velocidad de iniciación se reflejan

en el tamaño de los polisomas (Pain, 1996), el cual es directamente proporcional a la velocidad de iniciación e inversamente proporcional a la velocidad de elongación (Thomas *et al.*, 1982).

Los factores de iniciación son importantes en la regulación traduccional, muchos de estos van a interactuar con los elementos cis del mRNA. Trabajos recientes han descrito que un mecanismo de regulación de la traducción muy conocido, es la fosforilación/desfosforilación de los factores eIF-3, eIF-4A, eIF-4E, eIF-4G que median la unión entre las subunidades 40S y mRNA y son capaces de modular la velocidad de síntesis de proteínas y el crecimiento celular (Gingras *et al.*, 1999).

La fosforilación de la mayoría de estos factores se encuentra regulada por una cascada de transducción de señales característica de diferentes tipos de estímulos (Proud, 1992; Kleijn *et al.*, 1996). Como ejemplo, tenemos la fosforilación de eIF-2, lo cual tiene un papel central en el control traduccional, sobre todo, para la reiniciación de la traducción mediante la interacción de una de sus subunidades (eIF2 α) con el factor intercambiador de GDP/GTP: eIF-2B (Yang y Hinnebush, 1996). También existen numerosos estudios que evidencian la regulación de la traducción por fosforilación de varios factores de iniciación, como respuesta a infección viral (Kleijn *et al.*, 1996), disminución o ayuno de aminoácidos (Nave *et al.*, 1999). También estos factores de iniciación pueden ser modificados por acción de proteasas (Lamphear *et al.*, 1995), o por interacción con proteínas inhibitoras (Lawrence y Abraham, 1997), lo cual provoca que disminuya su disponibilidad para participar en la maquinaria de síntesis de proteínas. Por otra parte se ha visto que como respuesta a diferentes estímulos, los factores de elongación también pueden estar regulados por fosforilación (Nair y Palfrey, 1996; Remacha *et al.*, 1995).

Otro mecanismo de control traduccional es la fosforilación de proteínas ribosomales, particularmente la fosforilación de la pr S6 de la subunidad 40S. La fosforilación de esta proteína estimula la traducción de mensajes que contienen una secuencia específica de polipirimidinas en su región 5'UTR (mensajes 5'TOP), incluyendo

principalmente a los mRNA correspondientes a proteínas ribosomales y factores de elongación (Jefferies y Thomas, 1996) o de iniciación (Dinkova *et al.*, 2000).

De esta manera se ha propuesto que la fosforilación de 5 posibles sitios en la proteína S6, puede servir para inducir o estabilizar cambios conformacionales en el ribosoma que permitan una asociación diferencial con proteínas o mRNAs.

Alternativamente, dada su localización, formas diferencialmente fosforiladas de S6 pueden interactuar directamente con mRNAs o con sus proteínas asociadas y activar la de traducción de mRNAs específicos (Stewart y Thomas, 1994). Estudios recientes han demostrado que los mensajes 5'TOP se traducen normalmente a bajos niveles y que su expresión a nivel de síntesis de proteínas aumenta durante la estimulación del crecimiento celular debido a la fosforilación de la pr S6 (Meyuhas *et al.*, 1996; Fumagalli y Thomas, 2000).

La cinasa responsable de la fosforilación de la pr S6 en células de mamíferos es la pp70^{S6k} (Proud, 1996; Pullen y Thomas, 1997). Evidencias a favor de esto indican que pp70^{S6k} fosforila a la subunidad 40S más eficientemente que pp90^{S6k} y en forma más contundente, que la rapamicina, que es un inmunosupresor que bloquea la actividad de pp70^{S6k}, inhibe la fosforilación de la pr S6 en respuesta a varios estímulos en células intactas (Cheatham *et al.*, 1995; Jefferies y Thomas, 1996; Takuwa *et al.*, 1999; Valentinis *et al.*, 2000).

Por otro lado, en la subunidad 60S, se han encontrado otras proteínas que son fosforilables, las proteínas ácidas, también llamadas P1 y P2. La proteína P0 también se caracterizó como fosfoproteína y está inmunológicamente relacionada con las proteínas P1 y P2. Estas tres proteínas, conocidas como las proteínas P se encuentran fosforiladas en todos los organismos eucariontes estudiados incluyendo plantas (Aguilar *et al.*, 1998), y son componentes del tallo del ribosoma que es una protuberancia lateral identificada en la subunidad grande. Esta estructura tiene una función relevante en la síntesis de proteínas, ya que participa en la interacción de

algunos factores de elongación con el ribosoma. Los niveles de fosforilación del tallo pueden afectar el proceso de traducción, pero no todos los mRNA son igualmente sensibles a este efecto (Ballesta *et al.*, 1999).

Estos procesos de fosforilación/desfosforilación parecen ser un mecanismo que prevalece en el control traduccional durante la síntesis de proteínas en células de mamíferos (Fumagalli y Thomas, 2000; Allan *et al.*, 2001). Sin embargo, investigaciones en otros sistemas eucariontes, desde levaduras (Altmann *et al.*, 1997) hasta plantas (Bailey-Serres, 1999), demuestran que muchos de estos mecanismos se han conservado a lo largo de la evolución.

Gracias al conocimiento de las secuencias de aminoácidos de los factores de traducción en diferentes especies se han podido hacer comparaciones en cuanto a su actividad y regulación (Browning *et al.*, 1998). Estos factores presentan homología en los dominios correspondientes a la actividad, sin embargo su regulación no es siempre la misma.

2.3.3- Síntesis de Proteínas en Plantas y su Regulación

Como se mencionó anteriormente el proceso de síntesis de proteínas es sumamente complejo ya que tanto en sistemas procariontes como en eucariontes están involucradas un gran número de macromoléculas (factores de iniciación, elongación y terminación, ribosomas, mRNAs, aminoacil-sintetasas y tRNAs). Tanto el mecanismo de síntesis de proteínas como las macromoléculas que intervienen son similares en ambos sistemas, sin embargo en la naturaleza existen organismos cuya síntesis proteica presenta características muy específicas (Browning, 1996).

En el caso específico de plantas, el mecanismo de síntesis de proteínas y los factores que lo regulan son temas cuya investigación se ha incrementado en los últimos 5 años (Browning, 1996; Gallie, 1996; Bailey-Serres, 1999; Dinkova *et al.*,

2000). Se han realizado múltiples estudios sobre la actividad de los factores eIF-4F, -4A, -4G, -2 α , y algunos relacionados con su modificación por fosforilación (Browning *et al.*, 1990; Webster *et al.*, 1991; Le *et al.*, 1997).

Al respecto estudios hechos en germen de trigo, indican que la fosforilación de la pS6 es el mecanismo de regulación para la traducción de mensajes 5'TOP (Shama y Meyuhas, 1996). También se han aislado algunas cinasas, similares a las que participan en la cascada de fosforilación que activa la síntesis de proteínas en mamíferos (Mizoguchi *et al.*, 1996; Turck *et al.*, 1998; Hirt, 2000). Sin embargo, una de las características más importantes en plantas, respecto a mamíferos, ha sido el descubrimiento de dos isoformas antigénicamente distintas, pero funcionalmente similares para el complejo eIF4F denominadas eIFiso4F y eIF4F (Browning *et al.*, 1992). Cada uno de estos complejos tiene componentes eIF4E y eIF4G diferentes, por lo cual en plantas hay dos isoformas eIF4E/eIFiso4E y dos isoformas eIF4G/eIFiso4G (Browning *et al.*, 1998).

A pesar de los avances mencionados, en plantas no hay muchos reportes en cuanto a los mecanismos de regulación de la traducción (Le *et al.*, 1997), por lo cual se requiere de mayor investigación para comprender el control de la expresión de genes a nivel traduccional en estos organismos.

Los ribosomas de plantas tienen una arquitectura similar a los de mamíferos (Montesano y Glitz, 1988). Las proteínas ribosomales de las subunidades grande y pequeña del citoplasma han sido fraccionadas y catalogadas por electroforesis bidimensional (Scharf y Nover, 1987). Por otra la estructura de las proteínas ribosomales de varias especies de plantas superiores, tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas, parece estar conservada (Gualerzi *et al.*, 1974).

La mayoría de los genes que codifican las proteínas ribosomales de plantas presentan dos o más copias de cada gen, y se observan altos niveles de éstos transcritos en tejidos meristemáticos, y su expresión está regulada durante el

desarrollo de la planta (Bonham-Smith *et al.*, 1992; Gao *et al.*, 1994; Joanin *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1990; Larkin *et al.*, 1989; Lebrum y Freyssinet, 1991; Marty y Meyer, 1992; Stafstrom y Devitt, 1995; Taylor y Davies, 1994; Van Lijsebettens *et al.*, 1994). Por ejemplo, en papa se ha visto que la expresión de los mensajes para las proteínas ribosomales S₁₉, L₂₇, L₇, se incrementa durante la tuberización (Taylor *et al.*, 1992).

Investigaciones en tabaco indican que la expresión del mRNA de L₂ está relacionada con los tejidos en crecimiento (Marty y Meyer, 1992). También la expresión de los mARNs de pr L₂₅ y L₃₄, es muy alta en tejidos que crecen rápidamente, y esto puede ser provocado por heridas o tratamientos con hormonas (Gao *et al.*, 1994).

En plántulas de chícharo el mRNA de la proteína ribosomal L₂₇ se incrementa diez veces después de la decapitación de los brotes axilares (Stafstrom y Sussex, 1992). Por otra parte una mutación en el gen PFL de *Arabidopsis* da lugar a un fenotipo de crecimiento enano, lo que sugiere un efecto generalizado del gen sobre el crecimiento. Este gen ha sido identificado para la proteína ribosomal S₁₈ y es la primera mutación reportada para dicha proteína en eucariontes (Van Lijsebettens *et al.*, 1994). La otra mutación reportada para proteínas ribosomales en eucariontes fue en *Drosophila* y también dio lugar a un fenotipo pequeño (Andersson *et al.*, 1994).

Cabe mencionar que otras dos copias de los genes S₁₈ fueron encontradas en *Arabidopsis*. La presencia de múltiples copias para los genes de proteínas ribosomales en plantas, y su alta expresión en tejidos mitóticos activos parece asegurar que haya un amplio suministro de proteínas ribosomales para ensamblarse a ribosomas durante el crecimiento rápido. Esta característica parece ser común para todas las especies vegetales (Larkin *et al.*, 1989; Stafstrom y Sussex, 1992).

Durante la ontogenia de la semilla de maíz se ha visto que la familia de genes para la proteína ribosomal S₁₄ tiene de tres a seis miembros y la expresión del transcrito S₁₄ está regulada durante la formación de la semilla. La cantidad más alta del

mensaje se localiza en el endospermo antes de que inicie la síntesis de proteínas de almacenamiento, lo que sugiere la necesidad de una gran cantidad de ribosomas (Larkin *et al.*, 1989). Por otra parte Joanin y colaboradores (1993), reportan que el transcrito para la proteína ribosomal S₁₃ es abundante en tejidos con crecimiento rápido y la expresión parece ser paralela a la síntesis de DNA

Por otra parte existen reportes que muestran el efecto de las auxinas sobre el aumento de la expresión de los mRNAs de proteínas ribosomales y esto se debe al incremento de Ca²⁺ libre, el cual estimula selectivamente la fosforilación de la p70^{S6k} (Gantt y Thompson, 1990; Walden y Ecker, 1998) y rRNAs (Gantt y Key, 1985), sugiriendo que esta hormona induce la expresión coordinada de las proteínas ribosomales y el rRNA de plantas (Datta *et al.*, 1993) durante periodos de crecimiento rápido.

Por otra parte en *Arabidopsis*, se tienen evidencias de la presencia de receptores en la membrana con actividad de cinasas, y al parecer están involucrados en procesos como: embriogénesis, morfogénesis, resistencia a patógenos y en la transducción de señales (Walker, 1993; Schaller, 1999; Fletcher *et al.*, 1999; Bisseling, 1999; Trotochaud *et al.*, 2000).

En trigo se ha reportado que el estrés por calor provoca un incremento en la fosforilación de las proteínas ribosomales de la subunidad ribosomal grande y al mismo tiempo se incrementa la velocidad de síntesis de polifenilalanina (Fehling y Weidner, 1988). Sin embargo, un choque de calor a protoplastos de tabaco causa la desfosforilación de la pr S6, lo cual coincide con la disminución en la velocidad de síntesis de proteínas (Scharf y Nover, 1987).

En *Arabidopsis* se ha reportado la existencia de dos genes (atpk1 y atpk2) que codifican cinasas que fosforilan a dos proteínas ribosomales ácidas pequeñas (Zhang *et al.*, 1994). La presencia de cinasas inducibles por frío, calor, sales, y hormonas, similares a la cinasa de S6, sugiere que las condiciones ambientales

adversas pueden inducir respuestas de transducción de señales dirigidas a genes que alteran la actividad de los ribosomas con el objeto de adecuar a la planta a los cambios ambientales (Huttly y Phillips, 1995; León *et al.*, 2001; Monks *et al.*, 2001). Esto significa que las plantas han desarrollado varios mecanismos para regular los componentes de la maquinaria de síntesis proteica durante el crecimiento, desarrollo y condiciones ambientales.

Por todos estos reportes es claro que en plantas, la síntesis de proteínas es un proceso sumamente coordinado y de regulación compleja, el cual se incrementa o disminuye alternativamente según los estímulos recibidos.

Así entonces en plantas la fosforilación/desfosforilación es un mecanismo de control traduccional (Langland *et al.*, 1995) cada vez más estudiado.

La síntesis de proteínas en plantas presenta algunas diferencias importantes con respecto a los sistemas animales, las cuales se describen a continuación:

- 1.- Las plantas tienen isoformas del factor eIF4F, el cual tiene una subunidad grande diferente (86 kDa vs. 220 kDa) y una proteína de enlace al cap diferente a la de animales.
- 2.- El factor eIF4A de plantas es fosforilado en respuesta a condiciones de hipoxia y esto parece estar coordinado con la inhibición de la síntesis de proteínas.
- 3.- Las plantas muestran un requerimiento de factores diferentes para la hidrólisis de ATP dependiente del RNA y para el desdoblamiento del RNA de doble cadena dependiente de ATP, necesitando solamente eIF4F y eIF4A o eIFiso4F y eIF4A.

2.3.4. Regulación de la Síntesis de Proteínas Durante la Germinación de Maíz

La síntesis de proteínas es un evento temprano en la germinación de semillas de maíz, la evidencia de traducción selectiva de los mensajes almacenados, así como

los sintetizados *de novo* ofrece un modelo interesante para el estudio de los diferentes mecanismos de regulación que operan a este nivel de la expresión génica. Por tal motivo, de la gran diversidad de mecanismos de control traduccional estudiados en sistemas animales, algunos han sido confirmados durante el proceso de germinación.

Se ha reportado que en trigo (Cuming, 1984), algodón (Dure et al., 1981) y maíz (Sánchez de Jiménez y Aguilar, 1984) los mRNAs de proteínas ribosomales de embriones y endospermo persisten en las semillas maduras; estos transcritos son traducidos en las primeras etapas de la germinación (Beltrán-Peña *et al.*, 1995). La naturaleza de todos los mRNAs almacenados no se conoce, sin embargo, Spiegel y Marcus en 1975, reportaron que cuando las semillas de trigo se embeben, se reinicia rápidamente la síntesis de proteínas con la integración simultánea del aparato traductor, por lo que el hecho de que en semillas de maíz se encuentren almacenados mRNAs, es congruente con la necesidad que tiene la semilla de ensamblar nuevos ribosomas durante la germinación temprana.

Los patrones de expresión de varios factores de iniciación de la traducción muestran cambios importantes durante la germinación (Gallie *et al.*, 1998). La expresión génica en maíz parece estar regulada por un mecanismo traduccional similar al ya descrito en animales y en el que de igual forma se involucra la fosforilación de la pr S6 (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1997a). También la secuencia 5'TOP parece estar presente en varias proteínas ribosomales de plantas (Zhao *et al.*, 1995; Shama y Meyuhas, 1996; Dinkova *et al.*, 2000).

En la literatura existen evidencias que en sistemas animales, la insulina, factores "similares a insulina" (IGF-I e IGF-II) y mitógenos estimulan la fosforilación de la proteína ribosomal S6 con la movilización simultánea a polisomas de mRNA y de mensajes para algunos factores de elongación (Jefferies *et al.*, 1994; Terada *et al.*, 1994; Jefferies y Thomas, 1996). En maíz, la fosforilación de la pr S6 ocurre a partir de 10-12 h de germinación (Pérez-Méndez *et al.*, 1993) o bien se incrementa en

presencia de auxinas (Pérez *et al.*, 1990) o insulina (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1999) esto coincide con un incremento de la síntesis *de novo* de las proteínas ribosomales (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1997a). El paralelismo entre la fosforilación de la pr S6 y el reclutamiento del transcrito de S6 a polisomas sugiere que ambos procesos son controlados por la misma ruta de transducción de señales (Jefferies y Thomas, 1996).

La cascada de señales que opera sobre la fosforilación de la pr S6 en animales involucra la actividad de una cinasa específica, la de la proteína p70^{S6k}, aunque hay diversos estímulos que activan esta vía, uno de los más importantes es insulina y factores "similares a insulina". Al respecto, en plantas recientemente se ha sugerido la existencia de una cinasa homóloga a p70^{S6k} la cual podría encargarse de fosforilar a la pr S6 (Turck *et al.*, 1998).

Todos estos estudios indican que la fosforilación de la pr S6 es un mecanismo de regulación, clave para la expresión selectiva de mensajes durante la germinación de maíz.

En general se puede indicar que durante la germinación de semillas de maíz, los ejes embrionarios quiescentes reinician gradualmente la síntesis de proteínas traduciendo primeramente los mRNAs almacenados y posteriormente los sintetizados *de novo* (Bewley y Black, 1994; Sánchez de Jiménez y Aguilar, 1984). Durante este periodo la traducción parece estar altamente regulada (Pramanik y Bewley, 1996), probablemente por más de un mecanismo de control traduccional siendo uno de ellos la traducción selectiva de mRNAs tipo 5'TOP, regulados por la fosforilación de pr S6.

2. 4. Aspectos Generales de la Insulina

La insulina es una molécula que inicialmente se consideró que se encontraba en vertebrados primitivos e invertebrados complejos, actualmente se tienen evidencias de que existe y tiene actividad biológica en eucariontes unicelulares como: hongos (*Neurospora crassa* y *Aspergillus fumigatus*) y en el protozoo ciliado *Tetrahymena pyriformis*. La insulina extraída de estos organismos es similar a la de mamíferos. Estos antecedentes indican que evolutivamente la insulina es una molécula muy antigua y ha sido altamente conservada durante la evolución (Le Roith *et al.*, 1980).

2.4.1. Biosíntesis de Insulina

El páncreas humano secreta de 40 a 50 unidades de insulina al día, lo que representa del 15 al 20 % de hormona almacenada en la glándula. El regulador fisiológico más importante de la secreción de insulina es el aumento en la concentración de la glucosa plasmática. También ciertos aminoácidos como: leucina, arginina, histidina y fenilalanina son también potentes estímulos para la liberación de insulina. Los agonistas beta adrenérgicos (AMPc), agentes farmacológicos como la tolbutamida son otros estimuladores de la secreción de insulina. Por otra parte cabe mencionar que esta hormona no tiene una proteína plasmática transportadora; por lo tanto, bajo condiciones normales su vida media plasmática es menor de cinco minutos.

El gen de la insulina se ubica en el brazo corto del cromosoma 11. La mayor parte de los mamíferos expresan un gen único para insulina semejante en organización al gen humano, pero las ratas y los ratones tienen dos genes no alélicos (Bell *et al.*, 1980) y cada gen codifica una proinsulina única que se procesa en dos moléculas distintas de insulina activa (Ullrich *et al.*, 1980).

La insulina se sintetiza como una preprohormona, con una masa molecular de 11,500 daltones. Por esta razón esta hormona es prototipo de los péptidos que se procesan a partir de moléculas precursoras más grandes (Kuliawat *et al.*, 2000).

La regulación de la expresión del gen de la insulina se da por elevadas concentraciones de AMPc y/o glucosa en donde la síntesis del transcrito primario es estimulada (Rutter, 1999). Los niveles de mRNA de insulina son estabilizados por altas concentraciones de glucosa, lo cual conduce al incremento en la traducción del mRNA de insulina.

Con el estímulo apropiado (niveles altos de glucosa) los gránulos de secreción maduros se fusionan con la membrana plasmática y descargan su contenido en el líquido extracelular por exocitosis (Orci *et al.*, 1987; Huang y Arvan, 1995; Rutter, 1999). Esta proteína se secreta de los islotes de Langerhans del páncreas, se libera dentro de la vena pancreática, que se vacía en la vena porta. El hígado es el principal sitio de acción de la insulina.

La insulina fue la primera proteína en la que se comprobó la existencia de acción hormonal, se cristalizó, se determinó la secuencia de aminoácidos, se sintetizó por técnicas químicas, se demostró que se sintetiza como una molécula precursora más larga (Steiner *et al.*, 1974), se determinó su estructura tridimensional y fue la primera proteína preparada para uso comercial mediante la tecnología de DNA recombinante (Le Roith *et al.*, 1980; Rutter, 1999).

Ahora se sabe que la insulina madura es un polipéptido que pesa 6 kDa, constituido por dos cadenas, A y B, las cuales cuentan con 21 y 30 aminoácidos respectivamente en casi todas las especies y están unidas por dos puentes disulfuro intercatenarios. Su receptor reconoce a una región de aproximadamente 11 residuos de aminoácidos y dicho reconocimiento depende de la estructura terciaria intacta de la molécula.

Esta proteína es en muchos sentidos la hormona peptídica modelo debido a que tiene grandes efectos sobre el metabolismo y la movilización y almacenamiento de combustibles, por lo que se ha convertido en uno de los reguladores más importantes del metabolismo energético, de tal forma que *la insulina en esencia, señala el estado de buena nutrición; estimula el almacenamiento de combustible celular y la síntesis de proteínas por una serie de vías metabólicas.*

El receptor de la insulina se ha estudiado en detalle mediante técnicas bioquímicas y de recombinación del DNA. Se caracteriza por ser un heterodímero formado por dos subunidades designadas como alfa y beta, en la configuración alfa₂-beta₂, unidas por puentes disulfuro. La subunidad alfa (135 kDa) es completamente extracelular y fija a la insulina mediante un dominio rico en cisteína. La subunidad beta (95 kDa) es una proteína transmembranal. La porción citoplásmica de la subunidad beta tiene actividad de tirosina cinasa y un sitio de autofosforilación y ambas características intervienen en la transducción de la señal inducida por la acción de la insulina. Este receptor se sintetiza y degrada constantemente, su vida media es de 7 a 12 h y su gen se localiza en el cromosoma 19 (Whitehead *et al.*, 2000).

Este tipo de receptores se localizan en casi todas las células blanco de los mamíferos en concentraciones hasta de 20 000 por célula, a menudo también se localizan en células que no son consideradas como blanco de esta hormona, debido a que la insulina también interviene en el crecimiento y replicación celular, organogénesis y diferenciación fetal, así como en la reparación y regeneración de los tejidos (Rother y Accili, 2000; Whitehead *et al.*, 2000).

La estructura del receptor de la insulina y la capacidad de las diferentes insulinas para unirse a los receptores y provocar respuestas biológicas son virtualmente idénticas en todas las células y todas las especies, lo cual indica que el receptor de insulina se conserva tanto como la insulina misma (Liu *et al.*, 1995; Whitehead *et al.*, 2000; Brogiolo *et al.*, 2001).

2. 4. 2. – Mecanismos de Acción de Insulina

El mecanismo de acción de la insulina comienza cuando se une a su receptor en la superficie de la célula blanco y mediante segundos mensajeros, que pueden ser cinasas o una cascada de fosfatasas que internalizan la señal.

Las diversas acciones de esta hormona pueden ocurrir en segundos o minutos, tales como: el transporte de glucosa, la activación o inhibición de algunas actividades enzimáticas. Después de periodos más largos, estimula la síntesis de ácidos nucleicos, de proteínas y promueve el crecimiento celular (Zammit, 1996; Valverde *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999; Rother y Accili, 2000).

Cuando la insulina se une a su receptor, la señal se internaliza a través de la fosforilación del receptor unido al sustrato (ISR). Este receptor experimenta un cambio conformacional que induce su actividad de tirosin-cinasa, provocando la fosforilación de residuos de tirosina tanto del receptor como de las moléculas de señalización (Carter *et al.*, 1996; Accili, 1997), desencadenando una cascada de eventos intracelulares, que estimulan la actividad de moléculas clave (GTPasa, cinasas y lípido cinasas, involucradas en acciones metabólicas de la insulina), entre ellas la activación de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI-3-K) que a su vez, activa diversas vías de señalización. Una de estas vías es la activación de p70^{S6K}, la cual fosforila a la pr S6 en la subunidad ribosomal 40S y esto provoca la movilización para su traducción de mRNA 5'TOP con la consecuente síntesis de proteínas importantes para el crecimiento y diferenciación celular (Proud y Denton, 1997; White, 1998).

Cabe mencionar que de las proteínas que constituyen a la subunidad pequeña del ribosoma, sólo la proteína S6 es fosforilada en respuesta a factores de crecimiento/mitógenos (Stewart y Thomas, 1994).

2.4.3. Factores de Crecimiento “Insulin-like” (IGF-I e IGF-II)

IGF-I e IGF-II (del inglés, insulin-like growth factor) son proteínas semejantes a la insulina que se descubrieron al hacer estudios sobre los efectos de las hormonas en el crecimiento fetal y crecimiento postnatal. Además de los mamíferos, también se han localizado en el medio de cultivo condicionado de *Tetrahymena pyriformis*, organismos unicelulares, larvas de colmenas, equinodermos y nemátodos como *Caenorhabditis elegans*, por lo cual evolutivamente también, se les considera como proteínas muy antiguas (Engström *et al.*, 1998; Tissenbaum y Ruvhun, 1998).

Al igual que la insulina, estos factores de crecimiento se originan de una molécula precursora y presentan homología en los extremos amino y carboxilo de las cadenas A y B. Son polipéptidos de cadena sencilla de 70 y 67 aminoácidos, respectivamente. Hay 62 % de similitud entre IGF-I e IGF-II, y se asemejan a la insulina en un 50 % de sus residuos.

En términos generales IGF-I se sintetiza en el útero, riñón, sistema nervioso y principalmente en el hígado. Es importante en el crecimiento postnatal e incrementa los niveles de progesterona en la proliferación celular (Adashi *et al.*, 1984 y 1986b; Cassandra *et al.*, 1991; Quevedo *et al.*, 2000) por lo que se le considera un potente mitógeno (Baranao y Hammond, 1984; Wood *et al.*, 1994; Párrizas *et al.*, 1997; D'avis *et al.*, 1997) y también juega un papel importante en la fisiología del ovario (Murphy *et al.*, 1987; Daughaday y Rotwein, 1989).

Por otra parte, el IGF-II se sintetiza principalmente en el útero, tiene actividad regulatoria en la proliferación celular. Este factor de crecimiento está seriamente involucrado en el crecimiento fetal ya que se presenta en altas concentraciones en el útero fetal y disminuye después del crecimiento postnatal (Sussenbach y Steenbergh, 1991; Erwin *et al.*, 2000).

2. 4. 4. Mecanismos de Acción de los Factores de Crecimiento IGF-I e IGF-II

Los receptores de IGF-I e IGF-II son similares al de la insulina, también se localizan en la membrana, son un heterodímero de estructura α_2 y β_2 y tienen actividad de tirosina cinasa (Lopaczynski *et al.*, 2000; Werner y Le Roith, 2000).

El mecanismo de acción de estos factores de crecimiento también es muy parecido al de la insulina, ya que ambos activan una vía de transducción de señales (Tissenbaum y Ruvhun, 1998). Sin embargo debido a las semejanzas en sus estructuras, estos factores, en algunos casos pueden incidir en una u otra de las vías de los tejidos "blanco", dependiendo de la concentración de cada factor (Werner y Le Roith, 2000; Allan *et al.*, 2001).

En IGF-I, este mecanismo parece estar mediado por AMPc (Adashi *et al.*, 1988). Al respecto algunos estudios muestran que el IGF-I cuando se une a su receptor se incrementan los niveles de AMPc. Lo que sugiere que los receptores para IGF-I son dependientes de AMPc (Adashi *et al.*, 1988). Por otra parte se han aislado y caracterizado seis proteínas específicas de unión para IGFs (IGFBP) presentes en el suero humano (Brewer *et al.*, 1988; Wood *et al.*, 1988; Clemmons *et al.*, 1989; Shamasaki *et al.*, 1990), las cuales modulan el efecto de los IGFs al formar complejos de alto peso molecular (Rechler y Clemmons, 1998; Duan *et al.*, 1999).

2. 4. 5. Regulación Traduccional por la Insulina y Factores de Crecimiento (IGF-I e IGF-II)

Uno de los primeros efectos de la insulina y los factores de crecimiento sobre las células animales es la estimulación de la síntesis de proteínas. El mecanismo comprendido en esta estimulación traduccional no se conoce completamente a pesar de que se han identificado una serie de proteínas que podrían potencialmente regularlo. La estimulación de la síntesis de proteínas por estos factores se manifiesta por un incremento en la velocidad de traducción de los mRNAs. Esto afecta a los mRNAs que antes de estimular a la célula eran pobremente traducidos debido a que se asociaban con pocos ribosomas. Después de la estimulación con factores de crecimiento, los mARNs son más estables por lo que se asocian con más ribosomas para formar polisomas y aseguran su traducción (Pause *et al.* , 1994; Scheper *et al.*, 1996).

Las investigaciones al respecto, indican que la pr S6 se fosforila como respuesta a insulina/IGF/mitógenos que estimulan la traducción a través de la activación de la proteína cinasa p70^{S6k}. Sin embargo, a la fecha no se conoce con claridad cómo estas señales permiten la activación de esta cinasa (Takuwa *et al.*, 1999). Existen reportes en los que se demostró que la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI-3-k) es un mediador clave para la activación de la vía de transducción en respuesta a factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), interleucina-2 (IL-2) e insulina (Cheatham *et al.*, 1994; Valverde *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1999; Vanhaesebroeck y Alessi, 2000). Estos estudios fueron complementados usando dos inhibidores específicos de la PI-3-K(wortmanina y LY294002), los cuales bloquean la transducción de la señal (Cross *et al.*, 1995). Además la expresión de una molécula de PI-3-K activada constitutivamente, estimuló la actividad de la p70^{S6k} *in vivo* (Weng *et al.*, 1995). Estos resultados confirmaron que la PI-3-K media la activación de la p70^{S6k} y la fosforilación de pr S6 (Weng *et al.*, 1995; Chou y Blenis, 1996; Navarro *et al.*, 1998; Cambell *et al.*, 1999; Valentinis *et al.*, 2000; Adi *et al.*, 2001).

Por otra parte se ha determinado que PI-3-K fosforila lípidos de inositol en la posición D3. Dichos lípidos actúan como segundos mensajeros en forma análoga a AMPc y calcio. También la proteína cinasa Ser/Treo Akt, conocida como proteína cinasa B o PKB, es uno de los principales blancos de las señales generadas por la PI-3-K (Cross *et al.*, 1995; Coulonval *et al.*, 2000). El reconocimiento de un dominio PH (homología "pleckstrin") en la proteína Akt, el cual puede enlazar lípidos, sugirió un mecanismo de enlace entre la actividad de PI-3-k y Akt. PI-3-k, el cual es inhibido por wortmanina y LY294002, bloqueando la actividad de Akt estimulada por el factor de crecimiento epidérmico, insulina e IGFs (Burgering y Coffey, 1995; Cross *et al.*, 1995; Steller *et al.*, 1995).

Estos datos colocan a la Akt corriente debajo de la PI-3-k (Hemmins, 1997). El primer sustrato fisiológico de Akt que se identificó fue la cinasa de la glucógeno sintetasa (GSK-3). La fosforilación de GSK-3 permite la inactivación de esta cinasa y la estimulación de la síntesis de glucógeno (Cross *et al.*, 1995). Otros datos sugirieron que Akt se encuentra contracorriente arriba de la p70^{S6k}, pero dicha conexión es probablemente indirecta (Burgering y Coffey, 1995).

Por otra parte se sabe que la activación de la GTPasa, p21RAS, estimula una cascada de proteínas cinasas que activa a las isóformas p42/p44 de las MAP cinasas, las cuales son proteínas cinasas importantes en la regulación de la proliferación y diferenciación de varios tipos de células (Yonezawa *et al.*, 1994; Miller *et al.*, 1996; Thomson *et al.*, 1997; Yau *et al.*, 1999). También existen estudios sobre la activación del sustrato 1 del receptor de insulina (IRS-1) como iniciador de esta vía de transducción de señales (Araki *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1995; Kessler *et al.*, 1998). Otros estudios demuestran que proteínas como: MEK y ERK son cinasas activadas fuertemente por mitógenos como la insulina e IGFs (Kim *et al.*, 1997) y también son capaces de prevenir apoptosis celular mediante la activación de múltiples vías de transducción de señales (Párrizas *et al.*, 1997).

En resumen, cuando la insulina y los IGFs se unen a su receptor se provoca una dimerización por autofosforilación del receptor, al adquirir éste actividad de tirosina cinasa (Chan *et al.*, 1997), se favorece la fosforilación de sustratos celulares y se activa una ruta de transducción de señales que involucra la fosforilación de la pr S6 en la subunidad 40S y la traducción selectiva de mRNAs TOP (Meyuhas *et al.*, 1996; Martelli *et al.*, 1999; Gingras *et al.*, 1999; Erwin *et al.*, 2000). Esto finalmente conduce a la activación de genes que participan en la regulación del metabolismo, crecimiento, proliferación, diferenciación celular en animales (Sasaki, 1984; Hansen *et al.*, 1996; Jefferies *et al.*, 1997; Tissenbaum y Ruvhun, 1998; Fumagalli y Thomas, 2000 ; Allan *et al.*, 2001).

2. 5.- Proteínas Similares a Insulina en Plantas

En plantas no hay reportes que indiquen la existencia de factores de crecimiento del tipo IGF-I e IGF-II, ni de las vías de transducción que estos factores pudieran estar regulando.

Se ha demostrado, sin embargo, la existencia de receptores membranales similares a los receptores de factores de crecimiento en animales (Walker, 1994; Braun y Walker, 1996; Becraft, 1998), los cuales son capaces de autofosforilarse en residuos de serina y treonina (Becraft *et al.*, 1996; Jin *et al.*, 2000). Esto apoya la idea de que en plantas, las vías de transducción de señales pudieran ser similares a las de animales y mediadas por fosforilación de varios sustratos (Watanabe *et al.*, 1994; Trojanek *et al.*, 1996; Hirt, 2000).

Algunos estudios previos indican la presencia de péptidos semejantes a los IGFs en diferentes plantas, sin que se les relacione con una función endógena determinada. Al respecto, en 1987 Collier y colaboradores reportaron en espinaca y *Lemna gibba*, la existencia de un péptido que es reconocido por anticuerpos contra insulina (Collier *et al.*, 1987). En 1992, Hirano y colaboradores reportan una proteína de reserva en soya, capaz de unirse a los receptores de insulina de bovino, este péptido tiene 4 kDa de masa molecular (Hirano *et al.*, 1992).

Posteriormente, en 1997, Ilgoutz y colaboradores reportaron la existencia de una proteína leg-insulin en hojas de Lupino (Ilgoutz *et al.*, 1997) y recientemente se aisló un péptido de la fracción proteica de semillas de frijol de soya con una secuencia de aminoácidos idéntica a un segmento de la cadena β de insulina de bovino (Oliveira *et al.*, 1999). Experimentos con algunos de estos péptidos indican que son responsables de estimular la toma de glucosa en tejidos animales (Collier *et al.*, 1987; Oliveira *et al.*, 1999). Sin embargo, en ningún caso se ha estudiado el efecto regulatorio endógeno de estos péptidos en las plantas de origen.

Existe sólo un reporte en el que se determinó un efecto estimulador de insulina e IGFs después de la germinación de semillas de sandía y pepino, lo cual indica que estos péptidos provocan un incremento en la actividad enzimática, que favorece considerablemente al desarrollo de la plántula (Goodman y Davis, 1993).

En nuestro laboratorio se han realizado estudios en maíz, que mostraron un estímulo por insulina tanto en la germinación, como en el crecimiento de la plántula de maíz. A nivel molecular se encontró que la insulina en ejes de maíz incrementa la síntesis de proteínas ribosomales y la fosforilación de la pr S6 en la subunidad pequeña del ribosoma (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1999), así como el incremento de la traducción del factor de iniciación iso4E (Dinkova *et al.*, 2000). Dichos efectos se bloquean cuando a los ejes embrionarios tratados con insulina, se les adiciona rapamicina o wortmanina ya que estas sustancias son inhibidores específicos de la vía de transducción de señales de la insulina.

Estos resultados sugirieron que en maíz podría existir un factor de crecimiento tipo IGF, el cual podría estar estimulando una ruta de transducción de señales similar a la de insulina en animales, el cual regula en forma selectiva la síntesis de proteínas.

3.- JUSTIFICACIÓN

Las células somáticas de eucariontes muestran variaciones químicas, moleculares, estructurales y funcionales en forma sistemática. Por tal motivo es de suma importancia el estudio de los mecanismos de regulación metabólica durante los eventos dinámicos que ocurren en el proceso de proliferación y diferenciación celular.

La investigación al respecto ha presentado avances importantes en animales, tal es el caso del proceso de traducción y los mecanismos que lo regulan (Meyuhas *et al.*, 1996; Bushell *et al.*, 2000; Raugh *et al.*, 2000). Actualmente existen reportes que indican que la insulina y los factores de crecimiento "insulin-like" (IGFs) regulan tanto el crecimiento como la proliferación celular en animales (White and Kahn, 1994).

Estos factores de crecimiento modulan la síntesis de proteínas en los tejidos, a través de la estimulación de una ruta de transducción de señales que involucra la fosforilación de la pr S6. Esto provoca la traducción selectiva de mRNAs que contienen una secuencia rica en pirimidinas en el extremo 5' UTR (5'TOPmRNAs) (Meyuhas *et al.*, 1996; Martelli *et al.*, 1999).

En plantas, no existen hasta la fecha estudios contundentes que indiquen la presencia y los efectos de los IGFs.

Por otra parte la germinación de semillas constituye un sistema biológico donde se manifiestan varios de los mecanismos de regulación de la expresión genética. En particular en maíz, se han descrito mecanismos de control de la traducción (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1999). Se ha demostrado que la fosforilación de la pr S6 participa en la regulación de la síntesis de proteínas durante la germinación (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1997a y 1997b) y responde a estímulos con insulina en forma similar a lo descrito en mamíferos (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1999). Estos resultados sugirieron fuertemente la existencia de una ruta de transducción de señales en maíz, semejante a la inducida por insulina en células animales.

Conociendo estos antecedentes, se considera que es muy probable que en plantas exista también una ruta de transducción de señales inducida por un factor de crecimiento similar a los que se conocen en animales. **De ser así, ¿cuál sería entonces este péptido endógeno, responsable de la activación fisiológica de la ruta de transducción de señales en maíz?** Para responder a esta interrogante se decidió emprender la búsqueda de el o los posibles factores involucrados en la activación de la ruta de transducción de señales responsable de la fosforilación de pr S6, durante la germinación y el desarrollo del eje embrionario de maíz.

4.- HIPÓTESIS

Es posible que en tejidos de maíz exista un péptido similar a insulina (Zm-IGF), el cual tenga un papel semejante a este factor en la regulación del proceso de síntesis selectiva de proteínas, durante la germinación y desarrollo del eje embrionario de maíz

5.- OBJETIVO GENERAL

Obtener y caracterizar a una proteína "insulin-like" (Zm-IGF), la cual se espera que esté presente en tejidos de maíz e investigar si esta proteína participa en la regulación de la traducción durante la germinación y el desarrollo del eje embrionario de maíz.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Identificar a la proteína Zm-IGF mediante el uso de anticuerpos contra insulina
- 2.- Identificar en qué órganos y tejidos de la planta de maíz, se localiza a la proteína Zm-IGF
- 3.- Determinar en qué momento de la germinación, los ejes embrionarios de maíz presentan altos niveles de Zm-IGF
- 4.- Establecer la metodología que permita la extracción, purificación y conservación de la proteína Zm-IGF
- 5.- Evaluar el efecto de Zm-IGF a nivel fisiológico durante la germinación y el desarrollo del eje embrionario de maíz

4.- HIPÓTESIS

Es posible que en tejidos de maíz exista un péptido similar a insulina (Zm-IGF), el cual tenga un papel semejante a este factor en la regulación del proceso de síntesis selectiva de proteínas, durante la germinación y desarrollo del eje embrionario de maíz

5.- OBJETIVO GENERAL

Obtener y caracterizar a una proteína "insulin-like" (Zm-IGF), la cual se espera que esté presente en tejidos de maíz e investigar si esta proteína participa en la regulación de la traducción durante la germinación y el desarrollo del eje embrionario de maíz.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Identificar a la proteína Zm-IGF mediante el uso de anticuerpos contra insulina
- 2.- Identificar en qué órganos y tejidos de la planta de maíz, se localiza a la proteína Zm-IGF
- 3.- Determinar en qué momento de la germinación, los ejes embrionarios de maíz presentan altos niveles de Zm-IGF
- 4.- Establecer la metodología que permita la extracción, purificación y conservación de la proteína Zm-IGF
- 5.- Evaluar el efecto de Zm-IGF a nivel fisiológico durante la germinación y el desarrollo del eje embrionario de maíz

6.- Investigar el efecto de Zm-IGF a nivel bioquímico en:

A) El proceso traduccional durante la germinación de maíz

a) La evaluación de la síntesis de proteínas ribosomales

b) La fosforilación de la pr S6

B) La estimulación de la síntesis de DNA en los tejidos que conforman al eje embrionario de maíz

6.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para cumplir con los objetivos y comprobar la hipótesis inicial se utilizó la siguiente estrategia experimental:

1.- Una vez corroborada la existencia de Zm-IGF con ayuda de anticuerpos contra insulina de bovino, hacer un monitoreo exhaustivo de órganos y tejidos de maíz para determinar con exactitud la localización de Zm-IGF.

2.- Hacer un monitoreo a diferentes tiempos del proceso de germinación, para estimar los niveles de Zm-IGF. Esto permitirá disponer de material biológico con altos niveles de Zm-IGF.

3.- Por la técnica de inmunodetección *in situ*, localizar a la proteína Zm-IGF a nivel celular.

4.- Probar metodologías (como cromatografía en columna de exclusión molecular, inmunoprecipitación y/o cromatografía de afinidad, inmunodetección), que permitan establecer la estrategia metodológica para la extracción, purificación y conservación de Zm-IGF.

5.- Lograda la purificación de Zm-IGF, realizar estudios a nivel fisiológico durante la germinación y el desarrollo de ejes embrionarios de maíz, para monitorear el efecto que Zm-IGF tiene en la planta de la cual se obtuvo. Además, elaborar curvas de germinación y crecimiento de las plántulas obtenidas con el fin de determinar concentraciones óptimas de estimulación, las cuales puedan ser aplicadas en experimentos posteriores. Se utilizará insulina de bovino en experimentos paralelos como control.

6.- Mediante la incorporación de $^{32}\text{[P]}$ -ortofosfato y $^{35}\text{[S]}$ -metionina, evaluar el efecto que Zm-IGF pudiera tener en la síntesis de proteínas ribosomales y la fosforilación de la pr S6 durante la germinación.

7.- Mediante la incorporación de $^3\text{[H]}$ -timidina en ejes de maíz germinados en presencia de Zm-IGF y mediante la extracción de su DNA, evaluar el efecto sobre la síntesis de este material genético.

Con las estrategias experimentales planteadas será posible la identificación y purificación de Zm-IGF, así como la determinación de sus efectos en la germinación. Además del inicio de su caracterización.

Materiales y Métodos que no Están Descritos en el Artículo Publicado

7.- MATERIALES Y MÉTODOS

7. 1.- Obtención de Material Biológico

Se utilizaron tanto semillas como ejes embrionarios de maíz (*Zea mays* L.) cv. Chalqueño, en todos los experimentos realizados en este trabajo (Figura. 1).

7. 2.- Tratamiento de Desinfección de las Semillas de Maíz

Bajo condiciones asépticas, las semillas de maíz se colocaron en agua corriente por 30 minutos y posteriormente en un matraz estéril, al cual se le adicionó una solución de etanol al 70 % durante un minuto, enseguida se desinfectaron durante cinco minutos con una solución de hipoclorito de sodio al 5% más cuatro gotas de tween 20 y seis gotas de microdyn. Finalmente se dieron cinco enjuagues con agua estéril de tres minutos cada uno.

7. 3.- Incorporación de ³[H]-timidina en Ejes Embrionarios de Maíz

Se disectaron los ejes embrionarios de la semilla de maíz y se incubaron 15 h en medio MS (un gramo de embriones por tratamiento) a 24 ± 2 °C en oscuridad constante, posteriormente se aplicaron los siguientes tratamientos: Control (no estimulados), Insulina $200 \mu\text{Uml}^{-1}$, Insulina $200 \mu\text{Uml}^{-1}$ + DTT (2 mM), Zm-IGF $200 \mu\text{Uml}^{-1}$, Zm-IGF $200 \mu\text{Uml}^{-1}$ + DTT (2 mM) y Zm-IGF $200 \mu\text{Uml}^{-1}$ + Tripsina ($1 \mu\text{gml}^{-1}$) y Lisozima (2mgml^{-1}). Se marcaron con $15 \mu\text{Ci/ml}$ de ³[H]-timidina (A.E. 87 Ci/mmol) y se incubaron durante 15 horas más bajo las mismas condiciones. Al final se dieron dos enjuagues con agua desionizada estéril y se almacenaron a -70 °C, hasta el momento de ser procesados. Cada tratamiento se hizo por triplicado en cada experimento. Se realizaron tres experimentos independientes.

7. 4.- Aislamiento de Núcleos (Luthe y Quatrano, 1980).

Los ejes embrionarios (1 g) con incorporación de $^3\text{[H]}$ -timidina, se colocaron en acetona hasta que el tejido se plasmolizó, posteriormente se molió en presencia de buffer de aislamiento de núcleos, estéril (BAN) (sacarosa 1 M, MgCl_2 5 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7.2, β -mercaptoetanol 2 mM y cóctel de inhibidores de proteasas (de Laboratorios Roche). El homogeneizado se filtró en una malla miracloth y se centrifugó a 5,000 g por 10 minutos. La pastilla se resuspendió en buffer de lavado de núcleos (BLN) (igual al anterior, solo que en este caso además del cóctel de inhibidores y β -mercaptoetanol 2 mM, se adicionó 0.5 % de Tritón X-100) y se centrifugó a 5,000 g por 10 minutos. La pastilla se resuspendió en buffer BAN y se colocó sobre 5 ml de un gradiente de sacarosa 3 M más 5 ml de Percol con cada una de las siguientes concentraciones 20 %, 40 % y 80 %, posteriormente se centrifugó 30 minutos a 8,000 g. Los núcleos se aislaron de la interfase entre el percol 80 % y 40 % y esta fracción se lavó varias veces con buffer BAN. Finalmente la pastilla nuclear se resuspendió en 200 μl de buffer de almacenamiento de núcleos (BALN) (sacarosa 250 mM, HEPES-KOH 20 mM a pH 7.8, MgCl 5 mM, Glucosa 50 % y DTT 1 mM). La muestra se almacenó a -70°C . La pureza de las preparaciones nucleares se determinó observando los núcleos con DAPI al microscopio óptico (Figura. 9).

7. 5.- Extracción de DNA a partir de núcleos aislados (Chen y Dellaporta, 1994)

A la preparación de núcleos se adicionaron 750 μl de buffer de extracción (Tris-HCl 1 M, pH 8.0, EDTA 0.5 M, NaCl 0.5 M, β -mercaptoetanol 10 mM, SDS 10 %), se mezcló suavemente por inversión y se incubó a 65°C por 15 minutos (con la finalidad de disociar los complejos). Posteriormente se adicionaron 150 μl de acetato de potasio 5 M y se incubaron 20 minutos en hielo, después se centrifugó a 8,000 g por 10 minutos. A la fracción de sobrenadante se le adicionó una cantidad igual de

isopropanol (para precipitar el DNA genómico) y se centrifugó a 10,000 g por un minuto, la pastilla se lavó con etanol al 80 % y se secó perfectamente, después se resuspendió en la mínima cantidad de buffer TE (Tris 10 mM a pH 8 y EDTA 1 mM). Finalmente se determinó tanto la pureza del DNA como su concentración, por espectroscopia mediante la relación de absorbancia 260nm/280nm. Por otra parte se midió la incorporación de ³[H]-timidina en el DNA en un contador líquido de centelleo (Packard, Downers Grove, IL, U.S.A.).

7. 6.-Monitoreo de órganos y tejidos de maíz para la detección de Zm-IGF

Como uno de los objetivos planteados en este trabajo fue identificar a los órganos o tejidos en los que se localiza el factor Zm-IGF, por lo que se analizaron diferentes tejidos (desde meristemáticos hasta completamente diferenciados), los cuales se describen a continuación:

- 1.- Ejes embrionarios y escutelos no germinados (secos)
- 2.- Ejes embrionarios y escutelos de semillas germinadas en agua e incubados durante 24, 48 y 72 horas
- 3.- Coleoptilos, mesocotilos e hipocotilos de ejes germinados en agua e incubados por 48, 72 y 96 horas
- 4.- Puntas de raíz (secciones de 2 mm de longitud) de semillas germinadas en agua e incubadas por 96 horas.
- 5.- Penúltima (poco extendida) y última hoja (enrollada completamente) de plantas de maíz con 6 semanas de edad
- 6.- Tejido calloso con diferentes características: recién inducido (con dos semanas de edad) y no embriogénico, con más de cinco resiembras (este callo ya ha sido tratado para ser embriogénico y por tanto generar embriones somáticos). En este último caso las muestras se tomaron al inicio y al final de la última resiembra. También se evaluó callo viejo no embriogénico.

Para la extracción se parte de aproximadamente 10 g de tejido de maíz, el cual se molió en presencia de N₂ líquido, posteriormente se adicionaron 6 ml de buffer de extracción (100 mM KCl, 20 mM, Hepes pH 7.6, 7 mM 2-mercaptoetanol, 0.2 mM EDTA, 10% glicerol, 0.1% Tritón X-100, 10 mM benzamidina y 2 mM de PMSF y cóctel de inhibidores de proteasas). El homogenado se centrifugó a 27,000 g por 30 minutos a 4 °C y el sobrenadante a 280,000 g por 3.5 h. El sobrenadante fue concentrado cinco veces al colocarlo en bolsas de diálisis cubiertas con polietilenglicol-6000 (PEG-6000). Posteriormente se recuperó la muestra en tubos Ependorf y se almacenó a -70 °C, hasta que se utilizó.

A todos los extractos proteicos obtenidos se les hizo un análisis de dot-blot y western-blot, mediante anticuerpo contra insulina de bovino el cual también se utilizó para realizar la inmunodetección de Zm-IGF (ver apéndice).

7.7.- Inmunocitoquímica de Zm-IGF

Para la extracción y purificación de Zm-IGF, se decidió utilizar ejes embrionarios de maíz germinados en agua e incubados durante 48 h, por esta razón para el estudio de inmunocitoquímica se utilizaron tejidos bajo las mismas condiciones. Las muestras fueron de 1-2 mm de longitud, procurando tomar las zonas meristemáticas del epicotilo, mesocotilo e hipocotilo, ya que estas son las zonas donde la actividad mitótica se incrementa. También se utilizaron segmentos de escutelo de embriones incubados durante 15 h como control negativo y tejido de páncreas de ratón como control positivo.

Las muestras se fijaron en glutaraldehído al 2.5 % en buffer de fosfato 0.1 M, pH 7.2 durante 4 h a 4 °C, posteriormente se deshidrataron al pasarlas por una serie gradual de etanol, como sigue:

- Alcohol etílico al 25 %..... 10 minutos
- Alcohol etílico al 40 %..... 10 minutos
- Alcohol etílico al 70 %..... 10 minutos
- Alcohol etílico al 80 %..... 15 minutos, dos cambios

- Alcohol etílico al 96 %..... 15 minutos, dos cambios
- Alcohol etílico absoluto..... 20 a 30 minutos, dos cambios

Posteriormente viene la etapa de infiltración, en la que la muestra se mantuvo en rotación constante a temperatura ambiente, sumergida en las mezclas siguientes:

- Oxido de propileno puro 15 minutos (tres cambios)
- Oxido de propileno + Epon (3:1) 12 horas
- Oxido de propileno + Epon (1:1) 12 horas
- Oxido de propileno + Epon (1:3) 12 horas

La inclusión se hace en Epon al 100 % y la polimerización se lleva a cabo en una estufa a 60 °C durante 24 h.

Preparación de Epon

1.- Mezcla A endurecedor

- Epon 812 62 ml
- DDSA (Dodecyl succinic anhidride)..... 100 ml

2.- Mezcla B suavizador

- Epon 812 100 ml
- NMA (Nadic methyl anhidride) 89 ml

3.- Mezcla final

- Mezcla A 4 ml
- Mezcla B 6 ml
- DPM (Catalizador de polimerización) ... 0.15 ml

Los cortes fueron semifinos de 0.5 micras y se hicieron en un microtomo de Reichert con una navaja de diamante. Cada corte se monto en un portaobjetos y se fijo con calor, posteriormente se aplicó el anticuerpo contra insulina de bovino desarrollado en cerdo, en una concentración 1:1000, el complejo antígeno/anticuerpo fue reconocido por un segundo anticuerpo (CyTM3- conjugated AffiniPure Goat Anti-Guinea Pig IgG) fluorescente (concentración 1:100) y en un microscopio confocal marca BIO-RAD se visualizaron por fluorescencia las zonas donde se localiza el factor Zm-IGF, en aumentos de 10X y 40X.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

7. 8.- Análisis de la Proteína Zm-IGF Purificada

La muestra proteica fue analizada mediante el sistema de electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS descrito por Laemmli (1970). Se utilizaron geles al 12 y 15 % de poliacrilamida, los cuales están constituidos por las soluciones siguientes: **solución I** (Acrilamida 30 % y Bisacrilamida 0.8 %), **solución II** (0.75 M Tris-base a pH 8.8, 0.2 % de SDS), **solución III** (0.25 M Tris-base a pH 6.8 y 0.2 % de SDS), 10 μ l de TEMED (Tetrametil etilén diamina) y APS al 20 % (Peroxidisulfato).

El buffer de corrida que se utilizó se compone de 0.025 M de Tris-base pH 8.3, 0.192 M de Glicina y 0.1 % de SDS. Los geles fueron teñidos con 0.2 % de Coomassie Brilliant Blue R-250 (SIGMA). La destinción se hizo con una solución de 5 % de ácido acético y 10 % de etanol. Para lograr la autorradiografía, el gel se seco y fue expuesto en una placa fotográfica (películas para radiografía clínica Kodak X-Omat) a -70°C , utilizando intensificadores (DUPONT).

7. 9.- Efecto de insulina en las Curvas de Germinación y Desarrollo de Plántulas

Utilizando algodón como sustrato, lotes de cien semillas de maíz se imbibieron por completo. En el lote control se utilizó sólo agua y los demás lotes germinaron en presencia de insulina o Zm-IGF a diferentes concentraciones (200, 400, 500, 600, 800 y $1000\ \mu\text{U ml}^{-1}$), la insulina fue de páncreas de bovino; SIGMA, St. Louis, MO).

El tiempo de incubación fue de 72 horas a $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en oscuridad constante y el porcentaje de germinación de las semillas fue determinado cada 2 horas a partir de las 18 h de incubación. Las curvas de germinación se construyeron con los datos obtenidos de cuatro repeticiones para cada tratamiento y la Gt 50 de germinación fue calculada para cada grupo. Al final del experimento se determinó la longitud de las plántulas obtenidas de cada lote y los resultados fueron analizados estadísticamente mediante una prueba de t.

7. 10.- Elaboración de una Curva Patrón de Insulina

Para determinar la equivalencia del factor Zm-IGF con respecto a la insulina se elaboró una curva patrón (ver materiales y métodos del artículo), de esta forma se determinó la concentración de Zm-IGF equivalente a $200 \mu\text{Uml}^{-1}$, que fue la que se utilizó en todos los experimentos de esta investigación.

En este caso, una vez purificado el factor Zm-IGF se realizó un análisis de dot-blot de la muestra, se reveló y por comparación de la intensidad de las manchas obtenidas se estimó la equivalencia de Zm-IGF con respecto a la insulina y de esta forma se obtuvo la concentración requerida.

8.- RESULTADOS

8. 1.- Detección del Factor Zm-IGF en Órganos y Tejidos de Maíz

Existen muy pocos reportes en la literatura que describen la presencia de péptidos inmunorreactivos contra anticuerpos para insulina en plantas (Collier *et al.*, 1987; Hirano *et al.*, 1992; Ilgoutz *et al.*, 1997 y Oliveira *et al.*, 1999). Además de que no se ha investigado el papel que pudieran tener dichos péptidos.

Por los resultados obtenidos en el laboratorio de los estudios realizados con insulina durante la germinación de maíz, resultó interesante investigar si en esta planta existe un péptido endógeno similar a insulina.

Para determinar la presencia de este tipo de péptidos en maíz se analizaron diferentes tejidos, desde meristemáticos hasta completamente diferenciados, los cuales se describen en la tabla 1.

La detección se hizo mediante un análisis de dot-blot de los extractos proteicos y a través de anticuerpos policlonales contra insulina de bovino desarrollados en cerdo, se detectó la presencia del factor Zm-IGF.

Con la finalidad de hacer un estudio más preciso, se procedió a analizar el eje embrionario y al escutelo por separado, también se seccionó al eje embrionario con diferentes tiempos de incubación (24, 48, 72 y 96 h) en epicotilo, mesocotilo e hipocotilo. También se analizaron zonas meristemáticas correspondientes a puntas de raíz de 2 mm de longitud.

Por otra parte como el tejido calloso de maíz (obtenido del cultivo *in vitro* de ejes embrionarios de maíz) está constituido en parte por células en constante división, se incluyó en este estudio (ver Tabla 1).

Los resultados indican que sólo en algunos tejidos se presenta un péptido inmunorreactivo con anticuerpos contra insulina, siendo mayor el reconocimiento en los extractos proteicos provenientes de ejes embrionarios de maíz incubados durante 24 h, 48 h y de tejido calloso tipo embriogénico (Fig. 2).

Por otra parte, se detectó en mínima cantidad en extractos proteicos provenientes de ejes embrionarios secos (no germinados), escutelos de 24 y 48 h de incubación, zonas meristemáticas de raíces provenientes de semillas incubadas por 96 h y hoja completamente enrollada proveniente de plántulas de maíz con 6 semanas de edad. Lo mismo ocurre con los extractos proteicos obtenidos de cada una de las regiones de los ejes embrionarios incubados por 48 h (coleoptilo, mesocotilo y hipocotilo).

Finalmente en los tejidos provenientes de escutelo seco; coleoptilo, mesocotilo e hipocotilo proveniente de ejes embrionarios con 72 y 96 h de incubación y hoja extendida de plántulas de maíz con 6 semanas de edad; no se detectó la presencia del factor Zm-IGF.

Los resultados obtenidos indican que el factor Zm-IGF se encuentra en pequeñas cantidades en el tejido que constituye al eje embrionario maduro y por los resultados obtenidos, es posible que no se encuentre en el escutelo. Sin embargo, en el momento que la semilla se encuentra en proceso de germinación el contenido de Zm-IGF se incrementa de tal forma que además de estar en el eje embrionario también se detecta en el escutelo, alcanzando su nivel máximo a las 48 h de incubación (ver Tabla 1).

Después de las 48 h de incubación, los niveles del factor Zm-IGF disminuyen considerablemente ya que a las 72 y 96 h de incubación, ya no se detecta en ningún tipo de tejido. Esto implica que Zm-IGF podría ser un factor importante durante la germinación y podría tener un papel relevante durante la proliferación celular.

Esta hipótesis se apoya en los resultados obtenidos durante el análisis de los extractos protéicos provenientes de las zonas meristemáticas y del tejido calloso (ambos tejidos con abundante proliferación celular), y como se aprecia en la figura 2, el factor Zm-IGF se presenta en ambos casos, siendo más abundante en el tejido calloso.

Estos resultados parecen indicar que en maíz existe una proteína semejante a insulina, la cual pudiera estar actuando como factor de crecimiento y tener un papel relevante sobre la germinación y la proliferación celular durante la germinación de semillas de maíz.

Por otra parte mediante análisis en western-blot de extractos crudos de ejes germinados por 48 h se identificaron dos bandas de masa molecular aproximada de 7 y 20 kDa (Figura 4 del artículo)

La existencia del factor Zm-IGF en tejidos de maíz quedó plenamente confirmada por los resultados obtenidos de los estudios de inmunocitoquímica que se realizaron en las regiones meristemáticas de los ejes embrionarios con 48 h de incubación.

En la figura 3 se demostró por fluorescencia que el factor Zm-IGF se localiza en el citoplasma celular de las regiones meristemáticas del epicotilo e hipocotilo del eje embrionario de maíz (Fig. 3: C, D, E, F y G). Sin embargo, en las muestras de escutelo proveniente de embriones incubados durante 15 h, no se detectó (Fig. 3 B). Cabe mencionar que la intensidad de fluorescencia que se presentó en estos tejidos de maíz, fue similar a la registrada en tejido de páncreas, el cual se utilizó como control positivo (Fig. 3 A).

Los resultados obtenidos en ésta parte de la investigación, permitieron determinar en qué momento de la germinación los ejes embrionarios de maíz presentan altos niveles del factor Zm-IGF, por lo que considerando todo lo anterior y por la

facilidad de obtener el material biológico, para la purificación de Zm-IGF se decidió utilizar ejes embrionarios de maíz incubados en presencia de agua por 48 horas a 24 ± 2 °C y en oscuridad constante.

8. 2.- Extracción y Purificación del Factor Zm-IGF

Durante la optimización de las metodologías para la extracción del factor Zm-IGF, así como la concentración del extracto proteico obtenido y las condiciones óptimas para el almacenamiento del mismo, se procedió de la forma siguiente:

Para la purificación del factor Zm-IGF se probaron varias estrategias basadas en la técnica de cromatografía en columna. Se utilizaron resinas de exclusión molecular (Sephadex G-100 y Sephadex G-50), aniónicas (DEAE-Sephacel) y catiónicas (Q-Sepharosa y CM-Sepharosa). El extracto crudo obtenido de ejes embrionarios con 48 h de incubación se pasó por cada una de estas columnas. Esto permitió determinar que la resina Sephadex G-50 resultó ser la más conveniente de utilizar como un primer paso para la purificación de Zm-IGF, ya que mediante esta estrategia se pudo eliminar una gran cantidad de proteína total (alrededor de un 75 %) ya que al hacer el análisis por dot-blot de las fracciones eluidas, sólo de 6 a 10 fracciones dieron reacción positiva cuando se aplicó el anticuerpo contra insulina (Figura 2 de artículo).

En el caso de las otras resinas fue muy poca su resolución, ya que fue amplio el rango y el número de fracciones eluidas que resultaron positivas al anticuerpo contra insulina (20-40), por tal motivo se incrementaba el volumen de muestra que contenía al factor Zm-IGF junto con otras proteínas y esto resultó ser un problema en nuestro caso debido a que el tamaño de la columna de afinidad que se utilizó como segundo paso de purificación fue pequeño, por lo cual los volúmenes que debían manejarse no podían ser mayores de 8 ml de muestra.

Hasta este momento la cromatografía de exclusión molecular con la resina G-50 es la más adecuada ya que permitió obtener al factor Zm-IGF parcialmente puro.

Dado la necesidad de purificar a homogeneidad al factor Zm-IGF, para poder determinar su efecto a nivel tanto fisiológico como molecular, una primera aproximación al problema fue purificarla a través del método de inmunoprecipitación, el cual consiste de un soporte de proteína "A" sepharosa con anticuerpo contra insulina unido y de ésta forma sólo el factor Zm-IGF es atrapado por el anticuerpo. El producto obtenido se sometió a un análisis de electroforesis (SDS-PAGE) y western-blot, esto permitió la identificación de varias bandas entre 60 y 40 kDa, también se logró detectar una banda de 20 kDa aproximadamente, las cuales fueron reconocidas por el anticuerpo contra insulina. Con base en estos resultados surgió la pregunta acerca de si las bandas encontradas entre 60 y 40 kDa correspondían al anticuerpo contra insulina. Esto se comprobó mediante un análisis por electroforesis (DSD-PAGE) de la muestra de Zm-IGF eluída y el anticuerpo. Los resultados indicaron que durante la elución el factor Zm-IGF se despegó junto con su anticuerpo, lo cual generó un problema bastante serio, ya que la purificación de dicho factor por inmunoprecipitación no tuvo el éxito que se esperaba y la separación del factor Zm-IGF de sus propios anticuerpos resultó ser un problema difícil de resolver.

Por tal motivo se buscó unir en forma covalente al anticuerpo contra insulina a un soporte inerte como la proteína "A" sepharosa, de tal manera que en el momento de la elución sólo se desprenda el factor Zm-IGF sin su anticuerpo.

Con esta finalidad se preparó una columna de afinidad en la cual se acopló en forma covalente a una resina de poliestireno el anticuerpo contra insulina. En los ensayos que se realizaron utilizando esta columna los resultados fueron muy buenos, sin embargo al reutilizarla se presentó el mismo problema que en la inmunoprecipitación, lo cual pudo deberse a la poca estabilidad del enlace covalente.

Por este motivo se utilizó un kit (kit ImmunoPure IgG Orientation de PIERCE), el cual consta de una columna de Proteína "A" sepharosa en la que el anticuerpo contra insulina se inmovilizó de manera covalente. En este caso el Dimetilpimelimidato (DMP), reacciona con los grupos amino de las cadenas laterales de la proteína "A" sepharosa y del anticuerpo en el sitio de reconocimiento, por lo tanto se forma un enlace covalente estable. Cabe mencionar que la unión covalente es un proceso sumamente delicado y tardado ya que el Dimetilpimelimadato (DMP) que es el reactivo que se encarga de producir esta unión covalente, es muy lábil e higroscópico y se hidrata fácilmente. Por esto se requiere realizar un análisis de infrarrojo para corroborar que el DMP no este hidratado. Por otra parte también durante la preparación de la columna de afinidad se colectaron por separado todas las fracciones eluidas durante todo el proceso (al aplicar el anticuerpo, provocar la formación del enlace covalente, el bloqueo de sitios activos remanentes y equilibrio de la columna). Estas fracciones fueron analizadas en un gel de SDS-PAGE, con la finalidad de corroborar la unión covalente entre el anticuerpo y la proteína "A" sepharosa. En la figura 4 se muestra como al inicio de la preparación de la columna, las fracciones contienen anticuerpo, y éste poco a poco va desapareciendo como se muestra en la fracción número 9 en donde la columna ya está equilibrada.

Finalmente se evaluó la eficiencia del proceso, para lo cual se realizó un análisis electroforético de la resina que tiene unido al anticuerpo. El éxito de la reacción se determinó cuando en el gel se presentaron bandas pesadas y algunas bandas ligeras, por lo que se puede decir que el anticuerpo se ha unido a la resina de manera exitosa (Sisson y Castor, 1990) (Figura 5).

Los resultados obtenidos fueron exitosos, ya que se logró tener al factor Zm-IGF libre de anticuerpo, esto permitió por una parte confirmar que esta proteína tiene una masa molecular de 20 kDa y por otro lado se logró optimizar un método de purificación para obtener al factor Zm-IGF (Figura 4 y 5 del artículo).

8. 3.- Efecto Fisiológico del Factor Zm-IGF e Insulina Durante la Germinación de Maíz.

Para evaluar el efecto fisiológico de Zm-IGF (resultados que se muestran en el artículo publicado) se hizo previamente un estudio con insulina con el fin de estimar los rangos de concentración para dicho estudio.

Cabe mencionar que en el laboratorio se había ya demostrado que en maíz, la insulina estimula tanto la germinación como el crecimiento de los ejes embrionarios cuando se aplicó en concentraciones de $200 \mu\text{Uml}^{-1}$ (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1997 a). Sin embargo en esta investigación se consideró necesaria a manera de control, una evaluación completa del efecto que pudieran tener diferentes concentraciones de insulina sobre el proceso de germinación, y de esta forma determinar si existen otras concentraciones que también favorezcan dicho proceso.

En los ensayos que se realizaron se evaluó cuantitativamente la respuesta de germinación cuando se aplicaron 200, 300, 400, 500, 600, 800 y $1000 \mu\text{Uml}^{-1}$ de insulina. Los resultados obtenidos indicaron que a concentraciones bajas de insulina ($200 \mu\text{Uml}^{-1}$), la germinación se ve favorecida (Fig. 6 parte A) con respecto al control y a las otras concentraciones de insulina utilizadas, ya a esta concentración el 50 % de germinación se alcanza a las 32 horas de incubación.

Sin embargo, en el tratamiento control y las demás concentraciones de insulina este porcentaje de germinación se alcanza a las 36-40 horas de incubación (Fig. 6 A, B y Fig. 7). Los resultados obtenidos indican que a concentraciones altas de insulina la germinación se ve un tanto inhibida ya que las semillas tardan más tiempo en germinar o bien no lo hacen. Por otra parte, en trabajos previos en el laboratorio se observó que el crecimiento de las plántulas se acelera a partir de las 48 h de germinación, cuando se aplican altas concentraciones de Insulina (de 400

a $1000 \mu\text{Uml}^{-1}$); lo cual implicaría que de alguna forma el exceso de insulina es utilizado por la planta para su crecimiento.

8. 4.- Evaluación del Efecto del Factor Zm-IGF en la Incorporación de Marca Radioactiva en Proteínas Durante la Germinación.

Como uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar el efecto a nivel bioquímico del factor Zm-IGF a través de la síntesis de proteínas ribosomales, se tuvo la necesidad de determinar una estrategia metodológica que permitiera garantizar una buena incorporación de $^{35}\text{[S]}$ -metionina en los tejidos que constituyen a los ejes embrionarios, durante las primeras horas de germinación.

Los datos obtenidos de tres experimentos independientes indican claramente que la incorporación de marca radiactiva se mejora cuando el eje embrionario se encuentra dentro de la semilla las primeras 22 h de incubación. Bajo esta condición los niveles de incorporación se incrementaron hasta un 50 % con respecto a los tratamientos en donde el eje embrionario se disectó de la semilla seca y se incubó desde el inicio del experimento en medio de cultivo MS (Figura 8).

Es importante mencionar que al término de las 24 h, el tamaño de los ejes embrionarios provenientes de las semillas que se imbibieron con agua e incubaron durante 22 h, fue más grande (1.5 cm) con respecto a los ejes colocados en medio MS desde el principio del experimento (1 cm).

Esto podría indicar que los tejidos que se encuentran en contacto con el eje embrionario durante su germinación proveen en forma más eficiente los requerimientos nutricionales necesarios para una germinación exitosa y por tanto su desarrollo fue más rápido. Por el contrario, los ejes secos están sometidos a un

estrés desde el inicio del experimento, ya que al ser extraídos de la semilla y para que ocurra la germinación y proliferación celular primero tiene que adaptarse al medio de cultivo en el que se encuentra. Por todo esto se determinó utilizar el sistema de semillas incubadas durante 22 h (a) para realizar los experimentos de incorporación de marca radioactiva.

8. 5.- Efecto de Zm-IGF en la Síntesis de DNA Durante la Germinación

El efecto de la insulina y los factores de crecimiento similares a insulina (IGF-I e IGF-II) en animales repercute directamente en la proliferación celular, al activar rutas de transducción de señales y la expresión de genes que participan en la regulación del metabolismo, crecimiento y diferenciación celular (Fumagalli y Thomas, 2000; Allan *et al.*, 2001).

Por otro lado, hay abundantes reportes en la literatura sobre los efectos inducidos en plantas en lo que se refiere a la duplicación del DNA por acción de hormonas vegetales tales como citocininas. Sin embargo no existe información sobre el efecto de factores de crecimiento en este parámetro. Actualmente se sabe que la insulina y el Zm-IGF favorecen a la germinación y el crecimiento de ejes embrionarios de maíz, por lo que podría pensarse que Zm-IGF pudiera también tener algún efecto en la síntesis de DNA y la división celular durante la germinación de ejes embrionarios de maíz. Para resolver esta interrogante se evaluó la síntesis de DNA, con base en la incorporación de $^3\text{[H]}$ -timidina en el DNA de núcleos en interfase de ejes embrionarios de maíz (Fig. 9 y 10).

Para la realización de esta evaluación se determinaron las condiciones metodológicas adecuadas para la aplicación de la marca radioactiva, extracción de núcleos y extracción de DNA.

Los resultados obtenidos permitieron determinar que el factor Zm-IGF estimula la incorporación de $^3\text{[H]}$ -timidina en el DNA por arriba del control en células de ejes embrionarios con 30 h de incubación, la bencilaminopurina (una citocinina) usada como control, mostró un efecto de inducción de síntesis muy marcado. Esta hormona vegetal se conoce que participa en la regulación del ciclo celular en ejes de maíz e incrementa la síntesis de DNA (Baiza *et al.*, 1986). Estos datos sugieren que el efecto del factor Zm-IGF en la división celular podría ser el de estimular en forma selectiva la síntesis de alguna(s) proteína(s) relacionada(s) con el ciclo celular.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MONITOREO DE ÓRGANOS Y TEJIDOS DE MAÍZ PARA DETECTAR LA PRESENCIA DEL FACTOR Zm-IGF

Tipo de Tejido	Características de los tejidos y órganos analizados									
	Horas de germinación					96	Zonas meristemáticas	Hoja totalmente enrollada	Hoja extendida	
Seco	24	48	72	96						
Eje embrionario	X	XX	XXX	X	—					
Escutelo	—	X	X	X	—					
Epicotilo	—		X	—	—					
Mesocotilo	—		X	—	—					
Hipocotilo	—		X	—	—					
Puntas de raíz	—			—	—	X				
Última hoja	—				—		X			
Penúltima hoja	—				—					

Características del tejido calloso analizado:

Viejo (con 5 resiembras) Al final de la resiembra Tipo embriogénico	Viejo (con 3 resiembras) No embriogénico		Recién inducido No embriogénico 1ª resiembra
	Viejo (con 5 resiembras) Al inicio de la resiembra Tipo embriogénico	Viejo (con 3 resiembras) No embriogénico	
XX	X		

Tabla 1 Presenta los tejidos que fueron evaluados para detectar la presencia de Zm-IGF. En todos los casos a partir de 10 g de tejido, se obtuvo un extracto protéico, el cual se analizó por dot-blot y western-blot. Para la detección del factor Zm-IGF se utilizó un anticuerpo contra insulina de bovino desarrollado en cerdo. Esta tabla representa los resultados obtenidos de 4 evaluaciones independientes. — no detectado. X poco abundante. XX abundante

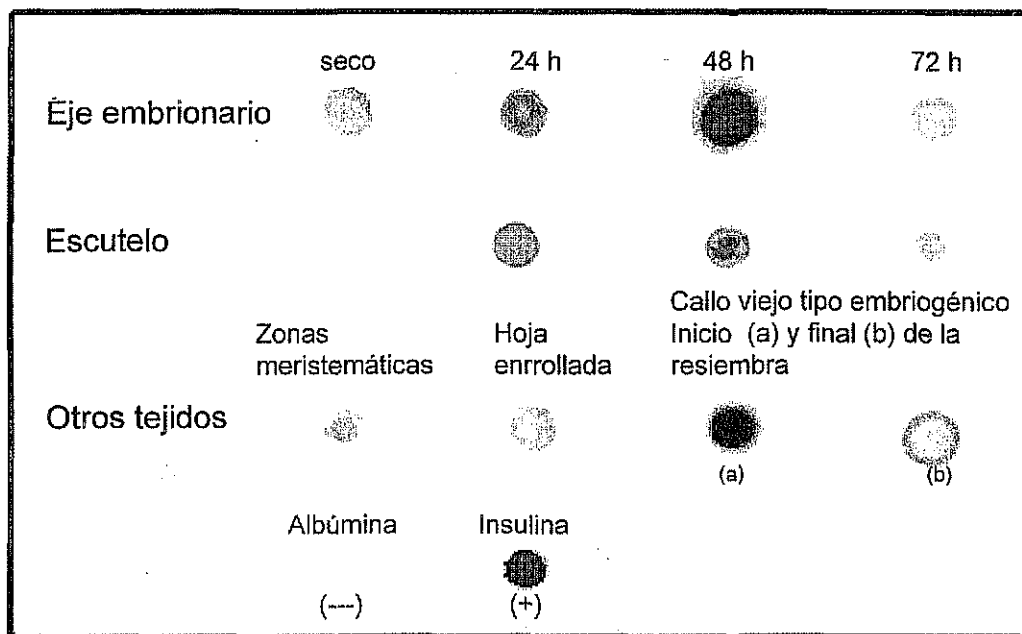


Figura 2. Dot-blot de tejidos en los que fue evaluada la presencia de Zm-IGF. De los tejidos y órganos que se presentan en la Tabla 1, se obtuvieron extractos proteícos y se aplicaron 50 µg de proteína total en membrana PDVF, usando un equipo de microfiltración. Se utilizaron anticuerpos contra insulina de bovino como primer anticuerpo (dilución 1:2000), la reacción de reconocimiento fue detectada por el sistema de ECL, mediante el empleo de un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa.

Como se puede observar, el factor Zm-IGF se presenta en pequeñas cantidades en el eje embrionario seco ($25 \mu\text{Uml}^{-1}$), va incrementándose y alcanza los niveles más altos ($150 \mu\text{Uml}^{-1}$) en extractos proteícos provenientes de embriones con 48 h de incubación en agua. Una respuesta similar se presenta en extractos proteícos de callo viejo (con 5 resiembras) que fue tomado al final de la resiembra. En hoja y zonas meristemáticas, la cantidad que se presenta es mucho menor ($25 \mu\text{Uml}^{-1}$). Como control negativo se aplicó albúmina en una concentración de $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ y el control positivo fue insulina $200 \mu\text{Uml}^{-1}$. Cabe mencionar que las cantidades de Zm-IGF sólo son aproximadas, ya que fueron determinadas por comparación con la curva patrón de insulina.

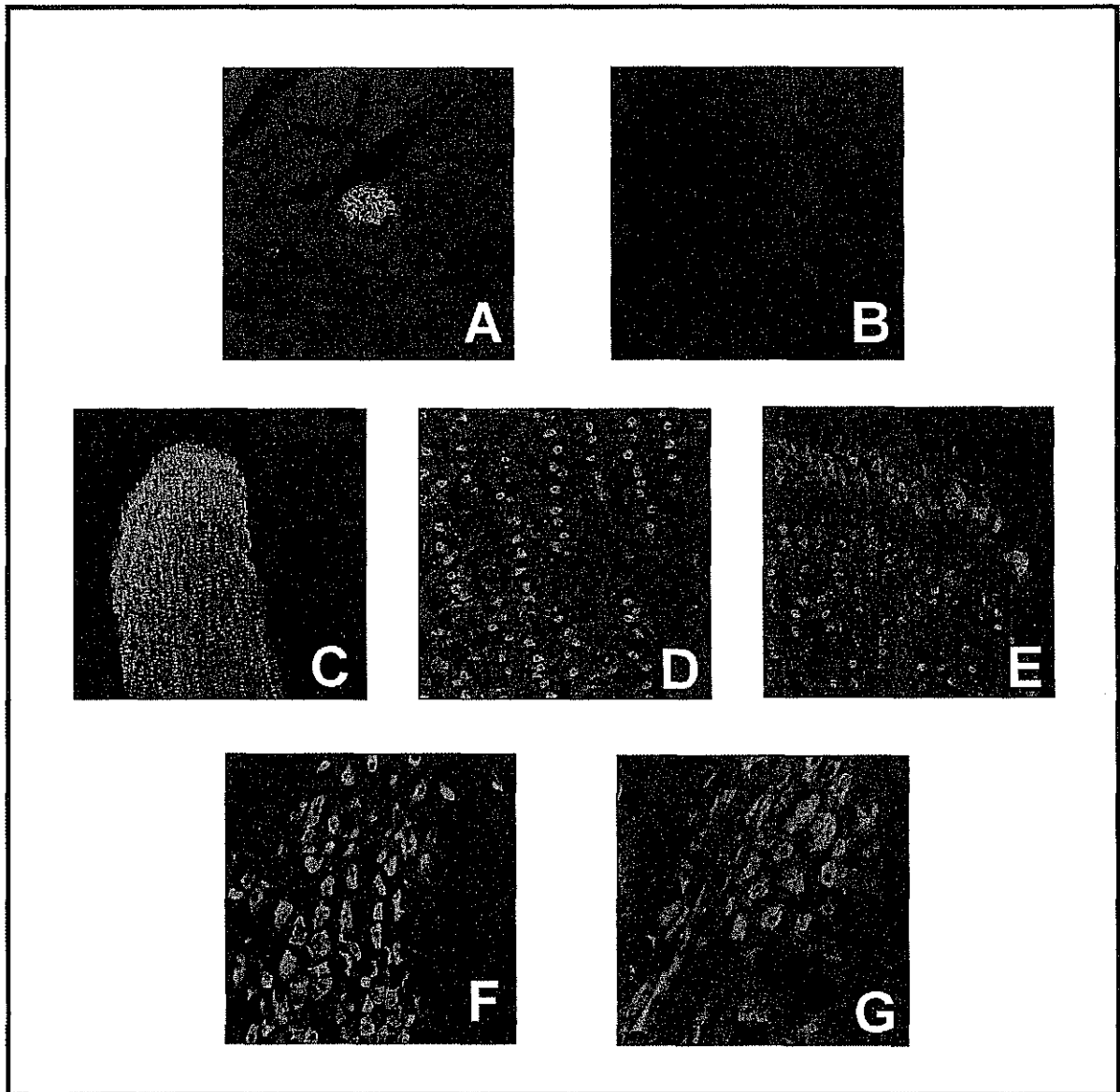


Figura 3 . Inmunocitoquímica de Zm-IGF. Segmentos de 1-2 mm de longitud de diferentes regiones de los ejes embrionarios de maíz (epicotilo e hipocotilo), incubados durante 48 horas en agua; se procesaron como se indica en materiales y métodos. En este caso se utilizó tejido de páncreas como control positivo (A) y tejido escutelar proveniente de embriones incubados durante 15 h como control negativo (B). El factor Zm-IGF se localizó en el citoplasma celular de las regiones meristemáticas, tanto del epicotilo (C, D y E) como del hipocotilo (F y G). En ambos tejidos se observó que la intensidad de la señal se va disminuyendo en las células más alejadas de la región meristemática (C) y esto implica que el factor Zm-IGF encuentra principalmente en regiones que están en constante división celular, por lo que es posible que tenga una participación relevante durante la proliferación celular. Aumentos: A y C 10X ; B, D, E, F y G 40X.

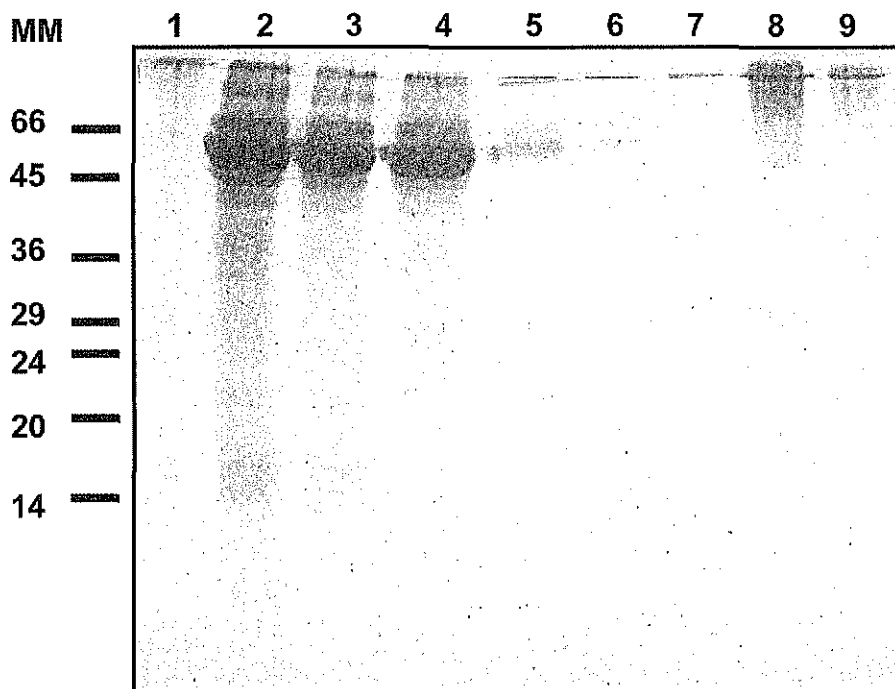


Figura 4. Monitoreo de las fracciones obtenidas durante la preparación de la columna de afinidad. Se cargaron aproximadamente 30 μg de las primeras fracciones (2, 3 y 4) y 15 μg de las fracciones 1, 5, 6, 7, 8 y 9 en un gel SDS-PAGE al 12 % y la tinción fue con azul de Coomassie R-250. (MM): marcadores de masa molecular; (1) solución de almacenamiento de la columna; (2) IgG recuperado (no unido a la resina); (3) solución de DMP recuperada después de la reacción del enlace covalente; (4) fracción del lavado con buffer de entrecruzamiento; (5 y 6) Buffer de bloqueo de sitios activos remanentes; (7 y 8) buffer de elución de IgG (eluye todo el anticuerpo que no esté unido); (9) Buffer de lavado. Las fracciones 10 a la 12 contienen el buffer que se recuperó cuando la columna se equilibró. Al igual que la fracción 9, en estas últimas fracciones no se lograron detectar bandas. En este caso el análisis electroforético nos indicó que la preparación de la columna de afinidad fue muy buena ya que al inicio se eluye el anticuerpo no unido, quedando sólo el que se unió en forma covalente a la proteína "A" sepharosa. Esto se comprueba en las últimas fracciones, ya que no se presentan bandas correspondientes al anticuerpo.

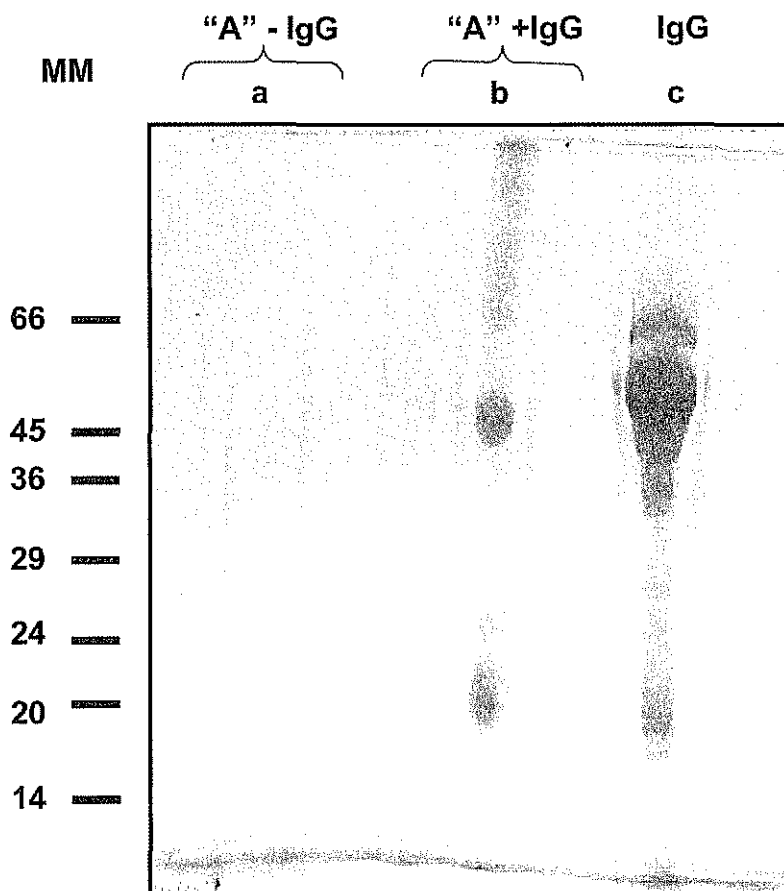


Figura 5 . Prueba de unión covalente entre el anticuerpo y la proteína "A" sepharosa. Se cargaron 15 μ g de proteína en un gel SDS-PAGE al 12 %, la tinción se realizó con azul de Coomassie R-250. **(MM)**: marcadores de masa molecular; **(a)** proteína "A" sepharosa sin anticuerpo; **(b)** proteína "A" sepharosa con el anticuerpo unido covalentemente (la muestra se tomó al final de la preparación de la columna de afinidad); **(c)** anticuerpo contra insulina. Esta prueba es la que se recomienda (Sisson y Castor, 1990) para verificar la presencia del enlace covalente, en el caso del carril **a**, la proteína "A" sepharosa nunca estuvo en contacto con el anticuerpo por lo cual no se deben observar bandas; en el carril **b** se observan bandas pesadas y ligeras, que si se comparan con las del carril **c** corresponden al anticuerpo contra insulina que quedó unido a la proteína "A" sepharosa. Es de suma importancia la realización de estas pruebas cuando se emplean columnas de afinidad, ya que es una manera de monitorear la condición de la unión covalente del anticuerpo a la proteína "A" sepharosa.

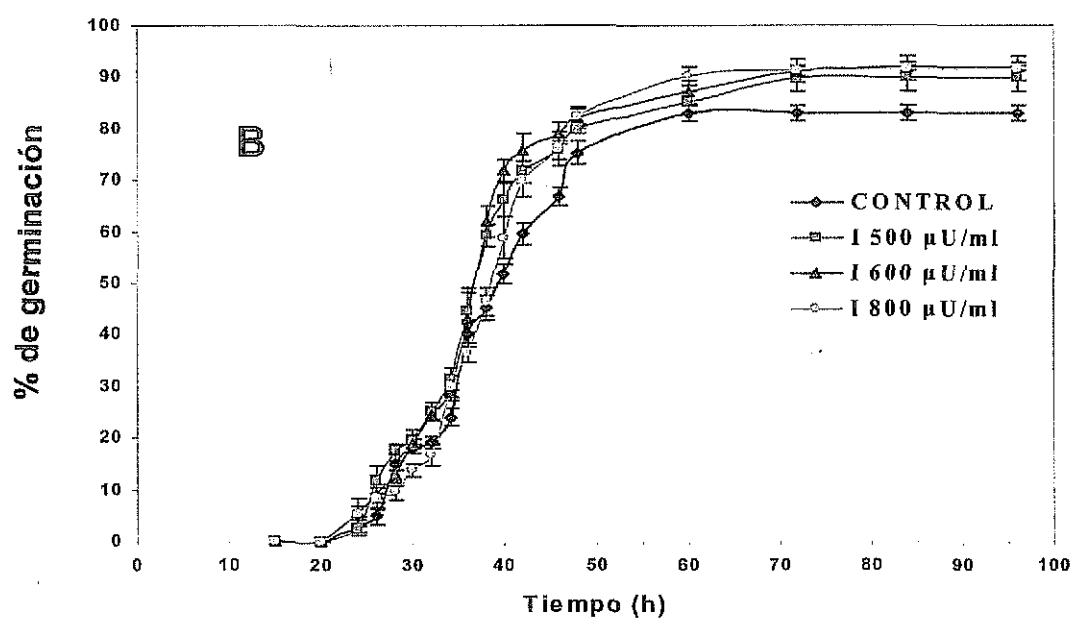
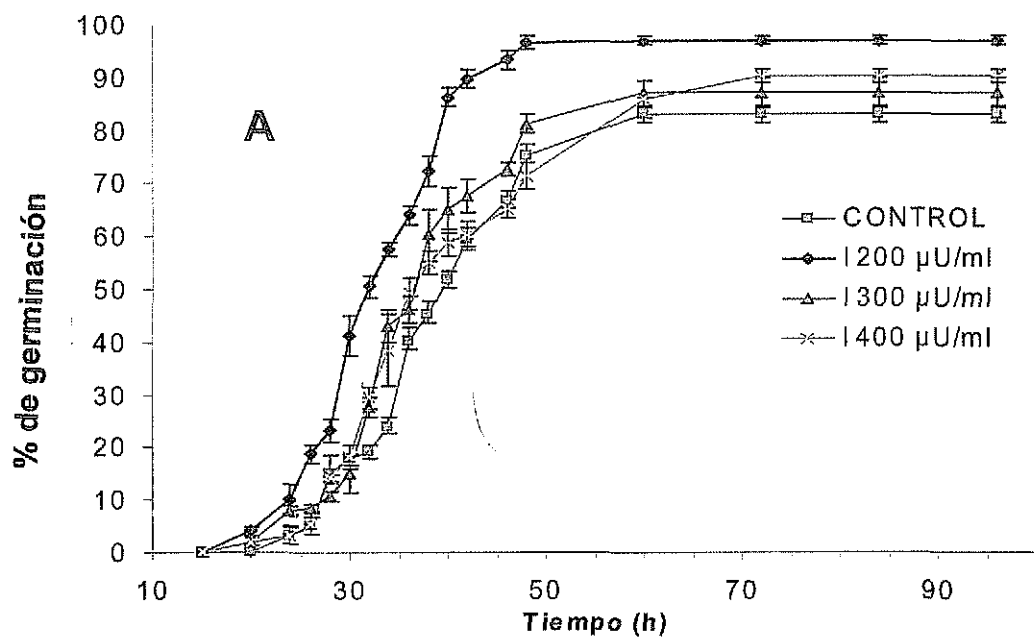


Figura 6. Efecto de diferentes concentraciones de insulina durante la germinación de semilla de maíz. Lotes de 100 semillas se desinfectaron y germinaron a 24 ± 2 °C en oscuridad constante y en presencia de diferentes concentraciones de insulina (200, 300, 400, 500, 600, 800 μUml^{-1}); el porcentaje de germinación se determinó cada 2 h a partir de las 18 h hasta las 72 h de incubación. Nótese que en el tratamiento con 200 μUml^{-1} de insulina, la germinación se favorece considerablemente. Los datos graficados son el promedio de cuatro ensayos independientes ($p < 0.01$).

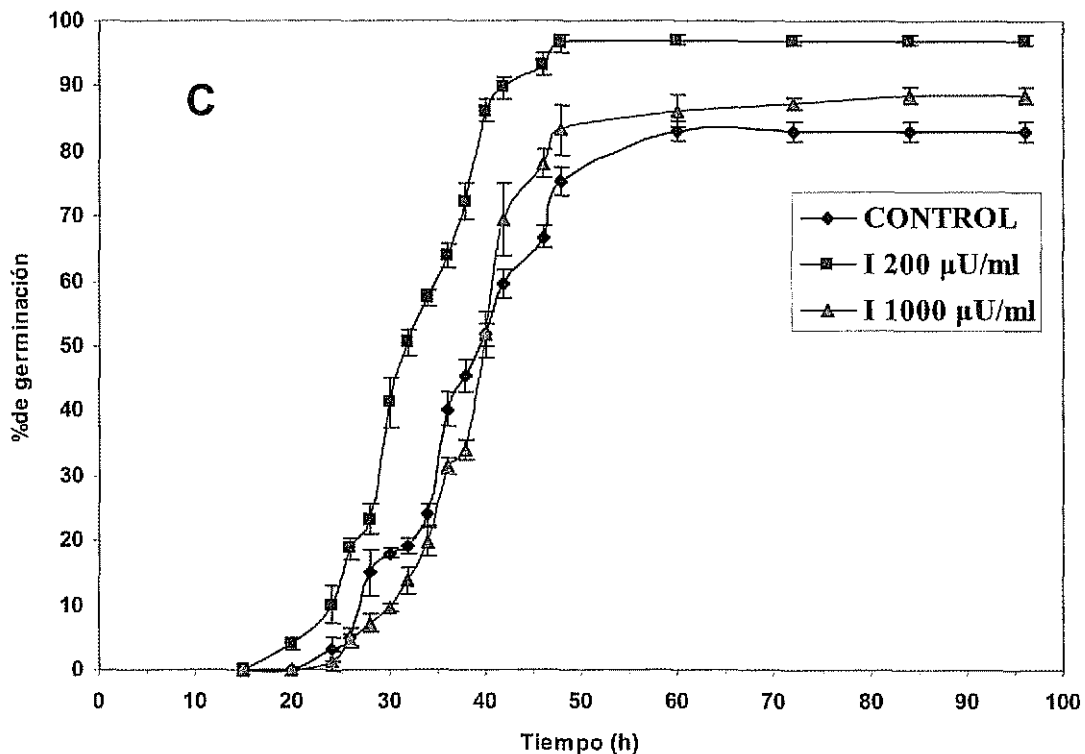


Figura 7. Efecto de la insulina durante la germinación de semillas de maíz. Las semillas se germinaron de la misma forma que la figura anterior, sólo que en este caso las concentraciones de insulina fueron 200 y 1000 μUml^{-1}). El porcentaje de germinación se determinó de igual forma. Es importante resaltar la diferencia que existe en la respuesta de germinación entre estos dos tratamientos ya que con 200 μUml^{-1} de insulina, la germinación se favorece considerablemente con respecto a los otros dos tratamientos (1000 μUml^{-1} y control). Los datos graficados también corresponden al promedio de cuatro ensayos independientes ($p < 0.01$).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

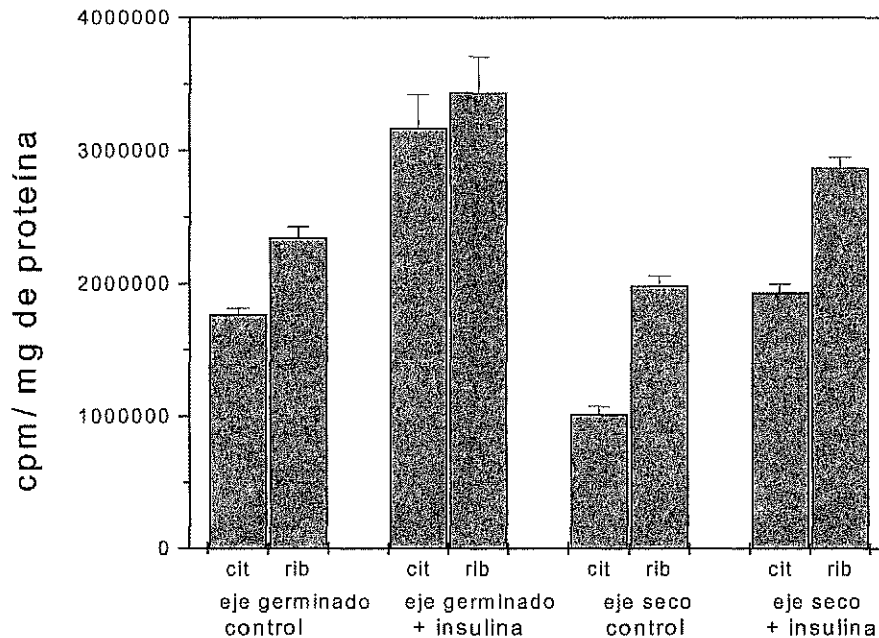


Figura 8. Evaluación de la incorporación de ^{35}S -metionina en proteínas de ejes embrionarios de maíz. Semillas intactas y ejes embrionarios se desinfectaron y se incubaron durante 22 h en agua y medio de cultivo MS respectivamente. Posteriormente, por una parte se disectaron los ejes embrionarios de la semilla y se colocaron en medio MS y por la otra, los ejes embrionarios disectados desde el inicio se pasaron a medio de cultivo nuevo; en ambas condiciones se trataron con $200 \mu\text{Uml}^{-1}$ de insulina o agua (como control) más $400 \mu\text{Ci}$ de ^{35}S -metionina durante dos horas más. Se obtuvieron las proteínas ribosomales y las citoplasmicas, y se evaluó la incorporación de marca mediante un contador de centelleo líquido.

Estos resultados indicaron que es mejor incubar las semillas por 22 h y posteriormente disectar los ejes embrionarios para una mejor incorporación de marca radioactiva. La gráfica presenta los resultados obtenidos de tres experimentos independientes ($p < 0.01$). Se demuestra que la presencia de insulina en ambos sistemas estimula la síntesis de proteínas tanto citoplásmicas (cit) como ribosomales (rib).

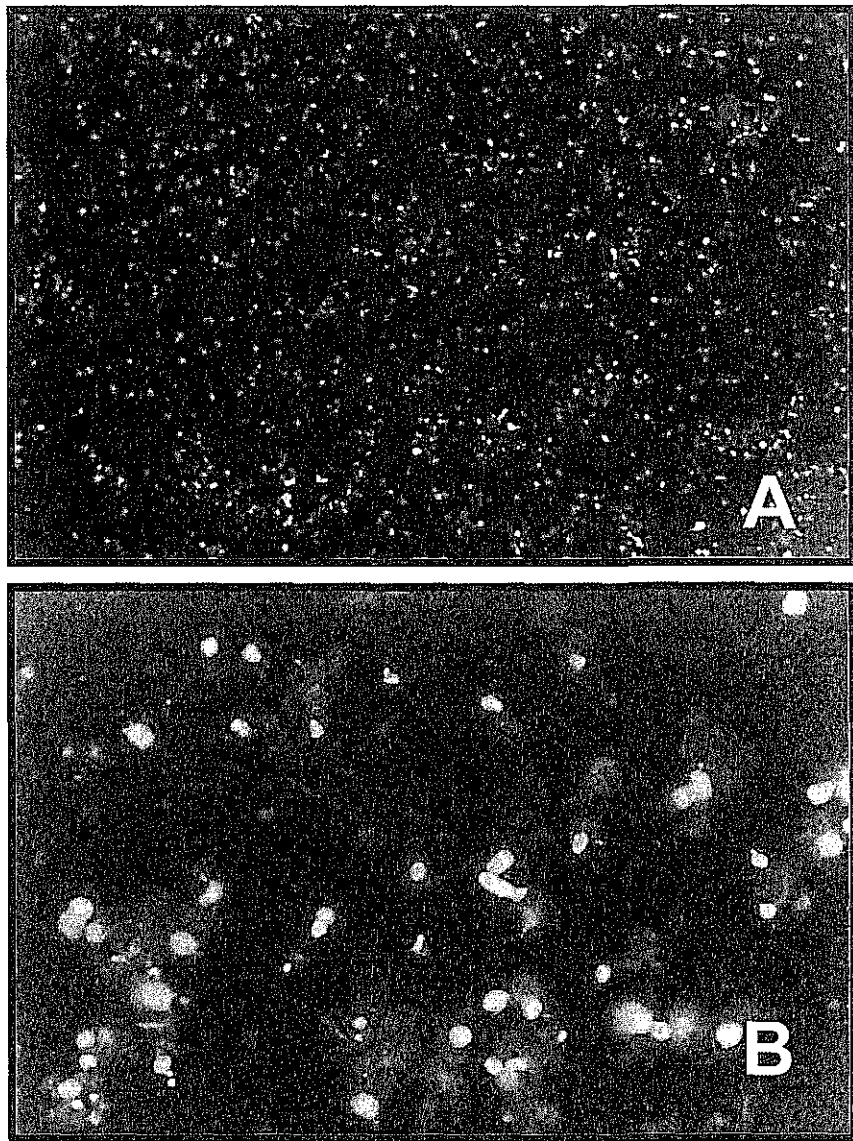


Figura 9. Núcleos de ejes embrionarios de maíz teñidos con DAPI. La extracción se hizo a las 30 h de incubación en medio MS. A los ejes embrionarios se les dió un pulso con $15 \mu\text{Ci/ml}^{-1}$ de ^3H -timidina (A.E. 87 Ci/mmol) durante 15 h. En **A** se muestran con un aumento de 10X y en **B** a 100X

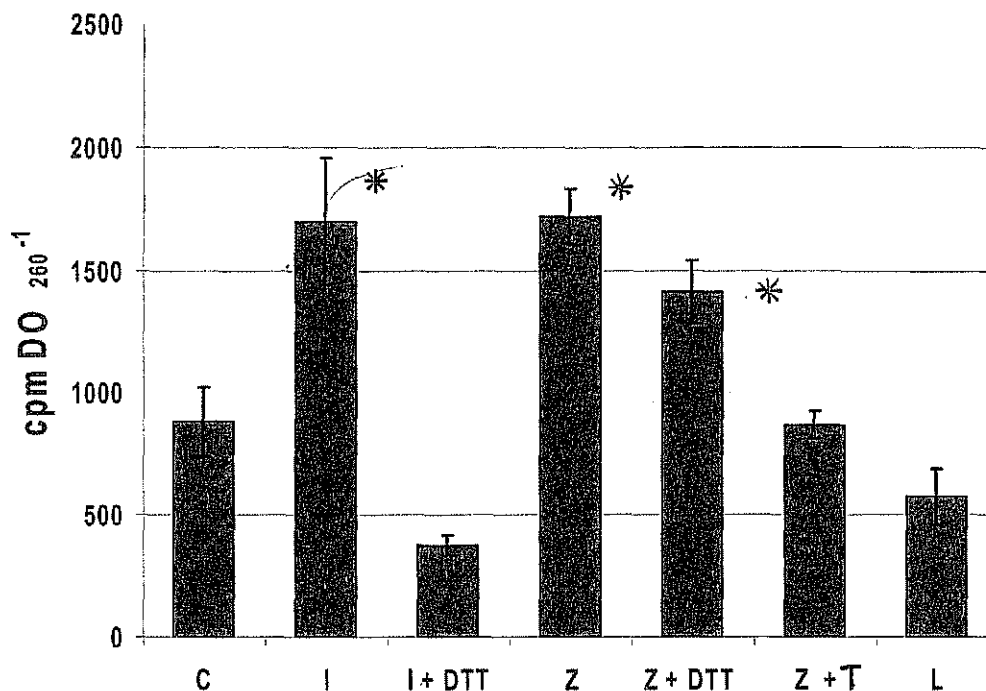


Figura 10. Efecto de Zm-IGF e Insulina en la síntesis de DNA durante la germinación de ejes embrionarios de maíz. Aproximadamente 1 g de ejes disectados de la semilla, se imbibieron por 15 h en agua y posteriormente se aplicaron los siguientes tratamientos: $200 \mu\text{Uml}^{-1}$ de insulina (I); $200 \mu\text{Uml}^{-1}$ insulina + 2 mM DTT (I+DTT); $200 \mu\text{Uml}^{-1}$ Zm-IGF (Z); $200 \mu\text{Uml}^{-1}$ Zm-IGF + 2 mM DTT (Z+DTT); $200 \mu\text{Uml}^{-1}$ Zm-IGF + $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ tripsina (Z+T); Lisozima (L) y agua como control (C) y se marcaron con $15 \mu\text{Ci } ^3\text{[H]-timidina}$ (s.a. $87 \mu\text{Ci/mmol}$) durante 15 h más. El DNA se extrajo a partir de los núcleos aislados, posteriormente se determinó la incorporación de $^3\text{[H]-timidina}$ en un contador de centelleo líquido. Los asteriscos señalan a los tratamientos cuya diferencia fue significativa con respecto al control. Los datos que se presentan son el promedio de tres experimentos independientes ($p < 0.01$).

A maize insulin-like growth factor signals to a transduction pathway that regulates protein synthesis in maize

Cristina GARCÍA FLORES*, Raúl AGUILAR*, Homero REYES DE LA CRUZ*, Martha ALBORES† and Estela SÁNCHEZ DE JIMÉNEZ*¹

*Departamentos de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Circuito Institutos, Ciudad Universitaria 04510, México D.F., México, and †Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) Circuito Institutos, Ciudad Universitaria 04510, México D.F., México

Insulin and insulin-like growth factors (IGFs) are well-characterized regulators in higher eukaryotic cells that control biological processes such as cell growth and survival, and selective translation of mRNAs. This research presents the purification of a 20 kDa protein, isolated from maize tissue, with IGF activity. The protein was purified from 48 h-germinated maize embryonic axes by G-50 Sephadex fractionation followed by affinity chromatography through a bovine insulin antibody–Sepharose column. This protein proved to significantly speed up maize germination and seedling growth. At the molecular level, *Zea mays* IGF (ZmIGF) enhanced phosphorylation of S6 ribosomal protein (rp) on the 40 S ribosomal subunit, in a similar way as observed when bovine insulin is applied to maize axes during

germination. Rapamycin, a specific inhibitor of the insulin-stimulated signal transduction pathway, prevented S6 rp phosphorylation in maize axes. Moreover, ZmIGF stimulated [³⁵S]methionine incorporation into rps, above the level of overall cytoplasmic proteins. Either incubation with anti-insulin antibody, heat treatment (60 °C) or trypsin digestion abolished this ZmIGF effect. It is proposed that ZmIGF is an endogenous maize growth factor that regulates the synthesis of specific proteins through a pathway similar to that of insulin or IGFs in animal tissues.

Key words: maize growth factor of peptide nature, protein synthesis regulation, signal transduction pathway.

INTRODUCTION

The relevance of gene expression regulation at translational level in eukaryotes has been widely recognized and, at present, a large variety of translational control mechanisms have been described [1–4].

A well documented mechanism of translational control in various higher eukaryotes is the insulin/growth factor-induced protein synthesis regulation [5–7]. Indeed, insulin and insulin-like growth factors (IGFs), widely distributed among eukaryotic organisms [8–10], stimulate a signal transduction pathway that targets the protein synthesis apparatus by phosphorylating the S6 ribosomal protein (rp) on the 40 S ribosomal subunit [11,12]. Further, the increase in phosphorylated ribosomes tightly correlates with the selective translation of mRNAs containing a specific tract of oligopyrimidines (5'-TOP) cluster at their 5'-untranslated region, mostly transcripts coding for rps and translation factors [12–14].

During seed germination, quiescent maize embryonic axes gradually reinitiate protein synthesis, primarily based on translation of stored mRNAs [15,16]. Within this period translation has shown to be tightly regulated [17]; however, scarce information is available about the mechanisms that control this process.

In plants, several types of evidence have suggested the presence of insulin-like peptides, mainly based on immuno-recognition with anti-bovine or human insulin antibodies [18,19]. And more recently, a protein fraction was isolated from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seed coat that contains a polypeptide showing amino

acid sequence identity with the β -chain of bovine insulin [20]. Some of these purified insulin-like peptides have shown stimulation of glucose uptake in target animal tissues [18,20]. However, no endogenous regulatory or physiological role has been investigated for these peptides during plant development.

Previous work in our lab has demonstrated that insulin is capable of inducing activation of a signal transduction pathway in maize cells [21], similar to the one reported to be stimulated by this peptide in animals [7,22], which selectively regulates translation. Indeed, germinating maize embryonic axes fed with [³⁵S]methionine showed fast growth and a selective increase of rp and initiation translation factor, iso4E, synthesis after insulin stimulation [21,23]. These effects are blocked either by rapamycin or wortmannin, specific inhibitors of the insulin-signal-transduction pathway [5]. Based on this previous work, the present report shows the purification of an insulin-like protein, *Zea mays* IGF (ZmIGF), from germinating maize axes and tests its biological action at physiological and biochemical levels in maize tissues. Our analysis showed that the signal transduction pathway revealed in maize axes by this plant protein is similar to that triggered by bovine insulin in non-plant eukaryotic cells.

EXPERIMENTAL

Biological system

Seeds and embryonic axes from *Z. mays* L. cv Chalqueño were used in all experiments. Axes were manually dissected from seeds

Abbreviations used: Ab-I, antibody against insulin; $\Delta 60$ °C, insulin heated for 20 min at 60 °C; DTT, dithiothreitol; $Gt_{1/2}$, half-time of germination; IGF, insulin-like growth factor; MS, Murashige and Skoog; rp, ribosomal protein; TOP, tract of oligopyrimidines; ZmIGF, *Zea mays* IGF; Ab-I, mixture of ZmIGF with antibody against insulin.

¹ To whom correspondence should be addressed (e-mail estelas@servidor.unam.mx).

and either frozen immediately in liquid nitrogen until used or incubated in Murashige and Skoog (MS) medium [24] for the stated period, as described previously [25].

Germination curves and seedling development

Maize seeds, in sets of 100 seeds each, were imbibed between two rolled filter papers, either in water (control), water plus insulin (a final concentration 200 μ unit/ml bovine pancreas insulin; Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.), or water plus ZmIGF (a final concentration of 200 μ unit/ml ZmIGF) during 72 h at 24 ± 2 °C in darkness. At 18 h of imbibition, seeds were evaluated every 2 h for radicle protrusion in all sets. Germination curves were plotted as the average values of five different sets. Results were statistically analysed to calculate $Gt_{1/2}$ values (half-time of germination, i.e. when 50% of seeds have germinated) and total germination percentages, as well as standard deviations for each group. In addition, seedling size (root and coleoptyle) was measured for each group at 72 h of development.

Isolation and purification of ZmIGF protein

Maize seeds were germinated in water-imbibed cotton at 24 ± 2 °C in darkness. After 48 h embryonic axes were dissected. The axes (10 g) were frozen in liquid N_2 , ground in a mortar and then homogenized in grinding extraction buffer [100 mM KCl/20 mM Hepes (pH 7.6)/7 mM 2-mercaptoethanol/0.2 mM EDTA/10% glycerol/0.1% Triton X-100/10 mM benzamidine/2 mM PMSF] in a 1:5 (w/v) ratio. The homogenate was centrifuged at 27000 g for 30 min at 4 °C and then the supernatant at 280000 g for 3.5 h. The supernatant was concentrated on poly(ethylene glycol) 6000. The concentrated supernatant was fractionated through a Sephadex G-50 column 1.5 cm \times 24 cm (approx. 15 ml of the column volume), and eluted in 1:10 ratio of elutant to grinding buffer. Absorbance was recorded at 280 nm and analysed for positive reaction with bovine insulin antibody by dot blot (see below). The selected fractions were resolved through affinity chromatography using a column packed with sepharose covalently linked to bovine insulin antibody, prepared according to the manufacturer's instructions (Immunopure IgG; Pierce). The column was washed once with binding buffer (10 mM Tris, pH 7.5) and eluted with buffer (0.1 M glycine, pH 2.8). The A_{280} of the fractions (1 ml) was recorded and analysed by dot blot as indicated above. Fractions containing ZmIGF were treated again with Protein A-sepharose to eliminate remaining insulin antibody. The purified fractions were analysed by Western blotting.

ZmIGF immunodetection

Dot blotting

Each column fraction (50 μ l) was blotted onto PVDF membrane (Immobilon-P; Millipore) using a Dot Micro Filtration Apparatus (Filtration Manifold System, Rockville, MD, U.S.A.).

Western blotting

The samples containing ZmIGF were resolved by SDS/PAGE (using 15% gel), and blotted onto PVDF membrane with a LKB semi-dry blotter (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, U.S.A.).

In both cases, guinea-pig polyclonal antibody raised against bovine insulin (Sigma) was used as the primary antibody diluted 1:2000 in 5% non-fat dry milk for ZmIGF immunodetection. After several washes, IgG guinea-pig antibody coupled to per-

oxidase (Sigma), diluted 1:2000, was used for signal detection (ECL[®] system; Amersham Pharmacia Biotech).

Insulin standard curve and ZmIGF units definition

For routine estimation of the relative concentration of ZmIGF, an insulin standard curve was set (50–500 μ unit/ml) and revealed by the dot blotting of 10 μ l aliquots. The ZmIGF concentration was calculated from the insulin standard curve.

In vivo labelling of rps

Maize embryonic axes from seeds imbibed in water during 22 h at 25 °C in darkness, were dissected and incubated in nutrient MS medium for 2 h more with either 300 μ Ci [³⁵S]methionine or 330 μ Ci [³²P]orthophosphate (Amersham Pharmacia Biotech), in presence or absence of 200 μ unit/ml of either ZmIGF or insulin. In some experiments, rapamycin (0.1 μ M) (Sigma–Aldrich) was applied 30 min before ZmIGF or insulin addition.

The axes were homogenized in liquid N_2 and the frozen powder mixed with extraction buffer [20 mM Tris/HCl (pH 7.8)/5 mM $MgCl_2$ /20 mM KCl/1 mM PMSF/5 mM NaF/0.5% 2-mercaptoethanol/1% Triton X-100/0.25 M sucrose]. The slurry was clarified at 27000 g at 4 °C for 30 min, and to purify the ribosomes from non-structural rps, the supernatant was layered on a sucrose-buffered cushion (0.5 M sucrose and 0.8 M KCl in extraction buffer) and centrifuged at 280000 g for 3.5 h. The ribosome pellet was resuspended in resuspension buffer (20 mM Hepes/20 mM KOH/5 mM magnesium acetate/125 mM potassium acetate/5% 2-mercaptoethanol) and the rps were extracted with acetic acid, precipitated with acetone as described previously [26] and resuspended in resuspension buffer. The cytoplasmic proteins were precipitated with 10% trichloroacetic acid, resuspended in water and neutralized with KOH. [³⁵S]Methionine uptake was measured in this fraction using a liquid scintillation counter (Packard, Downers Grove, IL, U.S.A.).

The labelled [³²P]orthophosphate rps were analysed by SDS/PAGE [12% (w/v) gel] [27]. The gels were stained with 0.2% Coomassie Brilliant Blue R-250, destained in 10% ethanol and 15% glycerol during 30 min, and dried or used for Western-blot analysis. Autoradiographs of the dried gels were obtained at –70 °C using X-Omat film (Eastman Kodak, Rochester, NY, U.S.A.).

S6 rp immunodetection

For the S6 rp immunodetection, the rps from the gels were electro-blotted on PVDF membrane. Membranes were blocked in TBS [50 mM Tris (pH 7.4)/150 mM NaCl/0.1% (w/v) Tween 20] with 5% non-fat dry milk, incubated with S6 rp rabbit antibody raised against a 17 amino acid peptide from the most conserved region of the S6 rp (Genemed Synthesis, San Francisco, CA, U.S.A.), diluted 1:2000, washed, and developed with 1:2000 diluted rabbit antibody IgG conjugated to horseradish peroxidase (Bio-Rad). Immunoreactive proteins were revealed by ECL[®].

Protein measurements were performed according to Bradford [28] using BSA (Sigma) as a standard.

RESULTS

In order to select the best tissue for ZmIGF purification, different maize tissue extracts were screened by dot blot analysis with insulin antibody. Results indicated the presence of an insulin-like peptide mainly in fast-growing tissues such as emerging seedlings

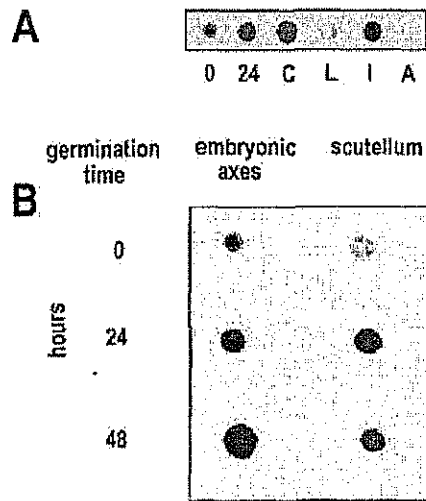


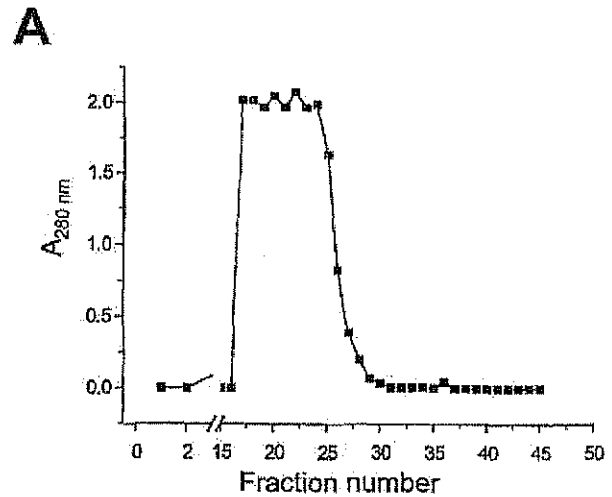
Figure 1 Immunological detection of ZmIGF in different maize tissues

(A) Dot blot of extracts from non-germinated maize axes (0), 24-h germinated maize axes (24), callus tissue (C), young leaf (L), bovine insulin (stock 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (I) and bovine serum albumin (A) (stock 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). (B) Dot blot of axes and scutellum extracts from germinated maize seed (0, 24 and 48 h). In both cases, 50 μg of proteins from the extracts were blotted onto a PDVF membrane using a Dot Micro Filtration Apparatus. Insulin antibody (1:2000 dilution) was used as primary antibody and the reaction was detected by ECL³⁰ system using guinea-pig IgG conjugated with peroxidase.

or calli (Figure 1A). Extracts of 48-h germinating axes were chosen as source of ZmIGF protein (Figure 1B). Maize axes extract containing 8 mg of total protein from 48 h germinating seeds were filtered through a G-50 Sephadex column. The eluted fractions (1 ml) were monitored at A_{280} (Figure 2A) and 10-fold dilutions of these fractions were tested by dot blot with insulin antibody. A peak of positive cross reaction was found in fractions 17–23 (Figure 2B). The highest positive fraction (number 20, indicated by the arrow) was then passed through an affinity chromatography column packed with anti-insulin-sepharose (Figure-3A). Extensive washing of the column was performed before eluting the retained proteins. The eluted fractions were monitored at 280 nm and tested by dot blot analysis. Positive reaction against insulin antibody was recorded from the first eluted fractions (ZmIGF) (Figure 3B). As control, bovine insulin was subjected to the same procedure through the affinity chromatography column and analysed by dot blot (Figures 3C and 3D).

Gel electrophoresis and Western-blot analysis of the eluted fraction was performed (Figure 4). The crude axes extract showed two bands of 20 kDa and 7 kDa by Coomassie-Blue stained gel (Figure 4A) and Western blot (Figure 4B). However, the eluted fraction from the affinity column showed only the band of 20 kDa (ZmIGF) (Figure 4B). All the following experiments were performed with the purified 20 kDa peptide.

To test the physiological activity of ZmIGF, sets of 100 seeds each were germinated in water or in water plus 200 $\mu\text{unit}/\text{ml}$ of either insulin or ZmIGF, and the % of germinated seeds was recorded after 18 h at 2 h intervals. At the end of a total 72 h incubation period the size of roots and coleoptyles was measured (Table 1). A representative seedling from each set is shown in Figure 5. Two negative controls were set by germinating the seeds with either ZmIGF previously mixed with insulin antibody (Ab-I) or insulin heated for 20 min at 60 °C ($\Delta 60$ °C) (Table 1).



B

Figure 2 Sephadex G-50 column chromatography

Crude protein extract from 48-h germinated maize axes were fractionated by applying 3 ml of extract (8 mg of protein) to a 1.5 cm \times 24 cm column (approximately 15 ml bed volume). Elution was performed with extraction buffer (1:10 dilution). Fractions (1.5 ml) were collected and assayed by dot-blot with bovine insulin antibody. (A) 280 nm elution profile. (B) Dot blot of the fractions (1:10 dilution). Blots were incubated with the same polyclonal antibody as in Figure 1.

$Gt_{1/2}$ was determined using the average values from each group. Significant acceleration of seed germination in insulin and ZmIGF sets was observed, as compared with the control (Table 1). The Ab-I and $\Delta 60$ °C groups gave similar $Gt_{1/2}$ values as the control. Roots and coleoptyles from the corresponding seedlings after 72 h of growth were measured. Significantly larger values were found for the experimental groups germinated with insulin or ZmIGF as compared with the controls, the Ab-I or $\Delta 60$ °C groups ($P < 0.01$). The largest values were obtained for coleoptyles from the ZmIGF-stimulated axes (Table 1).

Insulin is known to target the translation apparatus by inducing phosphorylation on the S6 rp of the 40 S ribosomal subunit, both in animal [12] and maize [21] tissues. To investigate if ZmIGF has the same effect on maize tissues as insulin, axes were stimulated either with ZmIGF, insulin or not at all (water) and exposed to [³²P]orthophosphate for the last 2 h of the incubation period. One additional group was also set where rapamycin, a powerful inhibitor of the insulin-stimulated signal transduction pathway, was added to the axes 30 min prior to ZmIGF stimulation. At the end of the incubation period, the rps were obtained from the ribosomes of each axis set, and aliquots with equal protein content were resolved by SDS/PAGE and revealed by autoradiography (Figure 6A). A phosphorylated 31 kDa labelled band (S6 rp) was observed in all samples tested. Stronger phosphorylation on S6 rp from axes stimulated with insulin or ZmIGF was observed, compared with the control. On the other

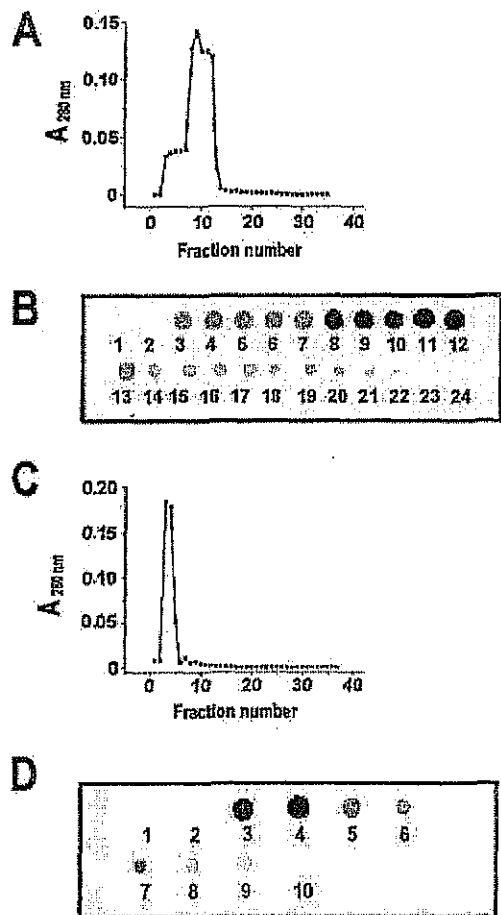


Figure 3 Affinity chromatography column

Purification of ZmIGF was performed through an affinity chromatography column of Sepharose-Protein A matrix covalently attached to insulin antibody. (A) Fraction number 20 from the Sephadex G-50 gel filtration column (arrow in Figure 2) (ZmIGF approximately equivalent to 3.3 units of insulin) was loaded onto the affinity chromatography column. After extensive washing the column was eluted with 0.1 M glycine buffer and the 280 nm elution profile was recorded. (B) Aliquots of each fraction were assayed by dot blot with bovine insulin antibody (1:2000 dilution), as described in the Experimental section. (C) Bovine insulin (0.15 mg, approx. 3.28 units) was applied to the same type of affinity column as the control. (D) Dot-blot analysis of fractions from column (C).

hand, the set of axes containing rapamycin did not exhibit the enhanced S6 rp phosphorylation induced by ZmIGF (Figure 6A). Densitometric analysis of the 31 kDa labelled bands clearly shows these differences (Figure 6C).

Identification of the 31 kDa phosphorylated band as the S6 rp was performed by Western-blot analysis using a specific antibody raised against a 17 amino acid peptide from the most conserved region of the S6 rp (see the Experimental section). Results indicated positive immunorecognition of the 31 kDa band with the specific antibody in all the sets confirming previous identification made by the full S6 rp antibody [26] (Figure 6B). These results also showed that the concentration of S6 rp in each channel was approximately the same, regardless of the experimental treatment applied.

According to previous reports [13,14], insulin-induced S6 rp phosphorylation of the ribosomes stimulates selective translation

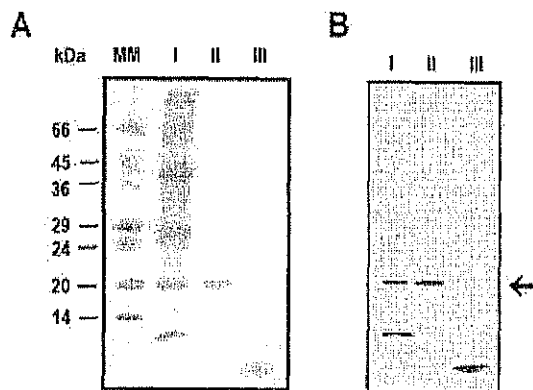


Figure 4 Western blot of immunoreactive fractions from affinity column

(A) Protein (50 μ g) from crude extract of 48-h germinated maize axes (I), 0.78 μ g of purified ZmIGF (II) and 2 μ g of insulin (III) were loaded on SDS/PAGE [12% (w/v) gel] and stained with 0.2% Coomassie Brilliant Blue R-250. MM, molecular mass markers. (B) Proteins were blotted on PVDF membranes and revealed as described in the Experimental section. Arrows indicate the immuno-reacting peptides against insulin antibody.

Table 1 Physiological effect of insulin and ZmIGF on maize germination and seedling growth

$G_{1/2}$, total germination and seedling size were recorded for each maize set (100 seeds). The percentage of germinated seeds was recorded every 2 h from 18–72 h of germination. After that, the length of coleoptyles and roots was measured in the maize seedlings from each treatment. The mean values of five independent replicates were used for statistical analysis (*t*-test). * $P < 0.01$ (statistically significant difference with respect to control).

Treatment	$G_{1/2}$ (h)	Germination (%)	Seedling size at 72 h	
			Root length (cm)	Coleoptyle length (cm)
Control	37	92	7.4 \pm 0.1	13.3 \pm 0.2
Insulin	34*	97	9.9 \pm 0.4*	15.0 \pm 0.6*
ZmIGF	32*	96	9.7 \pm 0.1*	17.1 \pm 0.2*
Ab-I	35	90	7.0 \pm 0.2	13.1 \pm 0.3
$\Delta 60^\circ\text{C}$	37	92	6.8 \pm 0.4	12.7 \pm 0.2

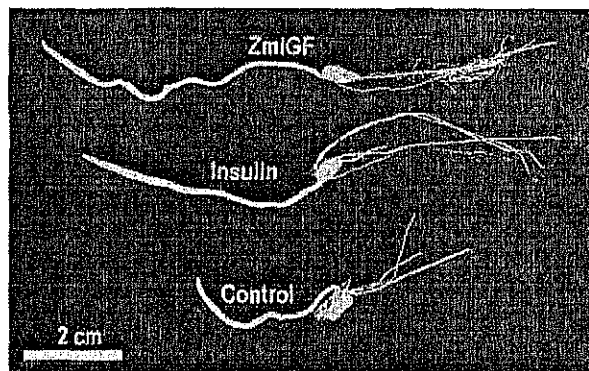


Figure 5 Effect of purified ZmIGF on maize seed growth

100 maize seeds were surface sterilized for 5 min with 5% hypochlorite, washed thoroughly with sterilized water and germinated at $24 \pm 2^\circ\text{C}$ in darkness in presence of either 200 μ unit/ml bovine insulin, ZmIGF equivalent to 200 μ unit/ml bovine insulin or in water as a control. Representative seedlings from each group after 72 h of germination are shown.

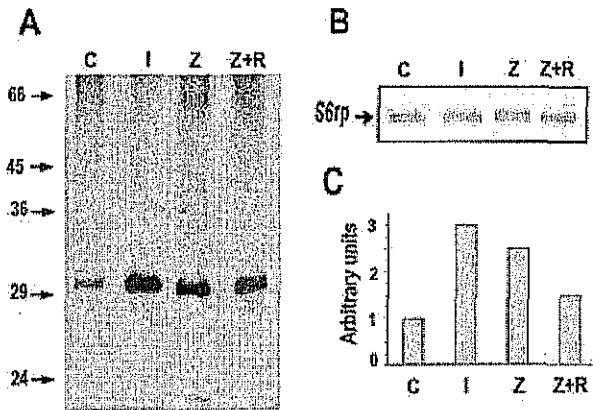


Figure 6 Effect of ZmIGF on S6 rp phosphorylation

Maize seeds were imbibed for 22 h in water and then the embryonic axes (1.0 g each) were manually dissected and incubated for 2 h in MS medium in the presence of 330 μ Cl [32 P]orthophosphate and final concentration of 200 μ unit/ml insulin (I) or ZmIGF (Z), ZmIGF and rapamycin (0.1 μ M) (Z + R) or none (C). (A) SDS/PAGE and autoradiography of phosphorylated S6 rp. Ribosomes were purified as indicated in the Experimental section and the rps (60 μ g) extracted and subjected to SDS/PAGE and analysed by autoradiography. (B) Identification of S6 rp by Western blotting; rps from (A) were blotted onto PVDF membrane and S6 rp immunodetection was performed by antiserum raised against S6 rp 17 residue peptide, as described in the Experimental section. (C) Densitometric analysis of the labelled 36 kDa band. These experiments were reproduced twice with similar results.

Table 2 Effect of ZmIGF and insulin on rp synthesis

Eight groups of maize seeds were imbibed in water for 22 h, embryonic axes were then manually dissected (1.0 g of each) and incubated for 2 h in MS medium in presence of 400 μ Cl [35 S]methionine and 200 μ unit/ml of insulin, insulin and 2 mM DTT, ZmIGF, ZmIGF and 2 mM DTT, ZmIGF and 1 μ g/ml of trypsin, 500 μ g/ml of protein extract devoid of ZmIGF, 500 μ g/ml lysozyme or no treatment (Control). Radioactivity incorporated in ribosomal and cytoplasmic proteins was determined. The values are presented as the ratio (*R*) of the radioactivity in rp (c.p.m./mg) to that in cytoplasmic protein (c.p.m./mg). Values are the mean of three independent experiments. **P* < 0.01 (statistically significant difference with respect to control).

Treatment	<i>R</i>
Control	0.286 \pm 0.017
Insulin	0.786 \pm 0.020*
Insulin and DTT	0.363 \pm 0.037
ZmIGF	0.690 \pm 0.011*
ZmIGF and DTT	0.636 \pm 0.017*
ZmIGF and trypsin	0.386 \pm 0.032
Extract devoid of ZmIGF	0.346 \pm 0.042
Lysozyme	0.383 \pm 0.023

of 5'-TOP mRNAs, rp mRNAs being among this group. Thus, the effect of ZmIGF on rp synthesis was determined on axes fed with [35 S]methionine during the last 2 h of the incubation period. A positive control with axes stimulated with a similar amount of insulin was also carried out. Cytoplasmic and ribosomal proteins were separately isolated from the axes and the incorporated labelled precursor was measured in these proteins. Relative values of the label incorporated into the rps, with respect to the cytoplasmic proteins, are presented (Table 2). Axes stimulated with either insulin or ZmIGF showed a significantly larger ribosomal to cytoplasmic protein ratio of 35 S incorporation than the control. This increment was not observed either when insulin was pre-treated with dithiothreitol (DTT), or

ZmIGF with trypsin (Table 2). It is interesting to notice that the stimulatory effect of ZmIGF was not affected by DTT, suggesting that ZmIGF biological activity does not depend on disulphide bridge structure. Other proteins than ZmIGF added to the axes during the same part of the incubation period, such as maize axes extract devoid of ZmIGF or lysozyme, did not show effect on rp synthesis (Table 2). On the other hand, addition of bovine insulin antibody to axes, with previous exposure to either insulin or ZmIGF, avoided the induced stimulation of rp synthesis (results not shown).

DISCUSSION

Up to now, only few peptides have been recognized as signal molecules functioning in plants [29]. On the other hand, IGFs are widespread peptides known to be present in lower and higher eukaryotes [10,30–32]. In animals, these highly conserved peptides are known to play important roles in promoting basic biological processes such as cell cycle progression, cell growth, survival and cell differentiation [8,31,33]. Similar peptides have also been found in plants (Figures 1–4) [19,20], suggesting that they have a very early evolutionary origin [18]; however, their biological activity has not been investigated in these organisms.

This study presents the purification of a maize insulin-like peptide, ZmIGF (Figures 1–3), and demonstrates its biological activity in maize seeds at physiological (Figure 5) and biochemical levels (Figure 6 and Table 2). To our knowledge, this is the first study to recognize an endogenous regulatory role of a plant insulin-like peptide. This peptide (ZmIGF) is specifically recognized by bovine insulin antibody and stimulated maize seed germination and seedling growth in a selective manner (Figure 5 and Table 1) similarly as shown to occur with insulin [21].

Growth-mediated protein synthesis regulation has been observed in many organisms after insulin/IGF stimulation [6,34,35]. Regulation of this process is particularly relevant during growth and differentiation in order to ensure the production of stage-specific proteins. A complex network of intracellular signalling pathways mediates the specific mechanisms of translational control exerted by insulin/IGF. This mechanism initiates at the cell membrane by effector–receptor recognition and targets the translational apparatus by phosphorylation of S6 rp on the 40 S ribosomal subunit [12,36]. Stimulation of S6 rp phosphorylation preferentially induces translation of 5'-TOP mRNAs. These transcripts mostly code for proteins of the translational apparatus, such as rps, and initiation and elongation translation factors [14,23,35,37]. In the present case, induction of S6 rp phosphorylation was clearly observed after ZmIGF-stimulation of maize axes. This reaction was reversed by rapamycin addition to the axes a few minutes before they were stimulated with ZmIGF (Figure 6). In animal cells, rapamycin has been demonstrated to block the insulin-induced signal transduction pathway [5].

These results suggest that there might be a ZmIGF-induced signal transduction pathway in maize, similar to the one described for insulin in animal tissues that selectively regulates protein synthesis. Accordingly, in this research ZmIGF was shown to stimulate S6 rp phosphorylation on the 40 S ribosomal subunit (Figure 6) and to enhance further the synthesis of rps without a significant increase in general cytoplasmic protein synthesis (Table 1 and 2). Several reports of insulin/IGF action on sea urchin eggs, as well as on mammalian cells, exhibited similar stimuli on S6 rp phosphorylation and induced selective synthesis of proteins of the translational apparatus including ribosomal proteins [4,12,13]. Recently, insulin-induced mobilization of S6 rp and initiation translation factor iso4E mRNAs (two 5'-TOP-

like mRNAs) into S6 rp phosphorylated polysomes has also been shown in maize axes [23]. All these results predict the existence of a cell membrane receptor in maize tissues for specific recognition of ZmIGF. Cell membrane receptors with predicted protein kinase activity have been reported in plant tissues [20,29], and particularly in maize [38], which strengthens the interpretation of our results regarding ZmIGF as a maize growth factor of a peptide nature that regulates specific protein synthesis, in a similar manner as insulin/IGFs in non-plant eukaryotes.

This research was supported by the Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA) (UNAM grant number IN202900), C. G. F. and H. R. C. received PhD fellowships from DGAPA, and research grants PADEP 129464 and 103347, respectively. We thank Dr Javier Plasencia and Dr Patricia Coello for critical review of the manuscript, and Dr Fermín Paul Pacheco Moisés for preparation of the figures.

REFERENCES

- 1 Adress, K. J., Basilion, J. P., Klausner, R. D., Rouault, T. A. and Pardi, A. J. (1997) Structure and dynamics of the iron responsive element RNA: Implications for binding of the RNA by iron regulatory proteins. *J. Mol. Biol.* **274**, 72–83
- 2 Bushell, M., Wood, W., Clemens, M. J. and Morley, S. J. (2000) Changes in integrity and association of eukaryotic protein synthesis initiation factors during apoptosis. *Eur. J. Biochem.* **267**, 1083–1091
- 3 Hinnebusch, A. G. (1994) Translational regulation of yeast GCN4-A window on factors that control initiator-tRNA binding to the ribosome. *J. Biol. Chem.* **272**, 21661–21664
- 4 Pause, A., Belsham, G. J., Gingras, A. C., Danzè, O., Lin, T. A., Lawrence, Jr, J. C. and Sonenberg, N. (1994) Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature* **371**, 762–767
- 5 Jelleries, H., Fumagalli, S., Dennis, P., Reinhard, C., Pearson, R. and Thomas, G. (1997) Rapamycin suppresses 5' TOP mRNA translation through inhibition of p70^{S6k}. *EMBO J.* **16**, 3693–3704
- 6 Raught, B., Gingras, A. C. and Sonenberg, N. (2000) Regulation of ribosomal recruitment in eukaryotes. In *Translational Control of Gene Expression* (Hershey, J. W. B., Mathews, M. B. and Sonenberg, N., eds.), pp. 245–293. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- 7 White, M. F. (1998) The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol. Cell. Biochem.* **182**, 3–11
- 8 Engström, W., Khokrai, A., Otte, K., Granérus, M., Gassbo, A., Bierke, P., Madej, A., Sjölund, M. and Ward, A. (1998) Transcriptional regulation and biological significance of the insulin like growth factor II gene. *Cell Proliferation* **31**, 173–189
- 9 Le Roith, D., Shiloach, J., Roth, J. and Lesniak, M. A. (1980) Evolutionary origins of vertebrate hormones: substances similar to mammalian insulin are native to unicellular eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 6184–6188
- 10 Tissenbaum, A. H. and Ruvkun, G. (1998) An insulin-like signalling pathway affects both longevity and reproduction in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **148**, 703–717
- 11 Chung, J., Grammer, T. C., Lemon, K. P., Kazlauskas, A. and Blenis, J. (1994) PDGF- and insulin-dependent pp70S6k activation mediated by phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature (London)* **370**, 71–74
- 12 Fumagalli, S. and Thomas, G. (2000) S6 rp Phosphorylation and signal transduction. In *Translational Control of Gene Expression* (Hershey, J. W. B., Mathews, M. B. and Sonenberg, N., eds.), pp. 695–717. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- 13 Amaldi, F. (1997) TOP genes: A translationally controlled class of genes including those coding for ribosomal proteins. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **18**, 1–17
- 14 Avni, D., Biberman, Y. and Meyuhas, O. (1997) The 5' terminal oligopyrimidine tract confers translational control on TOP mRNAs in a cell type- and sequence context-dependent manner. *Nucleic Acids Res.* **25**, 995–1001
- 15 Bewley, J. D. and Black, M. (1994) Seeds. In *Physiology of Development and Germination* (Bewley, J. D. and Black, M., eds.), pp. 147–148. Second Edition, Plenum Press, New York and London
- 16 Sánchez de Jiménez, E. and Aguilar, R. (1994) Protein synthesis patterns: relevance of old and new messenger RNA in germinating maize embryos. *Plant Physiol.* **75**, 231–234
- 17 Pramanik, K. S. K. and Bewley, J. D. (1996) Post-transcriptional regulation of protein synthesis during alfalfa embryogenesis: proteins associated with the cytoplasmic polysomal and non-polysomal mRNAs (messengers ribonucleoproteins complex). *J. Exp. Bot.* **45**, 1871–1879
- 18 Collier, E., Watkinson, A., Cleland, C. F. and Roth, J. (1987) Partial purification and characterization of an insulin-like material from spinach and *Lemna gibba* G3. *J. Biol. Chem.* **262**, 6238–6247
- 19 Watanabe, Y., Barbashov, S. F., Komatsu, S., Hemmings, A. M., Miyagi, M., Tsunasawa, S. and Hirano, H. (1994) A peptide that stimulates phosphorylation of the plant insulin-binding protein: isolation, primary structure and cDNA cloning. *Eur. J. Biochem.* **224**, 167–172
- 20 Oliveira, A. A. E., Elenir, A. A. O., Machado, T. O. L., Gomes, M. V., Neto, X. J., Pereira, C. A., Vierira, H. J. G., Fernández, S. V. K. and Javier-Filho, J. (1999) Jack bean seed coat contains a protein with complete sequence homology to bovine insulin. *Protein Peptide Lett.* **6**, 15–21
- 21 Sánchez de Jiménez, E., Beltrán-Peña, E. and Ortiz-López, A. (1999) Insulin-stimulated ribosomal protein synthesis in maize embryonic axes during germination. *Physiol. Plant.* **105**, 148–154
- 22 Gingras, A. C., Raught, B. and Sonenberg, N. (1999) eIF4 Initiation factors: Effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 913–963
- 23 Dinkova, D. T., Aguilar, R. and Sánchez de Jiménez, E. (2000) Expression of maize embryonic initiation factor (eIF) iso4E is regulated at the translational level. *Biochem. J.* **351**, 825–831
- 24 Murashige, T. and Skoog, C. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco callures. *Physiol. Plant.* **15**, 473–497
- 25 Beltrán-Peña, E., Ortiz-López, A. and Sánchez de Jiménez, E. (1995) Synthesis of ribosomal proteins from stored mRNAs in seed germination. *Plant. Mol. Biol.* **28**, 327–336
- 26 Pérez-Méndez, A., Aguilar, R., Briones, E. and Sánchez de Jiménez, E. (1993) Characterization of ribosomal protein phosphorylation in maize axes during germination. *Plant Sci.* **94**, 71–79
- 27 Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685
- 28 Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254
- 29 Franssen, H. J. (1998) Plants embrace a stepchild: the discovery of peptide growth regulators. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 384–387
- 30 Duan, C., Ding, J., Li, G., Tsai, W. and Pozlos, K. (1999) Insulin-like growth factor binding protein 2 is a growth inhibitory protein conserved in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 15274–15279
- 31 Parrizas, M., Saltiel, R. A. and Le Rollh, D. (1997) Insulin-like growth factor 1 inhibits apoptosis using the phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen activated protein kinase pathways. *J. Biol. Chem.* **272**, 154–161
- 32 Steller, A. M., Delgado, H. C. and Zou, Z. (1995) Insulin-like growth factor II mediates epidermal growth factor-induced mitogenesis in cervical cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 11970–11974
- 33 Holtzhuizen, P. E., Steenbergh, P. H. and Sussenbach, J. S. (1999) Regulation of IGF gene expression. In *The IGF System: Molecular Biology, Physiology and Clinical Applications* (Rosefield, R. G. and Roberts, C., eds.), pp. 37–61. Humana Press, Totowa, NJ, U.S.A.
- 34 Hornstein, E., Git, A., Braunstein, I., Avni, D. and Meyuhas, O. (1999) The expression of poly(A)-binding protein gene is translationally regulated in a growth-dependent fashion through a 5'-terminal oligopyrimidine tract motif. *J. Biol. Chem.* **274**, 1708–1714
- 35 Jelleries, H. B. J. and Thomas, G. (2000) Ribosomal protein S₆ phosphorylation and the signal transduction. In *Translational Control of Gene Expression* (Hershey, J. W. B., Mathews, M. B. and Sonenberg, N., eds.), pp. 389–405. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- 36 Brown, E. J. and Schreiber, S. L. (1996) A signal pathway to translational control. *Cell* **86**, 517–520
- 37 Sánchez de Jiménez, E., Aguilar, R. and Dinkova, T. (1997) S6 ribosomal protein phosphorylation and translation of stored mRNA in maize. *Biochimie* **79**, 184–187
- 38 Braun, D. M. and Walker, J. C. (1996) Plant transmembrane receptors: new pieces in the signalling puzzle. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 70–73

Received 21 February 2001/30 April 2001; accepted 30 May 2001

9.- DISCUSIÓN

Extracción, Identificación y Purificación del Factor Zm-IGF de Maíz.

En sistemas animales existen proteínas como insulina y factores de crecimiento parecidos a esta (IGF-I e IGF-II) que tienen un papel relevante en la regulación de la síntesis de proteínas, lo cual repercute en la proliferación y diferenciación celular (Werner y Le Roith, 2000; Fumagalli y Thomas, 2000). Desde el punto de vista evolutivo, estas proteínas son muy antiguas ya que se han localizado en eucariontes unicelulares como *Tetrahymena* y en procariontes como *Escherichia coli*. Esto hace suponer que se han conservado evolutivamente hasta nuestros días (Le Roith *et al.*, 1980).

Existen muy pocos reportes que indican la existencia de proteínas tipo insulina/IGFs en plantas, pero hasta la fecha no se ha reportado su relación con alguna función endógena determinada (Collier *et al.*, 1987; Hirano *et al.*, 1995; Ilgontz *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 1999). Experimentos recientes con algunos de estos péptidos en adipocitos de rata, han mostrado que son responsables de estimular la toma de glucosa (Collier *et al.*, 1987; Oliveira *et al.*, 1999). Sin embargo, en ninguno de los casos citados anteriormente se ha estudiado el efecto como tal en plantas.

En esta investigación, se demostró por primera vez la existencia de un péptido tipo "insulin-like" en maíz, con una masa molecular de 20 kDa y que fue reconocido por anticuerpos contra insulina de bovino, al cual se le denominó Zm-IGF. La presencia de este péptido fue plenamente confirmada ya que además de que se identificó en toda una serie de órganos y tejidos de maíz (Cuadro 1 y Fig. 2), también se localizó por inmunocitoquímica en regiones meristemáticas de ejes embrionarios de maíz incubados durante 48 h, principalmente en la zona meristemática del epicotilo (Fig. 3 C y D) y el meristemo fundamental y apical del hipocotilo (Fig. 3 E, F y G). Esta inmunolocalización fue una prueba contundente para demostrar la existencia del factor Zm-IGF.

Debido a que dicho factor se localizó en tejidos meristemáticos, se podría indicar que su acción pudiera ser de tipo autócrina por favorecer la proliferación celular del mismo tejido en el que se sintetiza. Este mecanismo de acción podría diferenciarlo del que se lleva a cabo por los IGFs, ya que estos últimos tienen un mecanismo de acción parácrino, porque se sintetizan en un tejido glandular y actúan en otro tejido muy diferente en el organismo (Cassandra *et al.*, 1991; Párrizas *et al.*, 1997; Quevedo *et al.*, 2000).

Mediante técnicas inmunológicas (western-blot) se identificaron claramente dos bandas de pesos moleculares aproximados de 7 y 20 kDa (Fig. 4 de artículo) en extractos crudos provenientes de ejes incubados por 48 horas. La explicación que se tiene al respecto es que el péptido de 7 kDa, por ser de peso molecular parecido al de la insulina, podría ser el péptido correspondiente a la molécula activa y el de 20 kDa podría corresponder entonces a un precursor inactivo tal y como se conoce que ocurre con otros péptidos de tipo hormonal como la insulina (Kuliawat *et al.*, 2000) y los IGFs (Engstrom *et al.*, 1998; Werner y Le Roith, 2000); sin embargo, se requiere de otros estudios que permitan esclarecer la naturaleza de este péptido.

Por otra parte, después de numerosos ensayos se determinó que la proteína correspondiente a la banda de 7 kDa, es muy inestable ya que no siempre se presentó. Sin embargo esto no ocurrió con la de 20 kDa, lo cual podría apoyar la propuesta anterior. Se podría considerar que dicha inestabilidad de la banda de 7 kDa, puede ser un mecanismo que permitiría regular la concentración del factor en su forma activa. Sin embargo esta hipótesis es muy apresurada ya que requiere de ser comprobada con experimentos enfocados directamente con la función del péptido de 7 kDa.

Todos estos resultados permiten indicar que Zm-IGF es un factor de crecimiento de naturaleza protéica capaz de regular el crecimiento de las plantas. Esto es muy

posible, ya que existen reportes de péptidos que tiene también funciones de regulador en las plantas denominados sisteminas.

El proceso de purificación para obtener Zm-IGF es confiable y reproducible. Al final de la purificación se obtuvo un rendimiento de 5 a 7 mil μU (aproximadamente 0.25 μg) de Zm-IGF por cada 40 g de tejido procesado.

Efectos Fisiológicos y Bioquímicos de Zm-IGF en Tejidos de Maíz

La insulina y los factores de crecimiento (IGF-I e IGF-II) modulan la síntesis de proteínas en tejidos animales a través de la estimulación de una ruta de transducción de señales que involucra la fosforilación de pr S6 en la subunidad 40S del ribosoma y la traducción selectiva de mRNAs "TOP" (Meyuhas *et al.*, 1996; Martelli *et al.*, 1999; Gingras *et al.*, 1999). Otros reportes indican que por esta vía, los factores de crecimiento regulan el crecimiento y metabolismo celular en diferentes organismos (Jefferies *et al.*, 1997; Fumagali y Thomas, 2000), sin embargo, el mecanismo no se conoce por completo a pesar de que se ha logrado la identificación de varias de las proteínas involucradas en este proceso.

En nuestro caso se logró obtener al péptido con un alto grado de pureza, lo cual permitió elucidar los efectos inducidos dicho factor a nivel fisiológico y bioquímico durante la germinación y el desarrollo del eje embrionario de maíz.

La germinación de semillas en general y específicamente la de maíz, constituyen un sistema donde se ponen de manifiesto varios de los mecanismos de regulación de la expresión genética, ya que se requiere del control de la expresión de genes específicos para proceder a la germinación en forma exitosa (Bewley, 1997). Uno de los procesos donde se pone de manifiesto este tipo de control es en la traducción (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1999), ya que las semillas almacenan mRNAs maduros cuya traducción se regula por diferentes mecanismos durante la germinación (Domes

y Walle, 1990; Pramanik *et al.*, 1992; Bewley y Black, 1994). Estos mecanismos de regulación de la traducción en plantas no se han descrito claramente debido al poco avance que se tiene, si se compara con las investigaciones realizadas en animales.

Al respecto, en nuestro laboratorio se ha venido investigando acerca de los mecanismos de control traduccional que operan en las semillas durante la germinación. Los logros obtenidos indican que en maíz, la insulina estimula tanto la germinación, como el crecimiento de la plántula. A nivel molecular incrementa la síntesis de proteínas ribosomales y la fosforilación de la pr S6 en la subunidad pequeña del ribosoma (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1999), también incrementa la traducción del factor de iniciación iso4E (Dinkova *et al.*, 2000).

Estos resultados sugirieron que en maíz podría existir una ruta de transducción de señales inducida por un factor de crecimiento similar a los que se conocen en animales. Esta hipótesis se apoya en la purificación del factor Zm-IGF, el cual es reconocido por anticuerpos contra insulina de bovino y en los efectos fisiológicos y bioquímicos de éste, durante la germinación de la semilla de maíz.

El factor Zm-IGF estimula la germinación de maíz, acortando significativamente el valor de Gt 50 y acelerando el crecimiento de la plántula, principalmente la elongación del coleoptilo (Tabla 1 y Fig. 5 de artículo), superando la respuesta obtenida con insulina.

Los ensayos bioquímicos revelaron que este factor es capaz de inducir la fosforilación de una proteína ribosomal de 31 kDa (Fig. 7 B de artículo), la cual se demostró que corresponde a la pr S6 (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1997b). Este fenómeno no se presentó cuando antes de dar el estímulo a los ejes con Zm-IGF, se adicionó rapamicina (inhibidor de la vía de transducción de señales inducida por insulina/IGF en animales (Jefferies *et al.*, 1997).

Estos resultados sugieren fuertemente que Zm-IGF es realmente el factor endógeno que estimula una vía de transducción de señales, la cual regula el crecimiento por

medio de la traducción selectiva de proteínas. El efecto inductor de Zm-IGF en la síntesis de proteínas ribosomales en forma selectiva apoya esta interpretación (Tabla 2 de artículo). Estos resultados son consistentes con información previa en que se demostró que la mayoría de los mRNA para proteínas ribosomales pertenecen al grupo de mARNs 5' TOP, en particular el mRNA que codifica la rp S6 (Fumagalli y Thomas, 2000).

Es interesante señalar que al hacer un tratamiento previo al Zm-IGF con DTT no se altera la actividad del factor (Fig. 10). Esto sugiere que la actividad biológica de este factor no depende de la integridad de puentes disulfuro (Tabla 2 de artículo). Al respecto, estudios sobre la secuenciación del péptido Zm-GF (actualmente en proceso), proporcionarán herramientas para inferir sobre la relación estructura-función del factor Zm-IGF.

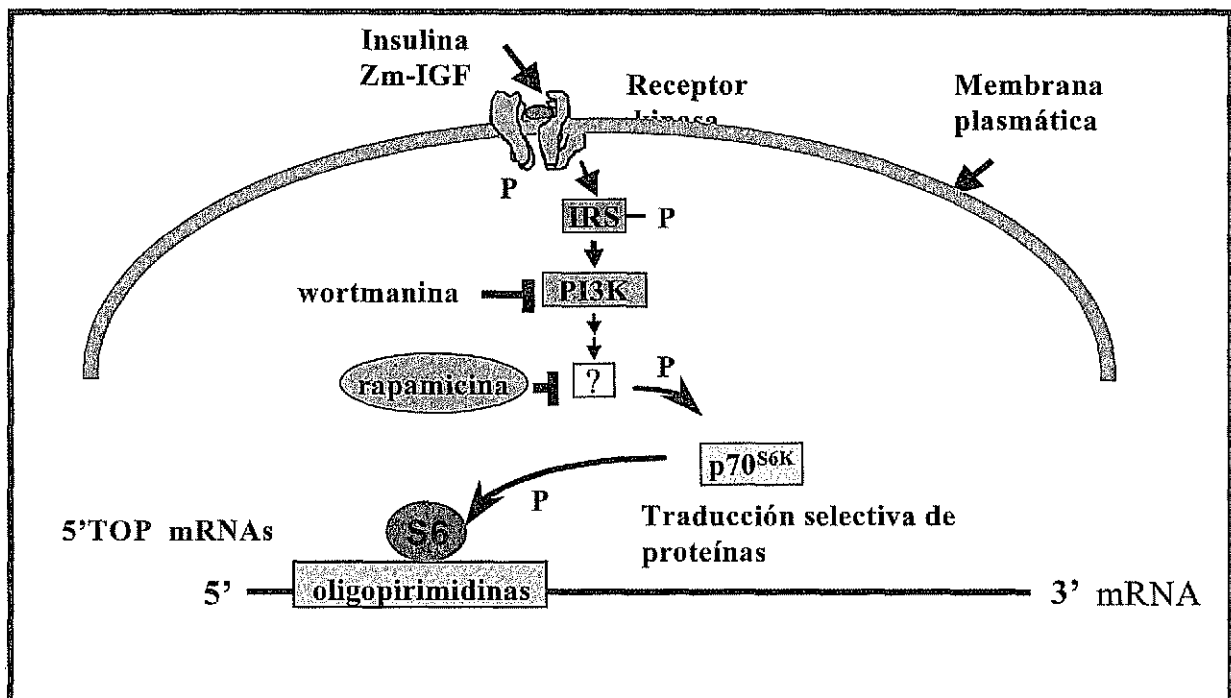


Figura 11. Vía hipotética que propone un mecanismo de transducción de señales en plantas.

Los datos obtenidos en este trabajo permiten tener una visión más integrada de los mecanismos que rigen el control traduccional evidenciado durante el proceso de germinación de maíz. En esta integración, la fosforilación de la proteína ribosomal S6 aparece como uno de los eslabones en la vía de transducción de señales estimulada por el factor de crecimiento Zm-IGF, y favoreciendo selectivamente el reclutamiento de mensajeros tipo 5'TOP hacia polisomas, para que finalmente ocurra la síntesis de proteínas importantes durante la germinación de la semilla de maíz.

Con base en los estudios realizados en el laboratorio con Zm-IGF y los datos que se han reportado para la vía de transducción de señales para insulina/IGFs (Meyuhas *et al.*, 1996; Tissenbaum y Ruvhun, 1998; Whitehead *et al.*, 2000) en la figura 11 se postula una vía hipotética de señalización para Zm-IGF que conduce a la inducción de la síntesis de proteínas ribosomales. En esta vía se propone que a nivel de membrana Zm-IGF interactúa con un receptor específico y la señal se internalizaría a través de la fosforilación del receptor unido a su sustrato (ISR), lo cual activaría a una fosfatidilinositol cinasa; posteriormente a través de una cascada de reacciones en la que por fosforilación se activara la proteína p70S6 cinasa se lograría la fosforilación a la proteína ribosomal S6 de la subunidad ribosomal 40S. Esto provocaría la ocurrencia de una traducción selectiva de mRNAs y por consiguiente la síntesis de proteínas importantes para el crecimiento y diferenciación celular.

La propuesta de esta vía se apoya también en los resultados obtenidos en nuestro laboratorio, en los que se ha demostrado que en ejes embrionarios de maíz estimulados con Zm-IGF se induce un incremento en la actividad de la prS6K (ZmS6K).

Finalmente habría que considerar los efectos de Zm-IGF a nivel de la síntesis de DNA evidenciada por la incorporación de ³[H]-timidina.

La síntesis de DNA de tipo replicativo y la división celular son eventos tardíos durante la germinación ya que la expansión de la radícula dentro de la semilla ocurre

inicialmente por elongación celular y la emergencia de la radícula no necesariamente está acompañada de división celular (Baiza *et al.*, 1989; Bewley y Black 1994). Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el factor Zm-IGF estimula la síntesis de DNA por encima del control (Fig. 10) durante la germinación. Estos datos sugieren que el efecto de Zm-IGF en la división celular podría ser indirecto, probablemente a través de estimular selectivamente la síntesis de algunas proteínas partícipes del ciclo celular cuyos mRNAs sean 5'TOP, o bien bloqueando el proceso de apoptosis celular, tal como se ha visto que ocurre con insulina; todo lo anterior puede finalmente acelerar la germinación y el crecimiento de la plántula (Tabla 1 y Fig. 5 de artículo) al reactivar los mecanismos que regulan el metabolismo celular.

Futuros trabajos de investigación en este aspecto se dirigirán a caracterizar aspectos estructurales de Zm-IGF, además de dilucidar algunos puntos de la ruta de transducción de señales que llevan a la activación de la S6K de maíz, utilizando como inductor a la insulina y al factor de crecimiento semejante a insulina en maíz, además de inhibidores de la ruta como la Wortmanina y la Rapamicina.

Como se puede apreciar, el fenómeno de la regulación de la expresión genética a nivel del control traduccional es muy complejo. Participan en él de forma simultánea diversos elementos, señales y factores que interaccionan a diferentes niveles celulares y del organismo, constituyendo así un sistema de regulación preciso y adaptable a diversos tejidos y etapas del desarrollo de los organismos.

La rapidez con la que se están sucediendo los nuevos descubrimientos en esta área de la ciencia, está proporcionando nuevas perspectivas, de tal manera que puede afirmarse que son estas aportaciones las que permiten una comprensión más clara de un fenómeno de tanta importancia. Sin embargo, también es un indicador de lo mucho que falta por entender, por lo que todavía no se ha llegado el momento para establecer una definición que cubra integralmente fenómenos como los que involucra el crecimiento y la diferenciación celular.

10.- CONCLUSIONES

Se demostró la existencia de una proteína de 20 kDa en tejidos de maíz que es reconocida por anticuerpos contra insulina, a través de técnicas de inmunodetección.

Se demostró que Zm-IGF estimula la germinación de semillas de maíz y principalmente la elongación del coleoptilo.

Se demostró, por métodos histológicos y de inmunodetección, que Zm-IGF se encuentra localizado en las células que constituyen a los tejidos meristemáticos del eje embrionario de maíz.

El factor Zm-IGF estimula la síntesis de proteínas ribosomales en forma similar a insulina, a través del incremento en la fosforilación de la proteína ribosomal S6 en el ribosoma

Se determinó que Zm-IGF estimula la síntesis DNA, durante la germinación de ejes embrionarios de maíz, por lo que es posible que intervenga durante la proliferación celular.

Con base en lo anterior se concluye que la proteína aislada a partir de ejes embrionarios de maíz, Zm-IGF es un factor de crecimiento de naturaleza protéica, que regula la síntesis de proteínas en maíz a través de una vía de transducción de señales que involucra la fosforilación de la pr S6 y la traducción selectiva de mRNAs TOP.

11.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Accili D. (1997) Insulin Receptor Knock-Out Mice. Trends in Endocrinology and Metabolism 3: 101-197.

Adashi E.Y., Resnick C.E., Svoboda M.E. and Van Wyk J.J. (1984) A novel role for somatomedin-C in the cytodifferentiation of the ovarian granulosa cell. Endocrinology 115: 12227-12229

Adashi E.Y., Resnick C.E., Svoboda M.E. and Van Wyk J.J. (1986) Somatomedin-C amplifier of follicle-stimulating hormone action; enhanced accumulation of 3', 5'-monophosphate. Endocrinology 118: 149

Adashi E.Y., Resnick C.E., Hernández E.R., Svoboda M.E. and Van Wyk J.J. (1988) Characterization and regulation of a specific cell membrane receptor for somatomedin-C/insulin-like growth factor I in cultured rat granulosa cells. Endocrinology 122: 194-201

Adi S., Wu N.Y. and Rosenthal S.M. (2001) Growth Factor-Stimulated Phosphorylation of Akt and p70 (S6K) Is Differentially Inhibited by LY294002 and Wortmannin. Endocrinology 142: 498-501.

Aguilar R., Montoya L. and Sánchez de Jiménez E. (1998) Synthesis and phosphorylation of maize acidic ribosomal proteins. Implications of translational regulation. Physiol. Plant. 116: 379-385.

Allan J.G., Flint J.D. and Patel K. (2001) Insulin like growth factor axis during embryonic development. Reproduction 122:31-39.

Altmann M., Schmitz N., Berset C. and Trachsel H. (1997) A novel inhibitor of cap dependent translation initiation in yeast: p20 competes with eIF-4G for binding to eIF-4E. EMBO J. 16: 1114-1121.

Anderson S., Sacboc-Larssen S., Lambertsson A., Merriam J. and Jacobs-Lorena M. (1994) A Drosophila third-chromosome minute locus encodes a ribosomal protein. Genetics 13: 513-520.

Araki E., Lipes M.A., Patti M.E., Brüning J.C., Haag III B., Johnson R.S. and Kahn C.R. (1994) Alternative pathways of insulin signaling in mice with targeted disruption of the ISR-1 gene. Nature 272:186. 190.

Bailey-Serres J. (1999) Selective translation of cytoplasmic mRNAs in Plants. Trends in Plant Science 4: 142-148.

Baiza A.M., Aguilar R. and Sánchez de Jiménez E. (1986) Histones and the first cell cycle in maize germination. Physiol. Plant. 68: 259.

Baiza A.M., Vázquez-Ramos J. and Sánchez de Jiménez E. (1989) DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *J. Plant Physiol.* 135: 416-421.

Ballesta J.P.G., Rodríguez-Gabriel M.A., Bou G., Briones E., Zambrano R. and Remacha M. (1999) Phosphorylation of yeast ribosomal stalk. Functional effects and enzymes involved in the process. *FEMS Micro. Rev.* 23: 537-550.

Baranao J.L.S. and Hammond J.M. (1984) Comparative effects of insulin and insulin-like growth factors on DNA synthesis and differentiation of porcine granulosa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 124 : 484-490

Baserga R. (1985) The biology of cell reproduction. Harvard University Press Cambridge. pp. 3-33, 62-65, 81-100, 134-165

Becraft P.W. (1998) Receptor Kinase in plant development. *Trends Plant Sci.* 3: 384-388

Becraft P.W., Stinard P.S and Mc Carty D.R. (1996) CRINKLY4: a INFR-like receptor kinase involved in maize epidermal differentiation. *Science* 273: 1406-1409.

Bell I.G., Pictet L.R. and Rutter J.W. (1980) *Nature* 284: 26-32.

Beltrán-Peña E., Ortiz-López A. and Sánchez de Jiménez E. (1989) Synthesis of ribosomal proteins from stored mRNAs in seed germination. *Plant Mol. Biol.* 28: 327-336.

Bewley J.D. and Marcus A. (1990) Gene expression in seed development. *Prog. In Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 38: 165-193.

Bewley J.D. and Black M. (1994) Cellular events during germination and seed growth. In: *Seeds: Physiology of development and germination.* Sd. Edition (1994), Plenum Press, New York, pp. 147-196.

Bewley J.D. (1997) Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9: 1055-1066.

Bisseling T. (1999) The role of plant peptides in intercellular signaling. *Curr. Opinion in Plant. Biology* 2:365-368.

Bonham-Smith P.C., Oancia T.L. and Moloney M.M. (1992) Cytoplasmic ribosomal protein S15 a from *Brassica napus*: Molecular cloning and developmental expression in mitotically active tissues. *Plant Mol. Biol.* 18: 909-919.

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

- Bradford K.J. (1995)** Water relations in seed germination. In: Seed development and germination (Kigel J. and Galili G., eds.) Marcel Dekker, New York, pp. 351-396.
- Brewer M.T., Stetter G.T. and Squire C.H. (1988)** Cloning characterization and expression of a human insulin-like growth factor binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 152: 1289-1297
- Brogiolo W., Stocker H., Ireya T., Rintelen F., Fernández R. and Hafen E. (2001)** An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Curr. Biol.* 11: 213-221.
- Browning K.S., Humphreys J., Hobbs W., Smith G.B. and Ravel J.M. (1990)** Determination of the amounts of the protein synthesis initiation and elongation factors in wheat germ *J. Biol. Chem.* 256: 17967-17973.
- Browning K.S., Webster C., Roberts J.K.M. and Ravel J.M. (1992)** Identification of an isozyme form of protein synthesis initiation factor 4F in plants. *J. Biol. Chem.* 276: 10096-10100.
- Browning K.S. (1996)** The plant translational apparatus. *Plant Mol Biol.* 32: 107-144.
- Browning K.S., Goss D.J., Roth D.A. and Gallie D.R. (1998)** The translational machinery of plants In: A look beyond transcription: Mechanisms determining mRNA stability and translation in Plants (Bailey-Serres J. and Gallie D. R., eds.) American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, pp. 68-84.
- Burgering B.M.T. and Coffey P.J. (1995)** Protein kinase B (c-akt) in phosphatidylinositol 3-OH kinase signal transduction. *Nature* 376: 599-602
- Cambell E.L., Wang X. and Proud G.Ch. (1999)** Nutrients differentially regulate multiple translation factors and their control by insulin. *Biochem J.* 344: 433-441.
- Carter W.G., Sullivan A.C., Asamoah K.A. and Sale G.J. (1996)** Purification and Characterization of an Insulin-Stimulated Insulin Receptor Serine Kinase. *Biochemistry* 35: 1434-14351.
- Cassandra X., Constantino P., Landis P.K. and Kostyo J.L. (1991)** Insulin-like growth factor-I stimulates steroidogenesis in rabbit luteal cells. *Endocrinology* 128: 1702-1708
- Chan J.L.K., Lai M. and Wang L.A. (1997)** Effect of Dimerization on Signal Transduction and Biological Function of Oncogenic Ros, Insulin and Insulin-like Growth Factor I Receptors. *J. Biol. Chem.* 272: 146-153.
- Chambard J.C., Franchi A., Le Cam A. and Pouyssegur J. (1983)** Growth factor-stimulated protein phosphorylation in G_0/G_1 -arrested fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 258: 1706-1713

Cheatham L., Monfar M., Chou M.M. and Blenis J. (1995) Structural and functional analysis of p70^{S6K}. Proc Natl. Acad. Sci USA. 92: 11696-11700.

Cheatham B, Vlahos C.J., Cheatham L., Wang L., Blenis J., Kahn C.R. (1994) Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase DNA synthesis and glucose transporter translocation. Mol. Cell Biol. 14: 4902-4911.

Chou M.M. and Blenis J. (1996) The 70 kDa S6 Kinase complexes with and is activated by the Rho family G proteins Cdc 42 and Rac 1. Cell 85:573-583.

Clemmons D.R., Thissen J.P. and Maes M. (1989) insulin-like growth factor-I (IGF-I) infusion into hypophysectomized or protein deprived rats induces specific IGF binding proteins in serum. Endocrinology 125: 2967-2972

Colasanti J., Tyers, M. and Sundaresan V. (1991) Isolation and characterization of cDNA clones encoding a functional p34cdc2 homologue from *Zea mays*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 3377.

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

Coulonval K., Vandeput F. Stein R.C., Kozma S.C., Lamy F. and Dumont J.E. (2000) Phosphatidylinositol 3-Kinase, protein kinase B and ribosomal S6 Kinase in the stimulation of thyroid epithelial cell proliferation by cAMP and growth factors in the presence of insulin. Biochem J. 348: 351-358.

Cross D.A.E., Alessi D.R., Cohen P., Adjelkovich M. and Hemmings B.A. (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. Nature 378: 785-7689.

Cruz-Alvarez M., Kiriwara J.A. and Messing J. (1991) Post-transcriptional regulation of methionine content in maize kernels. Mol. Gen. Genet 225:331339.

Cruz-García F., Zúñiga-Aguilar J.J. and Vázquez-Ramos J. (1998) Effect of stimulating maize germination on cell cycle proteins. Physiol. Plant. 102: 573-581.

Cuming A.C. (1984) Developmental regulation of gene expression in wheat embryos. Eur. J. Biochem. 145:351-357.

Cuadrado A., Navarrete M.H. and Cánovas J.L. (1985) The effect of partial protein synthesis inhibition of cell proliferation in higher plants. J. Cell Sci. 76: 97-104

D'avis Y.P., Frazier R.C.H., Shapiro R.J. and Fedarko S.N. (1997) Age-related changes in effects of insulin-like growth factor 1 on human osteoblast-like cells. *Biochem J.* 324: 753-760.

Datta N., La Fayette P.R., Kroner P.A., Nagao R.T. and Key J.L. (1993) Isolation and characterization of three families of auxin down-regulated cDNA clones. *Plant Mol. Biol.* 21: 859-869.

Daughaday W.H. and Rotwein P.S. (1989) Insulin-like growth factor I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocrine Rev.* 10: 68-91

Deltour R and Jacqmar A. (1974) Relation between water stress and DNA synthesis during germination of *Zea mays* *Ann. Bot.* 38: 329.

Dijk E.L., Sussenbach J.S. and Holthvise P.E. (2000) Distinct RNA Structural Domains Cooperate to Maintain a Specific cleavage site in the 3'-UTR of IGF-II mRNAs. *J. Mol. Biol.* 300: 449-467.

Dinkova T.D. and Sánchez de Jiménez E. (1999) Differential expresión ad regulation of translation initiation factors -4E and -iso4E during maize germination. *Physiol. Plant.* 107: 419-425.

Dommes J. and Van de Walle C. (1990) Polysome formation and incorporation of new ribosomes into polysomes during germination of embryonic axes of maize. *Physiol. Plant.* 79: 289-296.

Duan C., Ding J., Li Q., Tsai W. and Pozios K. (1999) Insulin-like growth factor binding protein 2 is a growth inhibitory and protein conserved in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 15274-15279.

Dure L. III, Greenway S.C., Galau G.A. (1981) Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by in vitro and in vivo protein synthesis. *Biochem.* 20: 4162-4168.

Ehrenshaft M. and Braml R. (1990) Respiration and mitochondrial biogenesis in germinating embryos of maize. *Plant Physiol* 93:295-304.

Engström W., Khokrai A., Otte K., Grnéus M., Gessbo A., Bierke P., Madej A., Sjölund M. and Ward A. (1998). Transcriptional regulation and biological significance of the insulin like growth factor II gene. *Cell Prolif.* 31, 173-189.

Epifanova O. I. and Polunovsky V. A. (1986) Cell cycle controls in higher eucaryotic cells: resisting state or a prolonged G1 period? *J. Theor. Biol.* 120: 467-477

Evans T., Rosenthal E.T., Youngblom J., Distel D. and Hunt T. (1983) Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at the end cleavage division, *Cell* 33: 389.

Feiler H.S. and Jacobs T.W. (1990) Cell division in higher plants: A cdc2 gene, its p34 protein product, and histone H1 kinase activity in pea, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5397.

Fehling E. and Weidner M. (1988) Adaptive potential of wheat ribosomes toward heat depends on the large ribosomal subunit and ribosomal protein phosphorylation. *Plant Physiol.* 87: 562-565.

Ferreira P.C.G., Hemerly A.S., Villareal R., Van Montagu M. and Inzé D. (1991) The Arabidopsis functional homologue of the p34 cdc2 protein kinase. *Plant Cell* 3, 531.

Fletcher J.C., Brand U., Runing M.P., Simon R. and Meyerowitz E.M. (1999) Signaling of Cell Fate Decisions by CLAVATA3 in *Arabidopsis* Shoot Meristems. *Science* 283: 1911-1914.

Gallie D.R. (1996) Translational control of cellular and viral mRNAs. *Plant. Mol. Biol.* 32: 145-158.

Gallie D.R., Le H., Tanguay R.L. and Browing K.S. (1998) Translation initiation factors are differentially regulated in cereals during development and following heat shock. *Plant J.* 14: 715-722.

Gallie D.R. (1998) A tale of two termini: a functional interaction between the termini of an mRNA is a prerequisite for efficient translation initiation. *Gene* 216: 1-11.

Gan W., La Celle M. and Rhoads R.E. (1998) Functional characterization of the internal ribosome entry site of eIF-4GmRNA. *J. Biol. Chem.* 273: 5006-5012.

Gantt J.S. and Key J.L. (1985) Coordinate expression of ribosomal mRNAs following auxin treatment of soybean hypocotyls. *J. Biol. Chem.* 260:6175-6181.

Gantt J.S. and Thompson M.D. (1990) Plant cytosolic ribosomal protein S11 and chloroplast ribosomal protein CS17. Their primary structures and evolutionary relationships. *J. Biol. Chem.* 256: 2763-2767.

Gao J., Kim S.R., Chung Y.Y., Lee J.M. and Ann G. (1994) Developmental and environmental regulation of two ribosomal protein genes in tobacco. *Plant Mol. Biol.* 25:761-770.

Geballe A.P. (1996) Translational control mediated by upstream AUG codons. In: *Translational Control* (Hershey, J.W.B., Mathews M.B. and Sonenberg, N., eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 173-197.

Georgieva E.I., López Rodas G., Hittmair A., Feichtinger H., Brosh G. and Loidl P. (1994a) Maize embryo germination: I. Cell cycle analysis. *Planta* 192: 118-127.

Georgieva E.I., López-Rodas G. and Loidl P. (1994b) Maize embryo germination: II. Proteins related to nuclear proto-oncogene and tumor suppressor gene products. *Planta* 192: 125-132.

Gingras A.C., Raught B. and Sonenberg N. (1999) eIF-4G initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 913-963.

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

Gossert R., Chang K.H., Rijnbrand R.Y.M., Sangar D.V. and Lemosn S.M. (2000) Transient expression of cellular polypyrimidine-tract binding protein stimulates cap independent translation directed by both picornaviral and flaviviral intonation ribosome entry sites in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 20: 1583-1595.

Gualerzi C., Janda H.G., Passow H. and Stoffler G. (1974) Studies on the protein moiety of plant ribosomes. *J. Biol Chem.* 249: 3347-3355.

Guilfoyle T.J. (1986) Auxin-regulated gene expression in higher plants. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 4:247-276.

Guy P.A. and Black M. (1998) Germination-related proteins in wheat revealed by differences in seed vigor. *Seed Sci. Res.* 8: 99-111.

Hansen F.B., Danielsen M.G., Drejer K., Sorensen R.A., Wiberg C.F., Klein H.H and Lundemose G.A. (1996) Sustained signaling from the insulin receptor after stimulation with insulin analogues exhibiting increased mitogenic potency. *Biochem J.* 315: 271-279

Hemmings B.A. (1997) Akt signaling: Linking membrane events to life and death decisions. *Science* 275: 628-630.

Hershey J.W.B. (1991) Translational control in mammalian cell. *Annu Rev Biochem* 60: 717-755.

Hgoutz C.S., Knittiel N., Lin M.J., Sterle S. and Gayler R.K. (1997) Transcription of genes for conglutin S and leginsulin-like protein in narrow leafed lupin. *Plant Mol. Biol.* 34, 613-627.

Hirano H., Kagawa H., Okubo K. (1992) Characterization of proteins released from legume seeds in hot water. *Phytochemistry* 31: 731-735.

Hirt H., Pay A., Bako L., Nemeth K., Bogre L., Schweyen R.J., Herbele-Bors E. and Dudits D. (1991) Complementation of yeast cell cycle mutant by an cDNA encoding a protein kinase homologous to p34cdc2. *Proc Natl. Acad. Sci USA* 88: 1636

Hirt H. (2000) Connecting oxidative stresses, auxin and cell cycle regulation through a plant mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 2405-2407.

Hornstein E., Braunstein I., Avni D. and Meyuhas O. (1999) The expression of poly (A)-binding protein gene is translationally regulated in a growth-dependent fashion through a 5' terminal oligopyrimidine tract motif. *Journal Biological Chemistry* 274: 1708-1714.

Huang F.X. and Arvan P (1995) Intracellular transport of proinsulin in pancreatic β -cells. *J. Biol. Chem.* 270: 20417-20423

Hunter T. (1993) Breaking the cycle. *Cell* 75: 839-841

Hutchison C. and Glover D.M. (eds.) (1995) *Cell cycle control*, first ed. Oxford University Press, England.

Huttly A.K. and Phillips A.L. (1995) Gibberellin-regulated expression in oat aleurone cells of two kinases that show homology to MAP kinase and ribosomal protein kinase. *Plant Mol. Biol.* 27: 1043-1052.

Jefferies H.B.J., Reinhard C., Kozma S.C. and Thomas G. (1994) Rapamycin selectively represses translation of the "polypyrimidine tract" mRNA family. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 4441-4445.

Jefferies H. B. J. and Thomas G. (1996) Ribosomal protein S6 phosphorylation and signal transduction. I: Translational Control (Hershey, J.W.B., Mathews M.B. and Soenbergl, N., eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 389-410.

Jin P., Guo T. and Becraft W.P. (2000) The maize CR4 receptor-like kinase mediates a growth factor-like differentiation response. *Genesis* 27: 104-116.

Joanin P., Gigot C. and Philipps G.(1993) cDNA nucleotide sequence and expression of a maize cytoplasmic ribosomal protein S13 gene. *Plant Mol. Biol.* 21:701-704.

Jones S. M., Klinghoffer R., Prestwich G.D., Toker A. and Kazlauskas A. (1999) PDGF induces an early and a late wave of P3-Kinase activity and only the late wave is required for progression through G1. *Current Biology* 9:512-521.

John P.C.L. and Lee M.G. (1989) A homolog of the cell cycle control protein p34^{cdc2} participates in the division cycle of *Chlamydomonas* and a similar protein is detectable in higher plants and remote taxa. *Plant. Cell* 1: 1185-1193

Kessler A., Muller G., Wied S., Crecelius A. and Eckel J. (1998) Signalling pathways of an insulin-mimetic phosphoinositolyglycan-peptide in muscle and adipose tissue. *Biochem. J.* 330: 277-286

Kigel J, and Galili G. (eds.) (1995) Seed Development and Germination. Marcel Dekker, Inc. New York pp 273.

Kim K., Zhang H. and Scholl R.L. (1990) Two evolutionarily divergent genes encode a cytoplasmic ribosomal protein of *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 93: 117-182.

Kim S.J. and Kahn R. (1997) Insulin regulation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK), mitogen-activated protein Kinase and casein kinase in the cell nucleus: a possible role in the regulation of gene expression. *Biochem. J.* 323: 621-627.

Kimbal S.R., Horetsky R.L. and Jefferson L.S. (1998) Signal transduction pathways involved in the regulation of protein synthesis by insulin in L6 myoblast. *American Physiol. Society.* pp. 221-228.

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

Kozak M. (1991) Effects of long 5' leader sequences on initiation by eukaryotic ribosomes in vitro. *Gene Expr.* 1: 117-125.

Kuligowski J., Ferrand M. and Chenou E. (1991) Stored mRNA in early embryos of a fern *Marsilea vestita*: a paternal and maternal origin. *Mol. Reprod. Devel.* 10: 27-33.

Kuliawat R., Prabakaram D. and Arvan P. (2000) Proinsulin Endoproteolysis Confers Enhanced Targeting of Processed Insulin to the Regulated Secretory Pathway. *Mol. Biol. Cell.* 11:1959-1972.

Lamphear B.J., Kirchweger R., Skern T. and Rhoads R.E. (1995) Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF-4G) with picornaviral proteases. *J. Biol. Chem.* 270: 21975-21983.

Lane H.A., Fernandez A., Lamb N.J.C. and Thomas G. (1993) p70S6k function is essential for G1 progression. *Nature* 363: 170-172.

Langland J.O., Jin S., Jacobs. and Roth D.A. (1995) Identification of a plant-encoded analogous of PKR the mammalian double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Plant Physiol* 108:1259-1267.

Larkin J.C., Hunsperger J.P., Culley D., Rubenstein I. and Silflow C.D. (1989) The organization and expression of maize ribosomal protein gene family. *Genes Develop.* 500-509

Lawrence J.C. Jr. and Abraham R.T. (1997) PHAS74E-BPs as regulators of mRNA translation and cell proliferation. *Trends Biochem. Sci.* 22: 345-349.

Le H., Browing K.S. and Gallie D.R. (1997) The phosphorylation state of wheat translation initiation factors eIF4A and eIF2 is differentially regulated during seed development and germination. *J. Biol. Chem.* 273: 20084-20089.

Lebrum M. and Freyssinet G. (1991) Nucleotide sequence and characterization of maize cytoplasmic ribosomal protein S11 cDNA. *Plant. Mol. Biol.* 17:265-268.

Lee W., Ryu J., Souto P.R., Pilch F.P. and Yung Y.C.H. (1999) Separation and partial characterization of three distinct intracellular Glut4 compartments in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 274: 37755-37762.

León J., Rojo E. and Sánchez-Serrano J.J. (2001) Wound signaling in plants. *J. Experimental Botany* 52: 1-9.

Liu J.X., Sorisky A., Zhu L. and Pawson T. (1995) Molecular cloning of an amphibian insulin receptor substrate 1-like cDNA and involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced *Xenopus* oocyte maturation. *Molecular and Cellular Biology* 15: 3563-3570

Lopaczynski W., Terry Ch. and Nissley P. (2000) Autophosphorylation of the Insulin-like Growth Factor I Receptor Cytoplasmic Domain. *Biochem. Biophysical Res. Comm.* 279: 955-960.

Luthe D.S. and Quatrano R.S. (1980) Transcription in isolated wheat nuclei. I. Isolation of nuclei and elimination of endogenous ribonuclease activity. *Plant Physiol* 65: 305-308.

Marty I. and Meyer Y. (1992) cDNA nucleotide sequence and expression of a tobacco cytoplasmic ribosomal protein L2 gene. *Nucl. Acids Res.* 20: 1517-1522.

Martelli, A. M., Coco L., Bareggi R., Tabellini G., Rizzoli R., Ghibellini M.D. and Narducci P. (1999) Insulin-like growth factor - I - dependent stimulation of nuclear phospholipase C-B1 activity in Swiss 3T2 cells requires an intact cytoskeleton and is paralleled by increased phosphorylation of three phospholipases. *J. Cell. Biochem.* 72: 339-348.

Mathews M.B., Sonnenberg N. and Hershey J.W.B. (1996) Origins and targets of translational control. In: *Translational Control* (Hershey, J.W.B., Mathews M.B. and Sonnenberg, N., eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 1-9.



Merkulova T.I., Frolova L.Y., Lazar M., Camonis J. and Kisselev L.L. (1999) C-terminal domains of human translation termination factors meRF1 and eRF3 mediate their in vivo interaction. *FEBS Lett.* 433: 41-47.

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

Merrick W.C. and Hershey J.W.B. (1996) The pathway and mechanism of eukaryotic protein synthesis. In: *Translational Control* (Hershey, J.W.B., Mathews M.B. and Sonenberg, N., Eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York pp. 31-69.

Mercer W. E., Avignolo C. and Barsega R. (1984) The role of the p53 protein in cell proliferation as studied by the microinjection of monoclonal antibodies. *Mol. Cell Biol.* 4: 276-281

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

Miller B.S., Shankavaram U.T., Horney M.J., Gore A.C.S., Kurtz D.T. and Rosenzwing S.A. (1996) Activation of cJun NH2- Terminal Kinase/Stress-Activated Protein Kinase by Insulin. *Biochemistry* 35:8769-8775.

Mitchison J.M. (1971) The biology of the cell cycle. Cambridge University Press, Londres pp. 58-158

Mizoguchi T., Hayashida N., Yamaguchi-Shinozaki K., Kamada H. and Sozaki K. (1996) Two genes that encode ribosomal-protein S6 kinase homologs are induced by cold or salinity stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 358: 199-204.

Möller W. (1990) Hypothesis: ribosomal protein L12 drives movement of tRNA. In: *The Ribosome: Structure, Function and Evolution* (Hill W.E., Dohlberg A., Garret R.A., Moore P.B., Schlessiner D. Warner J.D., eds.) American Society of Microbiologists, Washington, D.C., pp.380-389.

Monks D.E., Aghoram K., Courtney P.D., De wald D.B. and Dewey R.E. (2001) Hyperosmotic Stress Induces the Rapid Phosphorylation of a Soybean Phosphatidylinositol transfer protein Kinases SPK1 and SPK2. *Plant Cell* 13: 1205-1219.

Montesano L. and Glitz D.G. (1988) Wheat germ cytoplasmic ribosomes. *J. Biol. Chem.* 263: 4932-4938.

Murphy L.J., Bell G.I. and Risen H.G. (1987) Tissue distribution of insulin-like growth factor I and II messenger ribonucleic acid in the adult rat. *Endocrinology* 120: 1279.

Murashige T. and Skoog C. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-479.

Nair and Palfrey (1996) Regulation of protein synthesis by calcium. In: *Translational Control* (Hershey, J.W.B., Mathews M.B and Sonenberg, N., eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 295-319.

Navarro P., Valverde A.M., Benito M. and Lorenzo M. (1998) Insulin/IGF-I Rescues Immortalized Brown Adipocytes from Apoptosis Down-Regulating Bcl-xS. Expression, in a PI 3-Kinase- and Map Kinase-Dependent Manner. (1998). *Experimental Cell Res.* 243: 213-221.

Navarrete M.H., Cuadrado A. and Canovas J.L. (1983) Partial elimination of G1 and G2 periods in higher plant cells by increasing the S period. *Ex. Cell. Res.* 148: 273-280

Nave B.T., Ouwens M., Withers D.J., Alessi D.R. and Shepherd P.R. (1999) Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochem. J.* 344:27-31.

Norbury C., Blow J. and Nurse P. (1991) Regulatory phosphorylation of p34 cdc2 protein kinase in vertebrates *EMBO J.* 10: 3321

Nurse P. (1990) Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 344: 503

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

Odom O.W., Picking W.D. and Hardesty B. (1990) Movement of tRNA but not the nascent peptide during peptide bond formation on ribosomes. *Biochemistry* 29: 10734-10744.

O'Farrel M. and Dixon C. (1986) Biosynthesis of nuclear proteins after stimulation of quiescent Swiss mouse 3T3 cells. *J. Cell Sci.* 82: 173-186

Oliveira A.A.E., Elenier A.A.O., Machado T.O.L., Gomes M.V., Neto X.J., Pereira C. A., Vierira H.J.G., Fernández S.V.K. and Javier Filho J. (1999) Jack bean seed coat contains a protein with complete sequence homology to bovine insulin. *Protein and peptide letters*, &: 15-21.

Orci L., Ravazzula M., Storch J.M., Anderson W.G.R., Vassalli DJ. and Perrelet A. (1987) Proteolytic Maturation of Insulin Is a Post-Golgi Event Which Occurs in Acidifying clathrin-Coated Secretory Vesicles. *Cell* 49: 865-868

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

Pao Ch.I., Shu J., Wu G., Farmer P.K. and Phillips L.S. (1996) In vitro Transcription of the rat Insulin-like growth Factor-I Gene. *J. Biol. Chem.* 271: 8674.

Pardee A.B. (1987) Molecules involved in proliferation of normal and cancer cells. *Can. Res.* 47: 1488-1491

Pause A., Belsham G.J., Gingras A.C., Danzé O., Lin T.A., Lawrence J.C., Jr. and Sonenberg N. (1994) Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature* 371, 762-767.

Párrizas M., Saltiel R.A. and Le Roith D. (1997) Insulin- like growth factor 1 Inhibits apoptosis using the phosphatidyl inositol 3'-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *Journal. Biological Chemistry* 272: 154-161.

Pérez, L., Aguilar R. and Sánchez de Jiménez E. (1990) Phosphorylation of ribosomal proteins induced by auxins in maize axes during germination. *Plant Physiol.* 94: 1270-1975.

Pérez-Méndez, A., Aguilar-Caballero R. and Sánchez de Jiménez E. (1993) Characterization of ribosomal protein phosphorylation in maize axes during germination. *Plant. Sci.* 94: 71-79.

Paestova T., Shatsky I.N. and Hellen C.U.T. (1996) Functional dissection of eukaryotic initiation factor 4F: the 4A subunit and the central domain of the 4G subunit are sufficient to mediate internal entry of 43S preinitiation complexes. *Mol. and Cell. Biology* 16: 6870-6878.

Pierandrei-Amaldi P., Amaldi F. (1994) Aspects of regulation of ribosomal protein synthesis in *Xenopus laevis*. *Genetica* 94: 181-193.

Pines J. (1993) Cyclins and cyclin-dependent kinases: take your partner. *Trends Biochem. Sci.* 18: 195

Pledger W.J., Howe P.H. and Leof E.B. (1982) The regulation of cell proliferation by serum growth factors. *Ann. N. Y. Acad. Sci. USA* 397: 1-10

Pramanik S.K., Krochko J.E. and Bewley J.D. (1992) Distribution of cytosolic mRNAs between polysomal and ribonucleoprotein complex fractions in alfalfa embryos. *Plant Physiol.* 99: 1590-1596.

Proud C.G. (1992) Protein phosphorylation in translational control. *Curr. Top. Cell. Reg.* 32: 243-369.

Proud C.G. (1994) Peptide-chain elongation in eukaryotes. *Mol. Biol. Rep.* 19: 161-170.

Proud C.G. (1996) p70 S6 kinase: an enigma with variations. *Biochem. Sci.* 21: 181-185.

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

Quevedo C., Alcázar A. and Salinas M. (2000) Two Different Signal Transduction Pathways Are Implicated in the Regulation of Initiation Factor 2B Activity in Insulin-Like Growth Factor-1-Stimulated Neuronal Cells. *J. Biol. Chem.* 275: 19192-19197.

Rechler M.M. and Clemmons D.R. (1998) Regulatory actions of insulin-like growth factor-binding proteins. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 9: 176-183

Remacha M., Jiménez-Díaz A., Santos C., Briones E., Zambrano R., Rodríguez-Gabriel M.A., Guarianos E. and Ballesta J.P.G. (1995) Proteins P1, P2 and P0, components of the eukaryotic ribosome stalk. New structural and functional aspects. *Biochem. Cell. Biol.* 73: 959-968.

Rother I.K. and Accili D. (2000) Role of insulin receptor and IGF receptors in growth and development. *International Pediatric Nephrology Association New York* 14: 228-261.

Rutter A.G. (1999) Insulin secretion: Feed-forward control of insulin biosynthesis? *Current Biology* 9:443-445.

Scharf K.D. and Nover L. (1987) Control of ribosome biosynthesis in plant cell cultures under heat shock conditions. II. Ribosomal proteins. *Biochem. Biophys. Acta* 909: 44-57

Sacchs A.B., Sarnow P. and Hentze M. (1997) Starting at the beginning, middle and end: Translation initiation in eukaryotes. *Cell* 89: 831-838.

Sánchez de Jiménez E., Aguilar R. and López S. (1981) Distinctive characteristics of protein synthesis in maize embryos during the early stages of germination. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 99: 445-450

Sánchez de Jiménez E. and Aguilar R. (1984) Protein synthesis patterns: relevance of old and new messenger RNA in germinating maize embryos. *Plant. Physiol.* 75: 231-234.

Sánchez-Martínez D., Puigdomenech P. and Pagés M. (1986) Regulation of gene expression in developing *Zea mays* embryos. Protein synthesis during embryogenesis and early germination in maize. *Plant. Physiol.* 82: 543-549.

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

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

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

Sans J., Giménez-Martín G. And de la Torre C. (1980) Onset of cell proliferation in dormant roots of *Allium cepa*. Kinetic Analysis. *Biol. Cell.* 38: 95-104

Sasaki K. (1984) Multihormonal regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription. *J. Biol. Chem.* 259: 15239-15251.

Schaller A. (1999) Oligopeptide signaling and the action of systemin. *Plant Mol. Biol.* 40: 763-769.

Scharf K.D. and Nover L. (1982) Control of ribosome biosynthesis in plant cell cultures under heat shock conditions. II. Ribosomal proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 909: 44-57.

Schwartzman J.B., Krimer D.B. and Vant Hoff J. (1984) The effects of different thymidine concentrations on DNA replication in pea root cells synchronized by a protracted 5-fluorodeoxyuridine treatment. *Exp. Cell Res.* 150: 379-389

Sen S., Payne P.I. and Osborne D.J. (1975) Early ribonucleic acid synthesis during germination of rye (*Secale cereale*) embryos and the relationship to early protein synthesis. *Biochem. J.* 148: 381-387

Shama S. and Meyuhas O. (1996) The translational cis-regulatory element of mammalian ribosomal protein mRNAs is recognized by the plant translational apparatus. *Eur. J. biochem.* 236: 383-388.

Shamasaki S., Shimonaka M. and Ui M. (1990) Structural characterization of a follicular-stimulating hormone action inhibitor in porcine ovarian follicular fluid. Its identification as the insulin-like growth factor-binding protein. *J. Biol. Chem.* 252: 2198-2202

Scheper W., Holthuizen E.P. and Sussenbach S.J. (1996) Growth-condition dependent regulation of insulin-like growth factor II mRNA stability. *Biochem. J.* 318: 195-201.

Sisson T. H. and Castor C.W. (1990) An improved method for immobilizing IgG antibodies on protein A-agarosa. *J. Immunol. Meth.* 127: 215-220

Sonenberg N. (1996) mRNAs 5'Cap-binding protein eIF-4E and control of cell growth. In *Translational Control* (Hershey, J.W.B., Mathews M.B. and Sonenberg, N., eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 245-269.

Spirin A. (1996) Masked and translatable messenger ribonucleoproteins in higher eukaryotes. In: *Translational Control* (Hershey, J.W.B., Mathews M.B. and Sonenberg, N., eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 319-335

Spiegel S, Marcus A. (1975) Polyribosome formation in early wheat embryo germination is independent of either transcription or polyadenylation. *Nature* 256: 228-230.

Stafstrom J.P. and Sussex I.M. (1992) Expression of a ribosomal protein gene in axillary buds of pea seedlings. *Plant Physiol.* 100: 1494-1502.

Stanfstrom J.P. and Devitt M.L. (1995) Nucleotide sequence of four ribosomal protein L27cDNAs from growing axillary buds of pea. *Plant Physiol.* 107: 1031-1032.

Steiner D.F., Kemmler W., Taher H.S. and Peterson D.J. (1974) Proteolytic processing in the biosynthesis of insulin and other proteins. *Fed. Proc.* 33: 2105-2115

Steller A.M., Delgado H.C. and Zou Z. (1995) Insulin-like growth factor II mediates epidermal growth factor II induced mitogenesis in cervical cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 11970-11974.

Steward M.J. and Thomas G. (1994) Mitogenesis and protein synthesis: A role for ribosomal protein S6 phosphorylation? *Bio Essays* 16: 809-815.

Stoneley M., Chappell S. A., Jopling C.L., Dickens M., MacFarlane M. and Willis A.E. (2000) cMyc protein synthesis is initiated from the internal ribosome entry segment during apoptosis: *Mol. Cell. Biol.* 20: 1162-1169.

Stutz A., Conne B., Huarte J., Gubler P., Volkel V., Flandin P. and Vassalli J. (1998) Masking, unmasking, and regulated polyadenylation cooperate in the translational control of a dormant mRNA in mouse oocytes. *Genes and Dev.* 12: 2535-2548.

Sussenbach J.S. and Steenbergh P.H. (1991) Structural and regulatory aspects of the human genes encoding IGF-I and II. In: *molecular biology and physiology of insulin and insulin-like growth factors.* Raizada M.K. and Roith D.L. (eds). Plenum Press. New York pp 1-14

Tarun S.Z., Well S.E., Deardorff J.A. and Sachs A.B. (1997) Translation initiation factor eIF4G mediates in vitro poly (A) tail dependent translation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 9046-9051.

Takuwa N., Fukui Y. and Takuwa Y. (1999) Cyclin D1 Expression Mediated by Phosphatidylinositol 3-kinase through mTOR-p70^{S6k} Independent Signaling in Growth Factor-Stimulated NIH 3T3 Fibroblasts Mol. Cell Biol. 19(2): 1346-1358.

Taylor M.A., Arif S.A., Kumar A., Davies H.V., Scobie L.A., Pearce S.R. and Flavell A.J. (1992) Expression and sequence analysis of cDNAs induced during the early stage of tuberization in different organs of the potato plant (*Solanum tuberosum* L.) Plant Mol. Biol. 20:641-651.

Taylor M.A. and Davies H.V. (1994) Nucleotide sequence of a cDNA clone for a 60S ribosomal protein L27 gene from potato (*Solanum tuberosum* L.) Plant Physiol 105: 1025-1026.

Terada N., Patel H.R., Takase K., Kohno K., Nairn A.C., Gelfand E.W. (1994) Rapamycin selectively inhibits translation of mRNAs encoding elongation factors and ribosomal proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11477-11481.

Thomas G., Martin-Pérez J., Siegman M. and Otto A.M. (1982) The effect of serum EGF, PGF2a and insulin on S6 phosphorylation and initiation of protein and DNA synthesis. Cell 30: 253-242.

Thomson F.J., Jess T.J., Moyes C., Plevin R. and Gould G.W. (1997) Characterization of the intracellular signaling pathways that underlie growth-factor-stimulated glucose transport in *Xenopus* oocytes: pathways of phosphatidylinositol Rho-dependent pathways of phosphatidylinositol 3-Kinase activation. Biochem J. 325:637-643.

Tissenbaum A.H. and Ruvhun, G. (1998) An insulin-like signaling pathway affects both longevity and reproduction in *Caenorhabditis elegans*. Genetic 148: 703-717.

Tjian R. (1995) Molecular machines that control genes. Sci. Am. 272: 54-61.

Trojanek, J., Ek P., Scoble J., Muszynska G. and Engström L. (1996) Phosphorylation of plant proteins and the identification of protein-tyrosine kinase activity in maize seedlings. Eur. J. Biochem. 235: 338-344.

Trotochaud A.E., Jeong S. and Clark S.E. (2000) CLAVATA3, a Multimeric Ligand for the CLAVATA 1 Receptor-Kinase. Science 289: 613-617.

Turck F., Kozma S.C. Thomas G. and Nagy F. (1998) A heat-sensitive Arabidopsis thaliana kinase substitutes for human p70^{S6k} function in vivo. Mol. Cell Biol. 18: 2038-2044.

Ullrich A., Dull T. J. and Gray A. (1980) Genetic variation in the human insulin gene. *Science* 209: 612-614

Valentinis B., Navarro M., Zanocco-Marani T., Edmonds P., Mc Cormick J., Morrione A., Sacchi A., Romano G., Reiss K. and Baserga R. (2000) Insulin Receptor Substrate-1, p70^{S6K} and cell size in transformation and differentiation of hemopoietic cells. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 25451-25459.

Valverde M.A., Navarro P., Teruel T., Conejo R., Benito M. and Lorenzo M. (1999) Insulin and Insulin-like growth factor I up-regulate GLUT4 gene expression in fetal brown adipocytes, in a phosphoinositide 3-kinase-dependent manner. *Biochem J.* 3337: 397-405.

Valverde A.M., Navarro P., Benito M. and Lorenzo M. (1998) H-ras Induces Glucose Uptake in Brown Adipocytes in an Insulin and Phosphatidylinositol 3-kinase-Independent Manner. *Exp. Cell. Research* 243: 274-281.

Vanhaesebroeck B. and Alessi R.D. (2000) The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem. J.* 346: 561-576

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

Vázquez-Ramos J.M. (2000) Cell Cycle Control during Maize Germination. In: *Seed Biology. Advances and applications* (Black M., Bradford K. I. and Vázquez Ramos J. eds.) Proceedings of the sixth International Workshop on seeds, Mérida, México, 1999. CABI, Publishing, ISBN 0 851994040. pp. 261-269.

Walden R. and Ecker J.R. (1998) Cell signaling and gene regulation: presing the puzzle together. *Curr. Opinion in Plant Biology* 1: 375-377.

Walker J.C. (1993) Receptor-like protein kinase genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 3: 451-456.

Walker J.C. (1994) Structure and function of the receptor-like protein kinases of higher plants. *Plant Mol. Biol.* 26: 1599-1609.

Walling L., Drews G.N. and Goldberg R.B. (1986) Transcriptional and post-transcriptional regulation of soybean seed protein mRNA levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2123-2127.

Watanabe Y., Barbashov S.F., Komatsu S., Hemmings A.M., Miyagi M., Tsunasawa S. and Hirano H. (1994) A peptide that simulates phosphorylation of the plant insulin-binding protein: isolation, primary structure and cDNA cloning. *European Journal of Biochemistry* 224: 167-172.

Webster C., Gaut R.L., Browing K.S., Ravel J.M. and Roberts J.K.M. (1991) Hypoxia enhances phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4A in maize root tips. *J. Biol. Chem.* 266: 23341-23346.

Weng Q.P., Andrabi K., Kozlowski M.T., Grove J.R. and Arruch J. (1995) Multiple Independent Inputs are Required for Activation of the p70^{S6K}. *Mol. Cell Biol.* 15: 2333-2340.

Werner H. and Le Roith D.L. (2000) New concepts in regulation and function of the insulin-like growth factors: implications for understanding normal growth and neoplasia. *Cell. Mol. Life. Sci.* 57: 932-942.

White M.F. and Kahn C.R. (1994) The insulin signaling system. *J. Biol. Chem.* 269:

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

Whitehead J.P., Clark S.F., Urs B. and James D.E. (2000) Signaling through the insulin receptor. *Curr. Opinion in Cell. Biol.* 12: 222-228.

Wood W.I., Cachianes G., Henzel W.J., Winslow G.A., Spences S.A., Hellmiss R., Martin J.L. and Baxter R.C. (1988) Cloning and expression of the GH dependent insulin-like growth factor binding protein. *Mol. Endoc.* 2: 1176-1185

Wood A.M., Lambert A., Hooper M.A.K., Mitchell G.G. and Robertson W.R. (1994) Endogenous steroids and the control of estradiol secretion by human granulosa lutein cells by follicle stimulating hormone and insulin-like growth factor –I. *Human Reproduction.* 9: 19-23

Wu R.S., Tsai S. and Bonner W.M. (1982) Patterns of histone variant synthesis can distinguish G₀ from G₁ cells. *Cell* 31: 367-374

Yang W. and Hinnebusch S.G. (1996) Identification of a regulatory sub complex in the guanine nucleotide exchange factor eIF2B that mediates inhibition by phosphorylated eIF2. *Mol. Cell Biol.* 16: 6603-6616.

Yanishevsky R.M. and Stein G.H. (1981) regulation of cell cycle in eucaryotic cells. *Int. Rev. Cytol.* 69: 223

Yau L., Lukes H., Mc Diarmid H., Werner J. and Zahradka P. (1999) Insulin-like growth factor I (IGF-I) dependent activation of pp42/44 mitogen-activated protein kinase occurs independently of IGF-1 receptor kinase activation and IRS-1 tyrosine phosphorylation. *Eur. J. Biochem.* 266: 1147-1157.

Yonezawa K., Ando A., Kaburagi Y., Yamamoto-Honda R., Kitamura T., Hara K., Nakafuku M., Okabayashi Y., Kadowaki T., Kaziro Y. and Kasuga M. (1994) Signal transduction pathways from insulin receptors to ras. *J. Biol. Chem.* 269: 4634-4640

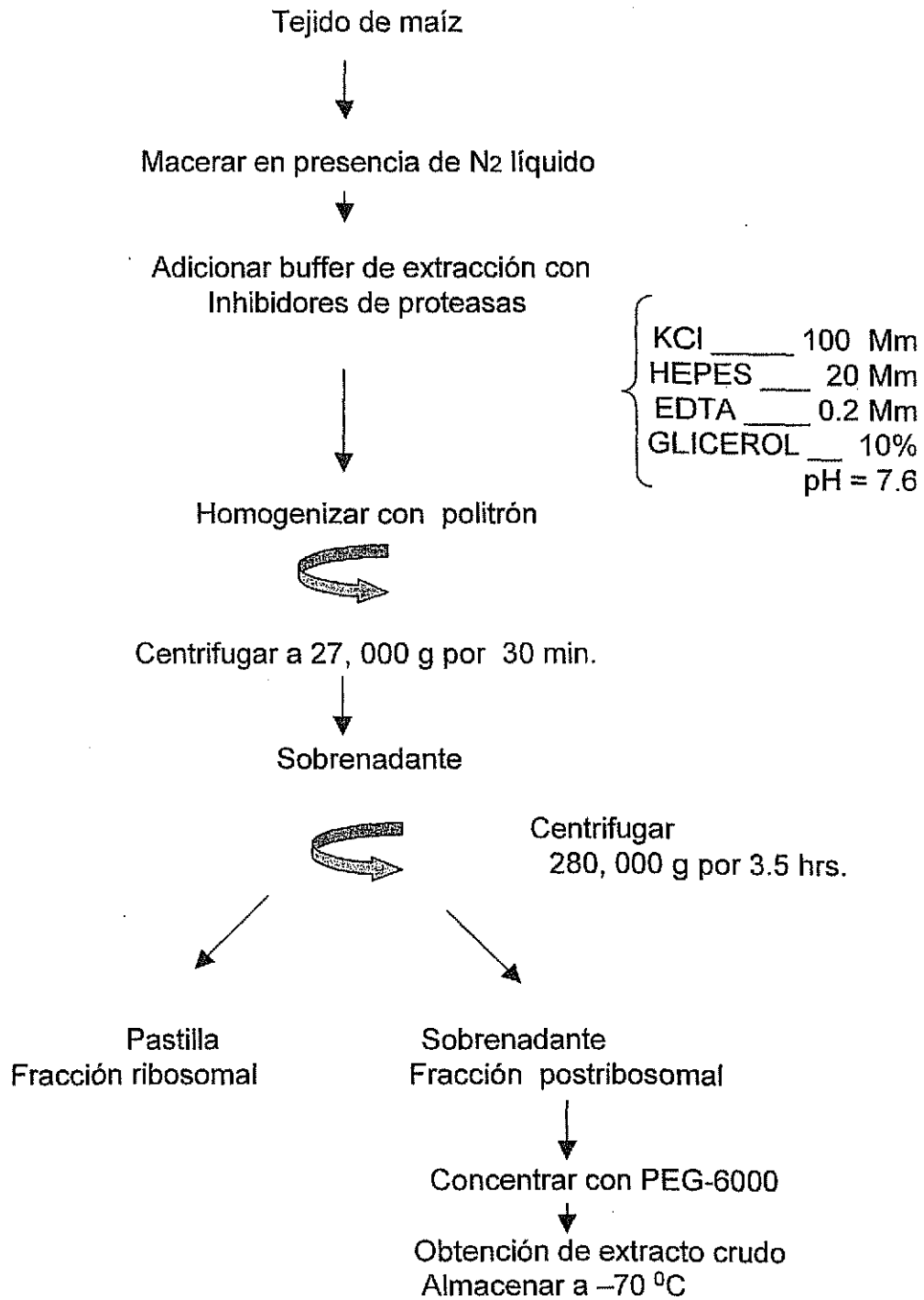
Zammit A.V. (1996) Role of insulin in hepatic fatty acid partitioning: emerging concepts. *Biochem. J.* 314: 1-14

Zhao Y., Watson J.C., Kung S. and Bottino P.J. (1995) Characterization of cDNA encoding ribosomal protein S16 in rice. *Plant Physiol.* 107: 1471-1472.

Zhang S.H., Broome M.A., Lawton M.A., Hunter T. and Lamb C.J. (1994) atpk1, a novel ribosomal protein kinase gene from *Arabidopsis*. II functional and biochemical analysis of the encoded protein. *J. Biol. Chem.* 269: 17593-17599.

12.- APÉNDICE

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA Zm-IGF



PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA Zm-IGF

1.- Por la técnica de cromatografía en columna de filtración G-50 (Primera etapa)

Muestra de extracto crudo concentrado



*** Columna de exclusión molecular
Sephadex G-50 (Resina activada y calibrada de SIGMA)



Eluir con buffer de extracción (dilución 1:10)
(con 3 volúmenes de la columna)



Colectar fracciones de 1 ml



Por absorbancia a 280 nm, monitorear las fracciones de elución



Monitoreo de fracciones por análisis de dot- blot



Concentrar fracciones inmunoreactivas con el anticuerpo contra insulina de
bovino. Cuantificación de proteína por el método de Bradford



Análisis por western-blot, para identificar a las
fracciones que contengan Zm-IGF

PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA Zm-IGF

2.- Por la técnica de cromatografía de afinidad



a) Columna de proteína "A" Sepharosa
Equilibrar con 5 ml de buffer de lavado
(Borato de sodio 50 mM, pH 8.2)

c) Agitar suavemente por
inversión durante toda
la noche a 4 °C

b) Añadir el anticuerpo contra
insulina de bovino (dilución
1:1 con buffer de lavado)

d) Drenar la solución de IgG y lavar
dos veces con buffer de lavado
(recuperar el IgG no unido
a la resina)

Unión covalente del IgG

Disolver el Dimethylpimelimidato (DMP) en buffer de
entrecruzamiento (triethanolamina, 0.2 M pH 8.2) y adicionarlo de inmediato a
la columna

Agitar suavemente por inversión por cuatro h a temperatura ambiente

Drenar la solución de DMP

Lavar la columna con buffer de entrecruzamiento

Bloqueo de sitios activos remanentes

Adicionar 2 ml de buffer de bloqueo (etanolamina 0.1 M, pH 8.2),
Para bloquear cualquier grupo imidato sin reaccionar

Agitar suavemente por inversión durante 1 h a temperatura ambiente
y posteriormente drenar la solución

Lavar la columna con buffer de elución de IgG (aminas primarias, pH 2.89).
En este paso se espera que eluya todo el IgG que no se unió covalentemente
a la proteína "A".

Lavar la columna con buffer de lavado

Purificación del antígeno

Equilibrar la columna con buffer de unión (Tris, 10 mM, pH 7.5)

Aplicar la muestra (previamente diluida 1:1 con buffer de unión)

Agitar suavemente por inversión durante toda la noche

Drenar la muestra y lavar la columna con buffer de unión
(obtener fracciones de 1ml y monitorear a 280 nm, hasta obtener la lectura
más baja)

Eluir la Zm-IGF con buffer de elución (Glicina-HCl, 0.1 M, pH 2.8)
y monitorear las fracciones a 280 nm

SINTESIS *IN VIVO* DE PROTEINAS RIBOSOMALES

0.5 g de ejes secos incubados
en medio MS durante 22 h

Aplicar tratamientos y según el caso, dar
pulso de ^{35}S -metionina ($300 \mu\text{Ci ml}^{-1}$) o
 ^{32}P -ortofosfato ($330 \mu\text{Ci ml}^{-1}$) por 2h

Macerar en presencia de N_2
líquido y adicionar buffer
de extracción

Homogenizar con politrón durante 3 min

a 27,000 g por 30 min a 4 °C

Sobrenadante

a 280,000 g por 3.5 h a 4 °C,
en un colchón de sacarosa

Sobrenadante

fracción postribosomal

Pastilla

fracción ribosomal resuspender en buffer
de resuspensión, incubar en hielo con
agitación ocasional

Evaluación de la poza

6,000 g por 15 min a 4 °C

Pastilla: Obtención de proteínas
citoplásmicas por precipitación
con TCA al 10 %, resuspendidas
en agua y neutralizadas con KOH.

Sobrenadante: extracción de
proteínas ribosomales con ácido
acético y precipitación con acetona
a -20 °C

centrifugar a 8,000 g, 15 min

Pastilla: resuspender en buffer de
resuspensión

1.- Análisis electroforético y autorradiografía

2.- Evaluación de la incorporación de marca por centelleo líquido