



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

CONTROL TRADUCCIONAL MEDIADO POR TOR DURANTE LA
GERMINACIÓN Y ESTABLECIMIENTO DE PLÁNTULA EN MAÍZ (*Zea mays*)

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:
KENIA SALAZAR DÍAZ

TUTOR PRINCIPAL
Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova
[Facultad de Química, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. Martha Patricia Coello Coutiño
[Facultad de Química, UNAM](#)
Dra. Nuria Sánchez Puig
[Instituto de Química, UNAM](#)

Ciudad de México. Octubre, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

ÍNDICE DE CONTENIDO

I. Introducción. Estructura en dominios de la proteína TOR y su regulación por fosforilación	11
Complejos TORC1 y TORC2 en células animales, composición, principales funciones y conservación en plantas	13
Vía de señalización río arriba de TOR en mamíferos y <i>Arabidopsis thaliana</i>	15
TOR participa en la regulación del desarrollo y crecimiento de las plantas	18
Breve descripción del mecanismo de traducción y su regulación mediada por TOR.....	21
TOR en la regulación de la traducción de RNA mensajeros que contienen uORF en plantas.....	23
Regulación traduccional y antecedentes de la vía TOR durante la germinación en maíz.....	27
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	29
HIPÓTESIS	30
OBJETIVO GENERAL.....	30
OBJETIVOS PARTICULARES.....	30
II. METODOLOGÍA	31
Material biológico, condiciones de germinación y crecimiento de plántula	31
Tratamiento con AZD-8055 y Espermidina para evaluar sus efectos en el crecimiento temprano de plántula.....	31
Tratamientos con AZD-8055 y Espermidina para evaluar la actividad de la vía TOR en ejes embrionarios de maíz.....	32
Aislamiento de proteínas	32
Separación de proteínas mediante SDS-PAGE	33
Protocolo de inmunodetección tipo western (<i>Western blot</i>)	34
Identificación de mensajeros que contienen uORF en maíz y análisis del 5'UTR	35
Diseño de oligonucleótidos para transcritos candidatos a ser regulados por TOR.....	37
Obtención de perfiles polisomales.....	38
Extracción de RNA total y RNA de polisomas.....	40

Tratamiento de RNA y síntesis de cDNA	40
Condiciones de PCR punto final y PCR tiempo real	41
Construcciones utilizadas en los ensayos en protoplastos	41
Generación de la construcción pZmPAO3-GUS	42
Ensayo de traducción en protoplastos de <i>A. thaliana</i> y medición de la actividad de GUS.....	43
Gráficos y tratamiento estadístico de los datos.....	45
III. RESULTADOS.....	46
Análisis de la identidad de las proteínas TOR, S6K y S6 de maíz con respecto a otras especies y conservación de los sitios de fosforilación ...	46
La actividad de la vía TOR aumenta durante la germinación y primeras etapas de establecimiento de plántula y es importante para el crecimiento de plántulas de maíz.....	49
TOR controla la traducción de mRNA específicos que contienen uORF	53
Las poliaminas regulan la germinación y crecimiento de plántulas de maíz a través de TOR.....	60
Las poliaminas inducen la actividad de TOR en semillas germinadas de maíz.....	61
TOR participa en el control de traducción de enzimas de la ruta de poliaminas	62
IV. DISCUSIÓN	66
V. CONCLUSIÓN GENERAL	73
VI. CONCLUSIONES PARTICULARES	73
VII. PERSPECTIVAS	74
VIII. REFERENCIAS	75
IX. ANEXOS.....	81
Anexo 1. Alineamientos de las proteínas S6, S6K, TOR de <i>Arabidopsis thaliana</i>, <i>Zea mays</i> (maíz), <i>Oryza sativa</i> (arroz) y <i>Homo sapiens</i> (humano). .	81
Anexo 2. Regiones 5'UTR de los mRNAs candidatos a ser regulados por la vía TOR.	90
Anexo 3. Ruta metabólica de poliaminas en plantas.....	93
Anexo 4. La inhibición de TOR disminuye la abundancia de polirribosomas y los niveles totales de transcritos blanco.....	95
Anexo 5. Publicaciones derivadas del trabajo de tesis.....	96

INICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura I. Estructura de la proteína TOR. Dominios funcionales y regulación por el complejo FKBP12-rapamicina.....	12
Figura II. Complejos TORC en células de animales y sus principales funciones.....	14
Figura III. Vías de señalización de TOR y principales procesos que regula en mamíferos y plantas.....	16
Figura IV. Control del crecimiento y desarrollo mediado por TOR en <i>Arabidopsis thaliana</i>	19
Figura V. Control traduccional mediado por la ruta TOR en plantas.....	23
Figura VI. Destinos del ribosoma después de la traducción de un uORF.....	24
Figura VII. Reinicio de la traducción mediado por TOR en <i>A. thaliana</i>	26
Figura 1. Los sitios de fosforilación de TOR, S6K y S6 descritos para la vía TOR están conservados en maíz.....	48
Figura 2. Aumento de la actividad de la vía TOR durante la germinación y las primeras etapas de establecimiento de plántula.....	50
Figura 3. La inhibición de TOR afecta el crecimiento de ejes embrionarios de maíz.....	52
Figura 4. La inhibición de TOR con AZD8055 disminuye su fosforilación y la de la proteína ribosomal S6 en ejes embrionarios de maíz.....	53
Figura 5. TOR regula la eficiencia traduccional de mRNAs que contienen uORF en ejes embrionarios de maíz.....	58
Figura 6. Las poliaminas inducen el crecimiento de plántulas de maíz a través de TOR.....	60
Figura 7. La actividad de la vía TOR aumenta en respuesta a espermidina en ejes embrionarios de maíz.....	61
Figura 8. TOR controla la traducción de enzimas del metabolismo de poliaminas que contienen uORF en el 5'UTR.....	63
Tabla I. Oligonucleótidos utilizados para la evaluación por PCR de los niveles de los transcritos.....	37
Tabla II. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de la 5'UTR de ZmPAO3.....	42

Tabla 1. Nivel de identidad de las proteínas TOR, S6K y S6 en maíz con las secuencias correspondientes a *A. thaliana*, arroz y humano.....46

Tabla 2. Transcritos seleccionados para el análisis de la regulación traduccional mediada por TOR en ejes embrionarios de maíz.....54

AGRADECIMIENTOS

Se agradece la beca otorgada por el Consejo Nacional de ciencia y Tecnología (CONACyT) de México para la realización del posgrado en Ciencias Bioquímicas.

Se agradece el financiamiento por parte del Programa de Apoyo a la Innovación e Investigación Tecnológica PAPIIT-UNAM IN218921 e IN214118, así como al apoyo complementario por parte de la Facultad de Química-UNAM PAIP 5000-9118.

Se agradece el apoyo recibido por parte del Programa a Apoyos de Estudios de Posgrado (PAEP)-UNAM para la asistencia a congresos de mucha relevancia para la realización de este proyecto.

Se agradece el uso de las instalaciones de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAII)-Facultad de Química y el apoyo técnico de Jorge Herrera-Díaz para la realización de los experimentos de PCR en tiempo real.

Agradezco a todo el personal de la Coordinación del Posgrado de Ciencias Bioquímicas en la Ciudad de México por sus atenciones, incluso bajo las dificultades impuestas por la pandemia.

Agradezco a mis compañeros del laboratorio 103 por ser partícipes de mi recorrido desde la maestría, su ayuda y enseñanzas en el lab. y en el ámbito personal.

Agradezco a los miembros de mi comité tutor por sus recomendaciones y observaciones que contribuyeron a que tuviera una visión más completa de mi proyecto de investigación y a mi formación como un profesional crítico.

Agradezco a mis familiares y amigos que me han acompañado, especialmente desde que comencé mis estudios de maestría en la UNAM, por su apoyo y confianza incondicionales.

En especial, agradezco a mi tutora principal Tzvetanka Dimitrova por su guía y todas las recomendaciones que me ofreció, desde que me aceptó para formar parte de su laboratorio y durante el desarrollo de mi proyecto de doctorado, así como por la evaluación y revisión oportuna de todos mis escritos y presentaciones. Sus comentarios siempre fueron claros y bien fundamentados por lo que han contribuido notablemente en mi manera de transmitir la información relacionada con la ciencia.

Se agradece a los miembros del jurado de esta tesis por su participación en la revisión del documento y sus valiosos comentarios que ayudaron a mejorar el escrito y la forma en la que se presentan los resultados:

Presidenta	Dra. María Soledad Funez Argüello
Vocal	Dra. Aurora Lara Nuñez
Vocal	Dr. Francisco Torres Quiroz
Vocal	Dr. Roberto Hernández Fernández
Vocal	Dr. Francisco Javier Plascencia de la Parra

RESUMEN

La vía TOR regula el crecimiento y desarrollo de las plantas en respuesta a estímulos ambientales y la disponibilidad de nutrientes y energía. En maíz, la composición del complejo TOR, la señalización río arriba y los efectores de la vía han sido poco explorados. Sin embargo, durante la germinación de maíz se demostró que TOR activa a la proteína cinasa de S6 (S6K), controla la biogénesis de ribosomas y la fosforilación de la proteína ribosomal S6. La germinación de la semilla y las primeras etapas del establecimiento de la plántula de maíz ocurren entre las 24 y 48 horas de imbibición. Durante este tiempo se produce la reactivación metabólica del tejido quiescente, la síntesis de proteínas y la inducción del ciclo celular. Estos procesos son blancos de TOR conservados en eucariontes, por lo tanto, resulta relevante el estudio de las funciones de la vía en estas etapas de desarrollo. Particularmente, en este proyecto abordamos el papel de TOR en el control del crecimiento de plántula y su relación con la regulación traduccional. Mediante el uso del inhibidor específico de TOR, AZD-8055, encontramos que TOR regula el crecimiento de la plántula de maíz y la traducción de mRNAs que presentan marcos de lectura río arriba del principal (uORFs), como los codificantes para enzimas del metabolismo de poliaminas y de la síntesis de trehalosa. Las poliaminas son moléculas esenciales para el crecimiento celular y la respuesta a estrés en las plantas por lo que se exploró su conexión con la vía TOR. Interesantemente, se encontró que la inducción del crecimiento de plántulas de maíz mediado por poliaminas depende de la actividad de TOR. Además del efecto de la inhibición de TOR en la traducción, a mayores concentraciones del inhibidor se encontraron cambios en los niveles de transcritos relacionados con la respuesta a la disponibilidad de azúcares, estrés y la síntesis de proteínas. En conjunto, nuestros datos sugieren que TOR participa en el control del crecimiento a través de la regulación de la expresión génica a nivel traduccional en respuesta a diferentes estímulos celulares en maíz.

ABSTRACT

The TOR pathway regulates plant growth and development in response to nutrients and energy availability. In maize, the TOR complex composition, upstream signaling, and effectors have been poorly explored. However, during maize germination, it has been demonstrated that TOR activates S6 protein kinase (S6K), ribosome biogenesis and phosphorylation of ribosomal protein S6. Maize seed germination and early seedling establishment occur between 24 and 48 hours after imbibition. During this time, the metabolic reactivation of quiescent tissues, protein synthesis and induction of the cell cycle take place. Those are conserved TOR targets in eukaryotes. Therefore, the study of the pathway functions during these developmental stages is relevant. In this project, we addressed the role of TOR in seedling growth control and its relationship with translational regulation. We used the specific TOR inhibitor, AZD-8055, and found that TOR regulates the maize seedling growth and the translation of mRNAs bearing upstream open reading frames (uORFs). For example, mRNAs encoding enzymes of polyamine metabolism and trehalose synthesis are regulated. As polyamines are essential molecules for cell growth and stress response in plants, its connection with the TOR pathway was explored. Interestingly, it was found that polyamine-mediated induction of maize seedling growth is dependent on TOR activity. In addition to the effect of TOR inhibition on translation of uORF-mRNAs, at higher inhibitor concentrations we found a decrement in the levels of transcripts related to sugar availability sensing, stress response, and protein synthesis. Taken together, our data suggest that TOR is involved in the control of growth through the regulation of gene expression at translational level in response to different cellular cues in maize.

I. INTRODUCCIÓN

El crecimiento de organismos multicelulares es el resultado del crecimiento y la proliferación celular. Los factores de crecimiento, mitógenos, nutrientes y señales de desarrollo estimulan la división celular a través de la activación de la vía de las MAPK (proteínas cinasas activadas por mitógenos) y PI3K-Akt/PKB (fosfatidilinositol-3 cinasa/proteína cinasa B). Esta cascada de señalización estimula la formación de complejos ciclina/CDK que inducen la entrada a la fase G1 y posteriormente a la fase S del ciclo celular (Duronio & Xiong, 2013). Durante estas dos primeras fases del ciclo se produce la síntesis de macromoléculas y la duplicación del material genético. La transición a la fase S es un importante punto de control que se regula a través de la activación del factor transcripcional E2F, el cual estimula la producción de la maquinaria de replicación. El avance a la fase mitosis se controla a través de la inhibición de complejos ciclinas/CDK por proteínas denominadas KRP (proteínas similares a KIP). Aunque existen diferencias en el control del ciclo celular entre plantas y mamíferos, se conserva la regulación mediada por ciclinas/CDK y E2F (Scofield *et al*, 2014).

La proliferación celular está estrechamente relacionada con el crecimiento de la célula ya que esta debe alcanzar un tamaño adecuado antes de dividirse. Para crecer, la célula depende de la disponibilidad de nutrientes y energía para la síntesis de biomoléculas que conforman nuevos organelos. Las proteínas constituyen gran parte de la biomasa de la célula, por lo que su tamaño depende en gran medida de la actividad traduccional. Dado que la síntesis de proteínas es un proceso costoso energéticamente, existen mecanismos para su fina regulación en respuesta a condiciones de estrés, señalización por hormonas, factores de crecimiento y nutrientes (Jackson *et al*, 2010). En eucariontes, la vía de la cinasa TOR (*Target Of Rapamycin*) es fundamental para la integración de estas señales con el uso de la energía para el crecimiento y proliferación celular.

Estructura en dominios de la proteína TOR y su regulación por fosforilación

La proteína TOR es una treonina/serina cinasa perteneciente a la familia de las PIKKs (*phosphoinositide 3 kinase related kinases*) cuya estructura y funciones se encuentran conservadas en eucariontes. TOR consta de cinco dominios denominados HEAT, FAT, FRB, FATC y el dominio catalítico que se ubica hacia el carboxilo terminal entre los dominios FRB y FATC (Jacinto & Hall, 2003) (Figura 1a). El dominio HEAT (*Huntington, EF3A, ATM, TOR*), ubicado en el extremo amino, está formado por repeticiones de aproximadamente 40 aminoácidos que forman dos α -hélices antiparalelas y está involucrado en la interacción con otras proteínas y la unión a membrana. El dominio FAT (*Frap, ATM, and TRRAP*) está formado por repeticiones HEAT y TRP (*tetratricopeptide*) e interactúa con parte del dominio cinasa de la enzima (Figura 1b), por lo que se ha propuesto que participa en la conformación del sitio activo. El dominio FATC en levadura y mamíferos está relacionado con la activación del dominio cinasa, probablemente a través de su interacción con el lazo de activación de la enzima (Yang *et al*, 2013). Por último, el dominio FRB (*FKBP12-rapamycin binding domain*) que se ubica entre el FAT y el dominio cinasa, tiene una importante función en la regulación de la actividad de la proteína. Este es el sitio de unión del complejo FKBP12-rapamicina (Figura 1c), que es un inhibidor alostérico de TOR fundamental en la caracterización de sus blancos y funciones en la célula. Además, el dominio FRB se ubica en las inmediaciones del sitio activo y forma, junto con una proteína regulatoria asociada a TOR, que se denomina LST8 (*letal with sec-13*) una “compuerta” capaz de regular la entrada de los sustratos en presencia del complejo con la rapamicina (Figura 1c).

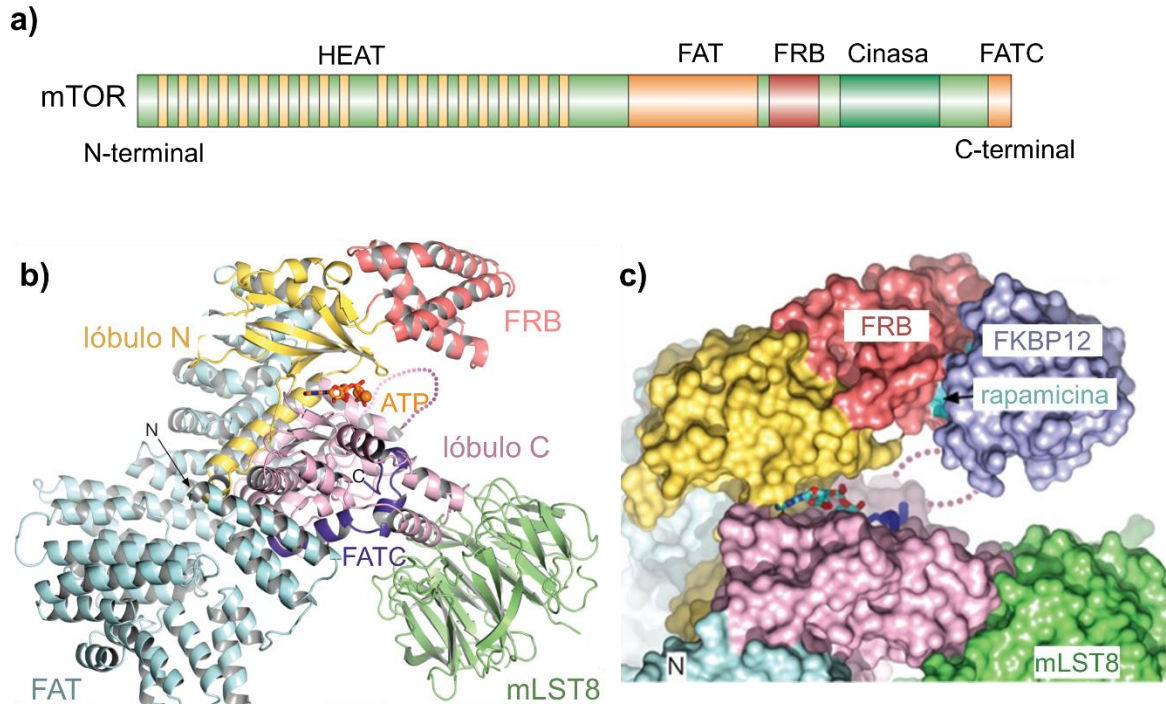


Figura I Estructura de la proteína TOR. Dominios funcionales y regulación por el complejo FKBP12-*rapamicina*. a) Estructura en dominios de TOR, en el extremo amino el dominio HEAT, seguido del dominio FAT, FRB y el dominio cinasa que se ubica contiguo al dominio FATC del extremo carboxilo terminal (tomado de Jacinto & Hall, 2003). b) Estructura terciaria de $mTOR^{\Delta N}$ -ATP/Mg (residuos 1376-2549 de la proteína de humano, el átomo de Mg se indica como una esfera naranja) unida a mLST8 (proteína de humano). Se muestra la conformación de los dominios funcionales de la proteína TOR. El dominio FAT forma una plataforma sobre la que descansa el dominio cinasa. El dominio cinasa adopta una estructura de dos lóbulos en cuya intersección se encuentra el sitio de unión a ATP. El dominio FATC interactúa con el dominio cinasa y con el sitio de unión a la proteína reguladora mLST8. El dominio FRB se ubica en las proximidades del sitio activo formando junto a mLST8 una hendidura que limita la entrada de los sustratos. c) Representación superficial de $mTOR^{\Delta N}$ -mLST8-FKBP12/*rapamicina*, señalando la formación de un sitio de regulación del acceso de sustratos al sitio activo. También se señala la interacción directa entre el dominio FRB y el inhibidor *rapamicina* (b y c se tomaron de Yang *et al*, 2013).

La actividad cinasa de TOR es regulada por fosforilaciones que ocurren a lo largo de la proteína. Se han descrito cuatro fosforilaciones activadoras en los residuos de Ser 1261 del dominio HEAT, Ser 1415 y Ser 2159 del dominio FAT y Thr 2164 en el dominio cinasa, de acuerdo con la numeración de TOR de mamíferos, mTOR (Figuroa & Lunn, 2016). Además, mTOR presenta dos fosforilaciones inhibitorias en la región entre el dominio cinasa y FATC en los

residuos de serina 2446 y 2481. El residuo de serina 2448 se ha encontrado consistentemente fosforilado en células cancerosas, en donde la actividad de la vía es alta (Chiang & Abraham, 2005). A pesar de haberse utilizado la modificación de este residuo como un marcador de la actividad de la vía, no está claro si es importante para el control de la actividad de TOR.

En plantas, se conoce muy poco de la regulación de TOR por fosforilación, solo se ha descrito la conservación del residuo de serina 2448 en *A. thaliana* y maíz. Se encontró que la fosforilación de este residuo aumenta por el estímulo de la fitohormona auxina, que induce la actividad de TOR en plántula de *A. thaliana* (Schepetilnikov *et al*, 2013). Además, esta fosforilación aumenta en células en alta proliferación durante la embriogénesis somática de maíz (Garrocho-Villegas *et al*, 2013).

Complejos TORC1 y TORC2 en células animales, composición, principales funciones y conservación en plantas

En mamíferos, TOR forma dos complejos proteicos denominados TORC1 y TORC2 (Wullschleger *et al*, 2006). El primero está constituido por la cinasa TOR, la proteína LST8 y RAPTOR (*regulatory associated protein of TOR*). LST8 se asocia al dominio cinasa (Figura 1b-c) y contribuye a la organización del sitio activo y la regulación de la interacción con sustratos (Yang *et al*, 2013). RAPTOR participa en el reconocimiento de sustratos a través del reconocimiento del motivo TOS (*TOR signaling*) (Schalm & Blenis, 2002), además, juega un papel importante en el reclutamiento de TORC1 al lisosoma, donde se produce su activación. El complejo TORC1 activo estimula el crecimiento celular, la biogénesis de ribosomas y el inicio de la traducción e inhibe la autofagia (Figura 11a). El complejo TORC2 contiene en lugar de RAPTOR a la proteína RICTOR (*rapamycin insensitive companion of TOR*). Aunque ambos complejos contienen a la cinasa TOR, solo el complejo TORC1 es sensible a la rapamicina (Sarbasov *et al*, 2004) lo cual ha limitado el estudio de las funciones específicas del complejo TORC2. Sin embargo, se conoce que este complejo está relacionado con el control de la organización del citoesqueleto de

actina, el crecimiento polarizado de la célula y el metabolismo de la glucosa (Luo *et al*, 2018).

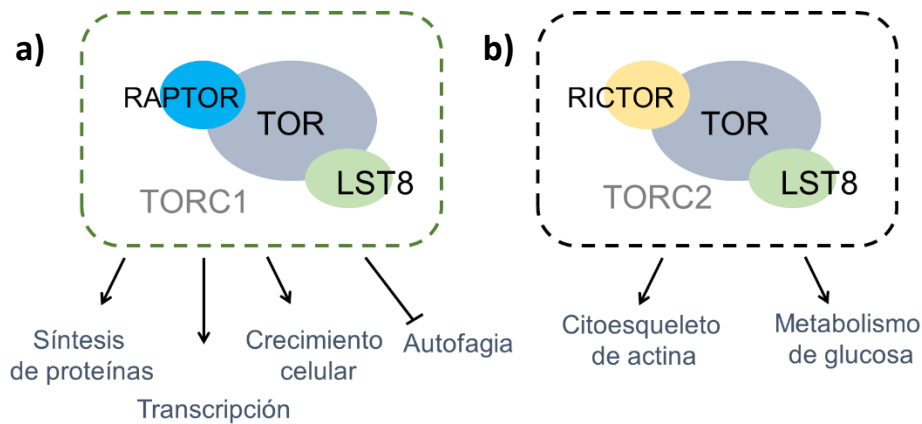


Figura II Complejos TORC en células de animales y sus principales funciones. TOR forma dos complejos con proteínas que regulan la actividad del complejo y el reclutamiento de sustratos. LST8 es importante para la conformación del sitio activo y la regulación de la entrada de sustratos. RAPTOR y RICTOR confieren diferente especificidad a los complejos 1 y 2, respectivamente. TORC1 se conserva en plantas en donde también activa procesos anabólicos e inhibe la autofagia. TORC2 es insensible a la rapamicina y es importante para el crecimiento polarizado de la célula a través de la regulación del citoesqueleto de actina, también participa en el metabolismo de la glucosa.

En las plantas sólo se ha descrito un complejo homólogo a TORC1. Al igual que en mamíferos, la proteína TOR de *Arabidopsis thaliana* está codificada en un único gen. RAPTOR es codificada por dos genes denominados *AtRaptor1B* y *AtRaptor1A* de expresión ubicua. *AtRaptor1A* tiene una baja expresión en todos los órganos de la planta comparado con su homólogo (Anderson *et al*, 2005). En el caso de LST8 de *A. thaliana* también está codificada por dos genes denominados *Ist8-1* y *Ist8-2*, pero solo se ha encontrado que se expresa *Ist8-1* (Moreau *et al*, 2012). Interesantemente, en plantas no se han identificado homólogos de RICTOR por lo que no hay evidencias de que exista un complejo similar a TORC2. Sin embargo, podrían existir otros interactores específicos de plantas, que se asocian a TOR con funciones regulatorias de su actividad o especificidad.

Vía de señalización río arriba de TOR en mamíferos y *Arabidopsis thaliana*

La proteína cinasa TOR percibe la disponibilidad de nutrientes, energía y condiciones de estrés en células eucariontes. Los primeros estudios de la vía de señalización de TOR se realizaron en mamíferos y levaduras, donde se demostró que los factores de crecimiento, hormonas, nutrientes y la relación ATP/ADP, son las principales señales percibidas por las vías que controlan la actividad de TOR (Martin & Hall, 2005) (Figura IIIa).

La activación de TOR ocurre a través de un entramado mecanismo de señalización que comienza en la membrana citoplasmática con la activación de receptores tirosina cinasa y la vía PI3K-Akt/PKB (Wullschleger *et al*, 2006). Los receptores activos fosforilan y activan a las proteínas PI3K. Las PI3K de clase I catalizan la formación de fosfatidilinositol-3-fosfato, fosfatidilinositol-(3,4)-bifosfato y fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfato. Estos fosfolípidos se requieren para la unión a membrana de la proteína Akt/PKB y su activación dependiente de PDK (*phosphoinositide-dependent kinase*). La disponibilidad de los fosfolípidos es controlada a través de la fosfatasa PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted in chromosome 10*) que posee actividad fosfatidilinositol-trifosfato-3-fosfatasa. Akt/PKB es fundamental para la regulación de la proliferación y supervivencia celular. Además, juega un importante papel en la activación del complejo TORC1 a través de la fosforilación e inhibición del heterodímero formado por TSC1 y TSC2 (*tuberous sclerosis complex 1/2*). Este, en condiciones no óptimas para el crecimiento celular, promueve la actividad GTPasa de RHEB (*Ras homolog enhanced in brain*), inactivándola. RHEB es uno de los principales activadores de TORC1 a través de su unión directamente al dominio cinasa y el desplazamiento de inhibidores del complejo.

En condiciones de déficit energético, TSC1/2 es activado de manera directa a través de la fosforilación mediada por la proteína AMPK (*AMP activated protein kinase*). La proteína AMPK fosforila directamente a RAPTOR, inhibiendo la actividad de TORC1. La disponibilidad de aminoácidos también juega un papel importante en el control de TORC1. En condiciones de alta disponibilidad de aminoácidos como la

leucina, se produce el reclutamiento de TORC1 a la membrana del lisosoma a través de complejos proteicos formados por GTPasa de la familia Rag que se unen a RAPTOR (Dobrenel *et al*, 2016). El complejo TORC1 unido al lisosoma es activado a través de RHEB y por la unión al dominio FRB de ácido fosfatídico producido de manera localizada por la proteína PLD (*phospholipase D*).

Los mecanismos de regulación de TORC2 han sido menos estudiados, pero se conoce que también responde a insulina y factores de crecimiento a través de la producción de PI3P por PI3K. Además, su asociación a la membrana citoplasmática y a ribosomas es importante para su actividad sobre sustratos. Otro punto importante en su regulación es el ensamblaje del complejo que se controla a través de modificaciones postraduccionales de RICTOR y LST8. Recientemente se encontró que la interacción del complejo con pequeñas GTPasas distintas a RHEB promueven su actividad en respuesta a glucosa en levaduras (Luo *et al*, 2018).

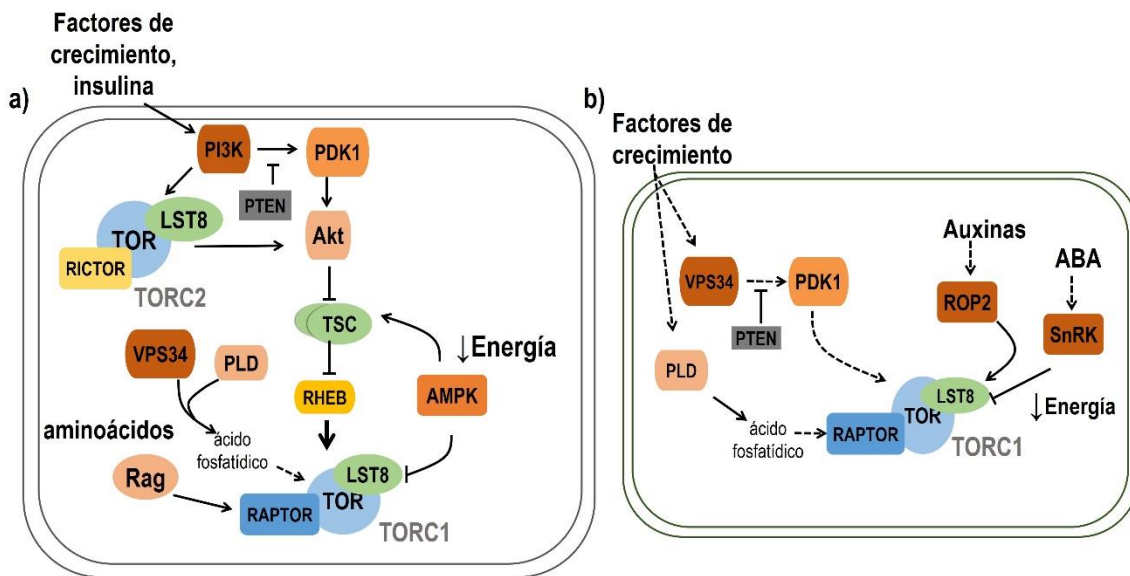


Figura III. Vías de señalización de TOR y principales procesos que regula en mamíferos y plantas. a) Cascada de señalización de la vía TOR en animales, procesos regulados por los complejos TORC1 y TORC2. Los factores de crecimiento y la insulina promueven la actividad de ambos complejos a través de la ruta PI3K. La disponibilidad de energía en la célula impacta en la actividad de TORC1 a través de la proteína AMPK. Las proteínas TSC y RHEB participan en la regulación de TOR en respuesta a factores de crecimiento, aminoácidos y disponibilidad de energía. Vps34 y las GTPasas Rag participan en la activación de TOR en respuesta a aminoácidos. **b)** Vía de señalización propuesta para

el complejo TORC de plantas. Los factores de crecimiento estimulan la actividad de la proteína TOR a través de Vps34, PDK y PLD. Condiciones de estrés o déficit energético conllevan a la inhibición del complejo mediada por SnRK. Las auxinas estimulan la actividad de TOR a través de las GTPasas ROP. Las líneas punteadas indican conexiones no comprobadas de manera directa. Figura modificada a partir de (Rexin *et al*, 2015).

En el caso de las plantas, el complejo homólogo a TORC1 también responde a la disponibilidad de nutrientes y energía en la célula, pero se conoce mucho menos sobre las vías de señalización que regulan su actividad (Figura IIIb). La ruta que se propone se basa parcialmente en relaciones hipotéticas entre proteínas de acuerdo con su conservación al compararlas con animales (Rexin *et al*, 2015). Sin embargo, algunos de los componentes principales de la vía en animales no tienen homólogos cercanos en las plantas. Por ejemplo, no se han identificado receptores tirosina-cinasa ni proteínas PI3K de clase I. En cambio, se sugirió un vínculo entre la proteína PI3K de clase III denominada Vps34 (*vacuolar sorting protein 34*) y la vía TOR. Vps34 cataliza la producción de fosfatidil inositol-3- fosfato y está relacionada con la tolerancia al estrés y el tráfico vesicular (Lee *et al*, 2010). El homólogo de esta proteína en animales participa en la regulación de TOR en respuesta a nutrientes, promoviendo la producción de ácido fosfatídico por PLD (Backer, 2008). Aunque el papel de los fosfolípidos en la activación de TOR no se ha comprobado en plantas, se reportó una relación entre la producción de ácido fosfatídico y TOR durante la respuesta a estrés abiótico. Esto sugirió que Vps34 podría participar en la señalización de entrada hacia TOR en condiciones particulares. Por otro lado, se planteó que la proteína PDK de plantas contribuye a la activación de TOR en respuesta a factores de crecimiento (Rexin *et al*, 2015).

La proteína SnRK1 (*Snf1 related kinase*), homóloga de la AMPK de animales, es un importante regulador del uso de energía en la célula, que impacta en la actividad de TOR. Dado que en plantas no existen homólogos de las proteínas TSC1/2, el vínculo entre ambas vías es directo. En respuesta a la acumulación de ácido abscísico (ABA), una fitohormona que aumenta en condiciones de estrés como déficit de agua, se produce la fosforilación de RAPTOR mediada por SnRK-1 disminuyendo la actividad del complejo TOR (Wang *et al*, 2018).

Por otro lado, también se ha descrito la relación entre TOR y la señalización por fitohormonas. En particular, se comprobó que las auxinas, hormonas que estimulan la proliferación celular, promueven la activación de TORC en plántulas de *A. thaliana* y ejes embrionarios de maíz (Schepetilnikov *et al*, 2013; Beltrán-Peña *et al*, 2002). Las auxinas activan a TOR a través de controlar a las GTPasas ROP (Proteínas similares a Rho). La más estudiada de estas es ROP2 de *Arabidopsis thaliana*, la cual puede unirse a TOR en su forma libre de nucleótidos, pero al igual que RHEB, se requiere en su forma activa, unida a GTP, para la activación de TOR (Schepetilnikov *et al*, 2017). Se plantea que estas GTPasas ejercen una función similar a RHEB, interaccionando con TOR y favoreciendo su reclutamiento a endosomas, donde ocurre su activación.

TOR participa en la regulación del desarrollo y crecimiento de las plantas

Estudios pioneros demostraron que TOR es esencial para el desarrollo embrionario en *A. thaliana* (Menand *et al*, 2002) (Figura IVa). Existe una amplia colección de mutantes de *tor* (mutantes de pérdida de función por inserción de un T-DNA) que producen semillas arrestadas durante las primeras 16-32 divisiones celulares del embrión (Ren *et al*, 2011). Interesantemente, la mutante de *Ist8-1* produce embriones, pero presenta afectaciones durante el desarrollo embrionario (Moreau *et al*, 2012). La doble mutante *raptor-A/B* (mutante de pérdida de función por inserción de T-DNA) también produce embriones, pero no mantienen el crecimiento derivado de la activación de meristemas (Anderson *et al*, 2005). Dado que no se ha encontrado expresión de *Ist8-2*, se sugirió que TOR podría actuar de manera independiente del complejo durante el desarrollo del embrión (Shi *et al*, 2018).

Para estudiar la función de TOR durante etapas posteriores al desarrollo embrionario en *Arabidopsis thaliana*, se han utilizado diferentes acercamientos ya que esta planta presenta una baja sensibilidad a la rapamicina. Por ejemplo, se han utilizado plantas RNAi de *tor* constitutivas o inducibles, en las cuales disminuye la expresión de *tor* pero no se abate totalmente la actividad de la vía (Deprost *et al*, 2007). Además, dado que las mutaciones de *Ist8-1* y *raptor1B* no son letales, se han

comparado los fenotipos de estas con los que aparecen cuando se afecta TOR. También se han utilizado inhibidores ATP-competitivos de la actividad cinasa de TOR tales como AZD-8055 y Torin-1 (Montané & Menand, 2013). De esta manera se encontró que la afectación de TORC retrasa la aparición de hojas, la floración y senescencia de la planta (Ren *et al*, 2012; Anderson *et al*, 2005; Moreau *et al*, 2012) (Figura IVb).

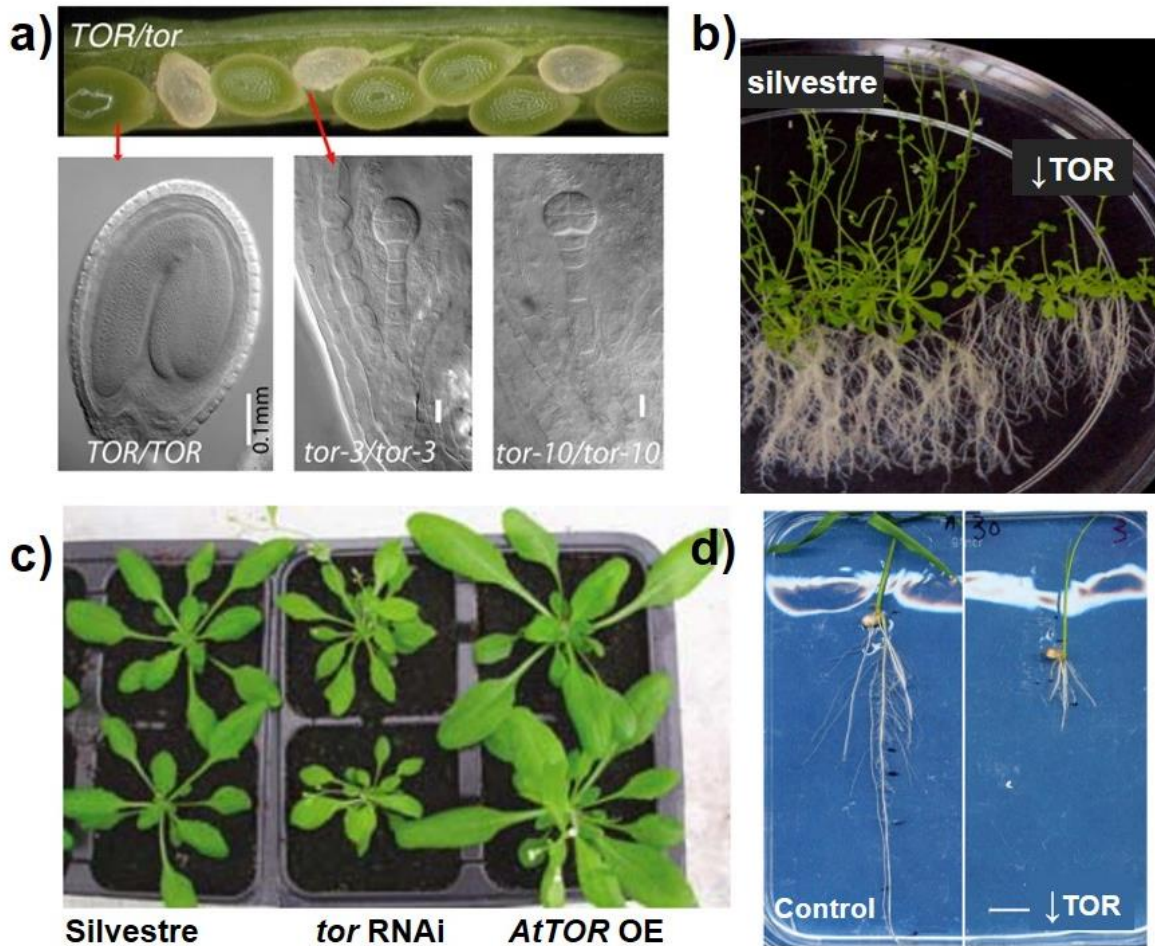


Figura IV. Control del crecimiento y desarrollo mediado por TOR en *Arabidopsis thaliana*. a) La mutación homocigota de *tor* genera semillas inviables en las que se produce el arresto del crecimiento embrionario. *tor-3* y *tor-10*: mutante por inserción de T-DNA en el dominio HEAT y dominio cinasa, respectivamente (tomado de Ren *et al*, 2011). b) La inhibición de TOR en plantas retrasa la floración y senescencia (tomado de Ren *et al*, 2012). c) El crecimiento de órganos aéreos correlaciona con los niveles de *tor*, en las mutantes silenciadas RNAi de *tor* y en la línea de plantas que sobreexpresan *AtTOR* (*AtTOR:OE*), (tomado de Deprost *et al*, 2007). d) La inhibición de TOR con AZD-8055 afecta el

crecimiento de plántulas de arroz, cuando este se aplica después de la germinación (tomado de Montané & Menand, 2013).

Además, TOR se expresa preferencialmente en células en proliferación y es esencial para el crecimiento de órganos aéreos y la raíz (Figura IVc-d). Durante las primeras etapas de desarrollo, TOR se requiere para la activación del meristemo radicular y el meristemo del brote en respuesta a azúcares y auxinas (Xiong *et al*, 2013; Li *et al*, 2017). TOR estimula la división celular en la raíz de *A. thaliana* y maíz (Díaz-Granados *et al*, 2020; Montané & Menand, 2013) y es importante para la elongación de pelos radiculares (Ren *et al*, 2012). Entre los blancos de TOR involucrados en el control del crecimiento en respuesta a glucosa se identificaron genes relacionados con la síntesis de DNA y el ciclo celular, la síntesis de RNA y su procesamiento, la regulación de la transcripción y la síntesis y degradación de proteínas. En particular, se describió que TOR fosforila y activa al factor transcripcional E2F que participa en la transcripción de genes de fase S del ciclo celular tales como la maquinaria de replicación (Xiong *et al*, 2013).

La vía también es importante durante etapas posteriores del desarrollo, cuando el crecimiento depende de la nutrición autotrófica (Deprost *et al*, 2007; Caldana *et al*, 2013). En plántulas de *A. thaliana* de 14 días, la inhibición prolongada de TOR disminuye el tamaño de la planta. En los primeros tres días de inhibición se detectó un reajuste metabólico que condujo a la acumulación de metabolitos de reserva como el almidón, denotando un cambio en el uso de nutrientes para el crecimiento de la planta. Además, se observó un incremento en las concentraciones de aminoácidos, lo cual podría estar relacionado con la inhibición de procesos anabólicos como la síntesis de proteínas (Caldana *et al*, 2013). El crecimiento de las hojas también depende de TOR, se encontró que existe una correlación entre los niveles de expresión de TOR y el crecimiento de la roseta en planta adulta (Figura IVc) (Deprost *et al*, 2007).

La vía también regula el crecimiento en plantas monocotiledóneas de interés agronómico como el arroz. En este caso no se han reportado mutantes de pérdida de función de genes de la vía, por lo que se utilizó el inhibidor AZD-8055 (Figura

IVd). Mediante su aplicación a semillas de arroz después de la germinación, se demostró que TOR se requiere para el crecimiento de la raíz y de la parte aérea de la planta (Montané & Menand, 2013). En plantas de arroz sobreexpresoras de AtTOR se observaron hojas y panículas más grandes y mayor cantidad de tallos (Bakshi *et al*, 2017). Además, durante la germinación y establecimiento de plántula de maíz, la insulina o un factor de maíz similar a insulina (ZmIGF) inducen la actividad de TOR y el crecimiento (García Flores *et al*, 2001).

Breve descripción del mecanismo de traducción y su regulación mediada por TOR

La síntesis de proteínas es uno de los principales procesos controlados por la vía TOR en eucariontes (Fonseca *et al*, 2016). Por eso a continuación se describe brevemente la traducción de transcritos a proteína. El proceso de traducción se divide en cuatro fases principales: inicio, elongación, terminación y reciclaje. Durante el inicio de la traducción se produce el reclutamiento del mRNA por la maquinaria de traducción y el reconocimiento del codón de inicio. El 95% de la síntesis de proteínas en eucariontes se produce a través de la unión del factor de inicio 4E (eIF4E) a la estructura 7-metil guanosina trifosfato en el extremo 5' del mensajero (Silva & Dinkova, 2010). El factor eIF4E se une a otras proteínas formando el complejo eIF4F que recluta a la subunidad 40S del ribosoma. Posteriormente, la maquinaria traduccional recorre la 5'UTR del mensajero hasta que se produce el reconocimiento del codón de inicio en el contexto correcto. En este momento se asocia la subunidad 60S para formar el ribosoma 80S y se liberan la mayoría de los factores de inicio. Después se produce la elongación o síntesis del péptido correspondiente. Cuando el ribosoma alcanza el codón de paro se produce la terminación, primeramente, el péptido se separa del ribosoma en un mecanismo mediado por factores de liberación. Luego el último tRNA que fue utilizado y el ribosoma se separan del mensajero y la subunidad 40S se recicla para otro evento de inicio de traducción (Jackson *et al*, 2010).

En animales y levadura la activación del complejo TORC1 estimula la biogénesis de ribosomas y el inicio de la traducción. Uno de los blancos más

importantes de TOR en el proceso de traducción es la proteína S6K (cinasa de la proteína ribosomal S6). S6K fosforila a la proteína ribosomal S6 que a su vez promueve la transcripción de genes requeridos para la producción de ribosomas. S6K también regula el inicio de la traducción a través de la fosforilación de los factores de inicio de la traducción eIF4B y eIF3 involucrados en el escrutinio de la región 5'UTR de los RNA mensajeros y en la asociación al RNA de la subunidad pequeña del ribosoma, respectivamente (Ma & Blenis, 2009). TOR regula el inicio de la traducción de manera directa a través de la fosforilación de las proteínas 4EBP (proteínas de unión al factor eIF4E) en múltiples sitios. Las proteínas 4E-BP fosforiladas se separan de eIF4E permitiendo que este se asocie con el factor eIF4G y se forme el complejo eIF4F para el inicio eficiente de la traducción (Jackson *et al*, 2010).

En plantas se conservan algunas de las principales funciones de TORC para el control de la síntesis de proteínas tales como la biogénesis de ribosomas (Figura V). AtTOR está relacionado con la producción de RNA ribosomales. La proteína contiene una secuencia de localización nuclear en el dominio cinasa, que lo dirige al núcleo. Allí se une al promotor de genes ribosomales 45S a través de una secuencia de unión a DNA ubicada en el dominio HEAT del extremo amino. A partir del procesamiento del precursor 45S se obtienen los RNA ribosomales 18S y 5.8S, que forma parte de la subunidad pequeña del ribosoma, y 25S, de la subunidad grande. En correspondencia, se encontraron mayor niveles de estos RNA ribosomales en plantas sobreexpresoras de TOR y una reducción en mutantes de *tor* (Ren *et al*, 2011).

El eje S6K/S6 también participa en la biogénesis de ribosomas en *Arabidopsis thaliana*. Cuando la vía TOR está inactiva, S6 se encuentra preferentemente desfosforilada y se une al promotor del precursor de RNA ribosomal 45S, inhibiendo su transcripción a través de la interacción con la histona desacetilasa 2B (HD2B) (Kim *et al*, 2014). Se propuso que, en condiciones de activación de la vía, la fosforilación de S6 mediada por S6K inhibe la unión de HD2B al promotor de la unidad transcripcional 45S, liberándolo de su inactivación.

Además, la vía TOR estimula la producción de proteínas ribosomales en *A. thaliana* y maíz (Dobrenel *et al*, 2016; Villa-Hernández *et al*, 2013).

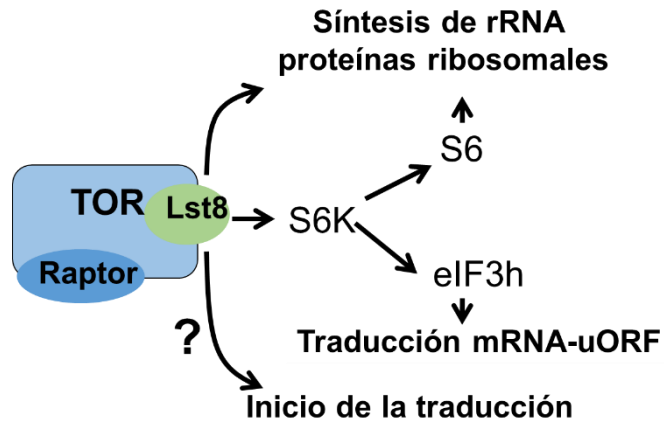


Figura V. Control traduccional mediado por la ruta TOR en plantas. La vía TOR se requiere para la biogénesis ribosomal y la traducción de mensajeros que contienen uORF. Los principales blancos de la vía involucrados en la regulación de la síntesis de proteínas son la proteína ribosomal S6 relacionada con la transcripción de RNAs ribosomales, la S6K (cinasa de S6) que está involucrada en la producción de proteínas ribosomales y el factor de inicio de la traducción eIF3h que, junto a S6K, participa en la traducción de mensajeros que contienen uORFs.

En cuanto a la regulación del inicio de la traducción, en plantas no se ha descrito un vínculo tan fuerte con la vía TOR. Esto podría deberse a la ausencia de homólogos de las proteínas 4E-BP, uno de sus principales blancos en este proceso para animales. Sin embargo, se han descrito mecanismos novedosos de regulación mediada por TOR que impactan en la traducción de mRNA que contienen uORF (marco abierto de lectura río arriba del ORF principal), para los que se requiere el factor traduccional eIF3h (Schepetilnikov *et al*, 2013).

TOR en la regulación de la traducción de RNA mensajeros que contienen uORF en plantas

Como parte de los mecanismo novedosos de control traduccional mediados por TOR en plantas, se demostró que participa en la traducción de mensajeros que contienen uORF en *A. thaliana* (Schepetilnikov *et al*, 2013, 2017). Los uORF son

marcos abiertos de lectura que se ubican en la región 5'UTR río arriba del ORF principal que codifica la proteína de interés (Hellens *et al*, 2016). Los uORF reducen la eficiencia de traducción del ORF principal (mORF) de los transcritos que los portan, dado que generalmente los ribosomas se separan del mRNA una vez terminada la traducción del uORF (Figura VI). Los mensajeros que contienen uORF están enriquecidos en secuencias codificantes para factores transcripcionales, proteínas cinasas y señalizadoras con un fuerte impacto en el control del crecimiento y desarrollo (Morris & Geballe, 2000).

Cuando la maquinaria traduccional alcanza el AUG de un uORF (uAUG) puede no reconocerlo dado que generalmente se encuentran en un contexto subóptimo para el inicio de la traducción. Por ejemplo, pueden no presentar una secuencia Kozac canónica (purina en la posición -3 y guanina en la posición +4: **A/G..AUGG**). Al proceso de “ignorar” el uAUG se le denomina *leaky scanning*, donde el ribosoma continúa el escrutinio hasta el reconocimiento del AUG principal. Si por el contrario, se produce el reconocimiento del uORF, pueden ocurrir varios eventos que afectan el inicio de la traducción del ORF principal (Figura VI). En unos casos, el péptido codificado en el uORF impide que el ribosoma se libere del mRNA una vez que se reconoce el codón de paro, bloqueando el avance de la maquinaria traduccional unida a la región río arriba del mensajero. Este proceso se denomina estancamiento o *stall* del ribosoma). Por otro lado, la producción de péptidos a partir del uORF puede afectar la estabilidad de los transcritos por la vía NMD (*Nonsense-Mediated Decay*) que es sensible a codones de paro prematuros. En otro caso, el ribosoma puede separarse del mRNA después de traducir el uORF en un evento de terminación (salida). Por último, se hipotetiza que la subunidad 40S puede continuar unida al mensajero y reanudar el escrutinio de la región UTR hasta reconocer el AUG principal, esto último se conoce como reinicio de la traducción (von Arnim *et al*, 2014; Hellens *et al*, 2016).

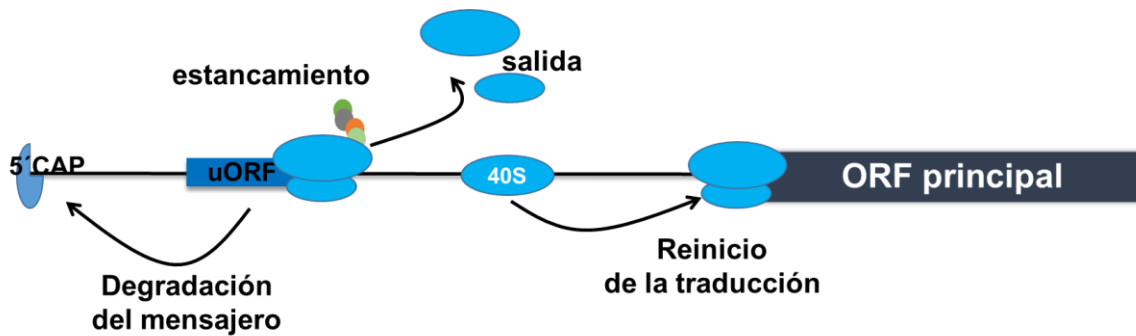


Figura VI. Destinos del ribosoma después de la traducción de un uORF. Representación esquemática de un mensajero que contiene un uORF en la 5'UTR y eventos que pueden producirse cuando se reconoce uno o más uORF. La producción del péptido codificado en el uORF puede provocar el estancamiento del ribosoma cerca del codón de paro del uORF o propiciar la desestabilización del mensajero. También se puede producir una terminación canónica en el uORF en la cual el ribosoma se separa del mensajero. Si por el contrario, la subunidad 40S se mantiene asociada al mRNA, se puede dar el reinicio de la traducción en el AUG del ORF principal.

Conceptualmente, un evento de reinicio de la traducción se produce después de una terminación incompleta en el uORF de manera que la subunidad 40S se mantiene unida al mRNA y continúa el escrutinio río abajo del mensajero hasta el AUG principal (von Arnim *et al*, 2014). En este caso la eficiencia del inicio de la traducción del ORF principal depende de la disponibilidad de factores de inicio de la traducción y de la longitud y secuencia de la región intercistronica. No se conoce con exactitud cómo se produce el reinicio de la traducción en este tipo de transcritos, pero se plantea que ciertos factores de traducción pueden persistir unidos al ribosoma después de un evento corto de la elongación y contribuir a un nuevo evento de inicio. Estos factores se han denominado RPF (*reinitiation promoting factors*) e incluyen al factor eIF3 y el complejo eIF4F (Morris & Geballe, 2000; Pöyry *et al*, 2004).

La regulación mediada por uORF puede deberse a su sola presencia o puede depender de la secuencia del péptido codificado en el uORF. En este último caso se denominan CPuORF (*conserved peptide uORF*) y codifican péptidos conservados en diferentes especies. Los CPuORF están relacionadas con el control de vías metabólicas en respuesta a los niveles de metabolitos en la célula, tales

como azúcares y poliaminas. En este caso, se planteó que el péptido nascente interactúa con un metabolito en el túnel de salida del ribosoma impidiendo la elongación y desacoplando la maquinaria traduccional (Horst *et al*, 2020).

En las plantas existe evidencia de control traduccional mediado por uORF. Mediante herramientas bioinformáticas se estimó que el 30% de los transcritos de *A. thaliana* contienen uORF (von Arnim *et al*, 2014), pero hasta el momento, solo se ha identificado un factor traduccional involucrado en el reinicio de la traducción. Este factor es el eIF3, que está involucrado en el cargado de la subunidad 40S al mensajero a través de su interacción con la proteína de andamiaje eIF4G que forma parte del complejo eIF4F. En plantas mutantes para la subunidad h de eIF3, se afecta de manera específica el reclutamiento a polisomas de transcritos que contienen uORF (Kim *et al*, 2007).

La vía TOR es muy importante para la traducción de transcritos que contienen uORF en *A. thaliana*. En un estudio del año 2013 se demostró que las auxinas promueven la activación de TOR, favoreciendo la traducción de mRNA de factores de respuesta a auxinas (ARF) que contienen uORF y de un factor transcripcional de respuesta a sacarosa denominada bZIP11 (Schepetilnikov *et al*, 2013). La mutación de los uORF de uno de los ARF demostró que tienen funciones inhibitorias para la traducción del ORF principal, y que su inhibición es aliviada en condiciones de estimulación de TOR. Se propuso que TOR activa mantiene el estado fosforilado de sus blancos en complejos traduccionales que están involucrados en el reinicio de la traducción (Figura VII). Se describió que TOR fosforila y activa a la proteína S6K unida al ribosoma a través de su interacción con el factor eIF3. A su vez, S6K fosforila a eIF3 en la subunidad h, haciéndolo competente para el reinicio (Figura VII) (Schepetilnikov *et al*, 2013).

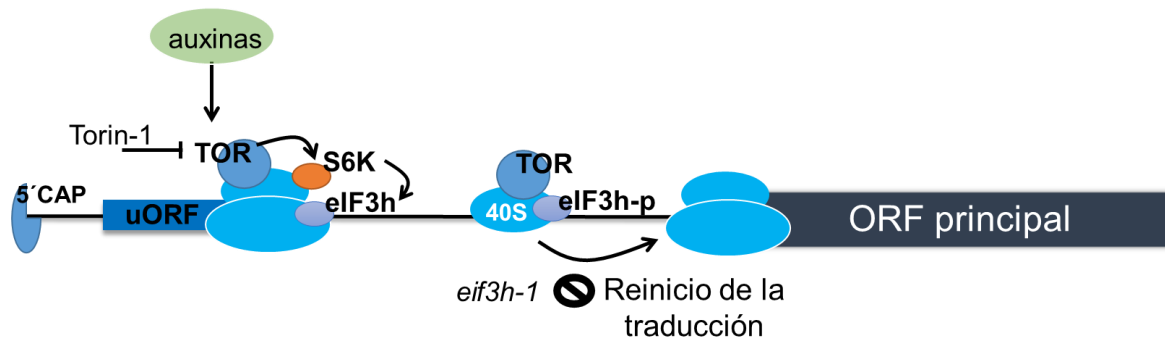


Figura VII. Reinicio de la traducción mediado por TOR en *A. thaliana*. Las auxinas activan a la proteína TOR estimulando la fosforilación de sus blancos en los complejos traduccionales. TOR fosforila a S6K y esta a su vez al factor eIF3h lo cual propicia el reinicio de la traducción en el AUG principal. Este proceso se afecta en condiciones de inhibición de TOR con el inhibidor ATP-competitivo Torin-1 y en mutantes de eIF3h (*eif3h-1*) (modificado de Schepetilnikov & Ryabova, 2018).

Aunque no se conoce el mecanismo de acción del factor eIF3 durante el reinicio de la traducción, se propuso que cuando es fosforilado, este se mantiene unido al ribosoma después de la terminación en el uORF, promoviendo: a) que se mantenga la asociación de la subunidad 40S con el mRNA y el escrutinio del resto de la 5'UTR, b) la unión del complejo ternario, el reconocimiento del codón de inicio y el reclutamiento de la subunidad 60S. eIF3h es imprescindible para el reinicio de la traducción, como se demostró mediante el uso de la mutante *eif3h-1*, pero pudieran existir otros blancos de la vía TOR en los complejos ribonucleoproteicos involucrados en este proceso, tales como los factores que componen el complejo eIF4F.

Regulación traduccional y antecedentes de la vía TOR durante la germinación en maíz

La germinación es una etapa fundamental en el desarrollo de las plantas durante la cual se produce la reactivación del metabolismo permitiendo el crecimiento celular y la protrusión de la radícula (Bewley, 1997). La regulación de la síntesis de proteínas es importante desde las primeras horas de imbibición. Primero, se sintetizan proteínas utilizando componentes de la maquinaria traduccional y los mensajeros almacenados en la semilla seca. Posteriormente, se utilizan transcritos sintetizados *de novo* y se induce la producción de ribosomas para las etapas

posteriores de crecimiento. La maquinaria traduccional también contribuye a la selectividad en la expresión de las proteínas que se requieren en cada etapa de la germinación de maíz. Por ejemplo, el factor de inicio de la traducción de unión al 5´CAP eIF(iso)4E es más abundante en el eje embrionario seco y se requiere de manera particular para la traducción de mensajeros almacenados. La isoforma eIF4E aumenta en las últimas etapas de la germinación y no es capaz de suplir la función de eIF(iso)4E en las primeras horas de la germinación (Dinkova *et al*, 2000, 2011). Además, se ha encontrado que existen diferentes proteínas asociadas a los complejos de unión a CAP dependiendo del tiempo de imbibición (Lázaro-Mixteco & Dinkova, 2012), lo cual podría estar relacionado con la selectividad traduccional observada en diferentes etapas de la germinación.

Los primeros estudios de la vía TOR en maíz utilizaron como modelo la germinación ya que durante este proceso ocurre una importante transición fisiológica que implica la regulación de la traducción y el ciclo celular, que son eventos esenciales y funciones conservadas de TOR. De esta manera, se identificó la conservación de las proteínas TOR, S6K y S6 y se observó un incremento de la actividad de la vía concomitante con la protrusión de la radícula a las 24 horas (Reyes de la Cruz *et al*, 2004; Dinkova *et al*, 2007). La proteína TOR de maíz es de aproximadamente 277 kDa y mantiene todos los dominios característicos de las PIKK. TOR aumenta su expresión en el eje embrionario de maíz a partir de las 12 horas de imbibición (Agredano-Moreno *et al*, 2007). En el caso de S6K, se encuentra presente durante todo el proceso de germinación pero se activa principalmente a las 24 horas, donde fosforila a S6 en respuesta a insulina y al factor de crecimiento de maíz similar a insulina (ZmIGF) (Reyes de la Cruz *et al*, 2004; García Flores *et al*, 2001). En las últimas etapas de la germinación la vía está relacionada con el reclutamiento selectivo a polisomas del factor eIF(iso)4E y la proteína ribosomal S6 (Dinkova *et al*, 2007). Además, se observó que TOR es importante para la síntesis *de novo* de proteínas ribosomales en ejes de 24 horas (Villa-Hernández *et al*, 2013). Al contrario de lo que ocurre en *A. thaliana*, en maíz TOR es sensible a la rapamicina, lo que permitió establecer su función en la regulación traduccional.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La vía de la cinasa TOR tiene un fuerte impacto en el crecimiento, desarrollo y rendimiento de las plantas. Una de las principales funciones conservadas de TOR es el control de la síntesis de proteínas y la biogénesis de ribosomas. Además, se describió que TOR participa en la traducción de transcritos que contienen uORFs en *A. thaliana*. En la actualidad están empezando a descubrirse blancos novedosos de TOR que confieren a la vía características especiales que permiten a la planta la adaptación a su ambiente. Sin embargo, la mayoría de los estudios se han realizado en la planta modelo *A. thaliana* y sus funciones en plantas de interés económico se han explorado poco.

En maíz, los estudios pioneros sobre la vía TOR abordan sus funciones en las etapas iniciales de imbibición y durante la germinación. Estos trabajos demuestran la importancia de la vía TOR/S6K/S6 en la regulación traduccional y su sensibilidad a señales de crecimiento en maíz. Sin embargo, no se conoce cuál es el papel de TOR en la regulación del crecimiento en etapas posteriores de establecimiento de la plántula y cómo esta función podría relacionarse con el control traduccional de nuevos blancos de la vía. Además, en las plantas el mecanismo de señalización hacia TOR difiere con respecto a animales. Por lo tanto, es necesario identificar señales específicas que permitan entender la amplia respuesta de la vía ante las cambiantes condiciones ambientales a las que se someten los organismos vegetales.

Es por eso que en este trabajo abordamos la función de TOR en la traducción de mensajeros que contiene uORF en maíz, así como su relación con la vía metabólica de poliaminas, las cuales son importantes moléculas para el crecimiento y la señalización de estrés. Los RNA mensajeros analizados participan en la regulación del metabolismo, la proliferación celular y adaptación a estrés. Por tanto, hipotetizamos que algunas de las funciones de TOR en el crecimiento temprano de plántulas de maíz están relacionadas con el control de la expresión de mensajeros que contienen uORF.

HIPÓTESIS

La vía TOR participa en el control del crecimiento y respuesta a señales externas durante etapas posgerminativas de maíz (*Zea mays*), en parte a través de la regulación de la traducción de mRNAs que contienen uORF.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el papel de la vía TOR en la regulación traduccional y el crecimiento durante las últimas etapas de la germinación y las primeras etapas de establecimiento de la plántula en maíz.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la actividad de TOR en el modelo de germinación-posgerminación y su efecto en el crecimiento de ejes embrionarios y plántulas de maíz.
- Identificar mRNA candidatos a ser regulados por la vía TOR mediante análisis *in silico* de su región 5'UTR en cuanto a la presencia de uORF conservados con respecto a sus ortólogos en *A. thaliana* y de sus patrones de expresión reportados en estudios globales durante la germinación y establecimiento de plántula maíz.
- Abordar la relevancia de TOR en la regulación de la expresión de mRNA relacionados con el control metabólico, la síntesis de proteínas y adaptación a estrés, previamente identificados en el análisis *in silico*.
- Evaluar la actividad traduccional general en condiciones contrastantes de la actividad de TOR a través de perfiles polisomales.
- Evaluar el papel de la vía TOR en la respuesta a estímulos de moléculas señalizadoras y reguladoras del crecimiento como las poliaminas, así como su relación con el control traduccional de enzimas de la ruta metabólica de poliaminas

II. METODOLOGÍA

Material biológico, condiciones de germinación y crecimiento de plántula

Se utilizaron semillas de maíz (*Zea mays*) de la variedad mexicana Chalqueño obtenidas de la cosecha de la primavera de 2017 y 2018, en Valle de Chalco, Estado de México. Para la germinación y crecimiento de plántula, las semillas secas (0 horas) se colocaron en algodón con agua, en una charola horizontal, durante 24-48 horas en oscuridad a $26 \pm 2^\circ\text{C}$.

Para evaluar la actividad de la vía TOR durante la germinación y el establecimiento de plántula se extrajeron proteínas totales a partir de ejes embrionarios de 0 horas (semilla seca), 24 horas (germinación) y 48 horas (establecimiento de plántula temprano). El tejido se utilizó completo o la raíz de ejes de 24 y 48 horas de imbibición (aproximadamente 1 cm desde la punta de la raíz de 48 horas).

Tratamiento con AZD-8055 y Espermidina para evaluar sus efectos en el crecimiento temprano de plántula

Para evaluar el efecto del inhibidor AZD8055 en el crecimiento, se obtuvieron semillas germinadas de 24 horas y se aislaron los ejes embrionarios. Estos se colocaron en caja Petri con algodón humedecido con medio Murashige y Skoog 0.5X (Murashige T, Skoog F, 1962) que contenía 0 (control), 5, 10, 20 μM de AZD-8055 disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO), en oscuridad durante 72 horas a $26 \pm 2^\circ\text{C}$. El control contenía el mismo volumen de DMSO, solvente, que el tratamiento con mayor cantidad de AZD-8055. Al finalizar el experimento se midió la longitud de la raíz primaria utilizando el *software* Image J, en tres experimentos independientes ($n=20$). En otro esquema experimental, se colocaron semillas secas envueltas en papel y en presencia de 50 μM del inhibidor o agua (control) en cilindro vertical, durante 48 horas en fotoperiodo largo (16 horas de luz/ 8 horas de oscuridad) a $26 \pm 2^\circ\text{C}$. En este caso se aumentó la concentración del inhibidor dado que se utilizaron semillas completas que presentan la barrera del endospermo para la entrada del inhibidor.

Para evaluar el efecto de la poliamina espermidina (Spd) en el crecimiento, así como su conexión con la vía TOR, las semillas se colocaron en cilindro vertical en presencia de 0.1 mM Spd, 50 μ M AZD-8055 o el doble tratamiento (Spd/AZD) durante 48-72 horas, en fotoperiodo largo a $26 \pm 2^\circ\text{C}$. Al finalizar el experimento, se midió la longitud de la raíz primaria utilizando el *software* Image J, en tres experimentos independientes para 48 horas de tratamiento y dos réplicas para 72 horas (al menos 10 ejes por experimento).

Tratamientos con AZD-8055 y Espermidina para evaluar la actividad de la vía TOR en ejes embrionarios de maíz

Para analizar el efecto de diferentes concentraciones de AZD-8055 en la actividad de la vía TOR durante las primeras etapas de establecimiento de la plántula, se aislaron proteínas totales a partir de ejes que se extrajeron de semillas imbibidas por 45 horas y fueron incubados durante 3 horas en presencia de 0 μ M, 1 μ M, 5 μ M o 20 μ M de AZD-8055, para un total de 48 horas de imbibición.

Para evaluar la actividad de la vía en presencia de espermidina y AZD-8055 durante el establecimiento temprano de plántula, se seleccionaron semillas germinadas de 24 horas de imbibición en oscuridad y se colocaron en cilindro vertical en presencia de 0.2 mM Spd, 50 μ M AZD-8055, o la combinación AZD/Spd, así como un tratamiento control (agua), durante 24 horas adicionales bajo fotoperiodo largo a $26 \pm 2^\circ\text{C}$.

Aislamiento de proteínas

Se aislaron proteínas totales a partir de 0.5 g de ejes embrionarios o punta de la raíz. El tejido se homogenizó con un Polytron en amortiguador de extracción. Posteriormente se centrifugó a 17000 x g durante 40 minutos a 4°C y se separó el sobrenadante que contenía las proteínas. Se realizó la cuantificación de las muestras utilizando el método de Bradford (Biorad) en un espectrofotómetro BIOMATE 3 (ThermoScientific). Las concentraciones de proteína se obtuvieron interpolando el valor de absorbancia de la muestra a 595 nm en una curva patrón con diferentes concentraciones de albúmina sérica bovina (BSA). La integridad de

las proteínas se verificó en gel desnaturizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% utilizando la tinción con Coomassie Coloidal G-250 para la visualización.

- **Amortiguador de extracción de proteínas**

 - 50 mM HEPES pH 7.6

 - 4 mM EDTA

 - 20 mM EGTA

 - 20 mM manitol

 - 0.2 mM PMSF

 - 1X *Halt Phosphatase Inhibitor Cocktail* (100X) (Thermo Fisher Scientific)

 - 1 tableta de inhibidores de proteasas *Complete TM* (Roche Diagnostics) por cada 50 mL de amortiguador

Separación de proteínas mediante SDS-PAGE

Las proteínas se sometieron a electroforesis vertical y se separaron en geles de poliacrilamida al 8%, para la posterior inmunodetección tipo western de la proteína TOR y al 12.5%, para la posterior inmunodetección tipo western de las proteínas S6 y S6K. La muestra de proteínas se preparó con amortiguador de carga 1X y se desnaturizó a 100°C durante 5 minutos. En cada pozo se aplicaron 40 µg de proteínas totales, para la detección de la proteína S6 o 100 µg de proteínas totales para la detección de S6K y TOR. La corrida se realizó a 100V durante aproximadamente 2 horas y 30 minutos en amortiguador de corrida 1X o hasta salida del frente de corrida.

- **Amortiguador de carga 5X**

 - Tris 240mM pH 6.8

 - 0.8% (m/v) SDS

 - 0.08% (m/v) azul de bromofenol

 - 5% β-mercaptoetanol (se añadió antes de usar)

- **Amortiguador de corrida 10X**

 - Tris 250 mM pH 8.3

 - 14.4 % (m/v) Glicina

1% (m/v) SDS

Protocolo de inmunodetección tipo western (*Western blot*)

Las proteínas en los geles se transfirieron a membrana de Fluoruro de Polivinilideno (PDVF; Millipore), previamente activada en metanol. La membrana y los geles se colocaron en una cámara de transferencia en húmedo de Biorad, conteniendo amortiguador de transferencia 1X. La cámara se colocó en un recipiente con hielo y se realizó la transferencia a 100V durante 2 horas para las membranas de S6 y S6K. Para la proteína TOR la transferencia se realizó en el cuarto frío a 4°C durante toda la noche (15-16 horas) a 25V.

- **Amortiguador de Transferencia 1X**

- 100 mL Metanol

- 100 mL Amortiguador de corrida 10X

- *Agregar H₂O odd cbp 1L

Después de la transferencia las membranas se incubaron durante 5 minutos en amortiguador de fosfatos PBS 1X y posteriormente se realizó el bloqueo en 10 mL de solución PBS 1X/ 5% (m/v) leche (leche descremada Svelty®) en agitación suave durante 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se desechó la solución de bloqueo y se lavó la membrana con amortiguador PBS 1X durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó con el anticuerpo primario durante toda la noche en el cuarto frío a 4°C para anticuerpos policlonales o durante 3 horas a temperatura ambiente para anticuerpo monoclonal anti-TOR-P.

- **Amortiguador PBS 10X pH 7.4**

- 1.38 M NaCl

- 30 mM KCl

- 81 mM Na₂HPO₄

- 15 mM KH₂PO₄

Los anticuerpos primarios se prepararon en 10 mL de solución PBS 1X/ 5% (m/v) leche/0.1% (v/v) Tween20. Para la detección de la proteína ribosomal S6 se utilizaron anticuerpos primarios generados contra las proteínas de *Arabidopsis*

thaliana: anti-AtrpS6 dilución 1:2500, anti-AtrpS6-P(S240), dilución 1:5000 (Enganti *et al*, 2018). Para S6K total se utilizó un anticuerpo policlonal de conejo generado para un epítipo del carboxilo terminal de la proteína de maíz anti-ZmS6K dilución 1:1000. Este anticuerpo fue amablemente proporcionado por el Dr. Homero Reyes de la Cruz de la Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo. En el caso de la proteína S6K-P (T389) se utilizó el anticuerpo anti-S6KP (Cell Signaling #9205, dilución 1:1000). Para la detección de TOR-P (S2448) se utilizó un anticuerpo monoclonal conjugado a HRP (*Horseradish Peroxidase*) (Santa Cruz Biotech, SC-293133, dilución 1:200).

Después de la incubación con el anticuerpo primario, la membrana se lavó tres veces con PBS 1X/0.1% (v/v) Tween20 durante 10, 5 y 5 minutos. Posteriormente la membrana se incubó con el anticuerpo secundario (IgG anti-conejo conjugado a HRP, dilución 1:5000) preparado en solución de bloqueo, durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se retiró el anticuerpo y se realizaron tres lavados con PBS 1X/0.1% (v/v) Tween20 durante 10, 5 y 5 minutos. Las membranas se revelaron utilizando el sustrato quimioluminiscente *Luminata Classic Western HRP* (Millipore) en detector Chemidoc de Biorad.

Identificación de mensajeros que contienen uORF en maíz y análisis del 5'UTR

Primeramente se revisó la literatura en búsqueda de transcritos que contienen uORF en *A. thaliana* y cereales, incluyendo maíz, ya que esto apunta a que se conserva la funcionalidad del uORF (Tran *et al*, 2008). Dentro de estos encontramos a los mensajeros de las enzimas trehalosa-6-fosfato fosfatasa (TPP), la proteína cinasa de S6 (S6K) y la S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC). Además, se incluyeron mensajeros que se había comprobado experimentalmente que son regulados por uORF, como los de la poliamina oxidasa dependiente de FAD (PAO) y el factor de transcripción tipo zipper básico de leucina-11 (bZIP11) en *A. thaliana* (Guerrero-González *et al*, 2016; Wiese *et al*, 2004). La regulación mediada por uORF en SAMDC de *A. thaliana* también se había comprobado experimentalmente (Hanfrey *et al*, 2005).

Se revisó la base de datos eFP Browser (www.bar.utoronto.ca) de maíz para investigar si estos candidatos se reportaban expresados en las etapas de imbibición de semillas de maíz estudiadas. Los mensajeros mencionados se eligieron sobre la base de que tuvieran funciones importantes en procesos blancos de TOR de interés para este proyecto, como la regulación de la expresión genética, el metabolismo o la adaptación a estrés.

Para la identificación de los homólogos en maíz se realizó un alineamiento utilizando BLAST (Basic Local Alignment search Tool) de las secuencias de las proteínas de *A. thaliana* descargadas a partir de TAIR (The Arabidopsis Information Resources) www.arabidopsis.org con respecto a las secuencias de *Z. mays* depositadas en la base de datos Phytozome: phytozome.jgi.doe.gov (Ensembl-18). De los resultados que arrojó este alineamiento, se consideraron los candidatos con un valor $E \geq 1.0e-50$, un porcentaje de identidad $\geq 60\%$ y una cobertura de la secuencia $\geq 50\%$ con respecto a la proteína de *A. thaliana*. Posteriormente se realizó el alineamiento recíproco en el que se utilizó la secuencia de la proteína de maíz y se alineó contra la base de datos de *A. thaliana*, obteniéndose la proteína inicial de *A. thaliana* entre 1 de las dos primeras coincidencias.

Los números de acceso de los candidatos identificados en maíz, así como las secuencias de sus 5'UTR, se actualizaron de acuerdo con la última anotación del genoma en la página web MGDB v.4 (*Maize Genetic and genomic Database*) www.maizegdb.org. En la Tabla I se enumeran los candidatos seleccionados para el estudio de la regulación de su expresión mediada por TOR.

Una vez que se identificaron los homólogos putativos en maíz, se realizó la búsqueda de uORF en el 5'UTR utilizando la herramienta *ORF Finder* de *gene Infinity* (<http://www.geneinfinity.org>). Se consideraron uORF de longitud mínima 3 codones, con AUG como codón de inicio, en cualquier marco de lectura con respecto al ORF principal que codifica la proteína de interés. Esa herramienta proporcionó la secuencia del uORF, su posición y la secuencia del péptido codificado. Las longitudes de los uORF y sus péptidos se determinaron manualmente utilizando el conteo de palabras en el programa Microsoft Word.

Diseño de oligonucleótidos para transcritos candidatos a ser regulados por TOR

Los oligonucleótidos empleados como cebadores en las reacciones de PCR para evaluar los niveles de los transcritos candidatos se diseñaron a partir de la secuencia de cDNA correspondiente utilizando el programa Primer3Plus (www.primer3plus.com). Se consideraron los parámetros que dicta el programa para cebadores a utilizarse en reacciones de qPCR tiempo real, tales como presentar 50% de GC, longitud de 20-24 nucleótidos y temperatura de hibridación 60°C. Las características energéticas de los cebadores se verificaron utilizando la herramienta OligoAnalyzer 3.1 (www.idtdna.com/calc/analyze). Se tomó en cuenta que no formaran dímeros o estructuras secundarias estables. Entre los pares de cebadores que arrojó el programa se consideró que se ubicaran hacia el extremo 3' del mensajero, en aras de aumentar las posibilidades de que este se está asociando a un transcrito completo. En la Tabla I se proporcionan las secuencias de los cebadores correspondientes y el tamaño del amplicón esperado en cDNA.

Tabla I. Oligonucleótidos utilizados para la evaluación por PCR de los niveles de los transcritos. Se muestran las secuencias de los cebadores correspondientes a cada transcrito y el tamaño del producto de amplificación por PCR en cDNA. Estos candidatos se evaluaron en RNA total y/o RNA de polisomas, la actina se utilizó como control constitutivo. Los oligos para TOR, S6K y S6 fueron diseñados previamente utilizando el procedimiento mencionado (Tesis de Licenciatura Grecia Olea Badillo). FT: factor transcripcional.

Transcrito	Identificador	Par de oligos (5'→3')	Amplificación (pb)
eIF4E, Factor de inicio de la traducción 4E	Zm00001d041682; GRMZM2G002616	FW:AGATGGACAAAGGCCTGAAG RV:AACCACCCAGCATGCATTTG	100
eIFiso4E, Factor de inicio de la traducción iso4E	Zm00001d014065; GRMZM2G022019	FW:TGCTAGTGTCCGTGCAAGAG RV:CTCTGCTGGGCTTGTCTCTC	167
S6K1, proteína cinasa de S6	Zm00001d022434; GRMZM2G080001	FW:CACAAGGAACCCAACAAGCG RV:CTTGAGCCTAGAGCCGGATG	306
TPP, trehalosa-6-fosfato fosfatasa	Zm00001d017502; GRMZM2G112830	FW:TGCATGGCTGTCAAAATGCC RV:ATGAACGCTTTGTCTGGGATC	141

SAMDC, S-adenosilmetionina descarboxilasa	Zm00001d020543; GRMZM2G060369	FW:AACCGTTCAAGCCCAACAAG RV:TGTCATGCACATCTCAAGCG	89
PAO, poliamina oxidasa	Zm00001d001883; GRMZM2G078033	FW:AATTACCCGCCAGCACAATG RV:ATTACGTTGCGCCTTGAGCAC	111
bZIP11, FT de tipo zipper de leu básico-11	Zm00001d015153; GRMZM2G444748	FW:TTAGCTTGCATGCACTTCCC RV:ACACACTACCACACCACACTA G	147
TOR, cinasa Target of rapamicyn	Zm00001d037950; GRMZM2G049342	FW: GATGCAAGTCCTTCGCACAA RV:CTCTCGGTTAGCCACTGCTT	178
S6, proteína ribosomal	Zm00001d022180; GRMZM2G054136	FW: AGTCTGTCCGTGGTTGCAT RV: ACCCCTCATCCTTGGCTTC	121
Actina	Zm00001d011086; GRMZM2G067985	FW:AACGAGCTTCGTGTTGCAC RV:GCCCACTAGCATAGAGTGATA GA	166

Obtención de perfiles polisomales

Para el análisis de la regulación traduccional mediada por TOR se obtuvieron perfiles polisomales a partir de ejes embrionarios de 48 horas tratados durante las últimas 3 horas de imbibición con AZD-8055 o DMSO (control) en medio MS.

Se maceró en mortero aproximadamente 1 gramo de tejido con nitrógeno líquido hasta polvo fino. Luego se agregó a la muestra 5 mL de amortiguador de lisis (consultar la composición más abajo). Seguidamente, las muestras se agitaron vigorosamente con *vortex* y se centrifugaron a 12000 x g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se tomó y se repitió la centrifugación en nuevos tubos. Luego se cargó el sobrenadante en 0.5 mL de amortiguador de gradiente (consultar la composición más abajo) y 1 mL de colchón de sacarosa 60% (preparado en amortiguador de gradiente) que contenía 50 µg/mL cicloheximida y 0.1% (v/v) DTT (1M). Las muestras se centrifugaron a 50000 rpm durante 3 horas en rotor fijo

Beckman 80Ti. El precipitado se resuspendió en 300-400 μ L de amortiguador de lisis y se aplicó a un gradiente continuo de 15% a 60% de sacarosa preparado previamente en amortiguador de gradiente. Para separar los ribosomas y polirribosomas en el gradiente se centrifugó a 38000 rpm durante 2 horas a 4°C en rotor Beckman SW55Ti. El gradiente se colectó en 15 fracciones de 500 μ L utilizando una bomba Labconco conectada a un detector Econo UV Monitor de Biorad. Las fracciones se agruparon de acuerdo con la absorbancia a 260nm en NP: no polisomas, M: monosomas, LP: polisomas ligeros, MP: polisomas medios, HP: polisomas pesados.

- **Amortiguador de lisis**

- 200mM Tris-HCl pH 8.5

- 50mM KCl

- 25mM MgCl₂

- 2mM EGTA

- 2% PTE

- 1% IGEPAL

- 1% Tritón X-100

- 0.1% DTT 1M

- 50 μ g/mL Ciclohexilamida (0.2 mg/ml)

- 0.5 mg/mL Heparina

- **Amortiguador de gradiente**

- 50mM Tris-HCl pH 8.5

- 20mM KCl

- 10mM MgCl₂

Extracción de RNA total y RNA de polisomas

La extracción de RNA total se realizó a partir de ejes embrionarios de 48 horas de imbibición utilizando el método fenol/cloroformo de acuerdo con el protocolo del reactivo TRIzol Reagent (Thermo Scientific).

El aislamiento de RNA del gradiente polisomal se realizó a partir de 500 μ l de cada fracción. La muestra se trató con 25 μ l de 10% SDS y 1 μ l de Proteinasa K (10 mg/ml), durante 30 minutos a 37°C, para la disociación de los complejos nucleoproteicos. Posteriormente se separó el RNA añadiendo 250 μ l de fenol ácido y 250 μ l cloroformo:alcohol isoamílico 25:1 (v/v), las fases se separaron por centrifugación a 15000 x g durante 5 minutos a 4°C. Se separó el sobrenadante y se precipitó el RNA añadiendo 70 μ l de 10M LiCl y 750 μ l de isopropanol. La mezcla se incubó durante 1 hora a -20°C. Posteriormente se centrifugó a 18000 x g durante 5 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado de RNA con etanol 70%. El precipitado se dejó secar al aire y se resuspendió en 20 μ l de H₂O-dietilpirocarbonato (DEPC). La integridad del RNA obtenido se verificó en gel de agarosa 1.0% (p/v), preparado en amortiguador TBE 0.5X (44.5 mM Tris, 44.5 mM ácido bórico, 1 mM EDTA).

Tratamiento de RNA y síntesis de cDNA

El RNA total (5 μ g) se trató con DNAsa RQ1 (Promega) durante 30 minutos a 37°C en una reacción de 30 μ L. Para el RNA de polisomas se realizó el mismo procedimiento, pero utilizando el mismo volumen de las muestras de RNA para cada fracción en la reacción de la DNAsa, con un mínimo de 0.6 μ g de RNA en las fracciones de no polisomas. Posteriormente las muestras se purificaron en columnas utilizando el estuche RNA Clean and Concentrator (Zymo Research) para eliminar residuos de la reacción de DNAsa.

La síntesis de cDNA se realizó a partir 1 μ g de RNA purificado (RNA total) o 3 μ l de RNA polisomal purificado de cada fracción. Se utilizó el protocolo del estuche Improm II™ Reverse Transcription System de Promega mediante el siguiente

programa: incubación de la mezcla y oligoDT a 25°C durante 5 minutos, extensión durante 60 minutos a 42°C e inactivación de la enzima transcriptasa reversa a 70°C por 15 minutos. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Condiciones de PCR punto final y PCR tiempo real

La distribución de los transcritos en las fracciones del perfil polisomal se evaluó por RT-PCR punto final. Para las reacciones de PCR se utilizaron de 1-2.5 µl de cDNA de cada fracción en 20-25 µl de reacción utilizando el estuche Taq Polimerasa Recombinante de Thermo Scientific. Los oligonucleótidos se emplearon a una concentración final de 100 µM cada uno. Para la amplificación de los blancos por PCR punto final se utilizó el siguiente programa: 5 min 95°C; 30 ciclos: 45 seg 95°C, 45 seg 60°C, 1:00 min 72°C; 1:00 min 72°C. Los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa 1-2% teñidos con bromuro de etidio. Los genes se prepararon en amortiguador TBE 0.5X (44.5 mM Tris, 44.5 mM ácido bórico, 1 mM EDTA).

Los niveles totales de RNA se evaluaron mediante RT-qPCR tiempo real. Para las reacciones de PCR se utilizó 1 µl de cDNA diluido 1:2 en 10 µl de reacción utilizando el estuche Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific). Los oligonucleótidos se emplearon a una concentración final de 100 µM. Para la amplificación de los blancos por PCR tiempo real se utilizó el programa indicado en el estuche: 2 min 50°C, 10 min 95°C; 40 ciclos: 15 seg 95°C, 1:00 min 60°C. Los resultados se visualizaron en el programa 7500 v2.0.6 de Applied Biosystems. Los niveles relativos de expresión se determinaron según el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ y se utilizó la actina como normalizador.

Construcciones utilizadas en los ensayos en protoplastos

pmonoGUS: se utilizó como control de traducción basal de un mensajero que no contiene uORF. La construcción pmonoGUS se describió previamente (Schepetilnikov et al. 2013). Contiene resistencia a ampicilina, el promotor constitutivo 35S proveniente del genoma del Virus del mosaico de la coliflor (CAMV) y el gen reportero de la β-Glucuronidasa (GUS). Entre las secuencias de 35S y GUS se encuentran una secuencia corta (55 pares de bases) que no contiene uORF.

Flanqueando esta secuencia se ubican dos sitios de restricción, Accl (extremo 5´) y KpnI (extremo 3´). Esta construcción se utilizó como control de traducción basal de un mensajero que no contiene uORF.

pAtCuAO1-GUS y pZmPAO3-GUS: [5´UTR AtCuAO1-GUS; 5´UTR ZmPAO3-GUS] se evaluaron como candidatos a ser regulados a nivel traduccional por TOR. Estas se generaron a partir de la sustitución de la secuencia corta del CAMV en el plásmido pmonoGUS con la 5´UTR de la enzima poliamina oxidasa de *A. thaliana* AtCuAO1 (At1g62810) o la 5´UTR de la poliamina oxidasa de maíz ZmPAO3 (Zm00001d001883). La construcción pAtCuAO1-GUS se generó en el laboratorio a cargo la Dra. Lyuba Ryabova en el Instituto de Biología Molecular de Plantas, Estrasburgo, Francia. La construcción pZmPAO3-GUS se generó en nuestro laboratorio como parte del trabajo de servicio social de Ernesto Miguel Ferruzca.

Generación de la construcción pZmPAO3-GUS

Para la clonación del 5´UTR de ZmPAO3 en pmonoGUS, se amplificó por PCR el 5´UTR completo con oligonucleótidos que contienen los sitios de restricción KpnI y Accl (Tabla 2).

Tabla II. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de la 5´UTR de ZmPAO3. Se muestra el identificador de los cebadores y su secuencia que incluye sitios de restricción (letras minúsculas) para las enzimas empleadas para la clonación de la 5´UTR en el vector pmonoGUS.

Oligonucleótido	Secuencia 5´→3´	Sitio de restricción
ZmPAO3-UTR-FW	ggggtaccccACCCGTGTCGTGTCTAAACGGAC	KpnI
ZmPAO3-UTR-RV	ggggtacccccggtataccgACCAGCCGCCGGCTTCG	KpnI/Accl

La secuencia de la 5´UTR se insertó en el vector pGEM de acuerdo con el protocolo del estuche pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega). El vector pGEM-5´UTR (inserto) se utilizó como templado para amplificar por PCR la 5´UTR. El producto de amplificación se purificó a partir de gel de agarosa 1% (p/v) utilizando

el protocolo de extracción de DNA del estuche Zymoclean Gel DNA Recovery (Zymo Research). Posteriormente, 3 μg de DNA del inserto purificado se digirieron utilizando una mezcla de las enzimas de restricción KpnI + Accl durante 2 horas a 37°C. El producto de la digestión se purificó en gel y se utilizó para insertarlo en pmonoGUS. El plásmido pmonoGUS (2 μg) se digirió con las enzimas de restricción KpnI y Accl durante 2 horas a 37°C y el producto de digestión se purificó en gel.

La reacción de ligación de la 5'UTR en pmonoGUS se realizó utilizando los reactivos del kit pGEM®-T Easy Vector Systems y una relación inserto:vector de 3:1 durante 1 hora a temperatura ambiente. La reacción se mantuvo a 4°C por 72 horas antes de la transformación de células de *E. coli* cepa DH5 α . Las células se transformaron por choque térmico a 42°C durante 45 segundos. Las bacterias se sembraron en cajas con medio Luria Bertani (LB) sólido (Sigma, mezcla Lennox) + ampicilina y se realizó PCR de colonias resistentes, utilizando los oligonucleótidos específicos para la 5'UTR. Las colonias confirmadas por PCR se propagaron y se purificó el plásmido a partir de los cultivos.

Los plásmidos obtenidos se enviaron a secuenciar para comprobar que contenían la 5'UTR en la dirección correcta y que no presentaran mutaciones que afectaran el uORF. Las secuencias obtenidas se alinearon con la secuencia reportada del 5'UTR en la base de datos MGDB. Se seleccionaron dos clonas que no contenían ninguna mutación en el 5'UTR.

Ensayo de traducción en protoplastos de *A. thaliana* y medición de la actividad de GUS

Se obtuvieron protoplastos de *A. thaliana* a partir de hojas de plántula de 10 días de acuerdo con el protocolo descrito previamente (Yoo *et al*, 2007). Se utilizaron plantas silvestres (WT) y plantas mutantes *tor* RNAi 35-7 previamente reportadas (Deprost *et al*, 2007), ambas del ecotipo Col-0. Los protoplastos se transfectaron con 5 μg del DNA correspondiente a cada construcción durante 20 minutos utilizando polietilenglicol. Los protoplastos transfectados se incubaron durante toda la noche para la expresión de las construcciones, a 26 °C en tampón WI, en oscuridad. Para los tratamientos que impactan en la actividad de TOR, en el

medio WI se incluyó 1 μM de auxina ácido 1-indolacético (1-NAA), 0.5 μM AZD-8055, o auxina+AZD.

Transcurrida la incubación los protoplastos se colectaron mediante centrifugación a 1300 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se lisaron en buffer de extracción, vórtex breve. El lisado se centrifugó a 17000 x g durante 10 minutos a 4°C para eliminar el debris celular. El sobrenadante que contenía las proteínas se separó en tubos preincubados en hielo y se utilizó inmediatamente para el ensayo de actividad de GUS.

- **Amortiguador WI pH 5.7**

 - 4mM MES

 - 0.5 M manitol

 - 20 mM KCl

- **Amortiguador de extracción de proteínas de protoplastos pH 7.0**

 - 50 mM NaH_2PO_4

 - 10 mM EDTA 10

 - 0.1% (v/v) NP-40

La actividad de GUS se midió realizando un ensayo fluorimétrico usando un lector de fluorescencia FLUOstar OPTIMA (BMG Biotech) de acuerdo con el protocolo descrito previamente (Schepetilnikov *et al*, 2013) y se normalizó con respecto a los niveles de RNA de GUS. Para estimar los niveles de RNA de GUS, se extrajo el RNA total de los protoplastos utilizando el protocolo del reactivo TRIzol. La síntesis de cDNA se realizó utilizando el estuche RT-SuperScript III (Invitrogen). Los niveles de los transcritos se evaluaron por PCR punto final utilizando oligonucleótidos específicos para GUS. Para la amplificación por PCR punto final se utilizó el siguiente programa: 2 min 98°C; 20 ciclos: 30 seg 98°C, 30 seg 56°C, 3 min 72°C. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 1.2% (p/v) y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Los geles de agarosa se prepararon en amortiguador TBE 0.5X (44.5 mM Tris, 44.5 mM ácido bórico, 1 mM EDTA).

Gráficos y tratamiento estadístico de los datos

Las gráficas se realizaron en el programa Origin Lab. En los gráficos de caja el tamaño de la caja indica el intervalo intercuartilo, la línea media es la mediana y los bigotes representan la desviación estándar de los datos.

En los experimentos de fenotipo las diferencias estadísticas entre el tamaño de la raíz se obtuvieron mediante la prueba ANOVA de una vía, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ **** $p \leq 0.0001$. Para la expresión relativa de los transcritos blanco de TOR las diferencias estadísticas se analizaron mediante la prueba t-test para dos muestras, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ **** $p \leq 0.0001$.

III. RESULTADOS

Análisis de la identidad de las proteínas TOR, S6K y S6 de maíz con respecto a otras especies y conservación de los sitios de fosforilación

Los antecedentes demuestran que TOR y componentes de la vía, como S6K y S6, son importantes para el control traduccional. En eucariontes, estas proteínas se regulan a nivel de fosforilación. En particular en *A. thaliana* y maíz, la fosforilación de S6K aumenta en respuesta a auxinas e insulina, respectivamente (Schepetilnikov *et al*, 2013; Reyes de la Cruz *et al*, 2004). Sin embargo, en artículos de investigación más recientes se utiliza la proteína S6 como marcador de la actividad de TOR, dado la poca abundancia de S6K en tejidos de plantas, en comparación con células en cultivo (Dobrenel *et al*, 2016; Couso *et al*, 2020; Forzani *et al*, 2019). Por otro lado, la fosforilación de TOR en el residuo de S2424 y su actividad aumentan en respuesta a estímulos de auxinas que inducen la traducción de mensajeros que contienen uORFs. En el presente trabajo se utilizaron las tres proteínas para evaluar la actividad de TOR durante la germinación y establecimiento de la plántula.

Primero se analizaron las secuencias de las proteínas TOR, S6K y S6 en maíz, en cuanto a su conservación con respecto a otras especies de plantas y la presencia de sitios de fosforilación dependientes de la actividad de la vía TOR. En la Tabla 1 se muestran los porcentajes de identidad de las proteínas TOR, S6K y S6 de maíz con respecto a las proteínas de humano (*Homo sapiens*), *A. thaliana* y arroz (*Oryza sativa*) que es una planta monocotiledónea más cercana a maíz (*Z. mays*). Como se muestra existe un bajo porcentaje de identidad entre las proteínas de plantas y humano, especialmente para las proteínas TOR y S6K, donde es menor al 50%. Mientras que existe una alta identidad entre las proteínas de plantas, más del 70% de identidad en todos los casos, especialmente entre maíz y arroz, más del 80% de identidad.

Tabla 1. Nivel de identidad de las proteínas TOR, S6K y S6 en maíz con las secuencias correspondientes a *A. thaliana* (At), arroz (Os) y humano (Hs). Los alineamientos se realizaron utilizando Clustal Omega (ver el Anexo 1 para los alineamientos completos y accesos). Las secuencias se obtuvieron a partir de TAIR (The Arabidopsis Information Resource www.arabidopsis.org), MGDB (Maize genetic and genomic data bank www.maizegdb.org) y NCBI (National center for Biotechnology Information www.ncbi.nlm.nih.gov). Para la proteína TOR de maíz y arroz no se ha reportado una secuencia completa en MGDB u otra base de datos específica de plantas por lo que se utilizó las secuencias depositadas en NCBI, en el caso de maíz esta se reportó de manera experimental por (Agredano-Moreno *et al*, 2007).

Proteína	Número de acceso	Longitud (aa)	Identidad (%)						
			ZmrpS6-2	AtrpS6A	AtrpS6B	OsrpS6-1	OsrpS6-2	HsrpS6	
ZmrpS6-1	Zm00001d022180	251	99.2	87.2	87.55	95.2	95.51	63.97	
ZmrpS6-2	Zm00001d006899	251	-	87.6	87.95	95.6	96.33	63.97	
			ZmS6K-2	AtS6K-1	AtS6K-2	OsS6K-1	OsS6K-2	HsS6K-1	HsS6K-2
ZmS6K-1	Zm00001d022434	486	72.92	66.08	65.37	86.3	76.83	43.3	43.19
ZmS6K-2	Zm00001d047531	481	-	66.3	65.37	81.95	85.62	43.77	41.53
			AtTOR			OsTOR		HsTOR	
ZmTOR	AAW78347.1*	2464	72.36			91.27		44.07	

En el genoma de maíz y arroz se identificaron dos isoformas de la proteína S6 que se denominaron aquí 1 y 2; las proteínas de maíz son muy similares entre sí (99.2%) y a las proteínas de *A. thaliana*. En *A. thaliana* estas isoformas tienen funciones redundantes y al igual que TOR son esenciales para la embriogénesis. La proteína S6K está codificada por dos genes en humano y en las plantas analizadas. La identidad entre las isoformas de maíz es moderada, 72.92%, similar a lo que ocurre para S6K-1/2 de humano, 70.35%. En humano S6K-1 está relacionada principalmente con la regulación de la síntesis de proteínas y S6K-2 con la proliferación celular, ambas son blanco de TOR (Tavares *et al*, 2015). Es importante mencionar que los nombres ZmS6K-1 o ZmS6K-2 fueron adjudicados de manera arbitraria ya que ambas tienen porcentajes de identidad muy similares con las proteínas de humano y *A. thaliana*. Es importante notar que las proteínas S6K de plantas contienen una secuencia adicional en el extremo amino terminal y son trunca en el extremo carboxilo terminal con respecto a la proteína de humano (señaladas con recuadro, Anexo 1). Estas secuencias podrían influir en su plegamiento, interacción con otras proteínas y su regulación.

Por su parte TOR está codificado por un solo gen, la proteína de maíz tiene 91.27% de identidad con la de arroz y una menor identidad (72.36%) con la de *A. thaliana*. En el alineamiento de TOR se observan bloques de residuos conservados a lo largo de la proteína que corresponden a los dominios HEAT, FAT, FRB, cinasa y FATC, el porcentaje de identidad aumenta especialmente en la región del dominio cinasa (Anexo 1). Cabe notar que todas las proteínas de plantas tienen aproximadamente 30 aminoácidos adicionales en el carboxilo terminal río arriba del dominio FATC (Anexo 1). Esta característica se reportó en *A. thaliana* donde se observó que, a diferencia de la proteína de animales, este dominio no es esencial para la actividad de AtTOR en condiciones de crecimiento en el laboratorio. Ya que el dominio FATC participa en las interacciones con otras proteínas y en el plegamiento del dominio cinasa. Estos residuos adicionales podrían conferir características especiales a la proteína TOR de plantas.

A pesar de la divergencia entre las proteínas S6, S6K y TOR de las especies de plantas analizadas y las de humano, se conservan los sitios de fosforilación relevantes para regular la actividad de la vía en mamíferos y levadura (Figura 1). En el caso de TOR, el residuo S2448 de la proteína de humano se encuentra conservado en las proteínas TOR de arroz, maíz y *A. thaliana*. Este aminoácido se ubica entre el dominio cinasa y FATC, y es reconocido por fosfo-anticuerpos dirigidos a la proteína de ratón (Schepetilnikov *et al*, 2013; Garrocho-Villegas *et al*, 2013). En la Figura 1a se puede apreciar un sitio de fosforilación en el contexto (R/KxxxRxx**S**), que se mantiene para todas las proteínas mostradas.

En el caso de S6K, la proteína contiene un residuo de serina o treonina en todas las especies analizadas, homólogo al residuo T389 fosforilado por TOR en mamíferos. Este residuo se encuentra en el contexto FxxF**S**/TYVxP, aunque se observan algunas diferencias importantes para las secuencias de plantas, como es la presencia de un residuo cargado, arginina (Figura 1b, sombreado azul claro), antes de una prolina conservada. Es importante señalar que a diferencia de su homólogo en humano donde la fosforilación del extremo carboxilo terminal de S6K expone la región interna de la proteína y permite la fosforilación mediada por TOR

en la T389, en plantas la proteína contiene solo de 15-20 residuos después del sitio de fosforilación por TOR, por lo que podría no requerir dicha exposición.

Para S6 se identificó en maíz y arroz el homólogo al residuo S240 fosforilado por S6K de *A. thaliana* en un contexto conservado. En la punta de la raíz de maíz se había identificado previamente por espectrometría de masas un fosfopéptido que contiene este residuo (Williams *et al*, 2003). Sin embargo, no se había comprobado mediante el uso de anticuerpos.

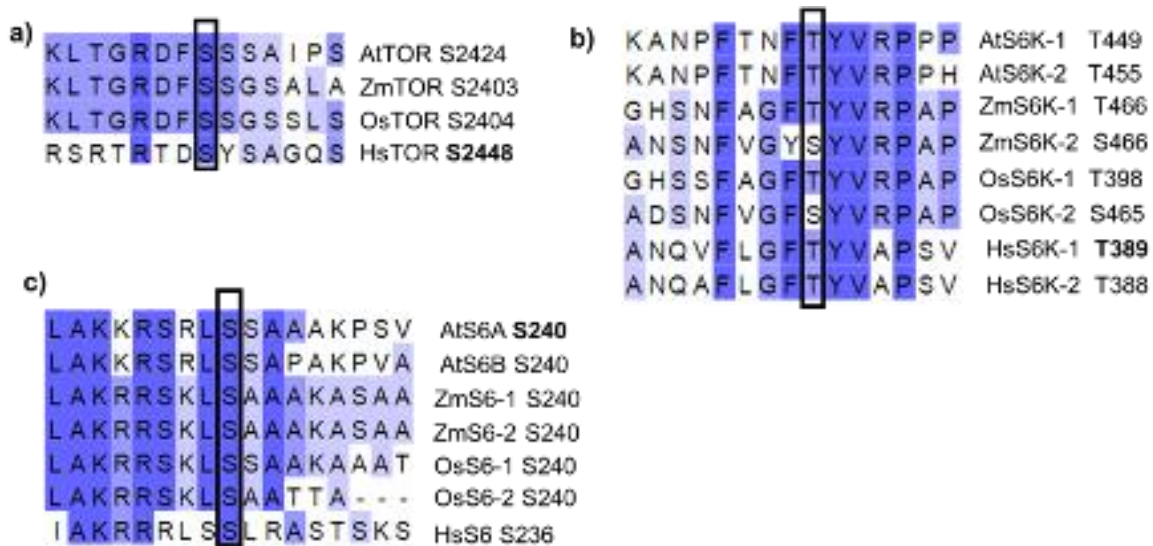


Figura 1. Los sitios de fosforilación de TOR, S6K y S6 descritos para la vía TOR están conservados en maíz. Alineamientos de las proteínas a) TOR, b) S6K y c) S6 de *A. thaliana*, *Z. mays*, *O. sativa* y *H. sapiens* realizado con Clustal omega. La visualización de los resultados se realizó mediante el software Jalview 2.11.1.3. Se señala con un recuadro el residuo que se evaluó mediante inmunodetección. En color azul se indican los residuos conservados en todas las secuencias (azul oscuro) o en al menos la mitad de las secuencias (azul claro). La numeración correspondiente a la proteína de cada organismo se indica al lado derecho del alineamiento y en negrita el residuo blanco de los anticuerpos utilizados. HsS6K-1 corresponde a la isoforma p70S6K-1 y HsS6K-2 a la isoforma p54S6K-2 de humano.

La actividad de la vía TOR aumenta durante la germinación y primeras etapas de establecimiento de plántula y es importante para el crecimiento de plántulas de maíz

Durante la germinación y las primeras etapas de establecimiento de plántula ocurre la activación metabólica del tejido quiescente y el crecimiento rápido del eje embrionario dependiente de la activación de la síntesis de proteínas, la transcripción

y el ciclo celular. Estos procesos son blancos fundamentales de TOR en eucariontes y reguladores esenciales del crecimiento. Por lo tanto, se estudió la actividad de TOR y el papel de la vía en el crecimiento de plántula de maíz.

En estas primeras etapas de desarrollo el crecimiento de la raíz primaria es más rápido que el del coleoptilo y depende de la proliferación y alargamiento celular. Dado que en otras especies se ha reportado una mayor expresión de TOR en células en alta proliferación, se analizó la actividad de la vía en la zona de mayor crecimiento (raíz de 24 y 48 horas de imbibición) con respecto al tejido completo (eje embrionario) (Figura 2a).

La forma fosforilada de TOR en el residuo S2448 aparece a bajos niveles a las 24 horas de imbibición y tiene un considerable aumento a las 48 horas, de manera concomitante con el crecimiento acelerado de la raíz (Figura 2b). Cabe notar que actualmente no contamos con un anticuerpo funcional para detectar la proteína TOR total de maíz. Se probó un anticuerpo generado contra la proteína TOR de *A. thaliana* (AS122608, Agrisera) en muestras de eje embrionario y de callos de maíz (trabajo experimental de la tesis de Licenciatura de Karen Calderón; este no cuenta con copia en la biblioteca central), pero solo se detectaron bandas tenues por debajo del peso esperado. Por lo que en este trabajo no pudimos discernir si el aumento en la fosforilación corresponde o no a un incremento de la proteína total. Los antecedentes muestran un aumento en la expresión a nivel de transcrito y proteína de TOR principalmente a las 48 horas de imbibición, sugiriendo que la expresión de la proteína podría tener un papel importante en la regulación de su actividad en estas etapas. Aunque no se conoce el impacto de esta fosforilación en la actividad de TOR de maíz, ensayos *in vitro* en *A. thaliana* demuestran que aumenta su actividad sobre S6K.

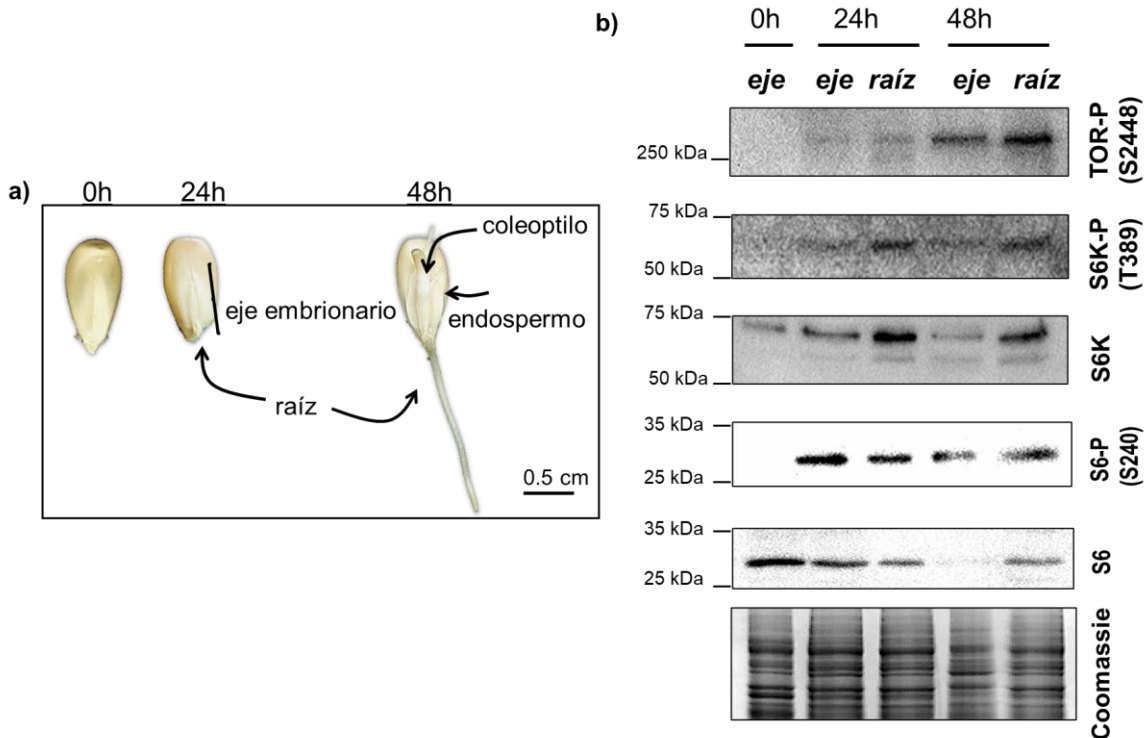


Figura 2. Aumento de la actividad de la vía TOR durante la germinación y las primeras etapas de establecimiento de plántula. a) Fenotipos de semillas de maíz variedad chalqueño en las etapas de desarrollo utilizadas en este trabajo y los tejidos analizados: 0 horas de imbibición (semilla seca), 24 horas (germinación) y 48 horas (primera etapa de establecimiento de plántula). Se señalan el eje embrionario que consta del coleoptilo, tejido que da lugar a la parte aérea de la planta, y raíz. b) Inmunodetecciones para TOR-P (S2448), S6K-P (T389), S6K, S6-P (S240) y S6 en muestras de eje embrionario de diferentes tiempos de imbibición y la raíz de ejes de 24 horas y 48 horas. Las muestras se sometieron a SDS-PAGE en gel de acrilamida 8% (TOR) o 12% (S6K y S6). Los geles se tiñeron con azul de Coomassie para observar la integridad de las proteínas y se utilizaron como control de carga para el análisis por inmunorréplica por western blot de TOR. El gel que se usó como control de carga se corrió simultáneamente con el que se utilizó para la transferencia.

Para S6K se observaron dos bandas para la proteína total, la cual está presente a bajos niveles o indetectables en el eje embrionario seco e incrementa después de las 24 horas de imbibición, principalmente en la raíz. Estas bandas podrían corresponder a la presencia de más de una isoforma de S6K en los tejidos ensayados. Un patrón similar se observa para la forma fosforilada de S6K, en conjunto estos resultados sugieren que la proteína S6K aumenta su expresión y es fosforilada por TOR en respuesta a la germinación.

En el caso de la proteína ribosomal S6, en contraste con TOR y S6K está presente a altos niveles en el eje embrionario desde la semilla seca. Sin embargo, en concordancia con los bajos niveles de S6K en tejido quiescente, está en forma no fosforilada. Interesantemente, su fosforilación aumenta a partir de las 24 horas de imbibición tanto en eje como raíz. Esto último sugiere que pueden existir otros mecanismos de fosforilación de S6 en este residuo, independientes de S6K cuya activación se produce principalmente en raíz. Estudios previos en plantas muestran que factores como el ciclo circadiano o la presencia de fosfatasa inducidas por estrés controlan la fosforilación de S6 en el carboxilo terminal (Williams *et al*, 2003; Enganti *et al*, 2018).

Estos resultados apuntan a una activación de la vía a partir de las 24 horas de imbibición de la semilla, de manera concomitante con la protrusión y crecimiento de la raíz. La función de la vía en esta etapa podría relacionarse con la producción de ribosomas y (Bewley, 1997) y con la activación del ciclo celular (Díaz-Granados *et al*, 2020).

Previamente se reportó que el factor similar a insulina de maíz (ZmIGF) activa a TOR e induce la germinación y crecimiento de la plántula. Sin embargo, los efectos de la inhibición de la vía en el crecimiento no se habían estudiado. En este trabajo utilizamos un inhibidor ATP competitivo específico de TOR que se describió para plantas por (Montané & Menand, 2013). Para analizar los efectos de TOR en el crecimiento de ejes embrionarios de maíz se utilizaron dos modelos. En el primero (Figura 3a), se extrajeron de la semilla ejes de semillas imbibidas por 24 horas y se colocaron directamente en medio Murashige & Skoog (MS) \pm 5 μ M, 10 μ M, y 20 μ M AZD-8055 en oscuridad durante 72 horas. En este experimento se observó una reducción en el crecimiento de la raíz (10, 20 μ M AZD-8055). En el segundo modelo (Figura 3b) se utilizaron semillas secas y se colocaron directamente en agua \pm 50 μ M AZD-8055 en presencia de fotoperíodo largo durante 48 horas. Cabe mencionar que se utilizó mayor concentración de AZD-8055 en semillas completas debido a la barrera de endospermo en cereales (Montané & Menand, 2013). En este experimento el efecto que se observa depende de las funciones de TOR durante la

germinación y el crecimiento posterior. Además, la presencia de luz contribuye a la activación de TOR. En dichas condiciones también encontramos resultados similares con un efecto principalmente a nivel de la raíz de la planta.

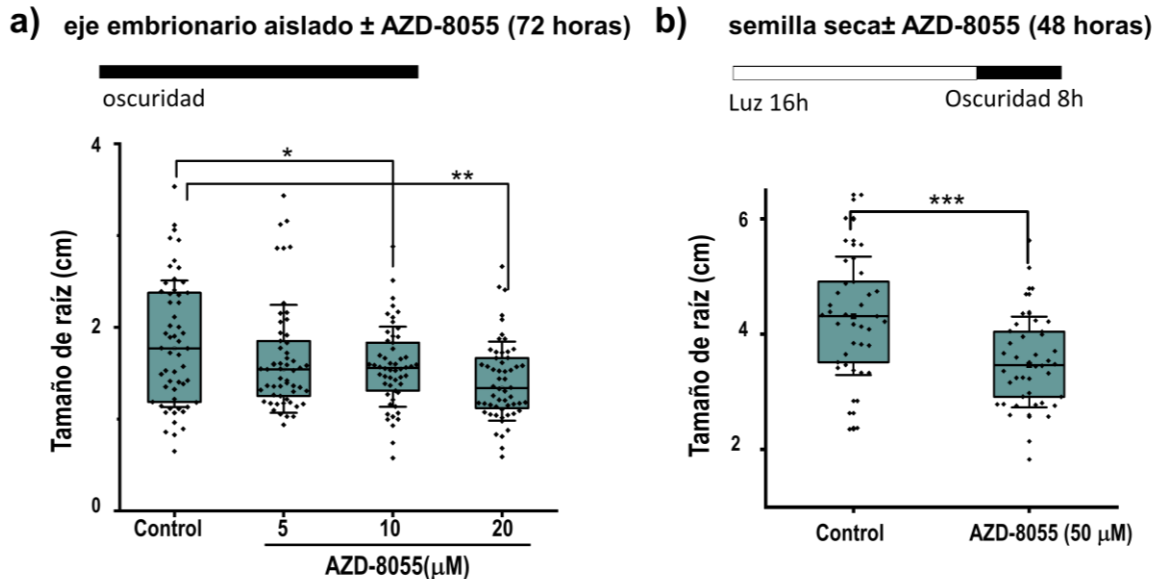


Figura 3. La inhibición de TOR afecta el crecimiento de ejes embrionarios de maíz. a) Las semillas secas se incubaron en algodón con agua durante 24 horas a 26 ($\pm 2^\circ\text{C}$) en oscuridad. Posteriormente se disectaron los ejes embrionarios de las semillas germinadas y se colocaron durante 72 horas adicionales sobre algodón con una solución acuosa de diferentes concentraciones de AZD8055 (0-20 μM), se utilizó la cantidad de DMSO (solvente) correspondiente a la mayor concentración en la condición control. b) Se seleccionaron semillas germinadas de 24 horas y se incubaron durante 48 horas adicionales en agua (control) o AZD8055 50 μM , a 26 ($\pm 2^\circ\text{C}$) bajo un fotoperíodo (16h luz/8h oscuridad). En ambos casos se midió la raíz (20 ejes por experimento) en 3 réplicas biológicas utilizando el programa Image J. La línea y los bigotes en las gráficas de caja representan la mediana y la desviación estándar de las muestras, respectivamente. El análisis estadístico se realizó con ANOVA de una vía: $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$.

TOR controla la traducción de mRNA específicos que contienen uORF

El crecimiento activo de los ejes embrionarios depende de la producción de nuevos organelos para la proliferación celular, lo cual requiere la síntesis activa de proteínas. Recientemente se describió que ZmTOR participa en la activación del ciclo celular durante la germinación a través del control de la expresión de ciclinas/CDK en respuesta a azúcares (Díaz-Granados *et al*, 2020). En este trabajo nos enfocamos a las funciones de TOR en la regulación traduccional en las primeras

etapas de establecimiento de plántula (48 horas de imbibición) donde se encontró una alta actividad de la vía.

Con este propósito se extrajeron ejes embrionarios y se incubaron durante las últimas 3 horas de imbibición \pm AZD-8055. Se probaron un rango de concentraciones, 1 μ M, 5 μ M 10 μ M y 20 μ M AZD-8055, teniendo en cuenta los resultados de fenotipo (Figura 3a). Se observó una disminución de la actividad de la vía acorde a la fosforilación de TOR y S6, principalmente a partir de 5 μ M AZD-8055 (Figura 4a). La fosforilación de S6K también se evaluó, sin embargo, la detección de la proteína por los anticuerpos utilizados fue en muchos casos por debajo del límite de detección del ensayo, dada su poca abundancia en los tejidos utilizados, por lo que no continuó analizándose como marcador de actividad de la vía y en su lugar se registró la fosforilación de S6.

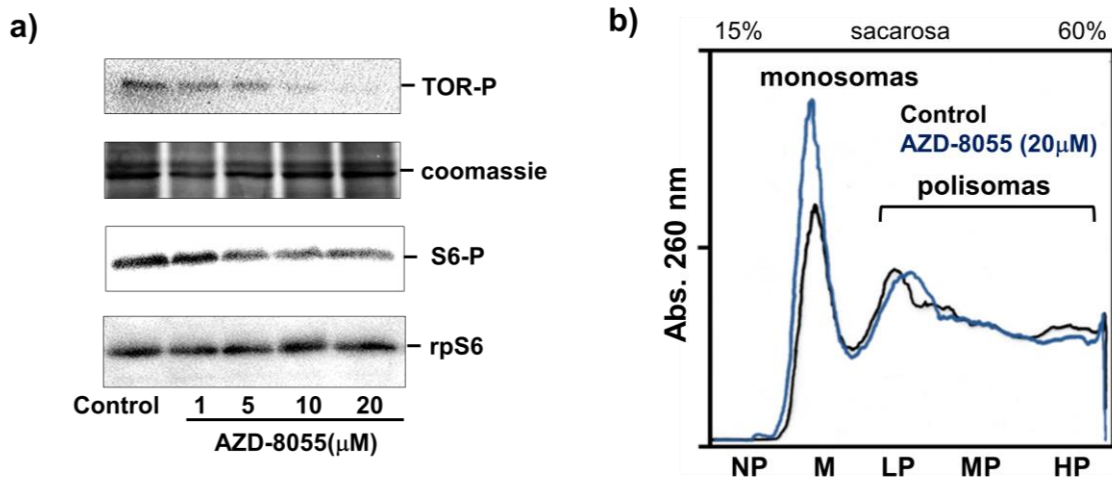


Figura 4. La inhibición de TOR con AZD8055 disminuye su fosforilación y la de la proteína ribosomal S6 en ejes embrionarios de maíz. Los ejes embrionarios se aislaron de la semilla y se incubaron durante 3 horas con las concentraciones de AZD8055 indicadas (para un total de 48 horas), se utilizó la cantidad de DMSO (solvente) correspondiente a la mayor concentración en la condición control, sin inhibidor. A partir de estas muestras se obtuvieron proteínas totales o polirribosomas. **a)** Actividad de la vía medida a través de la inmunodetección de la forma fosforilada de TOR-P (S2448), S6-P (S240) y S6 total. Las proteínas totales se sometieron a SDS-PAGE en gel de acrilamida 8% y 12% para TOR y S6, respectivamente. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie para observar la integridad de las proteínas y se utilizaron como control de carga para el análisis por inmunorréplica por western blot de TOR. El gel que se usó como control de carga se corrió simultáneamente con el que se utilizó para la transferencia. **b)** Perfil de polirribosomas de

ejes embrionarios tratados \pm AZD8055 20 μ M. Las fracciones del perfil polirribosomal se agruparon de acuerdo con la absorbancia a 260 nm en el gradiente de 15-60% de sacarosa en: M, monosomas; LP, polirribosomas ligeros; MP, polirribosomas medianos; HP, polirribosomas pesados.

Se obtuvieron perfiles polisomales para analizar la actividad traduccional en condiciones de inhibición de TOR. En los perfiles polisomales las fracciones más ligeras (NP, M, LP) se asocian con una menor actividad traduccional y las más pesadas (MP, HP) con una mayor actividad traduccional. En presencia de 20 μ M del inhibidor se observó un pequeño incremento en el pico de monosomas comparado con los polirribosomas (Figura 4b) evidenciando un aumento de la relación monosomas/polirribosomas de alrededor del 20%. Hasta este punto no conocíamos si TOR estaba involucrado en la regulación de transcritos particulares en el modelo de posgerminación de maíz. Previamente se demostró en *A. thaliana* que la activación de TOR por las fitohormonas auxinas promueve la traducción de mRNA de respuesta a auxinas que contienen uORF. Dada la gran relevancia de este tipo de mensajeros en el control del crecimiento y la adaptación de la planta a estímulos ambientales, en este trabajo se propusieron mRNA que contienen uORF como candidatos a ser regulados por TOR (Tabla 2).

Tabla 2. Transcritos seleccionados para el análisis de la regulación traduccional mediada por TOR en ejes embrionarios de maíz. Se presenta la información correspondiente a las UTR de los mensajeros de maíz de acuerdo con MGDB www.maizegdb.org: longitud de la UTR y número de uORF. *UTR de acuerdo phytozome.jgi.doe.gov (Ensembl18) dado que no se han reportado en la última versión de MGDB. *SAMDC*: S-adenosil metionina decarboxilasa; *TPP*: Trehalosa-6-fosfato fosfatasa; *S6K*: cinasa de S6; *PAO3*: poliamina oxidasa-3. *bZIP11*: factor transcripcional de tipo zipper básico-11 (en la anotación de maíz este gen se informa como bZIP160), *S6*: proteína ribosomal S6 de la subunidad pequeña, *eIF4E*: factor de inicio de la traducción eucarionte 4E. La secuencia completa de la 5' UTR y posición de los uORF muestra en el Anexo 2.

Transcrito	# Acceso <i>Z. mays</i>	# Acceso <i>A. thaliana</i>	Longitud UTR (nt)/ no. uORFs	Descripción
<i>SAMDC*</i>	Zm00001d020543	At3g02470	844/2 CP-uORF	-Enzima decarboxilasa que participa en la síntesis de poliaminas. -Esencial para el desarrollo embrionario. -Involucrada en la respuesta a estrés salino.
<i>TPP</i>	Zm00001d017502	At4g22590	376/2 uORF	-Enzima que participa en la síntesis de trehalosa -Involucrada en la respuesta a estrés y el mantenimiento de la homeostasis de sacarosa.
<i>S6K</i>	Zm00001d022434	At3g08730	228/1 uORF	-Cinasa involucrada en el control de la síntesis de proteínas y la proliferación celular.
<i>PAO3</i>	Zm00001d001883	At2g43020.1	480/1 uORF	-Enzima oxidasa que participa en el catabolismo de poliaminas. -Importante para la germinación y crecimiento de hoja de maíz en condiciones estrés salino.
<i>bZIP11*</i>	Zm00001d015153	At4g34590	972/6 uORF (1 CP-uORF)	-Factor transcripcional de tipo zipper básico involucrado en la germinación y la respuesta a la deficiencia de sacarosa. -participa en la regulación del crecimiento en condiciones de estrés.
<i>S6</i>	Zm00001d02280	At4g31700	141/0	-Proteína ribosomal de la subunidad pequeña involucrada en el control traduccional.
<i>eIF4E</i>	Zm00001d041682	At4g18040	192/2	-Factor de unión a Cap involucrado en la selección de mRNA.

Estos mRNAs se seleccionaron a partir de una búsqueda por homología de transcritos en *A. thaliana* que contienen uORF conservados y son importantes para la germinación, proliferación celular y respuesta a nutrientes. Aunque la anotación del genoma de maíz se actualiza constantemente y en especial las UTR se reportan de manera diferente según la fuente, aquí se utilizaron transcritos que previamente se había informado que contenían uORF comprobados al menos en *A. thaliana* (PAO3, SAMDC, bZIP11); o que están conservados en cinco especies de cereales incluyendo maíz (SAMDC, S6K, TPP, Tran et al. 2008). Adicionalmente, la 5' UTR completa de PAO3 se amplificó a partir de cDNA y se secuenció, mostrando que coincide con lo que se reporta en la última versión de Maize genome Databank (B73_AGPv4). Para eIF4E y S6 no se ha reportado experimentalmente su 5' UTR. Según la información disponible, el primero contiene una UTR corta y posee dos pequeños uORFs muy cerca del extremo 5'. La presencia de estos uORF es específica para el mensajero de maíz, ya que no aparece en el ortólogo de arroz o *A. thaliana*. De estar presentes, estos uORF no presentarían un gran potencial inhibitorio dado que se encuentran muy cerca de la estructura Cap (16 nucleótidos) y tendrían un bajo reconocimiento por la maquinaria traduccional. En el caso de S6 tiene una UTR relativamente corta que no contiene uORF (Figura 5a y Anexo 2).

De los siete transcritos cuya distribución se determinó a lo largo de los perfiles polirribosomales, cuatro presentaron un desplazamiento claro del mensajero hacia fracciones más ligeras: TPP, S6K, SAMDC y PAO3. En contraste, solo pequeños cambios ocurrieron para eIF4E y S6 (Figura 5b). La cantidad de ribosomas unidos a los mensajeros es un indicador de su eficiencia traduccional, por lo tanto, el desplazamiento hacia las fracciones de no polisomas (subunidades ribosomales), monosomas (un ribosoma) y polisomas ligeros (entre dos y tres ribosomas) indica una actividad traduccional más baja en comparación con transcritos enriquecidos en las fracciones de polisomas medios y pesados. A excepción de PAO3, los transcritos ensayados se asocian principalmente a las fracciones de polirribosomas y están enriquecidos en polisomas pesados en las muestras control. La inhibición de TOR propicia su redistribución a polisomas ligeros y no polisomas de manera concomitante con su disminución en polisomas pesados.

Este desplazamiento en el perfil de polirribosomas indica que ocurre una disminución en la eficiencia traduccional de estos mensajeros. No se observaron cambios en los niveles de transcritos totales (Figura 5c) de los candidatos, por lo que el comportamiento observado se debe a un mecanismo de regulación traduccional. Es importante notar que la abundancia de la proteína es regulada por otros mecanismos que involucran las modificaciones post-traduccionales por lo tanto este aspecto debe ser abordado mediante el uso de otras técnicas como la inmunodetección y espectrometría de masas. Sin embargo, estos transcritos se proponen como blancos traduccionales de TOR.

La baja abundancia de bZIP11 en las muestras ensayadas no permitió discernir si es un blanco de TOR. En *A. thaliana*, bZIP11 se expresa a altos niveles en la semilla antes de la germinación y disminuye durante las primeras horas post germinación (Iglesias-Fernández *et al*, 2013). Esto coincide con los bajos niveles encontrados en comparación con los demás candidatos a nivel de RNA total. Además, la presencia de muchos uORF en su UTR (Figura 5a) podría inhibir su cargado en polisomas en condiciones basales, lo cual corresponde con nuestros resultados. Para discernir la función de TOR en su traducción necesitamos conocer su patrón de expresión en maíz y explorar otros tejidos.

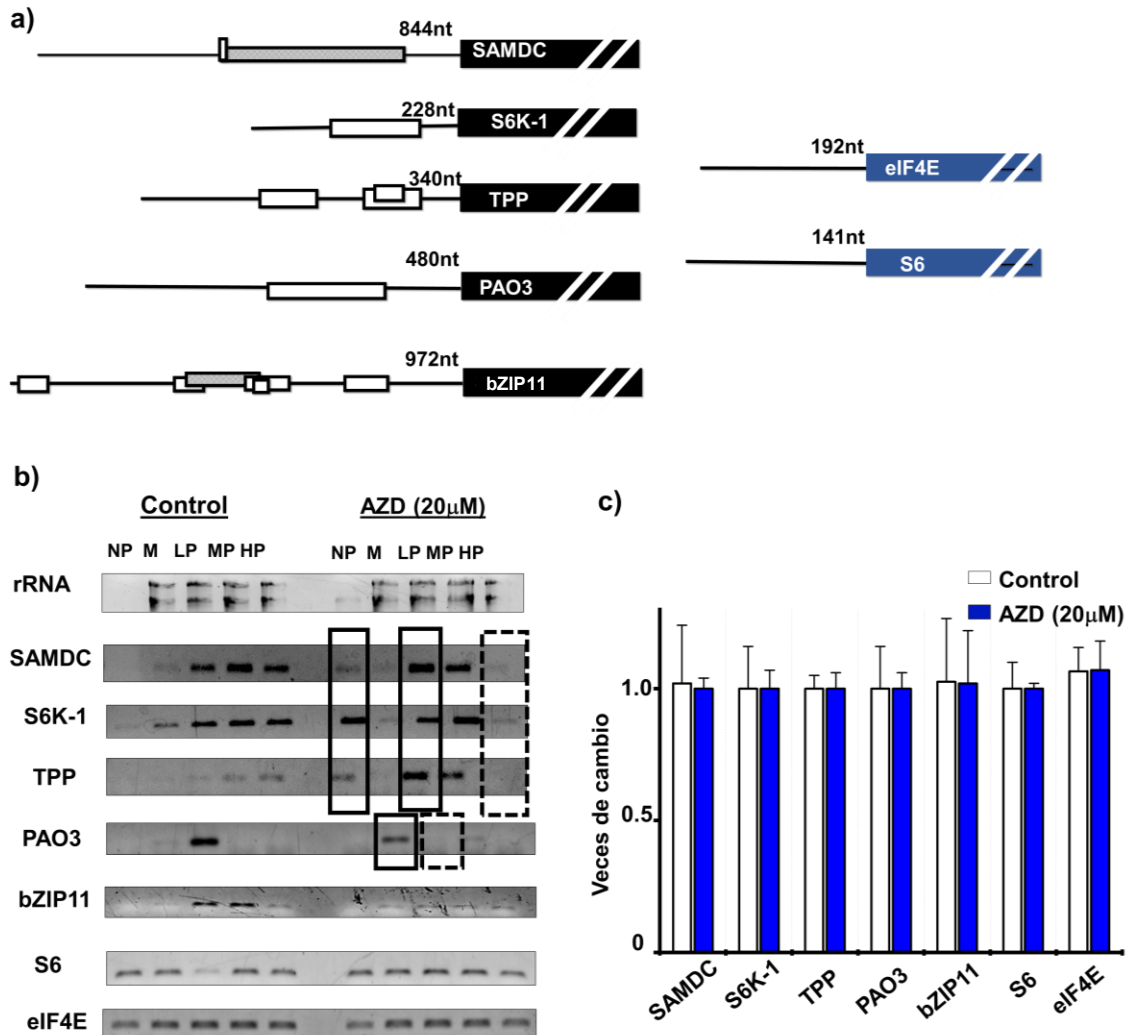


Figura 5. TOR regula la eficiencia traduccional de mRNAs que contienen uORF en ejes embrionarios de maíz. **a)** Representación del 5'UTR de los mRNAs evaluados de acuerdo con la información en el Anexo 2. En la parte superior se indica la longitud del UTR. La presencia de uORF se representa como recuadros, los recuadros rellenos indican CP-uORF (uORF que codifican un péptido conservado en secuencia con respecto a *A. thaliana*) en los mensajeros de SAMDC y bZIP11. **b)** La distribución de transcritos candidatos a lo largo del perfil de polirribosomas Control vs. + AZD8055 20 μM se analizó mediante RT-PCR de punto final y los productos de amplificación se visualizaron en gel de agarosa 2%. Las fracciones del perfil polirribosomal se agruparon de acuerdo con: NP: no polisomas, M, monosomas; LP, polirribosomas ligeros; MP, polirribosomas medianos; HP, polirribosomas pesados. La integridad del RNA ribosomal de cada fracción se muestra en la parte superior en un gel de agarosa 1.5%. Los recuadros de líneas punteadas señalan la disminución del transcrito en una fracción y su redistribución a otra, recuadro de línea continua. **c)** Niveles totales de los transcritos analizados mediante RT-qPCR en las muestras ensayadas. Se representan las veces de cambio con respecto al control y la barra

de error representa la desviación estándar (n=6). No se encontraron diferencias significativas entre las muestras, t-Student de dos colas.

Las poliaminas regulan la germinación y crecimiento de plántulas de maíz a través de TOR

Entre los transcritos blancos de TOR encontramos a las proteínas SAMDC y PAO3 que participan en la síntesis y degradación de poliaminas, respectivamente (ver la ruta metabólica de poliaminas en el Anexo 3). Las poliaminas son moléculas policatiónicas que se producen a partir de la arginina y participan en el reciclaje de nitrógeno en la célula. Son esenciales para el crecimiento de la planta y la adaptación a estrés. La espermidina (Spd) es una de las poliaminas más abundantes en plantas y es importante para la división celular y la síntesis de proteínas (Tiburcio *et al*, 2014).

La aplicación externa de Spd estimula la germinación y el crecimiento de hoja en estrés salino (Huang *et al*, 2017; Rodríguez *et al*, 2009). Sin embargo, se desconoce cómo estas moléculas son percibidas y ejercen sus funciones en las células vegetales. Dado que TOR es un regulador central que recibe estímulos provenientes de nutrientes como el nitrógeno y moléculas señalizadoras aún por identificar, exploramos la interconexión entre ambas vías. La primera aproximación fue analizar el efecto de las poliaminas exógenas en el crecimiento de plántula de maíz durante las primeras etapas y si este tenía relación con la actividad de TOR.

Para estudiar el efecto de la espermidina en el crecimiento de plántulas de maíz utilizamos semillas secas de maíz que se imbibieron por 48 y 72 horas en presencia de espermidina en presencia o ausencia de AZD-8055. A las 48 horas de imbibición se observó una tendencia a un mayor crecimiento en las muestras tratadas con espermidina (Figura 6), aunque no significativo estadísticamente. Después de 72 horas de tratamiento se encontró un aumento del crecimiento estadísticamente significativo inducido por la espermidina. Interesantemente, este efecto no se produce en condiciones de inhibición de TOR con AZD-8055. Estos datos sugieren que se necesita la vía TOR activa para que la espermidina tenga sus efectos en crecimiento, colocándola río arriba de TOR.

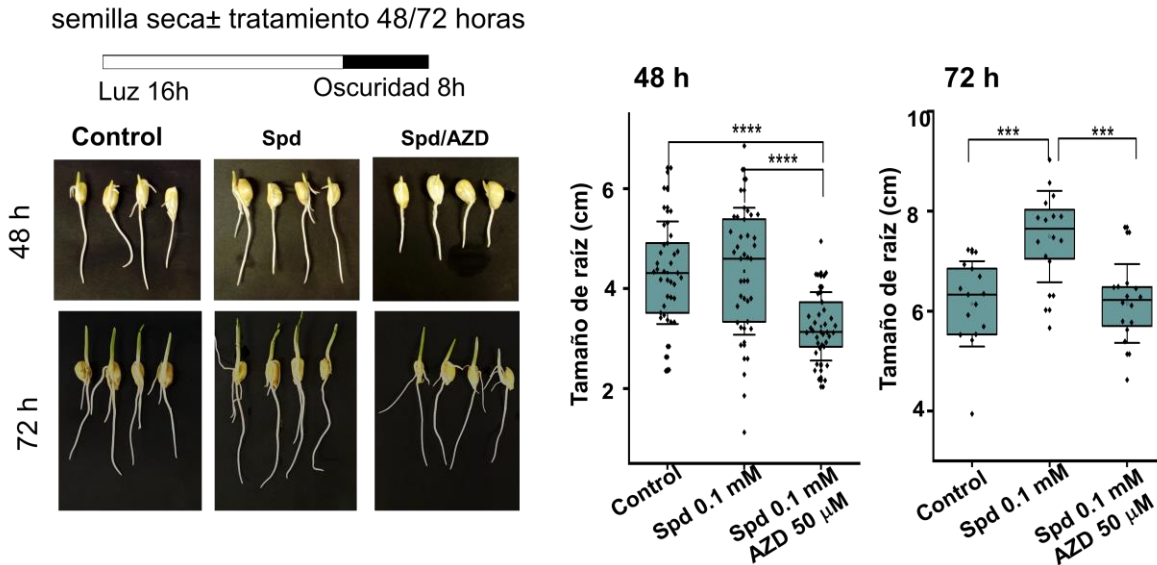


Figura 6. Las poliaminas inducen el crecimiento de plántulas de maíz a través de TOR. Las semillas secas se colocaron en un cilindro vertical en presencia de agua (control), tratamiento con 0.1 mM espermidina (Spd) o espermidina en combinación con 50 µM AZD-80055 (Spd/AZD), a 26 (± 2°C) bajo un fotoperíodo (16h luz/8h oscuridad) durante 48 o 72 horas. El tamaño de la raíz se determinó utilizando el programa Image J (al menos 10 ejes por experimento) en 3 réplicas biológicas para 48 horas y 2 réplicas biológicas para 72 horas. La línea y los bigotes en las gráficas de caja representan la mediana y la desviación estándar de las muestras, respectivamente. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba ANOVA de una vía: $p < 0,001^{***}$, $p < 0,0001^{****}$.

Las poliaminas inducen la actividad de TOR en semillas germinadas de maíz

Dado que los niveles de poliaminas aumentan durante la germinación (Huang *et al*, 2017) y que la espermidina requiere de la vía TOR para la inducción de la germinación-crecimiento de maíz, nos preguntamos si la presencia de espermidina podría regular la actividad de la vía.

Para abordar este aspecto se utilizaron ejes embrionarios de 24 horas de imbibición en agua, los cuales se trataron con espermidina, AZD-8055 y espermidina en combinación con AZD-8055 durante 24 horas adicionales. A partir de estas muestras se analizó la actividad de la vía a través de la inmunodetección de la fosforilación de la proteína ribosomal S6 dependiente de TOR/S6K (Figura 7). El tratamiento con espermidina aumentó la fosforilación de S6 y este estímulo fue bloqueado en presencia de AZD-8055, lo cual demuestra que depende de la vía

TOR. Estos resultados sugieren que las poliaminas estimulan la actividad de TOR durante el establecimiento de plántula y en respuesta a este y otros estímulos, TOR inducen el crecimiento del eje embrionario a través del control de la síntesis de proteínas y otros procesos que no fueron abordados en este trabajo, como el ciclo celular y el metabolismo del carbono, entre otros.

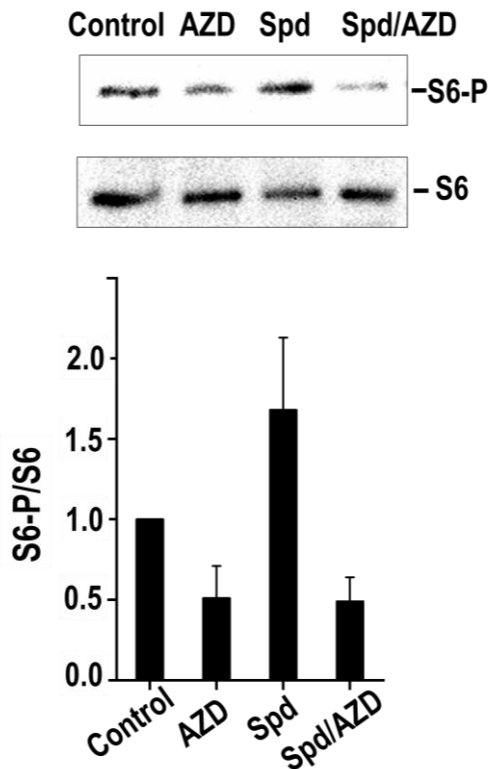


Figura 7. La actividad de la vía TOR aumenta en respuesta a espermidina en ejes embrionarios de maíz. Las semillas secas se colocaron en vertical en presencia de agua a 26 ($\pm 2^\circ\text{C}$) bajo un fotoperíodo (16h luz/8h oscuridad) durante 24 horas. Posteriormente se seleccionaron las semillas germinadas y se colocaron en agua (control), tratamiento con 0.2 mM espermidina (Spd) o espermidina en combinación con 50 μM AZD-80055 (Spd/AZD) durante 24 horas adicionales. Se obtuvieron proteínas totales y se analizó la actividad de la vía TOR a través de la inmunodetección de S6-P(S240)/S6 total. La gráfica muestra los valores de veces de cambio de la relación S6-P/S6 con respecto al control, la barra de error representa la desviación estándar (n=4).

TOR participa en el control de traducción de enzimas de la ruta de poliaminas

El mantenimiento de niveles óptimos de poliaminas en la célula es fundamental para lograr un balance entre el crecimiento y procesos deletéreos ya que su oxidación produce peróxido de hidrógeno que es una importante molécula señalizadora y que participa en la elongación celular a través de la oxidación de la pared de células vegetales. Los niveles de poliaminas son regulados por enzimas metabólicas que participan en su biosíntesis y catabolismo. Las enzimas SPDS, SPMS y SAMDC participan en la síntesis de las poliaminas de mayor peso molecular. Las Poliaminas Oxidasas dependientes de FAD (PAOs) catalizan la

conversión inversa de espermina, espermidina y putrescina; mientras que las Amino oxidasas dependientes de cobre (CuAOs) la oxidación terminal de las poliaminas.

Previamente observamos una distribución diferencial en polirribosomas de los mensajeros de SAMDC y PAO3 en las muestras tratadas con el inhibidor de TOR. SAMDC contiene dos uORF que se denominan *tiny* y *small* (ver Figura 4a). Estos uORF propician la inhibición traduccional del ORF principal en condiciones de alta disponibilidad de poliaminas, independientemente de la actividad de TOR. Por otro lado, PAO3 presenta un único uORF largo no conservado en secuencia. Para comprobar que TOR participa en la traducción de estas enzimas, se evaluó el efecto de las regiones 5' UTR de transcritos codificantes de enzimas del metabolismo de poliaminas sobre la traducción del reportero de beta-glucuronidasa (GUS) en protoplastos de *A. thaliana*.

Se ensayó la traducción del reportero de la beta-glucuronidasa (GUS) fusionado a la región 5' UTR de CuAO1 de *A. thaliana* o a la de PAO3 de maíz bajo el promotor constitutivo 35S (Figura 8a). AtCuAO1 contiene 3 uORF de tamaño relativamente corto, no conservados en secuencia. ZmPAO3 contiene un uORF largo, no conservado en secuencia. Tanto el último uORF de CuAO1 como el de ZmPAO3 se ubican muy cerca del AUG principal, esta característica junto a la longitud de uORF se han asociado a mayor inhibición de la traducción del AUG principal por uORF no conservados en secuencia (von Arnim *et al*, 2014).

En un primer acercamiento se utilizó una línea mutante de *tor* RNAi para evaluar la traducción de CuAO1 en comparación con la planta silvestre (WT). Posteriormente se evaluó la expresión del reportero en condiciones de inhibición de TOR (AZD-8055) y activación con auxinas (1-NAA) (Schepetilnikov *et al*, 2013). Como control de traducción basal se utilizó el reportero GUS bajo una región 5'UTR corta y eficiente para la traducción y el promotor 35S (pmono-GUS). Como control de transfección se utilizó una construcción similar a pmono-GUS pero que en su lugar contiene a la proteína GFP.

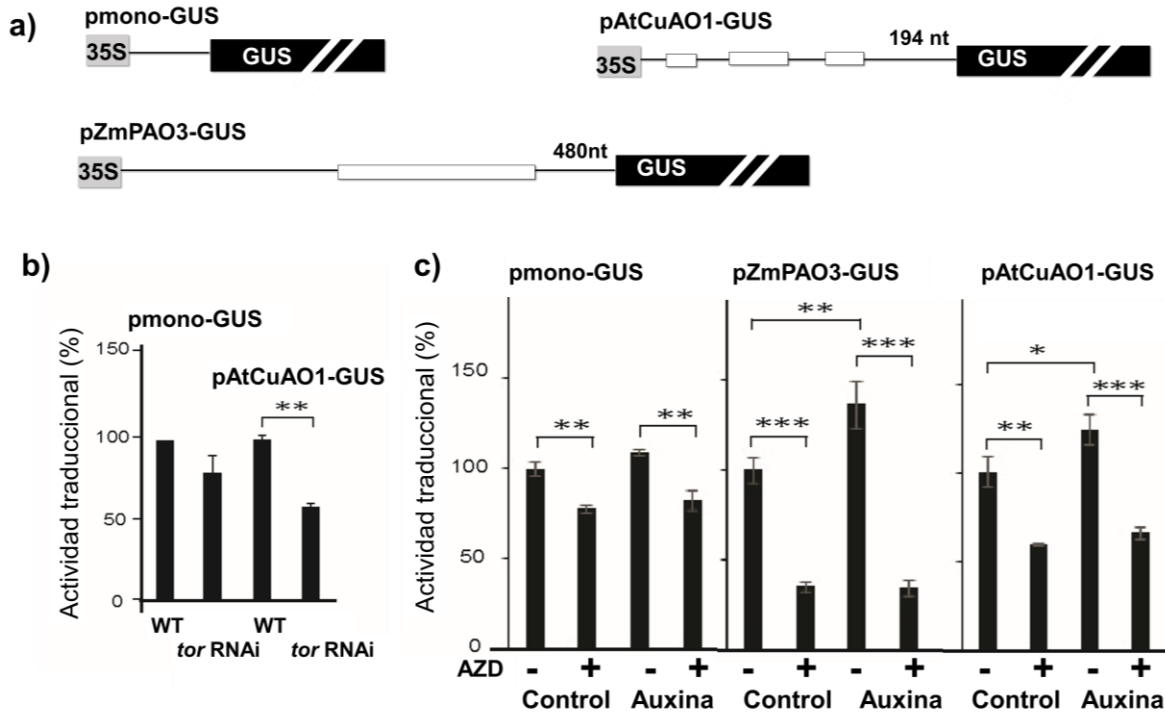


Figura 8. TOR controla la traducción de enzimas del metabolismo de poliaminas que contienen uORF en el 5'UTR a) Representación de las construcciones evaluadas en protoplastos de *A. thaliana*. Se fusionaron las regiones 5'UTR de AtCuAO1 y ZmPAO3 a la proteína reportera GUS bajo el control del promotor constitutivo 35S, se señalan los uORF en la 5'UTR correspondiente. Se utilizó la construcción pmonoGUS como control de traducción eficiente, este reportero contiene una 5'UTR corta que no contiene uORF ni otra secuencia regulatoria o estructuras secundarias. b) Actividad traduccional para las construcciones pmonoGUS (control) y pAtCuAO1 en protoplastos de *A. thaliana* WT (100 %) en comparación con *tor RNAi* 35-7. c) Actividad traduccional para las construcciones pmonoGUS (control), pAtCuAO1 y pZMPAO3 en protoplastos de *A. thaliana* WT en presencia del inhibidor de TOR 0.5 μ M AZD-8055 o en condiciones de activación por auxina, 0.1mM ácido 1-naftalenacético (1-NAA). La actividad traduccional de cada construcción en la condición control (sin AZD ni auxina) se tomó como 100%. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba ANOVA de una vía: $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$.

Se observó que la traducción dirigida por la 5' UTR de AtCuAO1 o de ZmPAO3 depende de manera específica de la actividad de TOR (Figura 8b-c). Por un lado, la actividad del reportero disminuyó notablemente (alrededor de 50-70%) en presencia de AZD-8055 y en los protoplastos de la línea *tor RNAi* (alrededor de 50% para AtCuAO1). Además, la actividad aumentó bajo el tratamiento con la auxina 1-NAA que activa TOR. En contraste, la traducción de la construcción control pmono-GUS se afectó alrededor de 20% en condiciones de inhibición de TOR y no

cambió en presencia de auxina. Este resultado evidencia una mayor sensibilidad ante la inhibición/activación de TOR para la traducción de mRNAs de enzimas del catabolismo de poliaminas que contienen uORF, en comparación con los efectos en un mensajero de UTR corta que no posee uORFs.

IV. DISCUSIÓN

La germinación y establecimiento de plántula son procesos esenciales para asegurar el éxito en el desarrollo posterior y rendimiento de la planta. Por lo tanto, es de vital importancia conocer las vías y mecanismos moleculares que controlan el crecimiento de la plántula en respuesta a diversas señales. La vía de señalización mediada por TOR en eucariontes modula el uso de la energía para el crecimiento en respuesta de la disponibilidad de nutrientes, hormonas y condiciones de estrés. Sin embargo, en plantas, los componentes y reguladores de TOR han sido menos explorados que en células de animales. Especialmente en monocotiledóneas de utilidad agronómica como el maíz, se han descrito escasos blancos de la vía y se conoce muy poco sobre los mecanismos a través de los cuales TOR impacta en el crecimiento y la adaptación a estrés.

En maíz la vía se exploró principalmente en el contexto de la germinación, donde se evidenció que es importante en el control de la síntesis de proteínas (Dinkova *et al*, 2007), la activación del ciclo celular (Díaz-Granados *et al*, 2020) y la respuesta a un factor de crecimiento similar a insulina ZmIGF (García Flores *et al*, 2001). Sin embargo, existe poca información sobre las funciones de TOR en etapas posteriores del desarrollo, así como las señales que regulan su actividad en respuesta a diferentes condiciones ambientales. En el presente trabajo abordamos la importancia de la vía en el control del crecimiento durante el establecimiento temprano de plántula y algunos de sus blancos traduccionales relacionados con la adaptación a señales ambientales, mediante el uso del inhibidor específico para TOR, AZD-8055. Asimismo, describimos su relación con la vía metabólica de poliaminas a través de la cual proponemos que percibe señales en etapas tempranas del desarrollo.

Primeramente, exploramos la actividad de la vía en nuestro modelo de estudio. Encontramos que posterior a la germinación y durante el establecimiento temprano de la plántula se produce mayor activación de la vía TOR (Figura 2). Estos resultados coinciden con los antecedentes que demuestran que la síntesis de la proteína TOR aumenta a partir de las 12 horas de imbibición y tiene un pico a las

48 horas (Agredano-Moreno *et al*, 2007), así como coincide con el aumento de la fosforilación de S6K durante la germinación en ejes embrionarios completos (Reyes de la Cruz *et al*, 2004). Además, aquí observamos que la fosforilación de S6K y TOR aumenta a estos tiempos de imbibición, principalmente en la raíz. Previamente, se demostró que en etapas tempranas del desarrollo el crecimiento de la raíz es más rápido que el del coleoptilo y depende de la activación de la proliferación celular. Además, que la activación de la vía TOR por la insulina en ejes de 24 horas, ocurre de manera preferencial en la raíz (Avila-Alejandre *et al*, 2013). En conjunto, estos hallazgos sugieren que la señalización por TOR es importante en las primeras etapas de crecimiento del eje embrionario, principalmente en la raíz.

Por lo tanto, en el presente trabajo nos planteamos analizar el papel de la vía TOR en el crecimiento. Particularmente, nos enfocamos en etapas posteriores a la germinación, ya que las investigaciones previas se habían concentrado en la etapa de 24 horas de imbibición, en la cual ocurre la protrusión de la radícula de manera concomitante con el aumento del número de células que entran a mitosis y la producción de ribosomas (Dinkova *et al*, 2007; Agredano-Moreno *et al*, 2007; Villa-Hernández *et al*, 2013; Reyes de la Cruz *et al*, 2004). En etapas posteriores comienza el establecimiento de plántula y la transición al crecimiento autotrófico, donde TOR podría jugar un papel fundamental en la adaptación metabólica y la regulación de la síntesis de proteínas específicas que se requieren en esta etapa.

Al utilizar el inhibidor de la actividad cinasa de TOR AZD-8055, que presenta una elevada especificidad por TOR (Liu *et al*, 2012) y que se había utilizado previamente en plantas (Montané & Menand, 2013), encontramos que se afecta el crecimiento de ejes embrionarios de maíz, escindidos de semillas imbibidas por 24 horas, después de tres días de tratamiento (Figura 3a). Esto concuerda con la activación más temprana del crecimiento de la raíz y la mayor sensibilidad de la vía TOR al estímulo de insulina en este tejido (Avila-Alejandre *et al*, 2013).

El crecimiento depende de la producción activa de proteínas. Aunque se conoce que TOR promueve procesos anabólicos como la síntesis de proteínas, su papel en la regulación traduccional en plantas se mantiene bajo investigación ya

que no se han encontrado homólogos de algunos de sus principales blancos en este proceso, como las proteínas 4E-BPs (Schepetilnikov & Ryabova, 2018). Sin embargo, se conserva el papel de la vía en la inducción de la biogénesis ribosomal (Ren *et al*, 2011; Villa-Hernández *et al*, 2013; Dobrenel *et al*, 2016) y el control de la abundancia de polirribosomas (Deprost *et al*, 2007).

En el presente trabajo nos planteamos analizar perfiles polirribosomales en condiciones de inhibición de TOR, como acercamiento a sus funciones en la regulación de la traducción general en maíz. Encontramos que la inhibición de TOR en ejes embrionarios con altas concentraciones de AZD8055 (50 μ M) desencadena una disminución en la abundancia de polirribosomas (Anexo 4a). Es importante señalar que en presencia de 50 μ M AZD-8055 también se produjo una reducción significativa en los niveles totales de transcritos que contiene uORF en la 5' UTR (Anexo 4b). Por lo tanto, hasta el momento no podemos discernir si este efecto a nivel transcripcional podría estar relacionado con la disminución en la abundancia de polirribosomas observada. Entre los transcritos afectados también encontramos los componentes de la ruta S6, S6K y el propio TOR. Esto sugiere una posible retroalimentación dentro de la ruta que impacta en la selectividad traduccional y el crecimiento celular. Notablemente, la disminución en los polirribosomas es menos marcada que en células de animales. Se ha sugerido que esta diferencia podría estar relacionada con mecanismos de regulación novedosos específicos de plantas (Schepetilnikov & Ryabova, 2018).

Entre los mecanismos mediados por TOR en plantas con relación a la traducción, se describió que la vía participa en la síntesis de proteínas cuyos mensajeros contienen uORF, los cuales son más susceptibles a condiciones donde la síntesis de proteínas es baja (Schepetilnikov *et al*, 2013). El control de este tipo de mensajeros es fundamental para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Su afectación conlleva a la desregulación de meristemos, defectos en la iniciación y polaridad de órganos y retraso en el crecimiento en respuesta a nutrientes y luz (Zhou *et al*, 2014). Las mutantes de los componentes del complejo TOR también muestran algunos de estos fenotipos como el retraso en la floración, desarrollo exacerbado de meristemos del brote y defectos en la adaptación metabólica a

cambios en el fotoperiodo (Deprost *et al*, 2007; Moreau *et al*, 2012; Anderson *et al*, 2005). Sin embargo, la relación de estos fenotipos en mutantes del complejo TOR con el control de la expresión de genes que contienen uORF no se ha explorado.

Al utilizar la concentración de 20 μ M de AZD8055 para los ejes embrionarios encontramos varios mensajeros que contienen uORF como nuevos candidatos a blancos traduccionales de TOR (la cantidad de los transcritos no se vio afectada por esta concentración) (Figura 5b-c). Entre estos blancos encontramos proteínas involucradas en el mantenimiento de la homeostasis de la sacarosa, la traducción y la adaptación a estrés. Por ejemplo, la proteína S6K, que es un componente importante de la vía TOR relacionado con la regulación del crecimiento celular y la síntesis de proteínas. La proteína de plantas posee características diferenciales con respecto a la de animales en cuanto a su estructura y regulación (Yaguchi & Kozaki, 2018). Aquí observamos que la vía TOR está involucrada en el control del cargado del transcrito de S6K a polirribosomas. Esto evidencia otro nivel de regulación hacia S6K en maíz, diferente a su fosforilación.

Por otro lado, el mensajero de la enzima TPP también mostró una disminución en su eficiencia traduccional cuando disminuye la actividad de TOR (Figura 5a). Esta enzima cataliza la síntesis de trehalosa a partir de threalosa-6-fosfato y está relacionada con la distribución y mantenimiento de la homeostasis de la sacarosa en la planta (Figuroa & Lunn, 2016). Su actividad es específica de tejido regulando el suministro de azúcar entre tejidos fuente/demanda, lo que permite un uso adecuado de los recursos energéticos para el crecimiento (Oszvald *et al*, 2018). En nuestro modelo, el crecimiento de los ejes embrionarios de maíz de 48 horas de imbibición depende de la movilización y toma de nutrientes desde el endospermo y escutelo de la semilla. Teniendo en cuenta que la trehalosa-6-fosfato es una señal de disponibilidad de azúcares, hipotetizamos que la regulación de TPP mediada por TOR podría señalar la necesidad de nutrientes para el crecimiento rápido y contribuir al mantenimiento del flujo de azúcar hacia el eje embrionario.

Un indicio de que existe un vínculo entre la síntesis de trehalosa y la vía TOR es que en la mutante *lst8-1*, se detectaron niveles más bajos de trehalosa con

respecto a la planta silvestre durante el cambio a fotoperiodo largo (Moreau *et al*, 2012). Además, ambas vías están relacionadas con la respuesta a estrés hídrico donde TOR protege a las plantas adultas de arroz y la trehalosa funciona como osmoprotector (Bakshi *et al*, 2017). Teniendo en cuenta este análisis, resultaría de interés explorar la relación entre ambas vías a través de la regulación traduccional mediada por TOR en maíz.

Además, mediante el uso de perfiles polisomales (Figura 5b) y ensayos de traducción en protoplastos (Figura 8), encontramos que la vía TOR es importante para la traducción de enzimas del metabolismo de poliaminas en *A. thaliana* y maíz, esto sugiere una conexión entre ambas vías. Este vínculo también podría sugerirse dado que ambas son esenciales para la embriogénesis, germinación, respuesta a estrés, crecimiento y proliferación celular (Shi *et al*, 2018; Chen *et al*, 2019). Además, en maíz se reportó la acumulación de poliaminas durante la germinación con un pico al final, durante la emergencia de la radícula (Huang *et al*, 2017).

Por lo tanto, decidimos explorar si la espermidina, una de las poliaminas más abundantes en células vegetales, tenía un papel en la activación de TOR. Encontramos que el tratamiento con Spd induce el crecimiento de plántula (Figura 6) y aumenta la fosforilación de S6 (S240) (Figura 7), para lo cual depende de TOR. Esto sugiere a las poliaminas como moléculas novedosas candidatas a participar en la activación de TOR en respuesta a la germinación y establecimiento de plántula. Sin embargo, no conocemos cómo se produce la activación de TOR por las poliaminas. Se planteó que dado que las poliaminas son moléculas cargadas positivamente se combinan con proteínas y otras biomoléculas regulando la actividad enzimática, la transcripción de genes, entre otras funciones (Chen *et al*, 2019). Una posibilidad es que exista una interacción directa entre la proteína TOR y la molécula de espermidina, lo cual impacta en la actividad cinasa de TOR.

Además, la ruta de poliaminas está muy ligada al metabolismo del nitrógeno y a la abundancia de aminoácidos como la metionina y arginina. Un indicio de lo anterior es que el suministro de nitrógeno aumenta los niveles de arginina y poliaminas en células vegetales (Paschalidis *et al*, 2019). En relación con lo anterior,

la disponibilidad de nitrógeno y aminoácidos es esencial para la actividad de TOR tanto en animales como en plantas (Cao *et al*, 2019; Deprost *et al*, 2007; Saxton & Sabatini, 2017). Sin embargo, al contrario de animales, donde se conoce que la leucina y arginina propician la activación de TOR en el lisosoma a través de GTPasas de la familia Rag, en células vegetales no existen homólogos de estas, por lo que se ha propuesto que existen moléculas sensoras novedosas que transmiten la señalización de aminoácidos hacia TOR en células vegetales (Wu *et al*, 2019). Entre estas moléculas podrían estar las poliaminas o productos de su catabolismo, lo cual es un área de interés para futuras investigaciones.

Dado que encontramos que TOR regula la expresión de enzimas de la síntesis y degradación de poliaminas, hipotetizamos que la vía es importante para mantener los niveles de estas moléculas en la célula. El balance de poliaminas es imprescindible para lograr un equilibrio entre viabilidad celular, respuesta a estrés y procesos dañinos. Por un lado, la espermidina es esencial para el paso de la fase G1 a S del ciclo celular en levadura y su deficiencia es letal en plantas (Tiburcio *et al*, 2014). Además, las poliaminas son importantes en la señalización en estrés y la activación transcripcional de genes de respuesta (Sagor *et al*, 2013). Pero, a pesar de estas funciones protectoras, altas concentraciones de poliaminas o exposición prolongada a estas, pueden conducir a la muerte celular, debido a la acumulación de peróxido y a la afectación de interacciones DNA-proteína y proteína-proteína (Thomas & Thomas, 2001).

Durante la germinación-establecimiento, TOR podría estimular la síntesis de SAMDC y la producción de poliaminas de alto peso molecular importantes para el crecimiento. En el caso de un exceso de poliaminas se produce la inhibición traduccional de SAMDC por un mecanismo independiente de TOR (Hanfrey *et al*, 2005), y la vía TOR podría contribuir a restablecer los niveles óptimos de poliaminas, a través de promover la síntesis de poliamina oxidasas.

Aunque hasta ahora no conocemos si la vía TOR influye en el contenido celular de poliaminas en maíz, un perfil metabólico en mutantes *tor* RNA inducibles en *A. thaliana* mostró cambios en la acumulación de poliaminas después de 6 días

de regulación a la baja de TOR (Caldana *et al*, 2013). La interconexión entre ambas vías podría ser de gran relevancia en la adaptación de la planta ante diferentes condiciones ambientales y durante la transición a etapas de desarrollo tales como la floración. Además, resulta de interés el vínculo de ambas vías durante la respuesta a estrés, donde ambas se necesitan para el mantenimiento del crecimiento en zonas específicas de la planta.

En resumen, en el presente trabajo abordamos la conexión entre la actividad de la vía TOR y el control del crecimiento de maíz a través de un estudio muy puntual de mensajeros con funciones previamente reportadas en la literatura para *A. thaliana*. Sin embargo, no conocemos el impacto de mutantes de sus proteínas en maíz, y la importancia del control mediado por los uORFs en sus funciones. Proponemos que la regulación de mensajeros que contienen uORFs contribuye al control del crecimiento y respuesta a estrés mediado por TOR, y que subyacen a sus funciones conservadas en relación con la regulación del ciclo celular, metabolismo y síntesis de proteínas.

Para comenzar a entender cómo la vía TOR regula una amplia gama de procesos en respuesta a disímiles señales se necesita establecer un perfil global de mRNA y proteínas blanco de la vía. La inactivación corta de TOR a través de inhibidores de su actividad cinasa proporciona blancos directos de la vía. Sin embargo, plantas como maíz y arroz muestran una elevada resistencia a estos compuestos. Se hipotetizó que esto podría deberse a diferencias en su entrada a los tejidos o mecanismos de detoxificación particulares de cultivos en comparación con *A. thaliana* (Montané & Menand, 2013). Por tanto, impera la necesidad de estudiar mutantes de componentes del complejo TOR, inducibles o constitutivos que permitan identificar fenotipos y las funciones de TOR a lo largo del ciclo de vida de la planta de maíz, los cuales podrían sugerir estrategias para el mejoramiento de cultivos.

V. CONCLUSIÓN GENERAL

En el presente trabajo establecimos una conexión entre la actividad de la vía TOR y el control del crecimiento de maíz en respuesta a estímulos de desarrollo y de las moléculas señalizadoras poliaminas. Encontramos que regula la traducción de mensajeros que contienen uORFs, relacionados con la proliferación celular, respuesta a nutrientes y regulación traduccional. Estos procesos están muy ligados al éxito en el establecimiento de plántula y su capacidad para adaptarse a los cambios ambientales.

VI. CONCLUSIONES PARTICULARES

- La actividad de la vía TOR aumenta durante la germinación y etapas tempranas de establecimiento de plántula y es necesaria para el crecimiento del eje embrionario, especialmente a nivel de la raíz primaria.
- TOR participa en la regulación de la abundancia de polirribosomas y la traducción de mensajeros que contienen uORF (S6K, TPP, PAO, SAMDC), relacionados con el control del crecimiento en respuesta a disponibilidad de nutrientes, señales de estrés, entre otros.
- La espermidina estimula la actividad de TOR y el crecimiento temprano de plántula.
- TOR regula la traducción de enzimas que participan en el metabolismo de poliaminas.

VII. PERSPECTIVAS

- Abordar el efecto de la activación e inhibición de TOR en el proteoma de la zona meristemática del eje embrionario de maíz en crecimiento, así como en la regulación de la abundancia de proteínas previamente identificadas como blancos de TOR, tales como TPP, SAMDC, PAO.
- Investigar el papel de TOR en el control de la actividad de enzimas del metabolismo de poliaminas y si interviene en la regulación de los niveles celulares de estos metabolitos, en respuesta a procesos de desarrollo y en condiciones de estrés.
- Determinar la relevancia de la regulación de mRNA que contienen uORF en el control de crecimiento y adaptación a estrés en maíz, y su interrelación con TOR.
- Identificar proteínas blanco de TOR en el proceso de traducción de mRNA que contienen uORF en maíz.

VIII. REFERENCIAS

- Agredano-Moreno LT, Reyes de la Cruz H, Martínez-Castilla LP & Sánchez de Jiménez E (2007) Distinctive expression and functional regulation of the maize (*Zea mays* L.) TOR kinase ortholog. *Mol Biosyst* 3: 794–802
- Anderson GH, Veit B & Hanson MR (2005) The Arabidopsis AtRaptor genes are essential for post-embryonic plant growth. *BMC Biol* 3: 12
- von Arnim AG, Jia Q & Vaughn JN (2014) Regulation of plant translation by upstream open reading frames. *Plant Sci* 214: 1–12
- Avila-Alejandre AX, Espejel F, Paz-Lemus E, Cortés-Barberena E, León-Sánchez FD de, Dinkova TD, Jiménez ES de & Pérez-Flores LJ (2013) Effect of insulin on the cell cycle of germinating maize seeds (*Zea mays* L.). *Seed Science Research* 23: 3–14
- Backer JM (2008) The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem J* 410: 1–17
- Bakshi A, Moin M, Kumar MU, Reddy ABM, Ren M, Datla R, Siddiq EA & Kirti PB (2017) Ectopic expression of Arabidopsis Target of Rapamycin (AtTOR) improves water-use efficiency and yield potential in rice. *Sci Rep* 7: 42835
- Beltrán-Peña E, Aguilar R, Ortíz-López A, Dinkova TD & De Jiménez ES (2002) Auxin stimulates S6 ribosomal protein phosphorylation in maize thereby affecting protein synthesis regulation. *Physiol Plant* 115: 291–297
- Bewley J (1997) Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell* 9: 1055–1066
- Caldana C, Li Y, Leisse A, Zhang Y, Bartholomaeus L, Fernie AR, Willmitzer L & Giavalisco P (2013) Systemic analysis of inducible target of rapamycin mutants reveal a general metabolic switch controlling growth in Arabidopsis thaliana. *Plant J* 73: 897–909
- Cao P, Kim S-J, Xing A, Schenck CA, Liu L, Jiang N, Wang J, Last RL & Brandizzi F (2019) Homeostasis of branched-chain amino acids is critical for the activity of TOR signaling in Arabidopsis. *Elife* 8
- Chen D, Shao Q, Yin L, Younis A & Zheng B (2019) Polyamine Function in Plants: Metabolism, Regulation on Development, and Roles in Abiotic Stress Responses. *Front Plant Sci* 9
- Chiang GG & Abraham RT (2005) Phosphorylation of Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) at Ser-2448 Is Mediated by p70S6 Kinase. *J Biol Chem* 280: 25485–25490
- Couso I, Pérez-Pérez ME, Ford MM, Martínez-Force E, Hicks LM, Umen JG & Crespo JL (2020) Phosphorus Availability Regulates TORC1 Signaling via LST8 in Chlamydomonas. *Plant Cell* 32: 69–80

- Deng K, Dong P, Wang W, Feng L, Xiong F, Wang K, Zhang S, Feng S, Wang B, Zhang J, *et al* (2017) The TOR Pathway Is Involved in Adventitious Root Formation in Arabidopsis and Potato. *Front Plant Sci* 8
- Deprost D, Yao L, Sormani R, Moreau M, Leterreux G, Nicolai M, Bedu M, Robaglia C & Meyer C (2007) The Arabidopsis TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO Rep* 8: 864–870
- Díaz-Granados VH, López-López JM, Flores-Sánchez J, Olguin-Alor R, Bedoya-López A, Dinkova TD, Salazar-Díaz K, Vázquez-Santana S, Vázquez-Ramos JM & Lara-Núñez A (2020) Glucose modulates proliferation in root apical meristems via TOR in maize during germination. *Plant Physiology and Biochemistry* 155: 126–135
- Dinkova TD, Aguilar R & Sánchez de Jiménez E (2000) Expression of maize eukaryotic initiation factor (eIF) iso4E is regulated at the translational level. *Biochem J* 351: 825–831
- Dinkova TD, Cruz HRDL, García-Flores C, Aguilar R, Jiménez-García LF & Jiménez ESD (2007) Dissecting the TOR–S6K signal transduction pathway in maize seedlings: relevance on cell growth regulation. *Physiologia Plantarum* 130: 1–10
- Dinkova TD, Márquez-Velázquez NA, Aguilar R, Lázaro-Mixteco PE & Jiménez ES de (2011) Tight translational control by the initiation factors eIF4E and eIF(iso)4E is required for maize seed germination. *Seed Sci Res* 21: 85–93
- Dobrenel T, Mancera-Martínez E, Forzani C, Azzopardi M, Davanture M, Moreau M, Schepetilnikov M, Chicher J, Langella O, Zivy M, *et al* (2016) The Arabidopsis TOR Kinase Specifically Regulates the Expression of Nuclear Genes Coding for Plastidic Ribosomal Proteins and the Phosphorylation of the Cytosolic Ribosomal Protein S6. *Front Plant Sci* 7: 1611
- Duronio RJ & Xiong Y (2013) Signaling Pathways that Control Cell Proliferation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5
- Enganti R, Cho SK, Toperzer JD, Urquidi-Camacho RA, Cakir OS, Ray AP, Abraham PE, Hettich RL & von Arnim AG (2018) Phosphorylation of Ribosomal Protein RPS6 Integrates Light Signals and Circadian Clock Signals. *Front Plant Sci* 8
- Figueroa CM & Lunn JE (2016) A Tale of Two Sugars: Trehalose 6-Phosphate and Sucrose. *Plant Physiol* 172: 7–27
- Fonseca BD, Graber TG, Hoang HD, González A, Hernández G, Alain T, Swift SL, Weisman R, Meyer C, Robaglia C, *et al* (2016) Evolution of TOR and translation control. In *Evolution of the Protein Synthesis Machinery and Its Regulation*, Hernández, G., Jagus, R. (ed) pp 327–411. Switzerland: Springer International Publishing
- Forzani C, Duarte GT, Van Leene J, Clément G, Huguet S, Paysant-Le-Roux C, Mercier R, De Jaeger G, Leprince A-S & Meyer C (2019) Mutations of the AtYAK1 Kinase Suppress TOR Deficiency in Arabidopsis. *Cell Rep* 27: 3696-3708.e5

- García Flores C, Aguilar R, Reyes de la Cruz H, Albores M & Sánchez de Jiménez E (2001) A maize insulin-like growth factor signals to a transduction pathway that regulates protein synthesis in maize. *Biochem J* 358: 95–100
- Garrocho-Villegas V, Aguilar C R & Sánchez de Jiménez E (2013) Insights into the TOR-S6K signaling pathway in maize (*Zea mays* L.). Pathway activation by effector-receptor interaction. *Biochemistry* 52: 9129–9140
- Guerrero-González M de la L, Ortega-Amaro MA, Juárez-Montiel M & Jiménez-Bremont JF (2016) Arabidopsis Polyamine oxidase-2 uORF is required for downstream translational regulation. *Plant Physiol Biochem* 108: 381–390
- Hanfrey C, Elliott KA, Franceschetti M, Mayer MJ, Illingworth C & Michael AJ (2005) A dual upstream open reading frame-based autoregulatory circuit controlling polyamine-responsive translation. *J Biol Chem* 280: 39229–39237
- Hellens RP, Brown CM, Chisnall MAW, Waterhouse PM & Macknight RC (2016) The Emerging World of Small ORFs. *Trends Plant Sci* 21: 317–328
- Horst S van der, Filipovska T, Hanson J & Smeekens S (2020) Metabolite Control of Translation by Conserved Peptide uORFs: The Ribosome as a Metabolite Multisensor. *Plant Physiology* 182: 110–122
- Huang Y, Lin C, He F, Li Z, Guan Y, Hu Q & Hu J (2017) Exogenous spermidine improves seed germination of sweet corn via involvement in phytohormone interactions, H₂O₂ and relevant gene expression. *BMC Plant Biol* 17: 1
- Iglesias-Fernández R, Barrero-Sicilia C, Carrillo-Barral N, Oñate-Sánchez L & Carbonero P (2013) Arabidopsis thaliana bZIP44: a transcription factor affecting seed germination and expression of the mannanase-encoding gene AtMAN7. *Plant J* 74: 767–780
- Jacinto E & Hall MN (2003) Tor signalling in bugs, brain and brawn. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 117–126
- Jackson RJ, Hellen CUT & Pestova TV (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11: 113–127
- Kim B-H, Cai X, Vaughn JN & von Arnim AG (2007) On the functions of the h subunit of eukaryotic initiation factor 3 in late stages of translation initiation. *Genome Biol* 8: R60
- Kim Y-K, Kim S, Shin Y, Hur Y-S, Kim W-Y, Lee M-S, Cheon C-I & Verma DPS (2014) Ribosomal Protein S6, a Target of Rapamycin, Is Involved in the Regulation of rRNA Genes by Possible Epigenetic Changes in Arabidopsis. *J Biol Chem* 289: 3901–3912
- Lázaro-Mixteco PE & Dinkova TD (2012) Identification of Proteins from Cap-Binding Complexes by Mass Spectrometry During Maize (*Zea mays* L.) Germination. *J MEX CHEM SOC* 56: 36–50
- Lee Y, Munnik T & Lee Y (2010) Plant Phosphatidylinositol 3-Kinase. In *Lipid Signaling in Plants*, Munnik T (ed) pp 95–106. Berlin, Heidelberg: Springer

- Li X, Cai W, Liu Y, Li H, Fu L, Liu Z, Xu L, Liu H, Xu T & Xiong Y (2017) Differential TOR activation and cell proliferation in Arabidopsis root and shoot apices. *Proc Natl Acad Sci USA* 114: 2765–2770
- Liu Q, Kirubakaran S, Hur W, Niepel M, Westover K, Thoreen CC, Wang J, Ni J, Patricelli MP, Vogel K, *et al* (2012) Kinome-wide selectivity profiling of ATP-competitive mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors and characterization of their binding kinetics. *J Biol Chem* 287: 9742–9752
- Luo Y, Xu W, Li G & Cui W (2018) Weighing In on mTOR Complex 2 Signaling: The Expanding Role in Cell Metabolism. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018: e7838647
- Ma XM & Blenis J (2009) Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 307–318
- Martin DE & Hall MN (2005) The expanding TOR signaling network. *Curr Opin Cell Biol* 17: 158–166
- Menand B, Desnos T, Nussaume L, Berger F, Bouchez D, Meyer C & Robaglia C (2002) Expression and disruption of the Arabidopsis TOR (target of rapamycin) gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 6422–6427
- Montané M-H & Menand B (2013) ATP-competitive mTOR kinase inhibitors delay plant growth by triggering early differentiation of meristematic cells but no developmental patterning change. *J Exp Bot* 64: 4361–4374
- Moreau M, Azzopardi M, Clément G, Dobrenel T, Marchive C, Renne C, Martin-Magniette M-L, Taconnat L, Renou J-P, Robaglia C, *et al* (2012) Mutations in the Arabidopsis Homolog of LST8/GβL, a Partner of the Target of Rapamycin Kinase, Impair Plant Growth, Flowering, and Metabolic Adaptation to Long Days. *Plant Cell* 24: 463–481
- Morris DR & Geballe AP (2000) Upstream open reading frames as regulators of mRNA translation. *Mol Cell Biol* 20: 8635–8642
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497.
- Oszvald M, Primavesi LF, Griffiths CA, Cohn J, Basu SS, Nuccio ML & Paul MJ (2018) Trehalose 6-Phosphate Regulates Photosynthesis and Assimilate Partitioning in Reproductive Tissue. *Plant Physiol* 176: 2623–2638
- Paschalidis K, Tsaniklidis G, Wang B-Q, Delis C, Trantas E, Loulakakis K, Makky M, Sarris PF, Ververidis F & Liu J-H (2019) The Interplay among Polyamines and Nitrogen in Plant Stress Responses. *Plants* 8: 315
- Pöyry TAA, Kaminski A & Jackson RJ (2004) What determines whether mammalian ribosomes resume scanning after translation of a short upstream open reading frame? *Genes Dev* 18: 62–75

- Ren M, Qiu S, Venglat P, Xiang D, Feng L, Selvaraj G & Datla R (2011) Target of rapamycin regulates development and ribosomal RNA expression through kinase domain in Arabidopsis. *Plant Physiol* 155: 1367–1382
- Ren M, Venglat P, Qiu S, Feng L, Cao Y, Wang E, Xiang D, Wang J, Alexander D, Chalivendra S, *et al* (2012) Target of rapamycin signaling regulates metabolism, growth, and life span in Arabidopsis. *Plant Cell* 24: 4850–4874
- Rexin D, Meyer C, Robaglia C & Veit B (2015) TOR signalling in plants. *Biochem J* 470: 1–14
- Reyes de la Cruz H, Aguilar R & Sánchez de Jiménez E (2004) Functional characterization of a maize ribosomal S6 protein kinase (ZmS6K), a plant ortholog of metazoan p70(S6K). *Biochemistry* 43: 533–539
- Rodríguez AA, Maiale SJ, Menéndez AB & Ruiz OA (2009) Polyamine oxidase activity contributes to sustain maize leaf elongation under saline stress. *J Exp Bot* 60: 4249–4262
- Sagor GHM, Berberich T, Takahashi Y, Niitsu M & Kusano T (2013) The polyamine spermine protects Arabidopsis from heat stress-induced damage by increasing expression of heat shock-related genes. *Transgenic Res* 22: 595–605
- Sarbassov DD, Ali SM, Kim D-H, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P & Sabatini DM (2004) Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* 14: 1296–1302
- Saxton RA & Sabatini DM (2017) mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 168: 960–976
- Schalm SS & Blenis J (2002) Identification of a conserved motif required for mTOR signaling. *Curr Biol* 12: 632–639
- Schepetilnikov M, Dimitrova M, Mancera-Martínez E, Geldreich A, Keller M & Ryabova LA (2013) TOR and S6K1 promote translation reinitiation of uORF-containing mRNAs via phosphorylation of eIF3h. *EMBO J* 32: 1087–1102
- Schepetilnikov M, Makarian J, Srour O, Geldreich A, Yang Z, Chicher J, Hammann P & Ryabova LA (2017) GTPase ROP2 binds and promotes activation of target of rapamycin, TOR, in response to auxin. *EMBO J* 36: 886–903
- Schepetilnikov M & Ryabova LA (2018) Recent Discoveries on the Role of TOR (Target of Rapamycin) Signaling in Translation in Plants1[OPEN]. *Plant Physiol* 176: 1095–1105
- Scofield S, Jones A & Murray JAH (2014) The plant cell cycle in context. *J Exp Bot* 65: 2557–2562
- Shi L, Wu Y & Sheen J (2018) TOR signaling in plants: conservation and innovation. *Development* 145
- Silva AVM & Dinkova TD (2010) Mecanismos de regulación traduccional mediados por el factor de inicio 4E: Las dos caras de la moneda. *Rev Educ Bioquímica* 29: 82–91

- Tavares MR, Pavan ICB, Amaral CL, Meneguello L, Luchessi AD & Simabuco FM (2015) The S6K protein family in health and disease. *Life Sci* 131: 1–10
- Thomas T & Thomas TJ (2001) Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci* 58: 244–258
- Tiburcio AF, Altabella T, Bitrián M & Alcázar R (2014) The roles of polyamines during the lifespan of plants: from development to stress. *Planta* 240: 1–18
- Tran MK, Schultz CJ & Baumann U (2008) Conserved upstream open reading frames in higher plants. *BMC Genomics* 9: 361
- Villa-Hernández JM, Dinkova TD, Aguilar-Caballero R, Rivera-Cabrera F, Sánchez de Jiménez E & Pérez-Flores LJ (2013) Regulation of ribosome biogenesis in maize embryonic axes during germination. *Biochimie* 95: 1871–1879
- Wang P, Zhao Y, Li Z, Hsu C-C, Liu X, Fu L, Hou Y-J, Du Y, Xie S, Zhang C, *et al* (2018) Reciprocal Regulation of the TOR Kinase and ABA Receptor Balances Plant Growth and Stress Response. *Mol Cell* 69: 100-112.e6
- Wiese A, Elzinga N, Wobbles B & Smeekens S (2004) A Conserved Upstream Open Reading Frame Mediates Sucrose-Induced Repression of Translation. *Plant Cell* 16: 1717–1729
- Williams AJ, Werner-Fraczek J, Chang I-F & Bailey-Serres J (2003) Regulated phosphorylation of 40S ribosomal protein S6 in root tips of maize. *Plant Physiol* 132: 2086–2097
- Wu Y, Shi L, Li L, Fu L, Liu Y, Xiong Y & Sheen J (2019) Integration of nutrient, energy, light, and hormone signalling via TOR in plants. *J Exp Bot* 70: 2227–2238
- Wullschlegel S, Loewith R & Hall MN (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124: 471–484
- Xiong Y, McCormack M, Li L, Hall Q, Xiang C & Sheen J (2013) Glucose-TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature* 496: 181–186
- Yaguchi M & Kozaki A (2018) Plant S6 kinases do not require hydrophobic motif phosphorylation for activity in yeast lacking Ypk3. *FEBS Lett* 592: 610–620
- Yang H, Rudge DG, Koos JD, Vaidialingam B, Yang HJ & Pavletich NP (2013) mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature* 497: 217–223
- Yoo S-D, Cho Y-H & Sheen J (2007) Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat Protoc* 2: 1565–1572
- Zhou F, Roy B, Dunlap JR, Enganti R & von Arnim AG (2014) Translational control of Arabidopsis meristem stability and organogenesis by the eukaryotic translation factor eIF3h. *PLoS One* 9: e95396

Zm00001d006899_rpS6-2	QRLVTPLTLQRKRARIADKKKRIAKKKSEAAEYQKLLAQRLKEQRDRRSESLAKRRSKL	240
Os07g0622100_rpS6-1	QRLVTPLTLQRKRARIADKKKRIAKKKSEAAEYQKLLAQRLKEQRERRSESLAKRRSKL	240
OS03g0390000_rpS6-2	QRLVTPLTLQRKRARIAQKKQRIAKKKSEAAEYQKLLAQRLKEQRERRSESLAKRRSKL	240
NP001001.2_HsrpS6	QRLVTPRVLQHKRRRIALKKQRTKKNKEAAEYAKLLAKRMKEAKEKRQEQIAKRRRLS	236

***** .*: ** ** *: : * : : ** : * ** : * : * : * : * : *

At4g317000_rpS6A	SAAAKPSVTA---	250
At5g10360_rpS6B	SAPAKPVAA---	249
Zm00001d022180_rpS6-1	AAAKASAATSA--	251
Zm00001d006899_rpS6-2	AAAKASAATSA--	251
Os07g0622100_rpS6-1	SAAKAAATTA---	250
OS03g0390000_rpS6-2	AATTA-----	245
NP001001.2_HsrpS6	LRASTSKSESSQK	249

Alineamiento CLUSTAL O(1.2.4) proteína cinasa de S6 (S6K)

AT3G08730_S6K-1	MVSSQRPVP-----NKIQKQYLSISPSNSVLKDDVELEFSDVFGPLPE-----	44
AT3G08720_S6K-2	MVSSQCSVA--NKNQTGKPFQKHLSLISPPKSVLGDNLELQFSDVFGPMPEANS-----	53
Zm00001d022434_S6K-1	MVSSQPSSLTAILAQGNHCPVNIILLPTGPPDVSSDNVEYDFSDVFGSTPVQTPTNLCG	60
Zm00001d047531_S6K-2	MVSSEMTSVTVTRAQGSKLFGRKILLPGGSSDVVPSENVEFDFSDVFGPSAVHTHTEVSV	60
Os07g0680900_S6K-1	-----	0
Os03g0334000_S6K-2	MVSSEISSVTTHAQGPKLFRGKILLPMGPPDVVPSENVEFDFSDVFGPTAVQTPDLSI	60
NP_001258989.1_HsS6K-1	-----	0
NP_003943.2_HsS6K-2	-----	0

AT3G08730_S6K-1	-----EANDIAYDEPAVVYSRSHSLVGPCLSDSHSLKLTKLTLLETEDS-----I	89
AT3G08720_S6K-2	-----EEACDVAYDEPAVVYSRSHSLVGPCLVSHSLKMNKLTLETEDS-----V	99
Zm00001d022434_S6K-1	FGPESPAPTVESNEEFYSDPVVIINRSLSLVGPTSLVSRSLRLSKLSLGKNEGS-----S	115
Zm00001d047531_S6K-2	LTLGSPAPVAESNDEVYNDPDIIVKRSLSLVGPPSSLVSQSLPFSKLTLLHKDKSS-----L	115
Os07g0680900_S6K-1	-----APLAESNEGYYNDPIVIVIKRSLSLVGPTSLVSOQLRLSNLTLNKTGEGS-----S	49
Os03g0334000_S6K-2	LTPDSPAPLTESSEGIYNDPLVIVKRSLSLVGPPSSLVSQSLPLSKLTLHESDSA-----L	115
NP_001258989.1_HsS6K-1	-----MAGVFDIDLQPEDAGSEDEL	21
NP_003943.2_HsS6K-2	-----MAAVFDLLETETEGSEGEPE	21

. . : * . : :

AT3G08730_S6K-1	DL---VECLEGESLKENDDFSGN---DDSDNEKALEGDLVKVSGVVGIDDFEVMKVVGK	142
AT3G08720_S6K-2	DL---VECVGESIKENDEFSGN---DDTDSEKSP---EEVSGVVGIEDFEVLKVVGQ	148
Zm00001d022434_S6K-1	EL---VKCLSEEKEGQQLSDE---DLG-----NAMTEDEGIGLDDLEILKLVGQ	160
Zm00001d047531_S6K-2	EI---SECLSKEKQINQGSFSD---EFD-----DVKKENEGVGLDDFEVLKLVGR	160
Os07g0680900_S6K-1	EP-----AEEKERNLQLSDE---EFD-----NATTENEGIGLDDFEILKLVGQ	90
Os03g0334000_S6K-2	DL---LECTK-EKKSQNEALSDE---ELD-----DTKNENGVVGLDDFEVLKLVGQ	159
NP_001258989.1_HsS6K-1	EEGGQL---NESM--DHGGVGPYELGMEHCEKFEISETSVNRGPEKIRPECFELLRVLGK	76
NP_003943.2_HsS6K-2	ELSPADACPLAEL--RAAGLE---PVGHYEEVELTETSVNVGPERIGPHCFELLRVLGK	75

: . : * . : :

AT3G08730_S6K-1	GAFGKVYQVRKK---ETSEIYAMKVMRKDHIMEKN-HAEYMKAERDILTKIDHPFIVQLK	198
AT3G08720_S6K-2	GAFGKVYQVRKK---DTSEIYAMKVMRKDKIVEKN-HAEYMKAERDILTKIDHPFIVQLK	204
Zm00001d022434_S6K-1	GAFGKVFQVRKK---NTSEIYAMKVMRKDRILEKN-HSEYMKAEREILTKVDHPFIVQLR	216
Zm00001d047531_S6K-2	GAFGKVYQVRKK---GTSEIYAMKVMRKDKVVEKN-HTEYMKAERDILTKVDHPFVQQLR	216
Os07g0680900_S6K-1	GAFGKVFQVRKK---GTSEIYAMKVMRKDKILEKN-HAEYMKAERDILTKVDHPFVQQLR	146
Os03g0334000_S6K-2	GAFGKVFQVRKK---GTSEIYAMKVMRKDKILEKN-HAEYMKAERDILTKVDHPFVQQLR	215
NP_001258989.1_HsS6K-1	GGYGKVFQVRKVTGANTGKIFAMKVLKAMIVRNAKDTAHTKAERNILEVKHPFIVDLI	136
NP_003943.2_HsS6K-2	GGYGKVFQVRKVGQTNLGIYAMKVLKAKIVRNAKDTAHTRAERNILESVKHPFIVELA	135

*.:***:**** .*:****:* :.: : : :***:** ..**:*:

NP_001258989.1_HsS6K-1
NP_003943.2_HsS6K-2

RGASASTANPQTPVEYPMETSGIEQMDVTMSGEASAPLPIRQPNSGPYKKQAFPMISKRP
PSPSLPE-----PTELPLPP-----LLPPPPSTTAPLPIRPPSGTKKSKRGRG----RP

495
480

AT3G08730_S6K-1 ----- 465
AT3G08720_S6K-2 ----- 471
Zm00001d022434_S6K-1 ----- 486
Zm00001d047531_S6K-2 ----- 481
Os07g0680900_S6K-1 ----- 419
Os03g0334000_S6K-2 ----- 480
NP_001258989.1_HsS6K-1 EHLRMNL 502
NP_003943.2_HsS6K-2 GR----- 482

Alineamiento CLUSTAL O(1.2.4) Target of rapamycin (TOR)

```
AT1G50030.1_TOR      MSTSSQSFVAGRPASMASPSQSHRFCG--PSATASGGG---SFDTLNRVIADLCSRG-NP  54
AAW78347.1_ZmTOR     -----MKPSPHFPEIGKKPKDLIAKDH---TFN-----IAAYISSG---  33
XP_015639567.1_OsTOR -----MKPSPHFPEIGKKPKDLIAKEH---GFN-----IAAYISSG---  33
NP_001373429.1_HsTOR -----MLGTGPAAAATTAATTSSNVSVLQQFASGLKSRNEET  36
                        * * : .. : * .

AT1G50030.1_TOR      KEGAPLAFRKHVEEAVRDLSGEASSRFMEQLYDRIANLIESTDVAENMGALRAIDELTEI  114
AAW78347.1_ZmTOR     ADVIAAALRKHVEEAEARDLSGEAFLRMDQLYEQISSLLQSNVDNENLLALRAIDALIDM  93
XP_015639567.1_OsTOR ADVIAAALRKHVEEAEARDLSGEAFLRMEQLYEQICSLQSNVDVAENLLALRAIDALIDM  93
NP_001373429.1_HsTOR RAKAAKELQHYVTMELREMSQEESTRFYDQLNHHIFELVSSSDANERKGGILAIASLIGV  96
                        ::::* *:* * ** :** .* :*. * . : : * * * :

AT1G50030.1_TOR      GFGENATKVSFRFAGYMRTVFEKRDPEILVLASRVLGHARAGGAMTSDEVEFQMKTAFD  174
AAW78347.1_ZmTOR     PFGEGASKVSKFASFLRNVFEVKRDPEILVPASEVLGHLAKAGGAMTAEVERQIKTALG  153
XP_015639567.1_OsTOR PFGEGASKVSKFANFLRTVFEVKRDPEVLVPASAVLGHAKAGGAMTAEVERQIKTALG  153
NP_001373429.1_HsTOR E-GGNATRIGRFANYLRNLLP-SNDPVMEMASKAIGRLAMAGDTFTAAYVEFEVKRALE  154
                        * .*: : : ** : : * * .*: * * : : : * * : * * :

AT1G50030.1_TOR      WLRVDRVEYRRFAAVLILKEMAENASTVFNHVHPEFVDIAIWWALRDPQLQVRERAVEALR  234
AAW78347.1_ZmTOR     WLTGERVEYRRFAAVLILKEMAENASTVFNHVHPEFVDIAIWWALRDPKQAVREKAVEALR  213
XP_015639567.1_OsTOR WLGADRNEGRRHAAVLVLRELAISVPTFFFQVQVFFDNI FVAVWDPKQAIREGAVAALR  213
NP_001373429.1_HsTOR WLGADRNEGRRHAAVLVLRELAISVPTFFFQVQVFFDNI FVAVWDPKQAIREGAVAALR  214
                        ** : * * * * .*: : * * * * . * * : * * * * : * * : * * * *

AT1G50030.1_TOR      ACLRVIEKRETR--WRVQWYYRMFEATQDGLGRNAP-----VHSIHGSL LAVGELLRN  285
AAW78347.1_ZmTOR     ACLHVIEKRETR--WRVQWYYRMCEAAQVGLGRNAS-----VHSIHGSL LAVGELLRN  264
XP_015639567.1_OsTOR ACLHVIEKRETR--WRVQWYYRMCEAAQVGLGKNAS-----VHSIHGSL LAVGELLRN  264
NP_001373429.1_HsTOR ACLILTTQREPKEMQPQWYRHTFEEAEKGFDETLAKEKGMNRDDRIHGALLILNELVRI  274
                        *** : : * * : : * * * : * : : * : . . * * * * * : * * * *

AT1G50030.1_TOR      T----- 286
AAW78347.1_ZmTOR     T----- 265
XP_015639567.1_OsTOR T----- 265
NP_001373429.1_HsTOR SSMEGERLREEMEEITQQQLVHDKYCKDLMGFGTKPRHITPFTSFQAVQPQQSNALVGLL  334
                        :
```


AT1G50030.1_TOR	LPI---DIRLLGALAIEKCRVFAKALHYKEMEFEGPRSKRMDANPVAVVEALIHINNQLH	1358
AAW78347.1_ZmTOR	LPI---DTRLLGALAIEKCRFAKALHYKEMEF EAVCTKKMGANPVTVVESLIHINNQLQ	1344
XP_015639567.1_OsTOR	LPI---DTRLLGALAIEKCRFAKALHYKEMEF EAVCSKMGANPVTVVESLIHINNQLH	1346
NP_001373429.1_HsTOR	LPLRDDNGIVLLGERAAKCRAYAKALHYKELEFQKGP-----TPAILESLSINNKLQ ** : . *** * ** :*****:** : :*:** **:* :	1424
AT1G50030.1_TOR	QHEAAVGILTYAQOHL-DVQLKESWYEKLRWDDALKAYTLKASQTTNPHLVLEATLGQM	1417
AAW78347.1_ZmTOR	QHEAAIGILTYSQONS-EVQLKESWYEKLRHWDEALKAYTVKSSQTSGLQNLDATLGRM	1403
XP_015639567.1_OsTOR	QHEAAIGILTYSQOHL-EVQLKESWYEKLRHWDEALKAYKAKSSQASGLQNLDATLGRM	1405
NP_001373429.1_HsTOR	QPEAAAGVLEYAMKHFGLEIQATWYEKLRHEWEDALVAYDKKMDTNK---DDPELMLGRM * *** *:* * : : : : : :***** :*:* ** * . : **:*	1481
AT1G50030.1_TOR	RCLAALARWEELNNLKKEYWSPAEPSARLEMAPMAAQAANMGEWDQMAEYVSRLDDGDE	1477
AAW78347.1_ZmTOR	RCLAALARWEDLSALCREQWTGAEPSARLEMAPMAANAAMHMGEDHMDYVSRLLDDADE	1463
XP_015639567.1_OsTOR	RCLAALARWEDLSALCREQWTGSEPSARLEMAPMAANAAMHMGEDHMAEYVSRLDDGDE	1465
NP_001373429.1_HsTOR	RCL EALGEWQLHQCCCKWTLVND ETQAKMARMAAAAWGLGQWDSMEEYTCMIPR--- *** ** . * : * * * * : : : : : ** *** ** :*:* * :* . . :	1538
AT1G50030.1_TOR	TKLRGLASPVSSGDGSSNGTFFRAVLLVRRAKYDEAREYVERARKCLATELAALVLESYE	1537
AAW78347.1_ZmTOR	NKLRMLGNATASGDGSSNGAFFRAVLLVRYKKYDDARMYVERARRCLATELAALVLESYE	1523
XP_015639567.1_OsTOR	NKLRILGNATTASGDGSSNGAFFRAVLSVRCKKYEERARVYVERARRCLATELAALVLESYE	1525
NP_001373429.1_HsTOR	-----DTHDGAFYRAVLALHQDLFSLAQQCIDKARDLLDAELTAMAGESYS : : *:*:* ** : : : * : : : ** * :*:* : . ***.	1584
AT1G50030.1_TOR	RAYSNMVRVQQLSELEEVIYYTLPVGNITAEERRALIRNMWTQRIQSKRNVEVWQALL	1597
AAW78347.1_ZmTOR	RAYNNMVRVQQLSELEEVIDYCTLPMESPIADGRRELIRNMWNERIKGTRKNVEVWQALL	1583
XP_015639567.1_OsTOR	RAYNNMVRVQQLSELEEVIDYCTLPMESPIADSRRELIRNMWNERIKGTRKNVEVWQALL	1585
NP_001373429.1_HsTOR	RAYGAMV SCHMLSELEEVIQYKLV-----ERREIIRQIWWERLQGCQRIVEDWQKIL ** . ** : *****:* : * ** :*:* : * : : * : * ** * : *	1637
AT1G50030.1_TOR	AVRALVLPPTEDVETWLKFAFLCRKSGRISQAKSTLLKLLPFDPEVSPENMQYHGPPQVM	1657
AAW78347.1_ZmTOR	AVRELVLPPNEDRDTWIKFAELCWKNGRISQARSTLVKLLQFDPESSPELTLYHAHPQVA	1643
XP_015639567.1_OsTOR	AVRELVLPPNEDRDTWIKFAKLCWKSGRISQAKSTLVKLLQFDPESSPELTLYHGHPQVV	1645
NP_001373429.1_HsTOR	MVRSLVVSPHEDMRTWLKYASLCKGSGRLALAHKTLVLLLVGDPSRQLDHP LPTVHPQVT * * * : * * * * :*:* : * * * : : * : * : * * . * . . : **	1697
AT1G50030.1_TOR	LGYLKYQWSLGEERKRKEAF TKLQILTRELSSVPHSQSDILASMVSSKGANVPLLARVNL	1717
AAW78347.1_ZmTOR	LAYLKYQYAVGDELKRRDAF SKLQELSVQVATTMGNLPGTSANHGTM SNAGVPLIARVYL	1703
XP_015639567.1_OsTOR	LAYLKYQYAVGDELKRRDAFCRLQDLSVQLATATNSYSGTLASQVATSNAGVPLIARVYL	1705
NP_001373429.1_HsTOR	YAYMKNMWSARKI---DAFQHMQHVFQTMQQQA--QHAIATEDQQHKQELHKL MARCFL .*:* : . : : ** : * : : : : : . . . *:* * *	1752
AT1G50030.1_TOR	KLGTWQWALSSGLNDGSIQEIRDAFDKSTCYAPKAWAKAWHTWALFNTAVMSHYISRG--Q	1775
AAW78347.1_ZmTOR	TLGSWKALSPALDDDSIQEILISYHNATLSAKDWGKAWHIWALFNTAVMSRYTFRGRPD	1763
XP_015639567.1_OsTOR	TLASWKRALSPGLDDDSIQEILVSYKNATLNAKDWGKAWHLWALFNTAVMSRYTLRGRPD	1765
NP_001373429.1_HsTOR	KLGEWQLNL-QGINESTIPKVLQYSSAATEHDRSWYKAWHAWVMNFEAVLHYKHQNQAR . * . * * . : : : * : : * . * * * * * : * : * : *	1811
AT1G50030.1_TOR	I-----	1776
AAW78347.1_ZmTOR	I-----	1764
XP_015639567.1_OsTOR	I-----	1766
NP_001373429.1_HsTOR	DEKKLRHASGANITNATTAATTAATATTASTEGSNESEAESTENSPTPSPLQKKVTE	1871

AT1G50030.1_TOR	VMQVLRNKSVMAMMEAFVHDPLINWRLFNFNEVPQLALLGNNNPAPADVEPDEEDED	2371
AAW78347.1_ZmTOR	VMQVLRNRSVMAMMEAFVHDPLINWRLFNFNEVPQVSNYGNVHAHTVVS-----SEEA	2350
XP_015639567.1_OrsTOR	VMQVLRNKSVMAMMEAFVHDPLINWRLFNFNEVPQVTNYGNAHSHTVWN-----SEE-	2351
NP_001373429.1_HsTOR	VMEVLRHKDSVMAVLEAFVYDPLLNWRLMDTNTKGNKRSRTRTDS-----YSAGQSVET	2457
	**.* ** :.* ** :.* ** :.* ** :.* ** :.* ** :.* ** :.* ** :.* **	

AT1G50030.1_TOR	PADIDLPPQRSTREKEILQAV-NMLG---DANEVLNERAVVVMARMSHKLTRGRDFSSA	2427
AAW78347.1_ZmTOR	VANRELMQPRGARERELLQAV-NQLG---DANEVLNERAVAVMARM SDKLTGRDFSSGS	2406
XP_015639567.1_OrsTOR	AANRELMQPPRGARERELLQAV-NQLG---DANEVLNERAVAVMARM SHKLTRGRDFSSGS	2407
NP_001373429.1_HsTOR	LDGVELGEPAHKKTGTTVPESIH SFIGDGLVKPEALNKKAIQIINRVRDKLTGRDFSHDD	2517
	.:* :* : : : : :.* ** :.* ** :.* ** :.* ** :.* ** :.* **	

AT1G50030.1_TOR	IPSN----PIADHNNLLGGDSHEVEHGLSVKVVQVQKLINQATSHENLCQNYVGWCPFW	2481
AAW78347.1_ZmTOR	ALAGAGSSIQH GSEHLASGDARDAQPGLSVKVQVQKLILQATSHENLCQNYVGWCPFW	2464
XP_015639567.1_OrsTOR	SLSGAGSSTQH GNEHLASGDTREVEPGLSVKVVQVQRLILQATSHENLCQNYVGWCPFW	2465
NP_001373429.1_HsTOR	T-----LDVPTQVELLIKQATSHENLCQCYIGWCPFW	2549
	. ** :.* ** :.* ** :.* ** :.* ** :.* ** :.* ** :.* **	

uORF-1 (36nt)

ATGGCCATCCCTATGAAGGCCTCTCCGGTTCCTGA

péptido codificado en uORF-1

MAIPMKASPGS*

uORF-2 (123nt)

ATGTTTCTTGTCTGAACATGAAAAGTTCTCAGGTAATCCGCCGTTGATGAACTGCCTC
CACACCTGCGGCGACAAGAAGACGCTGAAGAAGTGTTTTTCATCGACAAGACAGTAGGC
TAA

péptido codificado en uORF-2

MFPCSEHEKFSGTPPLMNCLHTCGDKKTLKKWFFIDKTVG*

uORF-3 (30nt)

ATGAAAAGTTCTCAGGTAATCCGCCGTTGA

péptido codificado en uORF-3

MKSSQVLRR*

- **PAO3 Zm00001d001883 (480 nt)**

ACCCGTGTCGTGTCTAAACGGACTTCTCATCTCCGCGTCTATTTAAGGCCACTCCTCGCATCGCCTTTAACTCCCATC
CCAGATCAGGATTAGCCGACCACCCGCCGAAGGCCAGAGAGAAATATCTCATCTTCTCTCCACCGGATCGGTTCAATCGA
GAGCGAGGGAGAAAGGGAGGTGGTGCCTCGAGGGGGCCGAGATTTTCCGGTGGAGCCAGATAGGGGTATGAGCTGC
TTTCGCGCACCGCCGCGCTCCGACGTCGCCCCGCCAGGACGGCTCCTCGTCTTCGTCTTCTTCTCTCGATTCCCAT
ACGTACCAGTAGTTTTAATTTAAGTAGTAGTAATTGTAGTAGCAATCTCTTGTAAGACTGCGCTCGCCTTTGCGTGTTTCGT
GGTCTTTTGCCTTCTCGTCCCTCTTCTCTCAATCTCTCTTATTCTTCTCTTCCACGGCGAAGCCGGCGGCTGGT
ATG

uORF-1 (147nt)

ATGAGCTGCTTCGCGCACCGCCGCGCTCCGACGTCGCCCCGCCAGGACGGCTCCTCGTCTTCGTCTTCTTCTCTCTC
GATCCCATACGTACCAGTAGTTTTAATTTAAGTAGTAGTAATTGTAGTAGCAATCTCTTGTAAG

péptido codificado en uORF-1

MSCFAHRRRSVDVARRQDGLLVFVFFLSIPIRTSSFNLSNCSNLL*

- **S6K Zm00001d022434 (228nt)**

GCCCCATCTCCGTCGCGGAGAAGAGGTAATCCGCTCCGCGGAATCCCCGCTGCCTCCTTCCCCAGCGGCCGCATC
CCTCGTCTCTCCTTTGTCTGTTTCAGCTTCTATGAGTTCTGGGAAAGCACTGGCATCCAACATCTCTTATTCAACAGTG
AACAGCAGCATCATCTTCTCTGCCTTTTCGCGGGATACTTGGGAATTCCTGGTGGAAAGCTTCGCTGGAGGAAGCTAAT
TAGTCTTCACTGTAGTAGAAGTTTGGCCTAAGAGTTTGTAGGCTTTCAGCTTCAGAAATG

uORF-1 (126nt)

ATGAGTTCTGGGAAAGCACTGGCATCCAACATCTCTTATTCAACAGTGAACAGCAGCATCATCTTCTCTGCCTTTTCGC
GGGATACTGGGAATTCCTGGTGGAAAGCTTCGCTGGAGGAAGCTAA

péptido codificado en uORF-1

MSSGKALASNISYSTVNSSIIFLCLFAGYLGIPGGSFAGGS*

- **bZIP11 Zm00001d015153; GRMZM2G444748 (972nt)**

CCCCCTGGCCCCCTCCCTTCTCCTTCTCACATCTTCTTTCGTCAGCCGAGATGCGCCAGCATCTCTCCACGGGCAGGA
GGAGGAGGAGCGAGAGGCACAGTGAAGACAGAGAGAGAGCGCGCGGGGGAGCCAGCACAGCACCTACACTAGCTA
GCCACCGCCACCACCACCACCACCACCACCGAATCGGGTGCAGCGCGCGCTGCTCGTCAGCTCCGCGCGCGCGCC

GCTTTATAAAGCCACCCACCCAGCCCCGCCGATCGCCATCGCCATACCCCCGCCTCCGTCCACGGACACACACCCGCCT
TGCCAGCCGGCACCCTCCCGCCTCCCCACCTGTGTCTCCGGCTCGCCGCCGAAAACCCGCCGCGCAGGCCGGTTG
CTCCGATTGGGAGTGCCAATCGGAGCCAACAGCGAGGGAAGCACATGCTGCCGTTTCGTCTAGAGTTCCTCATTGATGTC
GCCTGTGATCAGTGAATCCTCCTCTCGGGTTTATGATCAACTCCACACTCCGGCGCCGCACCCACCTGGTCCAGTCCT
TCTCCGTCGTCTTCTCTACTGGTTCTATGCTTCTCATGAAGTACTCGCCCCATCATAGCCACGCCCTTCTCTCCA
CTCCTCCTCCTCTTTCCCTCCATCTAGTAGCATCTACCGTCTCCTCTTCTCTCCGTGTCAGTCTCTGCCTTCGTC
GTCGCCGTTTCAGTCGTTCCCTAAACCTTCTTAGCTTGCATGCACTTCCCTACTGCTGCTAGCAAAGACCTTTATTACT
AGTGTCAATTAAGTTACGAAAGAAGAAGAAAGAAAATTTGAGGCCGAGAAAAAGACGGCTTTGATCTCTGCTAG
TGTGGTGTGGTAGTGTGCTTCTAGTAAGTAAGCGAGCCAGGGATCAAGAAGCAGAGAGCTGCTCTGTCTTTTGTCT
CTTGCAAGAATG

uORF-1 (54nt)

ATGCGCCAGCATCTCTCCACGGGAGGAGGAGGAGCGAGAGGCACAGTGA

péptido codificado en uORF-1

MRQHLSHGQEEEEEREAQ*

uORF-2 (51nt)

ATGCTGCCGTTTCGTCTAGAGTTCCTCATTGATGTGCGCTGTGATCAGTGA

péptido codificado en uORF-2

MLPFVLEFLIDVACDQ*

CPuORF-3 (126nt)

ATGTCGCCTGTGATCAGTGAGATCCTCCTCTCGGGTTTATGATCAACTCCACACTCCGGCGCCGCACCCACCTGGTCCA
GTCCTTCTCCGTCGTCTTCTCTACTGGTTCTATGCTTCTCATGA

péptido codificado en CPuORF-3

MSPVISEILLSGFMINSTLRRRTHLVQSFVFLYWFYVFS*

uORF-4 (84nt)

ATGTCTTCTCATGAAGTACTCGCCCCATCATAGCCACGCCCTTCTCTCCACTCCTCCTCCTCTTTCCCTTCCAT
CTAG

Péptido codificado en uORF-4

MSSHLLAPIIATPLLSHSSSSSFPSI*

uORF-5 (24nt)

ATGAACTACTCGCCCCATCATAG

Péptido codificado en uORF-5

MNYSPPS*

uORF-6 (42nt)

ATGCACTTCCCTACTGCTGCTAGCAAAGACCTTTATTACTAG

péptido codificado en uORF-6

MHFPTAASKDLYY*

- **S6** Zm00001d02280 (141nt)

TCCCCGCAACTTATATAAAAACCAATCGTCTGTCTCTGCCCCTCTCGTCCAAAACCTAGCCCTCGCGCCGCCGCTC
CTTCGCCACCCAGCGCTCGAGCTCCTCGCTCCCTGCGAGCGCGCCGCAACGCCACCATG

- **eIF4E** Zm00001d041682 (192nt)

ATCCCAACCACCTACC **ATGGGCCTGGCCTGGCCTGGCCCATTTCT** **ATG** **AGAAGAGAGGAGGAGAACTGA**AGGGATCAAAG
GGAAAGGAAACCTAGACAAGCGAGGCGGCCGCCCGCTTCTCCGTCTCCGTCTCCGTCTCCGTCCGCCCGCGTAAAGA
AAAGCCTCTCTCACCACAGCCGCCACGCCATG

uORF-1 (33nt)

ATGGGCCTGGCCTGGCCTGGCCCATTTCTATGA

péptido codificado en uORF-1

MGLAWPGPFL*

uORF-2 (24nt)

ATGAGAAGAGAGGAGGAGAACTGA

péptido codificado en uORF-2

MRREEN*

- **CuAO-1 At1g62810**

AAATAACCTAAACCAATTGC **ATGGTTAGAATAAATTAG** TAAAATATCTCATAG **ATGCGATCAAGCGTACAGGA**
CTTTGAAAAGCGTTAATTATTGTTTATTTCTTATTTAAC **ATGTTGTTTAACTGGACTAAGTAA**TTATTTATCT
CAGCTTTTATAAGTAACTTTCCAAAAGATAGTCAAAAACCTCACTCAATCGATG

uORF-1 (18nt)

ATGGTTAGAATAAATTAG

péptido codificado uORF-1

MVRIN*

uORF-2(36nt)

ATGCGATCAAGCGTACAGGACTTTGAAAAGCGTTAA

péptido codificado en uORF-2

MRSSVQDFEKR*

uORF-3 (24nt)

ATGTTGTTTAACTGGACTAAGTAA

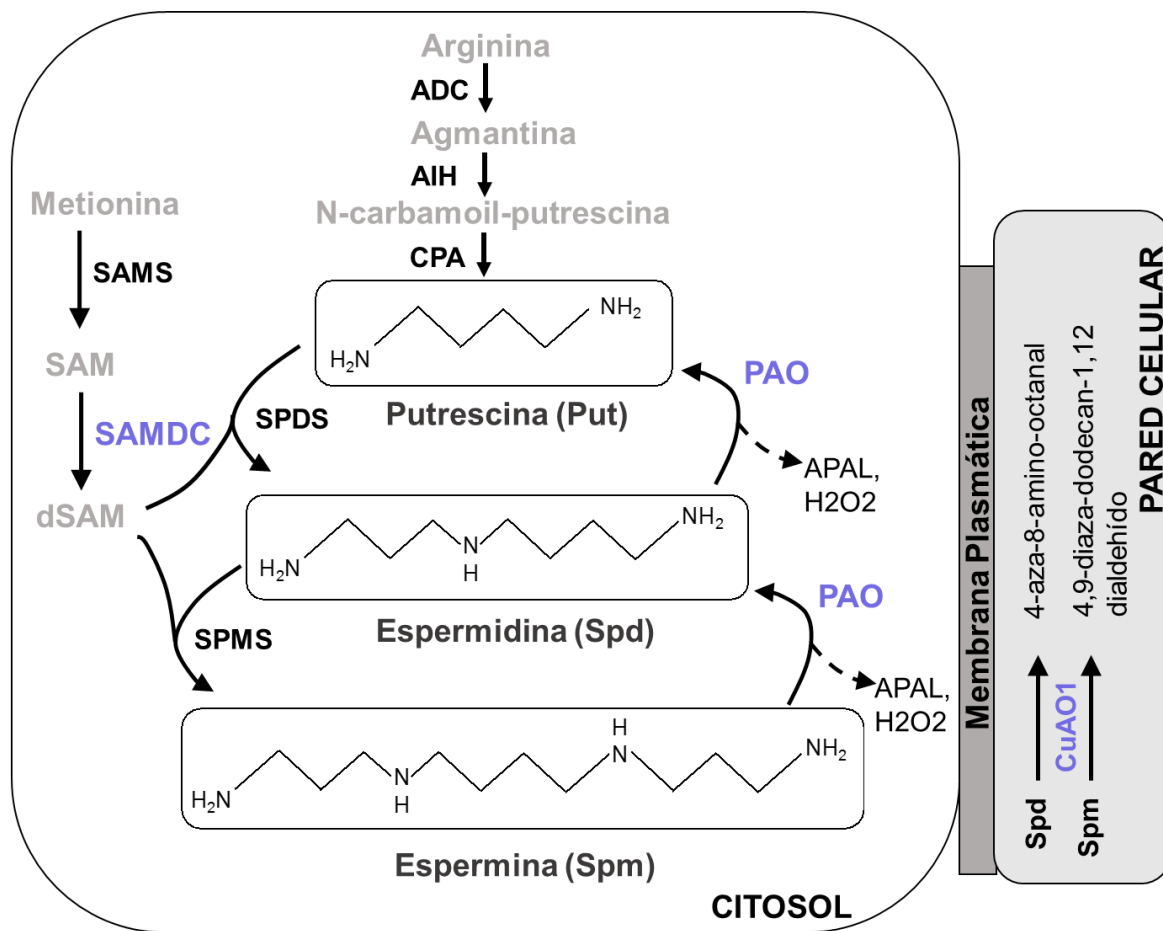
péptido codificado uORF-3

MLFNWTK*

Anexo 3. Ruta metabólica de poliaminas en plantas.

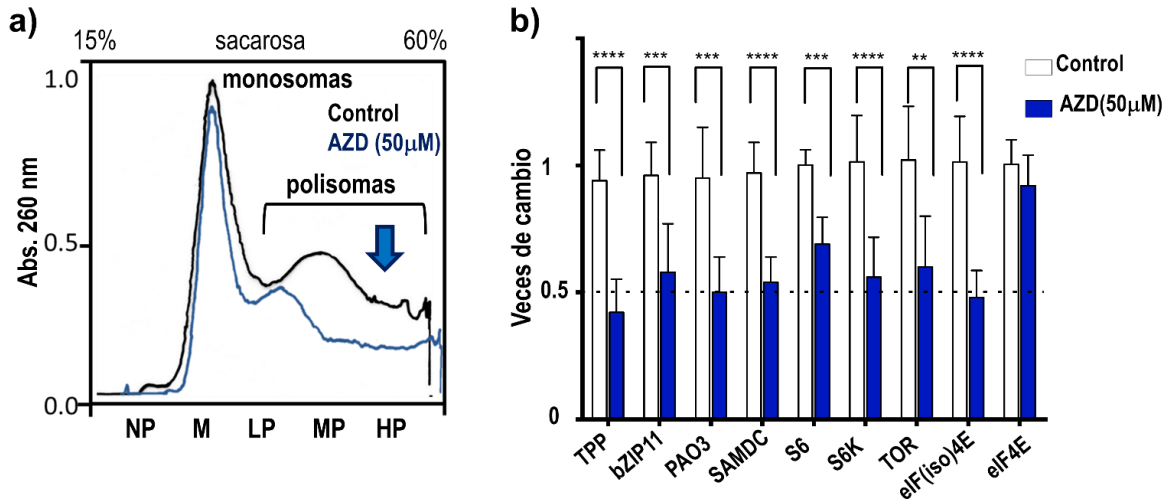
La primera poliamina putrescina se produce a partir de la descarboxilación e hidrólisis de la arginina proveniente del ciclo de la urea en el citosol. Las poliaminas de mayor peso, espermidina y espermina, se sintetizan por adición de grupos isopropilos provenientes de la metionina. Las enzimas que limitan la velocidad de síntesis de las poliaminas son la ADC y SAMDC por lo que la disponibilidad de aminoácidos en la célula es importante para mantener sus niveles. Además, los niveles de poliaminas también dependen de su oxidación, las enzimas oxidasas dependientes de FAD (PAO) degradan las poliaminas de mayor peso molecular en

un proceso denominado *back-conversion* que produce peróxido de hidrógeno. Por otro lado, en el apoplasto ocurre la degradación terminal de estas poliaminas y de la putrescina por enzimas oxidasas dependientes de cobre denominadas CuAO produciéndose también peróxido de hidrógeno y amonio. ADC: Arginina decarboxilasa, AIH: Arginina iminohidrolasa, CPA: N-carbamoyl-putrescina, SAMS: S-adenosil-metionina sintetasa, SAMDC: S-adenosil-metionina descarboxilasa, SPDS: Espermidina sintasa, SPMS: Espermina sintasa. dSAM: S-adenosil metionina descarboxilada, APAL: 3-(aminopropil)4-aminobutanal. En color azul se indican las enzimas analizadas en este trabajo.



Anexo 4. La inhibición de TOR disminuye la abundancia de polirribosomas y los niveles totales de transcritos blanco.

a) Efecto de la inhibición de TOR en la abundancia de polirribosomas cuando se usa una alta concentración de AZD-8055 (50 μ M). Los ejes embrionarios se aislaron de la semilla y se incubaron durante 3 horas con AZD8055 (para un total de 48 horas), se utilizó la cantidad de DMSO (solvente) correspondiente para la condición control, sin inhibidor. NP: no polisomas, M: monosomas, LP: polisomas ligeros, MP: polisomas medios, HP: polisomas pesados. b) Reducción en los niveles totales de transcritos candidatos, evaluados en las mismas condiciones de a) por RT-qPCR en 3 réplicas biológicas. Se utilizó actina como gen constitutivo en el experimento. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba t-Student: $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$, $p < 0,0001^{****}$.



Anexo 5. Publicaciones derivadas del trabajo de tesis

1 **TOR senses and regulates spermidine metabolism during seedling establishment and**
2 **growth in maize and Arabidopsis**

3 *Kenia Salazar-Díaz^{1,3}, Yihan Dong^{2,3}, Csaba Papdi², Ernesto Miguel Ferruzca-Rubio¹, Grecia*

4 *Olea-Badillo¹, Lyubov A. Ryabova^{2,4*}, Tzvetanka D. Dinkova^{1*}*

5

6 ¹ Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de

7 México, Ciudad de México, 04510, México

8 ² Institut de biologie moléculaire des plantes, CNRS, Université de Strasbourg, 67084,

9 Strasbourg, France

10 ³ these authors contributed equally

11 ⁴ Lead contact

12 *Correspondence: cesy@unam.mx and lyuba.ryabova@ibmp-cnrs.unistra.fr

13

14 **SUMMARY**

15 Spermidine (Spd) is a nitrogen sink and signaling molecule that plays pivotal roles in
16 eukaryotic cell growth and must be finetuned to meet various energy demands. In eukaryotes,
17 Target of Rapamycin (TOR) is a central nutrient sensor, especially N, and a master-regulator of
18 growth and development. Here, we discovered that Spd stimulates the growth of maize and
19 Arabidopsis seedlings through TOR signaling. Inhibition of Spd biosynthesis led to TOR
20 inactivation and growth defects. Furthermore, disruption of a TOR complex partner
21 RAPTOR1B abolished seedling growth stimulation by Spd. Strikingly, TOR activated by Spd
22 promotes translation of key metabolic enzyme uORF-containing mRNAs, *PAO* and *CuAO* by
23 facilitating translation reinitiation and providing feedback to polyamine metabolism and TOR
24 activation. The Spd-TOR relay protected young-age seedlings of maize from expeditious stress
25 heat shock. Our results demonstrate Spd is an upstream effector of TOR kinase in *planta* and
26 provide its potential application for crop protection.

27

28 Keywords: heat stress tolerance, polyamine biosynthesis, polyamine oxidation, spermidine
29 degradation enzymes, TORC1 signalling, translation reinitiation, upstream open reading frames
30 (uORFs)

31

32 INTRODUCTION

33 Seedling establishment is a foremost phase in the plant life cycle which determines the vegetative
34 growth and agricultural yields. Global climate change leads to unpredictable challenges at the
35 seedling stage of crops, which impacts the further growth, development and the final
36 productivity. It is an important task to understand the molecular regulatory networks during
37 seedling establishment facing expeditious stresses. Polyamines are pivotal molecules for plant
38 development and stress adaptation in eukaryotes and have shown a great potential for crop
39 protection (Tiburcio et al., 2014). One major type of polyamines, spermidine (Spd), is essential
40 for embryogenesis, cell division and protein synthesis in both, plants and animals. In the monocot
41 crop plant maize, polyamines increase in seedlings in response to salt stress and their homeostasis
42 is regulated by the concerted action of biosynthetic and oxidation enzymes (Jiménez-Bremont et
43 al., 2007; Rodríguez et al., 2009). However, it remains obscure how Spd is sensed and regulates
44 growth and stress responses.

45 Target of rapamycin (TOR) is a highly conserved serine/threonine protein kinase that
46 coordinates cellular metabolism with nutrient and energy sufficiency in eukaryotes. In mammals,
47 mTOR promotes anabolic and inhibits catabolic processes in response to growth factors,
48 hormones, energy and various environmental signals via two complexes, mTORC1 and
49 mTORC2 (Liu and Sabatini, 2020). In plants, only TORC1 is conserved (Ryabova et al., 2019)
50 and knock out mutations of the *TOR* gene in *Arabidopsis* caused embryo lethality (Menand et
51 al., 2002). Up to now, two core subunits of TORC1, RAPTOR (regulatory associated protein of
52 TOR) and LST8 (Lethal with Sec13 protein 8), have been described in *Arabidopsis*. Both TOR
53 partners are encoded by two genes (RAPTOR1A/RAPTOR1B and LST8-1/LST8-2, respectively
54 (Anderson et al., 2005; Deprost et al., 2005; Moreau et al., 2012). The use of TOR-specific
55 inhibitors and *tor RNAi* inducible mutants in *Arabidopsis* revealed its strong relevance for growth
56 control (Deprost et al., 2007; Montané and Menand, 2013; Ren et al., 2012). TOR inactivation

57 decreases S6K phosphorylation at the TOR-responsive hydrophobic motif residue T449 position
58 equivalent to their animal counterparts (Schepetilnikov et al., 2011; Xiong and Sheen, 2012). The
59 40S ribosomal protein S6 (rpS6) was identified as major phosphorylation target of the TOR-
60 S6K1 signaling axis among ribosomal proteins in mammals and plants (Turck et al., 2004). This
61 pathway also operates during maize germination in response to the insulin/IGF to regulate
62 polysomal loading of mRNAs (Dinkova et al., 2007).

63 Among all eukaryotes, TOR is a central nutrient sensor of nitrogen source and amino acid
64 availability (Cao et al., 2019; Dong et al., 2017; Saxton and Sabatini, 2017). Since spermidine is
65 a significant nitrogen sink and signaling molecule, it is intriguing to know whether TOR is
66 affected by Spd availability. In animals, mTOR senses a precursor for Spd biosynthesis, S-
67 adenosyl-methionine (SAM), through SAMTOR (Gu et al., 2017). Interestingly, to form Spd,
68 SAM is catalyzed by decarboxylase SAMDC/AMD1 whose stability is also controlled by mTOR
69 (Zabala-Letona et al., 2017).

70 In plants, polyamine metabolism is largely controlled by the metabolic genes that harbour
71 upstream open reading frames (uORFs) within their leader regions (von Arnim et al., 2014).
72 uORFs located within the leaders of up to 40% of total mRNAs in *Arabidopsis* are considered as
73 prevalent translation repressors that are under the control of TOR (Schepetilnikov et al., 2013).
74 When TOR is activated by auxin, the ROP2-TOR-S6K1 signaling axis promotes phosphorylation
75 of eukaryotic translation initiation factor 3 subunit h (eIF3h) and thus translation reinitiation of
76 uORF-mRNAs (Schepetilnikov et al., 2013, 2017).

77 Up to now, the relationship between the TOR signaling pathway and polyamines remains
78 unexplored in *planta*. Here we used the monocot crop plant maize and the model organism
79 *Arabidopsis thaliana* to show an important role of Spd-TOR relay in early seedling
80 establishment. We discovered that Spd activates TOR and active TOR facilitates production of
81 polyamine metabolic enzymes through translation reinitiation. According to this, Spd acts as an

82 upstream effector of TOR and provides a feedback-regulation of Spd metabolism by TOR during
83 early seedling growth. We suggest that Spd employs TOR signaling for protection of crop
84 seedlings from heat stress.

85

86 **RESULTS**

87 **Spermidine impacts growth in maize through active TOR that accumulates during earlier** 88 **stages of seedling establishment**

89 Polyamines are nitrogenous signaling molecules, which can impact on germination and growth
90 and thus may collaborate with TOR that is a central nutrient sensor. Here, we aimed to test
91 whether polyamines can mediate their effect on growth through the TOR signaling pathway. We
92 selected Spd, one of the most abundant polyamines in plants, which, in contrast to spermine (Imai
93 et al., 2004a), is essential for survival in *Arabidopsis* (Imai et al., 2004b).

94 To determine first how TOR is activated during earlier seedling stages in maize, we tested
95 the ZmTOR activation status using phospho-specific antibodies, anti-(mTOR-S2448-P), as well
96 as the downstream target S6K1 phosphorylation status at the *At*TOR specific hydrophobic motif
97 residue T449 and phosphorylation of rpS6 at the S6K1-dependent residue Ser240 (S240) in maize
98 seeds before and after 24h or 48h of imbibition (**Figure 1A**). mTOR S2448 appears to be
99 conserved in maize and *Arabidopsis* TOR and corresponds to S2424 in *Arabidopsis* TOR
100 (Agredano-Moreno et al., 2007; Schepetilnikov et al., 2013). Except in dry seeds, we observed
101 phosphorylation of TOR at 24 h of seed imbibition, which was further increased at 48 h (Figure
102 1A). Both S6K1 and RPS6 were found in dry seeds, but no detectable phosphorylation was found
103 at the tested residues. However, S6K1 and RPS6 were found phosphorylated in extracts prepared
104 from isolated axes and roots, after 24 h imbibed conditions, confirming the active status of TOR
105 after 24 h of seed imbibition (**Figure 1A**). Although, we detected *TOR*, *Lst8*, *Raptor*, *S6K1*, *RPS6*
106 transcripts in maize seeds, only the *TOR*, *S6K1* and *RPS6* transcript levels were further increased

107 during seed imbibition (**Figure S1** and **Table S1**). Albeit S2448 phosphorylation has been used
108 to measure TOR activation in plants, recent reports exposed limitations on its use in mammals
109 (Casagrande Figueiredo et al., 2017). Thus, measurements of TOR phosphorylation using anti-
110 (mTOR-S2448-P) were excluded from further analysis, and we employed S6K1 and RPS6
111 phosphorylation as valuable readouts for activation of the TOR pathway. We next tested whether
112 TOR inactivation impairs maize seedling growth specifically. The embryonic axes preimbibed
113 for 45 h were treated with a second generation TOR inhibitor AZD-8055 (Montané and Menand,
114 2013; Schepetilnikov et al., 2017) for 3 h (**Figure 1B**). The level of TOR activity observed at 48
115 h was reduced by AZD-8055 in a dose-dependent manner as manifested by the decrease in
116 downstream S6K1 and RPS6 phosphorylation levels (**Figure 1B**). To demonstrate that TOR is
117 required for growth during the earlier stage of seedling establishment, we dissected embryonic
118 axes from maize germinated seeds and performed a 3-day treatment with different AZD-8055
119 concentrations. Our results showed that TOR inactivation led to a significant decrease in
120 embryonic axe length at 20 μ M AZD8055, while the root elongation was significantly affected
121 even at 10 μ M AZD-8055 (**Figure 1C**).

122 To test the relationship between TOR and Spd pathways, we first added the polyamine
123 Spd to non-germinated seeds (**Figure S2**), since Spd was shown to activate germination rate
124 (Huang et al., 2017). We observed a tendency to greater root length at 48 h, although there was
125 a high sample variability during germination (**Figure S2A–S2B**). However, Spd-treated
126 seedling growth was highly sensitive to AZD-8055 (50 μ M), indicating that TOR active status
127 is important for Spd-treated maize. Higher AZD-8055 concentration was applied to whole
128 seeds as compared to dissected embryonic axes (see **STAR Methods**). A longer incubation
129 period for Spd-treated seedlings, led to a significant effect of Spd on root growth (**Figure S2B**,
130 right panel). Strikingly, the enhanced growth of Spd-treated seedlings was fully abolished by
131 AZD-8055 reaching the level corresponding to mock seedlings. Spd application resulted in an

132 increase of S6K phosphorylation, that was nearly abolished upon both Spd and AZD-8055
133 application (**Figure S2C**).

134 To further verify our hypothesis, we modified our experimental set up and used the 24 h
135 post-germinated seeds to perform 0.2 mM Spd treatment in the absence or the presence of 50
136 μ M AZD-8055 for the next 48 h of seedling growth. The results showed that Spd soaking
137 significantly increased shoot length of post-germinated seeds at 48 h of treatment, while there
138 was practically no difference in root length between the mock and Spd treated seedlings
139 (**Figure 1D**). Strikingly, AZD-8055 application impaired growth of both, mock and Spd-treated
140 seedlings. We also analyzed the phosphorylation of rpS6 at S6K1-dependent Ser240 (S240) to
141 compare TOR responses to AZD-8055 treatment (Dobrenel et al., 2016). Given that Spd
142 treatment increased rpS6 phosphorylation at S6K1-sensitive S240 in AZD-8055 dependent
143 manner (**Figure 1E**), we concluded that this polyamine positive effect on post-germinated
144 seedling growth might depend on ZmTOR pathway activation. These data further strengthen
145 our hypothesis that polyamine signaling requires TOR activity to impact on the early post-
146 germination seedling growth.

147 To further test the specificity of Spd on TOR activation and root elongation, we used
148 the cyclohexylamine (CHA) to inhibit Spd synthesis in the 24 h post-germinated seeds during
149 48 h. As expected, 1 mM CHA was sufficient to significantly reduce root length (**Figure 1F**)
150 and resulted in a significant decrease in both, S6K and rpS6 phosphorylation (**Figure 1G**).
151 Strikingly, seedlings pre-treated with 1 mM CHA and 0.2 mM Spd during 48 h nearly restored
152 the Spd effect on root growth. As expected, application of Spd with CHA was sufficient to
153 restore S6K and rpS6 phosphorylation (**Figure 1G**). Thus, we concluded that Spd can induce
154 TOR activation and earlier seedling growth in AZD-8055 and CHA sensitive manner.

155

156 **Spermidine can activate TOR signaling in *Arabidopsis***

157 To gain more genetic insight into the Spd-TOR relay, we next investigated the effect of
158 exogenous Spd on TOR activation and seedling growth in *Arabidopsis*. Importantly, Spd
159 significantly increased *Arabidopsis* seedling growth at 0.01 mM concentration and further
160 promoted root elongation at 0.1 mM concentration (**Figure 2A**). In addition, TOR inactivation
161 by AZD-8055 caused a decrease in root elongation of Spd-treated seedlings, but at lesser
162 extend as compared with that in mock seedlings, likely due to higher levels of active TOR in
163 Spd-treated seedlings. We also performed immunoblot analysis of TOR-dependent
164 phosphorylation of S6K1 at conserved TOR specific hydrophobic motif residue T449 under
165 different exogenous Spd concentrations. S6K is a TOR downstream target and its canonical
166 signaling output marker in mammals and plants (Schepetilnikov et al., 2011; Xiong and Sheen,
167 2012). As expected, the level of S6K1 phosphorylation at T449 in Spd-treated seedlings was
168 increased as compared with mock seedlings about 1.3 and 1.7 -fold by 0.01 and 0.1 mM Spd,
169 respectively, while decreased by AZD-8055 treatment in all tested conditions (**Figure 2B**).
170 Worth noting that growth arrest caused by TOR inactivation in the 0.1 mM Spd-containing
171 media was less pronounced and S6K1 phosphorylation levels remained more than two-fold
172 higher than in the case of using inhibitor alone (**Figure 2B**). This suggests that 0.1 mM Spd-
173 treated seedlings showing higher levels of active TOR are less sensitive to AZD-8055
174 inhibition and supports Spd as an upstream effector of TOR in promoting plant growth.

175 The fact that Spd promotes phosphorylation of S6K1 in AZD-8055 sensitive manner
176 suggests that Spd acts through the TORC1 complex for its downstream effects. Given that
177 Raptor is required to recruit substrates of TORC1 for their phosphorylation by TOR, we tested
178 whether RAPTOR1B knockout line *rap78* (Kravchenko et al., 2015) would support increased
179 growth in response to Spd. *rap78* mutants have their root growth decreased as expected (Fig.
180 2C, left panel). Although WT *Arabidopsis* seedlings have their growth accelerated by two-fold
181 when grown on medium containing 0.1 mM Spd, *rap78* mutant plants lost their capacity to

182 respond to Spd, indicating that Spd signals through the TORC1 complex. These data strongly
183 suggest that Spd functions upstream of TOR and requires RAPTOR1B to activate TOR-S6K1
184 signaling relay and thus seedling growth.

185

186 **TOR activates translation reinitiation of uORF-containing *CuAO1* and *PAO3* mRNAs**

187 In eukaryotes polyamine levels are regulated through many metabolic enzymes encoded by
188 mRNAs that harbour upstream open reading frames (uORFs) within their leader regions. For
189 example, S-adenosyl methionine decarboxylases (SAMDCs) required for polyamine
190 biosynthesis, copper-dependent amine oxidases (CuAOs) and FAD-dependent polyamine
191 oxidases (PAOs) that catalyze terminal oxidation and back conversion of polyamines,
192 respectively, are encoded by uORF-containing mRNAs (**Figure S3 and Tables S2–S3**). It was
193 shown that TOR, when activated by the phytohormone auxin, overcomes the inhibitory
194 pressure of uORFs and promotes translation of uORF-containing mRNAs (Schepetilnikov et
195 al., 2013; 2017).

196 To shed light on the role of TOR in translation reinitiation in maize, we compared
197 polysomal association of uORF-containing endogenous mRNAs such as *PAO3* and *SAMDC* in
198 extracts prepared from the 48 h dissected embryonic axes, treated or not with 20 μ M AZD-
199 8055 for 3 h, by employing sucrose density gradients (**Figure 3A**). Comparative polysome
200 profile analysis in WT and AZD-8055-treated seedling-derived extracts suggested that 20 μ M
201 AZD-8055 treatment partially reduced the polysome/monosome ratio in WT extracts by about
202 20% (**Figure 3A**, left panel). *PAO3* mRNA, preferentially detected only in light polysomes of
203 mock plants, was shifted to the fraction of monosomes in response to AZD-8055 treatment,
204 again uncovering translation suppression by the TOR inhibitor (**Figure 3A**, right panel). The
205 results showed a shift in *SAMDC* mRNA from heavy to the medium polysomal fractions,
206 suggesting inhibition of translation by uORFs upon TOR inactivation. It should be noted that

207 *SAMDC* 5'UTRs contain the so-called Conserved Peptide uORF (CPuORF; see **Figure S3**),
208 which encodes a peptide causing ribosome stalling at the stop codon of CP uORF in the
209 presence of high Spd levels in mammals and plants (Hanfrey et al., 2005; Hill and Morris,
210 1992; Ryabova and Hohn, 2000). However, under normal level of polyamines, the CPuORF2 is
211 often bypassed by ribosomes that translate uORF1. In contrast, distribution along the sucrose
212 gradient of uORF-less mRNAs—*rpS6* and *eIF4E* (*eukaryotic translation initiation factor 4E*)—
213 was either not affected or slightly increased in LP by AZD-8055. No changes in mRNA
214 abundances were observed for any of the analysed transcripts under 20 μ M AZD-8055
215 application (**Figure 3B**).

216 To further validate that the Spd-TOR relay regulates growth via promoting synthesis of
217 proteins from uORF-mRNAs, we tested whether TOR activation by Spd or auxin impacts
218 translation reinitiation in *Arabidopsis* mesophyll protoplasts. In a first experimental set up,
219 protoplasts derived from WT or TOR-deficient 35-7 RNAi plants (Deprost et al., 2007) were
220 transfected with reporter gene harbouring a single beta-glucuronidase (*GUS*) construct placed
221 downstream of a short unstructured leader (*pmonoGUS*) or *AtCuAO1* 5'UTR (*pAtCuAO1-GUS*)
222 and *pmonoGFP*, containing a single *GFP* ORF (control for transformation efficiency; **Figure**
223 **3C**). As expected, reinitiation of *AtCuAO1-GUS* was about 40% less efficient in TOR-deficient
224 as compared with WT protoplasts, while *monoGUS* expression in 35-7 protoplasts was only
225 20% less efficient than in WT (**Figure 3D**).

226 Next we tested the effect of Spd and auxin on *pZmPAO3-GUS* and *pAtCuAO1-GUS*
227 expression in the absence or presence of AZD-8055 using the same experimental set up. In
228 these experiments, we did not include maize *SAMDC* 5' UTR to avoid any repression of *GUS*
229 ORF translation by the product of CPuORF2 at increased Spd levels. In contrast to the
230 *pmonoGUS* uORF-less leader, the *ZmPAO3* leader fused to the *GUS* ORF in its authentic
231 initiation context (*pZmPAO3-GUS*) reduced *GUS* ORF translation by about 7-fold and

232 *AtCuAOI* leader — by about 14-fold, suggesting that uORFs become nearly reinitiation non-
233 permissive in mock conditions. This low level of *pZmPAO3-GUS* expression was significantly
234 increased by auxin and further enhanced by Spd. Importantly, the protoplast response to both
235 auxin and Spd was abolished by AZD-8055 (**Figure 3E**). Three short uORFs of *AtCuAOI*
236 leader were less responsive to either auxin or Spd, but their positive effects were abolished by
237 AZD-8055. We noted that AZD-8055 was efficient in suppressing uORF-containing mRNA
238 expression by at least 50% in mock protoplasts while *pmonoGUS* expression decreased to a
239 lesser extent. The levels of *GUS*-containing RNAs were unaltered during protoplast incubations
240 (data not shown). Next we assayed whether the Spd-TOR signaling axis has a general role in
241 promoting translation reinitiation of uORF-mRNAs that do not encode polyamine biogenesis-
242 related proteins. As expected, both auxin and Spd can increase translation of *auxin response*
243 *factor 3*, *ARF3* mRNA in AZD-8055-sensitive manner (**Figure 3E**), indicating that TOR
244 activated by either auxin or Spd has a general effect on reinitiation after uORF translation
245 (Schepetilnikov et al., 2013).

246 Our results show that Spd activates translation of *CuAOI* and *PAO3* acting through
247 TOR. Thus, the Spd-TOR relay can impact production of polyamine biosynthesis-related
248 enzymes, if these are encoded by uORF-containing mRNAs. The data presented above indicate
249 that TOR governs production of SAMDC and polyamine oxidases in an AZD-sensitive manner.
250 Hence, uORF control is required to balance and maintain proper polyamine levels for growth
251 and stress responses.

252

253 **The Spd-TOR signaling axis attenuates heat stress susceptibility of maize**

254 Polyamines and especially Spd have been implicated in protecting rice and wheat seedlings
255 from heat-induced damage (Jing et al., 2020; Mostofa et al., 2014; Tang et al., 2018). However,
256 how Spd can alleviate the consequences of high temperature remain to be investigated. Given

257 increasing climate-induced yield losses for many crops each year, we attempted to further
258 investigate a capacity of the Spd-TOR signaling relay to alleviate the heat injury of maize
259 seedlings at earlier stages of their establishment and growth.

260 To evaluate TOR dependency, maize seeds imbibed for 24 h were soaked without or
261 with 0.2 mM Spd either in the absence or the presence of AZD-8055 for 48 h at ambient
262 temperature 28 °C. Then plantlets were either further maintained at 28 °C or transferred to 42
263 °C for additional 72 h (**Figure 4**). Although treatment with 0.2 mM Spd of seedlings growing
264 for 6 days at normal temperature did not show great impact on growth (**Figure 4A**), shoot and
265 root length were highly sensitive to AZD-8055 and decreased significantly, indicating active
266 TOR state at 28 °C. Plantlets grown under heat stress showed significant damage and strong
267 delay in development as compared to seedlings grown at normal temperature (**Figure 4B**). In
268 contrast, Spd treatment positively affected growth by significantly improving root and shoot
269 elongation (**Figure 4B**, Spd). Strikingly, the protective effect of Spd was abolished in the
270 presence of AZD-8055, confirming that the connection between polyamines and TOR operates
271 under stress conditions.

272

273 **DISCUSSION**

274 Until now it was unclear how polyamine levels are sensed and participate in seed germination
275 and growth. However, genetic evidence suggests that spermidine, but not spermine (Imai et al.,
276 2004a), plays an essential role in plant embryo development, given that disruption of both
277 genes encoding spermidine synthase lead to embryo lethal phenotype at the heart-torpedo
278 transition stage in *Arabidopsis* (Imai et al., 2004b). Interestingly, double-mutant seeds are
279 deficient in Spd, while accumulate high levels of its precursor, putrescine. Here we discover
280 that Spd promotes seedling growth through the TORC1 signaling pathway in *Arabidopsis* and
281 maize.

282 We have demonstrated an increase in the level of active TOR during maize seed
283 germination and post-germinative growth. Inactivation of TOR decreases the embryonic axes
284 and roots growth due to insufficient TOR signaling and S6K activity. Our study uncovered the
285 involvement of the TOR signaling pathway in perception and transduction of the Spd signal
286 towards balancing cellular homeostasis and sustained growth in *Arabidopsis* dicot and maize
287 crop plants. First, Spd promotes growth in TOR inhibitor AZD-8055 sensitive manner in maize
288 and *Arabidopsis*. Further, TOR was activated in the presence of Spd and assists seedling growth,
289 while either genetic or pharmaceutical inhibition of TOR slowed down growth and abolished
290 growth stimulation by Spd. In contrast, cyclohexylamine (CHA) that inhibits Spd biosynthesis
291 abolished the phosphorylation of S6K and, accordingly, reduced root elongation during maize
292 seedling development. When CHA and Spd were applied together we observed a strong recovery
293 of the CHA-mediated seedling growth defect. These results demonstrate that TOR pathway
294 activation by Spd leads to enhanced root elongation and seedling growth.

295 TORC1 ability to phosphorylate target substrates depends on the activity of a conserved
296 eukaryotic TOR binding partner, RAPTOR, which presents substrates to TOR for
297 phosphorylation (Schalm and Blenis, 2002; Liko and Hall, 2015). RAPTOR binding to the TOR
298 HEAT (Huntington, EF3A, ATM, TOR) domain was demonstrated in both *Arabidopsis* and the
299 green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Anderson et al., 2005; Deprost et al., 2007; Mahfouz et
300 al., 2006; Moreau et al., 2012), suggesting conserved mechanism of RAPTOR function in
301 TORC1. Our genetic experiments demonstrated that the induction of growth by Spd was
302 downregulated in the *rap78 Raptor 1b* knockout mutant, suggesting that Raptor can mediate Spd-
303 activated TOR action *in planta*. Given that the Spd-promoted TOR signaling activity is reduced
304 by AZD-8055 application to the mock plant and decreased in conditions of RAPTOR deficiency,
305 we conclude that Spd and TOR signaling act in a common pathway to control plant growth. In
306 plants, the number of upstream effectors of TOR signaling is growing—phytohormone auxin,

307 growth factors, nutrients, and light (Garrocho-Villegas et al., 2013; Schepetilnikov et al., 2013;
308 Xiong et al., 2013; Li et al., 2017; Schepetilnikov and Ryabova, 2017; Shi et al., 2018). Our study
309 provides evidence that Spd is a strong candidate to function as upstream effector of TOR.
310 According to our data, Spd triggers phosphorylation of S6K1 at TOR specific hydrophobic motif
311 residue T449, and ribosomal protein S6 at S240, indicating the canonical TOR signaling pathway
312 is likely to be involved in the perception of the Spd signal.

313 Our data suggested that TOR not only sensed Spd availability, but also finetuned Spd
314 homeostasis through a post-transcriptional mechanism. Indeed, previous work in *Arabidopsis*
315 demonstrated that AtTOR positively modulates total mRNA translation (Deprost et al., 2007).
316 In eukaryotes, mRNAs in polyamine catabolism (*PAOs* and *CuAOs*) are enriched by inhibitory
317 uORFs that impede their translation (von Arnim et al., 2014; Guerrero-González et al., 2014;
318 Schepetilnikov and Ryabova, 2017). In *Arabidopsis*, inefficient translation of uORF mRNAs
319 could be attenuated by the auxin-ROP2-TOR signaling axis (Schepetilnikov et al., 2013, 2017).
320 We have shown that TOR inactivation by AZD-8055 causes defects in polysomal loading of
321 endogenous maize uORF-containing *PAO3* (**Figure 3A**), strongly suggesting that TOR
322 inhibition contributes to decreased uORF-mRNA translation in maize. AZD-8055 treatment
323 interferes with CP uORF-*SAMDC* association with only heavy polysomes in our conditions
324 (**Figure 3A**). The results in plant mesophyll protoplasts confirmed the role of Spd in translation
325 of *PAO3*, *CuAO1* and unrelated to polyamine metabolism *ARF3* in AZD-8055 sensitive manner
326 (**Figure 3E**), suggesting that TOR, if activated by either auxin (Schepetilnikov et al., 2013) or
327 Spd, promotes translation initiation of uORF-containing mRNAs. Indeed, we observed a strong
328 defect in *CuAO1* 5'UTR-mRNA translation in TOR-deficient plants, and an increase in both,
329 *CuAO1* and *PAO3* leader-driven expression in protoplasts treated with auxin or Spd. In both
330 cases, inactivation of TOR nearly abolished uORF-mRNA translation in mock, auxin- or Spd-

331 treated protoplasts. Thus, Spd can promote translation of polyamine degradation enzymes
332 through the TOR pathway.

333 Our data reveal a simple view of the mRNA specific features such as inhibitory 5'UTR
334 uORFs and mechanisms that confer Spd-TOR-dependent translation control in Spd biogenesis.
335 The subset of uORF-mRNAs that are specifically regulated by TOR consists almost entirely of
336 transcripts for polyamine oxidases, PAOs and CuAOs, in addition to spermidine synthase
337 (SPDS), spermine synthase (SPMS) and thermospermine synthase (ACL5) (Guerrero-González
338 et al., 2014, Moschou et al., 2012; von Arnim et al., 2014) (see **Figure 5**, yellow panel; **Figure**
339 **S3** and **Tables S2–S3**). We find no uORF-rich transcripts for synthesis of putrescine from
340 either arginine or ornithine, except of *agmatine iminohydrolase (AIH)* mRNA that can harbour
341 several uORFs (**Figure 5**, blue panel; **Table S3**). Spd synthesis depends on decarboxylation of
342 SAM by SAMDC (**Figure 5**, pink panel). *SAMDC* mRNA is among the PA-responsive
343 transcripts with a short uORF preceding the CPuORF; high PA concentrations lead to CP
344 uORF translation that results in SAMDC synthesis suppression (Hanfrey et al., 2005; **Figure 5**,
345 *top right*).

346 Here we propose a model, which states that Spd-TOR signaling differentially controls
347 the Spd homeostasis by regulating translation competence of uORF-containing mRNAs. We
348 found that Spd-related catabolic enzymes such as polyamine oxidases are the main targets of
349 uORFs responsible for maintaining the moderate Spd levels. Indeed, TOR inactivation by
350 AZD-8055 strongly correlated with translational repression of *PAO 5'UTR* - or *CuAO 5'UTR*-
351 driven reporter (**Figure 3E**). This is likely the consequence of a negative feedback in response
352 to the excess of Spd. Moreover, high Spd will trigger CP-uORF translation, to arrest SAMDC
353 synthesis and function of spermidine and spermine synthases (Hanfrey et al., 2005). Recent
354 work by Guerrero-González et al. (2014) suggested that although 168 nt *AtPAO2* uORF inhibits
355 downstream main ORF translation, increase in exogenous polyamine levels promotes

356 downstream reporter expression with both native *AtPAO2* and 35S promoter, thus alleviating
357 the negative effect of *AtPAO2* uORF. The Spd positive effect on *AtPAO2* mRNA translation is
358 consistent with our model, where TOR activated by Spd can increase reinitiation of *ZmPAO3*
359 after translation of upstream uORF.

360 In addition, analysis of currently available transcriptomic data (Caldana et al., 2013;
361 Xiong et al., 2013; Dong et al., 2015) revealed no significant differences in the levels of
362 mRNAs that encode enzymes involved in Spd biogenesis upon application of TOR inhibitors
363 (see **Table S3**). These results argue that translation of uORF-containing mRNAs is highly
364 sensitive to TOR activation, and that this is the basis of their regulation by Spd. However, we
365 cannot rule out mRNA isoforms that appear as a result of alternative splicing events, which can
366 change the position and/or number of uORFs.

367 Our observation of active TOR requirement for facilitating production of PAOs and
368 CuAOs that catalyze PA oxidation, is consistent with previously published data demonstrating
369 a shift into putrescine at the expense of spermidine in TOR inactivation conditions (Caldana et
370 al., 2013), and with a 5'UTR dependence of *Arabidopsis SAMDC* expression in root meristems
371 at early germination stages (Majumdar et al., 2017). Thus, the concerted action of uORF
372 regulatory mechanisms under the control of Spd and TOR can balance spermidine homeostasis
373 to regulate growth in response to various environmental conditions.

374 Spd, when applied exogenously, is involved in protecting crops from stress-induced
375 damage (Chen et al., 2019; Huang et al., 2017; Rodríguez et al., 2009). The observations of
376 requirements for high levels of free Spd and Spm in salt stress conditions (Duan et al., 2008)
377 are consistent with a central role of Spd-TOR relay in increasing tolerance of maize seedlings
378 to heat stress damage (Fig. 4B). Indeed, our results indicate that the Spd-TOR signaling axis
379 helps young-age seedlings of maize to alleviate heat stress damage to a certain extent.

380 In conclusion, our results suggest that Spd can link TOR regulation of translation with
381 plant adaptation to environmental and internal cues. Molecular actors in such regulation, as
382 well as the impact of Spd on TOR activity on the proteome and metabolic profiles, are awaiting
383 future investigation to bring a better understanding of plant physiology and breeding proposals.
384 The knowledge gain on regulatory mechanisms that impact gene expression at these stages
385 would be of utmost relevance to better understand and apply improvement technologies in
386 agriculture.

387 **Limitations of the study**

388 In this study, we have illustrated that TOR by sensing spermidine sufficiency can regulate
389 spermidine homeostasis by promoting translation reinitiation of uORF-containing mRNAs
390 encoding polyamine degrading enzymes. Although we have analyzed expression levels of
391 enzymes involved in polyamine catabolism in plants, further systematic analysis of mRNA
392 translation efficiencies encoding both the polyamine biosynthesis and degradation enzymes in
393 different TOR contrasting conditions is necessary to understand the fundamental principles of
394 this regulation. Combining our approach with the direct analysis of endogenous levels of
395 spermidine and other polyamines, that is beyond the scope of this study, will enhance our
396 understanding of how polyamine homeostasis is regulated by TOR. In addition, the molecular
397 analysis could be extended to different developmental stages.

398

399 **ACKNOWLEDGEMENTS**

400 We thank A. von Arnim for providing crucial antibodies for these studies, R. A. Urquidi
401 Camacho and A. von Arnim for providing an uORF database for Arabidopsis genes and A.
402 Geldreich for excellent technical support. We appreciate the use of core facilities at Unidad de
403 Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAI) and technical support from Jorge
404 Herrera-Díaz.

405 This work was funded by UNAM-PAPIIT IN218921, IN214118 and Facultad de Química-
406 UNAM PAIP 5000-9118 to TDD.; a CONACyT PhD fellowship program to KSD; French
407 Agence Nationale de la Recherche— ANR-18-CE13-0019 – "ReinitiaTOR" to LR and 2020
408 Marie Curie fellowship 885864 "TOR in acTIon" MSCA-IF-EF-ST to YD

409

410 **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

411 Conceived and designed the project: YD, LR and KSD, TDD. Performed the experiments: KSD,
412 YD, CP, EMFR, GOB. Analyzed the data: KSD, YD, CP, LR, TDD. Designed the regulatory
413 model: YD, LR. Wrote and revised the paper: YD, KSD, LR, TDD. All authors approved the
414 final version. KSD performed her Ph.D. studies in TDD lab and a 3-month internship in LR lab.

415

416 **DECLARATION OF INTEREST**

417 The authors declare no competing interests.

418

419 **FIGURE LEGENDS**

420

421 **Figure 1. Exogenous Spd promotes seedling growth in AZD-8055- and CHA-sensitive**
422 **manner.**

423 A Representative images of Chalqueño maize seed germination and seedling growth at 24
424 and 48 h of imbibition. *Bottom* Immunoblot analysis of phosphorylated TOR (TOR-P); S6K-P/
425 S6K and rpS6-P/ rpS6 in whole axes and root tissues. Lc: loading control by Coomassie
426 staining.

427 B Immunoblot analysis of phosphorylated S6K-P/ S6K and rpS6-P/ rpS6 in whole
428 embryonic axes without (DMSO, solvent) or with AZD-8055 added to dissected axes at 45 h of
429 seed imbibition as indicated.

430 C Quantification of whole embryonic axes and root lengths after 3 days of treatment with
431 different AZD-8055 concentrations as indicated (n=20).

432 D 24 h imbibed maize seeds were further incubated in water (mock), or 0.2 mM Spd with
433 (+) or (-) without 50 μ M AZD-8055 (AZD) at 28 °C for 48 h (n=10). Scale bar refers to
434 seedling length.

435 E Immunoblot analysis of rpS6 total and phosphorylated at S240 (rpS6-P) levels in root
436 tips. *Bottom panel* Specific rpS6 phosphorylation was estimated as rpS6-P/rpS6 ratio from four
437 independent experiments. Representative immunoblot is shown (n=4).

438 F 24 h imbibed maize seeds were incubated in water (mock), 1 mM CHA, or 1 mM CHA
439 with 0.2 mM Spd (n=10) during 48 h. Scale bar refers to seedling length.

440 G Immunoblot analysis of total S6K1 and rpS6 levels and the levels of S6K1
441 phosphorylated at T449 (S6K1-P) and rpS6 phosphorylated at S240 (rpS6-P) in embryonic axes
442 isolated from 24 h imbibed seeds treated with 1 mM CHA or 1 mM CHA with 0.2 mM Spd at
443 28 °C during 24 h. *Right panel* Specific S6K or rpS6 phosphorylations were estimated as S6K-
444 P-T449/S6K or rpS6-P-S240/rpS6 ratios from three independent experiments. Representative
445 immunoblot is shown (n=3) for each case.

446 Data information: Values were presented as boxplot with median \pm s.d. (C, D, F) and bar chart
447 with mean \pm s.d. (F). Statistical test was performed by One way ANOVA followed by two-
448 tailed t-test: p < 0.05 *, p < 0.01 **, p < 0.001 ***, p < 0.0001****.

449

450 **Figure 2. Exogenous Spd boosts seedling growth in Arabidopsis through the TORC1**
451 **pathway.**

452 A Arabidopsis seedlings were grown for 14 days on 1/2 Murashige and Skoog (MS)
453 medium plus 0.5% sucrose (mock), supplemented with 0.01 or 0.1 mM Spd without (-) or with
454 0.2 μ M AZD-8055 at 22 °C under long photoperiod for two weeks. Representative images of

455 whole plantlets and quantification of root length are shown (n=15). Scale bar refers to root
456 length.

457 B Immunoblot analysis of total S6K1 levels and the levels of S6K1 phosphorylated at
458 T449 (S6K1-P) in 14 days-old seedlings. *Right panel* Specific S6K phosphorylation was
459 estimated as S6K-P-T449/S6K ratio from three independent experiments.

460 C Col-0 and *rap78* were grown for 14 days on 1/2 MS medium plus 0.5% sucrose (mock),
461 supplemented with 0.1 mM Spd at 22°C under long photoperiod for two weeks (n=15). Scale
462 bar refers to root length.

463 Data information: Values were presented as boxplot with median \pm s.d. (A, C). Statistical test
464 was performed by One way ANOVA followed by two-tailed t-test: $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p <$
465 0.001 ***, $p < 0.0001$ ****.

466

467 **Figure 3. PAO and CuAO translation reinitiation is activated in response to both Spd and**
468 **TOR in AZD-8055 sensitive manner.**

469 A Polysomes from 48 h imbibed embryonic axes not treated (black line) or treated (red
470 line) with 20 μ M AZD-8055 were subjected to velocity sedimentation through sucrose density
471 gradient. Gradients were fractionated while scanning at 260 nm, and the resulting absorbance
472 profiles are shown. Fractions were collected and pooled as NR (no ribosome), 80S
473 (monosomes), LP (light polysomes), MP (medium polysomes) and HP (heavy polysomes), and
474 RNA was analyzed by RT-qPCR for transcripts indicated on the right of each gel along the
475 profile (n = 2). Positions of 18S and 28S rRNA are shown.

476 B *ZmSAMDC*, *ZmPAO3*, *ZmrpS6* and *ZmeIF4E* transcript abundances were evaluated by
477 RT-qPCR in 48 h imbibed embryonic axes treated or not with 20 μ M AZD-8055 (n = 2). *Actin*
478 was used as the normalization control and results expressed as fold change relative to mock.

479 C Schematic representation of constructs containing the GUS reporter with either short or
480 uORF-containing 5'UTR used for transformation of mesophyll protoplasts.

481 D Transfection experiments in Arabidopsis WT or 35-7 RNAi mesophyll protoplasts
482 included one reporter plasmid as indicated and transfection control plasmid *pmonoGFP*. The
483 GUS/GFP in mock protoplasts was set as 100% for *pmonoGUS* (250000 relative fluorescence
484 units, RFU). GFP levels were estimated by western blot (*Bottom panel*).

485 E WT mesophyll protoplasts were transfected with reporter plasmids shown in (C) as
486 indicated. After transfection, cells were incubated or not (mock) with 1 μ M NAA or 0.1 mM
487 Spd in the presence or not 0.5 μ M AZD-8055 for 18 h (n=3). mRNA integrity and levels were
488 estimated by semiquantitative RT-PCR. GUS/*GUS RNA* ratios were calculated and shown as
489 black bars. The GUS/*GUS RNA* in mock protoplasts was set as 100% for *pmonoGUS* (200000
490 relative fluorescence units, RFU); *pZmPAO3-GUS* (30000 RFU); *pCuAO1-GUS* (20000 RFU)
491 and *pARF3-GUS* (50000 RFU).

492 Data information: Values were presented as bar chart with mean \pm s.d. (B, C). Statistical test
493 was performed by One way ANOVA followed by two-tailed t-test: $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p <$
494 0.001 ***, $p < 0.0001$ ****.

495

496 **Figure 4. Spd-TOR signaling alleviates heat stress damage in maize seedlings.**

497 A, B Representative images of 6 days-old maize seedlings grown at 28 °C (A) or 42 °C (B)
498 under long photoperiod in water (mock) or supplemented with 0.2 mM spermidine (Spd) in the
499 presence (+) or not (-) 50 μ M AZD-8055 (n=15). Scale bars refer to seedling length.

500 Data information: Values were presented as boxplot with median \pm s.d. (A, B). Statistical test
501 was performed by One way ANOVA followed by two-tailed t-test: $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p <$
502 0.001 ***, $p < 0.0001$ ****.

503

504 **Figure 5. uORF allocation among the polyamine metabolic network: effects of TOR and/**
505 **or Spd on polyamine synthesis and degradation**

506 *Blue box* Putrescine biosynthesis pathways from arginine or ornithine are presented by arginine
507 decarboxylase (ADC), agmatine iminohydrolase (AIH), N-carbamoylputrescine
508 amidohydrolase (CPA) and ornithine decarboxylase (ODC)—encoded largely by uORF-less
509 mRNAs.

510 *Pink box* S-adenosyl-methionine (SAM), if decarboxylated by S-adenosylmethionine
511 decarboxylase (SAMDC) is used for Spd synthesis. *SAMDC* mRNA 5'UTR contains conserved
512 peptide (CP) uORF.

513 *Yellow box* Spd degradation pathways are presented by FAD-dependent polyamine oxidases
514 (PAOs), spermine synthase (SPMS) and thermospermine synthase (ACL5) encoded by uORF-
515 rich mRNAs.

516 *Top Right* High Spd can arrest SAMDC synthesis via CP uORF.

517 *Bottom Right* The Spd-TOR signaling axis can positively regulate translation competency of
518 PAOs and copper-dependent amine oxidases (CuAOs).

519

520 **STAR Methods**

521 **RESOURCE AVAILABILITY**

522 *Lead contact*

- 523 • Further information and requests for resources and reagents should be directed to and
524 will be fulfilled by the lead contact, Lyubov A. Ryabova (lyuba.ryabova@ibmp-
525 cnrs.unistra.fr)

526 *Materials availability*

- 527 • Plasmids and seeds used in this study are available with a completed Materials Transfer
528 Agreement Request for these materials by submitting to Dr. L.A. Ryabova
529 (lyuba.ryabova@ibmp-cnrs.unistra.fr).

530 *Data and code availability*

- 531 • This paper analyzes existing, publicly available data. The accession numbers for
532 analyzed datasets are listed in the key resources table.
- 533 • This paper does not report original code.
- 534 • Any additional information required to reanalyze the data reported in this paper is
535 available from the lead contact upon request.

536 **EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS**

537 Mexican maize (*Zea mays* L. cv. Chalqueño) seeds (Spring 2018) were used dry or between one
538 and six days upon imbibition. For *Arabidopsis thaliana*, the ecotype Columbia-0, *tor* RNAi line
539 35-7 (Deprost et al., 2007), *s6k1-1* mutant (Salk_148694) and Raptor mutant *rap78*
540 (Salk_078159) were used at 14 days upon imbibition.

541 **METHOD DETAILS**

542 **Maize growth conditions and treatments**

543 For germination experiments Mexican maize (*Zea mays* L. cv. Chalqueño) seeds (Spring 2018)
544 were imbibed on moisturized cotton at 26 (± 2 °C) in the darkness for 24 or 48 h. Short treatments
545 with the TOR inhibitor AZD-8055 were performed during the last three hours of imbibition of
546 48 h excised axes to evaluate TOR pathway activity and polysomal profiles. To test the
547 concentration-dependent inhibitor effect, embryonic axes dissected from 24 h imbibed seeds
548 were placed on a cotton moisturized with 1/2 Murashige and Skoog (MS) \pm AZD-8055 (5 μ M,
549 10 μ M, 20 μ M) during additional 72 h at 28 °C in the darkness.

550 For long-term seedling growth phenotyping and treatments, whole seeds were rolled in a paper
551 towel and placed vertically in a cylindrical container under 16 h light/8 h darkness photoperiod
552 at 28 °C as described previously (Crombez et al., 2016). The paper towel was imbibed in water
553 (mock), 50 μ M AZD-8055 (AZD), 0.1 mM (for non-germinated seeds) or 0.2 mM (for
554 germinated seeds) Spermidine (Spd), or combination of both (Spd/AZD).

555 Higher concentration of AZD-8055 was employed for whole seed incubations due to the starchy
556 endosperm seed barrier as reported for cereals, including maize (Montane and Menand, 2015;
557 Díaz-Granados et al., 2020). For cyclohexylamine (CHA) treatments, 24 h imbibed seeds were
558 treated with 1 mM CHA alone or with 0.2 mM Spd and phenotype was registered after 48 h of
559 the treatment. AZD-8055 was dissolved in Dimethyl Sulphoxide (DMSO) and CHA in water.
560 Equivalent amount of DMSO was added to mock for AZD inhibition experiments.

561 Since cyclohexylamine (CHA) is a competitive inhibitor of Spd synthase (SPDS), which
562 competes with Put for SPDS binding, we used 1 mM CHA to ensure competition with Put and

563 evaluate the effect of exogenous Spd used at 0.1 mM concentration. 2 mM CHA was used for
564 dicot plants in Hummel et al. (2002).

565 For heat stress, germinated seeds were grown at 28 °C for 72 hours under the indicated
566 treatments, after which those were separated in two groups. One group was maintained at 28 °C,
567 whereas the other was transferred to a chamber at 42 °C, for additional 72 h under the same
568 treatments.

569 ***Arabidopsis* seedlings growth conditions**

570 *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia-0 seeds were used for all experiments. The *tor* RNAi
571 line 35-7 was previously described (Deprost et al., 2007). Raptor mutant *rap78* (Salk_078159)
572 was provided by C. Meyer (INRA, Versailles, France). *Arabidopsis* seeds were cultured on
573 squared plates containing 1/2 MS, 0.5% sucrose and 0.8% agar medium for two weeks under 16
574 h light/ 8 h darkness photoperiod at 21 °C. Treatments of 0.2 µM AZD-8055 (AZD), 0.01 mM
575 or 0.1 mM Spermidine (Spd) and double treatment for each Spd concentration (AZD/Spd) were
576 included in the medium. To analyse the growth phenotype caused by AZD, Spd or combination,
577 we used lower AZD concentration than previously reported (Schepetilnikov et al., 2017) to avoid
578 causing dramatic growth phenotype (Montané and Menand, 2013) and allowing to study
579 sensitivity to Spd.

580 **Seedling Phenotyping**

581 After each imbibition time and treatment, maize seeds were photographed and length
582 measurements of whole embryonic axe, the principal root or the shoot were performed using the
583 Image J software. For *Arabidopsis thaliana*, root measurements corresponded to the end of the
584 experiment (two weeks).

585 **Protein extraction**

586 Total proteins were extracted from half gram of maize whole embryonic axes or root tips (1.0
587 cm from the tip) to evaluate activation of TOR-S6K during germination and seedling
588 establishment. To analyze the effect of different AZD-8055 concentrations, protein extractions
589 were made from whole embryonic axes. To analyze effects of Spd, CHA or both Spd and CHA
590 treatment on TOR signaling pathway activation, treatments were performed for 24 hours on
591 excised embryonic axes from 24 h imbibed seeds.

592 Maize tissues were homogenized in extraction buffer [50 mM HEPES pH 7.6, 4 mM EDTA, 20
593 mM EGTA, 20 mM mannitol, 0.2 mM PMSF, 1X Halt Phosphatase Inhibitor Cocktail
594 (ThermoFischer), and Protease Inhibitor Complete™ (Roche Diagnostics)], cleared by
595 centrifugation for 40 min, and determined for protein concentration by Bradford. Protein
596 extractions for *Arabidopsis* were performed from whole seedlings at the end of treatments using
597 2X Laemmli buffer. About 10-20 µg of total protein from *Arabidopsis*, 100 µg (TOR-P) and 40
598 µg (S6K, S6K-P, rpS6, rpS6-P) of total protein extract from maize were loaded per line.

599 **Western blot analysis**

600 Protein extracts were separated by 7% (TOR) or 12% (S6K and rpS6) SDS-PAGE and
601 electroblotted onto polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane. The membrane was blocked with
602 5 % (w/v) fat-free milk in 1X PBS, pH 7.4 and incubated overnight at 4 °C (primary polyclonal
603 antibodies) or during 3 h (monoclonal antibodies) at the appropriate dilutions prepared in 1X
604 PBS/0.1% (v/v) Tween-20. The following primary antibodies were used in this study: AtrpS6
605 (Enganti et al., 2018, 1:2500), AtrpS6-P(S240) (Enganti et al., 2018, 1:5000), AtS6K1/2
606 (Agrisera, AS121855, 1:5000), mTOR-P(S2448) (Santa Cruz Biotech, SC-293133, 1:200),
607 S6K1-P(T449) (Abcam, ab207399, 1:5000). The secondary antiserum (Goat anti-rabbit
608 IgG:HRP, Bio-Rad, 403005) was used at 1:5,000 dilution and incubated for 2 h at room
609 temperature. Blots were developed with Luminata Classic Western HRP Substrate from
610 Millipore. All antibodies had been previously used in *Arabidopsis* (Schepetilnikov et al., 2013;
611 Cao et al., 2019) and maize (Garrocho et al., 2013; Díaz-Granados et al., 2020) reports. Full size
612 Western blots with molecular weight indications are shown for each antibody/species in

613 Supplemental information file (Data S1). Migration of the endogenous unphosphorylated S6K is
614 unusual, since it shows retardation on the gel (around 65 kDa), possibly due to particularities of
615 the plant protein, such acidic residues or unstructured N- and C-terminal regions interfering with
616 SDS interaction. However, upon urea application, S6K1 migrates on SDS-PAGE at about 53 kDa
617 as shown in Data S1. Further, the 65 kDa band detected by anti-AtS6K1/2 (Agrisera) appears
618 reduced in a *s6k1-1* mutant (Salk_148694), as does the 53 kDa band detected by anti-S6K1-P
619 (Abcam).

620 **Polyribosome fractionation**

621 One gram of whole embryonic axes was ground with liquid nitrogen in a mortar and
622 homogenized in 5 ml of lysis buffer consisting of 200 mM Tris-HCl pH 8.5, 50 mM KCl, 25 mM
623 MgCl₂, 2 mM EGTA, 2% PTE (10 Tridecyl Polyoxyethylene ether), 1% IGEPAL, 1% Triton X-
624 100, 0.1% DTT 1 M, 0.2 mg/mL cycloheximide and 0.5 mg/mL Heparin. The slurry was cleared
625 twice from debris at 12,000 x g for 15 min, 4 °C and the supernatant was applied onto 2 ml of
626 60% sucrose cushion in gradient buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.5, 20 mM KCl, 10 mM MgCl₂)
627 to enrich ribosomes by 3 h-centrifugation at 50,000 rpm, 4 °C in a fixed angle rotor 80Ti. The
628 precipitate was dissolved in 300-400 µl extraction buffer, applied to a continuous 15% to 60%
629 sucrose density gradient and centrifuged at 38,000 rpm, 4 °C for 2 h in a swinging rotor SW 55Ti.
630 Gradients were collected in 500 µl fractions with a Labconco bomb connected to Econo UV
631 Monitor (BioRad) for continuous absorbance monitoring at 260 nm. According to the 260 nm
632 profiles, fractions were pooled as NR (no ribosome), 80S (monosomes), LP (low polysomes),
633 MP (medium polysomes) and HP (high polysomes).

634 **RNA analysis**

635 Total RNA was extracted using TRIzol Reagent. RNA from polysomal profiling was obtained
636 by pooled fractions treatment with 25 µl of 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) and 1 µl of 10
637 mg/ml proteinase K for 30 min at 37 °C, extraction with 250 µl of acid phenol and 250 µl of
638 chloroform: iso-amyl alcohol (24:1) and precipitation with 70 µl of 10 M LiCl and 470 µl
639 isopropanol. Precipitated RNA was washed with 70 % ethanol, briefly air-dried and dissolved in
640 30 µl of DEPC-treated water. Total and polysomal RNAs were subjected to DNase treatment and
641 purification by RNA Clean and Concentrator kit, followed by reverse transcription with Improm-
642 II Reverse Transcriptase and either end- point PCR (polysomal fractions) or real-time PCR (total
643 RNA) using Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix. Gene-specific primers were
644 designed with Primer3 Plus (Untergasser et al., 2007) and are available in **Table S1**. Relative
645 expression levels were computed by $2^{-\Delta\Delta CT}$ method using actin as housekeeping control in two
646 independent biological replicate experiments.

647 **Construct generation for protoplast transfections**

648 Standard short UTR *pmonoGUS* and *pmonoGFP* were used as basal translation and transfection
649 controls, respectively (Schepetilnikov et al., 2011, 2013). The *pAtCuAO1-GUS* and *pZmPAO3-*
650 *GUS* constructs [*AtCuAO1 5'UTR-GUS*; *ZmPAO3 5'UTR-GUS*] were generated by substitution
651 of a short *CAMV* sequence in *pmonoGUS* plasmid with the *AtCuAO1* (At1g62810) 5'UTR or
652 *ZmPAO3* (Zm00001d001883) 5'UTR, downstream of the constitutive 35S promoter and
653 upstream of the start codon of the *GUS* reporter. Primers used for 5'UTR amplification were:
654 *CuAO1-UTR-FW*: acgcgtcgacGCGTTTGTAATGACATGAACATG; *CuAO1-UTR-RV*:
655 gggtttctacaggacgtaaCATCGATTGAGTGAGAGTTTTTG *ZmPAO3-UTR-FW*:
656 ggggtaccccACCCGTGTCGTGTCTAAACGGAC; *ZmPAO3-UTR-RV*:
657 ggggtacccccggtataccgACCAGCCGCCGGCTTCG. Small case letters indicate added nucleotides
658 including sites for restriction enzymes KpnI and AccI (underlined) used to clone the 5'UTR
659 within *pmonoGUS*. The construct *pAtARF3-GUS* was described in Schepetilnikov et al. (2013).

660 **Arabidopsis protoplast preparation and GUS activity measurement**

661 Transient expression of constructs and GUS activity assays in *Arabidopsis* mesophyll protoplasts
662 were conducted according to (Schepetilnikov et al., 2013; Yoo et al., 2007) with minimal

663 modifications. Five micrograms pAtCuAO1-GUS, or 5 µg pZmPAO3-GUS, or 10 µg pAtARF3-
664 GUS or 5 µg pmonoGUS were used for co-transformation of Arabidopsis mesophyll protoplasts
665 with 5 µg pmonoGFP as transfection control (see **Figure 3D**). Transfected protoplasts were
666 incubated in WI buffer including 1 µM auxin (1-NAA), or 0.1 mM Spd with or without 0.5 µM
667 AZD-8055 overnight at 26 °C in WI buffer (4 mM MES pH 5.7, 0.5 M mannitol, 20 mM KCl)
668 under darkness. After overnight incubation transfected protoplasts were harvested by
669 centrifugation and resuspended in GUS extraction buffer (50 mM NaH₂PO₄ pH 7.0, 10 mM
670 EDTA, 0.1% NP-40). The aliquots were immediately taken for GUS reporter gene assays. GUS
671 activity was measured by a fluorimetric assay using a FLUOstar OPTIMA fluorimeter (BMG
672 Biotech) and normalized with respect to GUS RNA levels. The values given are the means from
673 at least three independent experiments.

674 To estimate GUS RNA levels, total RNA from protoplasts was extracted using TRIzol. RNA
675 samples were reverse transcribed into cDNA using SuperScript III reverse transcriptase with
676 oligo-(dT)₁₈. sqRT-PCR was performed with the pair of specific primers to the full-length GUS
677 reporter gene. The PCR conditions were as follows: 2 min, 98 °C (first cycle); 30 s, 98 °C; 30 s,
678 56 °C; 3 min, 72 °C (20 cycles). PCR products were separated on a 1.2% agarose gel and
679 visualized by ethidium bromide staining.

680 **QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS**

681 At least 15 seeds were used for each treatment in three independent biological experiments (n =
682 3). For seedling phenotyping and reporter construct expression in protoplasts under different
683 treatments, statistical analysis was performed by One-way ANOVA followed by two-tailed t-
684 test. For RT-qPCR experiments, statistical differences were evaluated by two-sample t-test.
685 Asterisks indicate values that are significantly different from the relevant control * p ≤ 0.05 **
686 p ≤ 0.01 *** p ≤ 0.001 **** p ≤ 0.0001. Graphs were generated with BoxPlotR. The statistical
687 details of each experiment can be found in the corresponding figure legend.
688

689 **REFERENCES**

- 690 Agredano-Moreno, L.T., Reyes de la Cruz, H., Martínez-Castilla, L.P., and Sánchez de
691 Jiménez, E. (2007). Distinctive expression and functional regulation of the maize (Zea
692 mays L.) TOR kinase ortholog. *Mol Biosyst* 3, 794–802.
- 693 Anderson, G.H., Veit, B., and Hanson, M.R. (2005). The Arabidopsis AtRaptor genes are
694 essential for post-embryonic plant growth. *BMC Biol.* 3, 12.
- 695 von Arnim, A.G., Jia, Q., and Vaughn, J.N. (2014). Regulation of plant translation by upstream
696 open reading frames. *Plant Sci.* 214, 1–12.
- 697 Caldana, C., Li, Y., Leisse, A., Zhang, Y., Bartholomaeus, L., Fernie, A.R., Willmitzer, L., and
698 Giavalisco, P. (2013). Systemic analysis of inducible target of rapamycin mutants reveal
699 a general metabolic switch controlling growth in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* 73, 897–
700 909.
- 701 Cao, P., Kim, S.-J., Xing, A., Schenck, C.A., Liu, L., Jiang, N., Wang, J., Last, R.L., and
702 Brandizzi, F. (2019). Homeostasis of branched-chain amino acids is critical for the
703 activity of TOR signaling in Arabidopsis. *Elife* 8.
- 704 Chen, D., Shao, Q., Yin, L., Younis, A., and Zheng, B. (2019). Polyamine Function in Plants:
705 Metabolism, Regulation on Development, and Roles in Abiotic Stress Responses. *Front.*
706 *Plant Sci.* 9.

- 707 Crombez, H., Roberts, I., Vangheluwe, N., Motte, H., Jansen, L., Beeckman, T., and Parizot, B.
708 (2016). Lateral Root Inducible System in Arabidopsis and Maize. *J Vis Exp.* *107*,
709 e53481.
- 710 Deprost, D., Truong, H.-N., Robaglia, C., and Meyer, C. (2005). An Arabidopsis homolog of
711 RAPTOR/KOG1 is essential for early embryo development. *Biochem. Biophys. Res.*
712 *Commun.* *326*, 844–850.
- 713 Deprost, D., Yao, L., Sormani, R., Moreau, M., Leterreux, G., Nicolai, M., Bedu, M., Robaglia,
714 C., and Meyer, C. (2007). The Arabidopsis TOR kinase links plant growth, yield, stress
715 resistance and mRNA translation. *EMBO Rep.* *8*, 864–870.
- 716 Díaz-Granados VH, López-López JM, Flores-Sánchez J, et al. (2020). Glucose modulates
717 proliferation in root apical meristems via TOR in maize during germination. *Plant*
718 *Physiol Biochem.* *155*, 126-135.
- 719 Dinkova, T.D., Cruz, H.R.D.L., García-Flores, C., Aguilar, R., Jiménez-García, L.F., and
720 Jiménez, E.S.D. (2007). Dissecting the TOR–S6K signal transduction pathway in maize
721 seedlings: relevance on cell growth regulation. *Physiologia Plantarum* *130*, 1–10.
- 722 Dobrenel, T., Mancera-Martínez, E., Forzani, C., Azzopardi, M., Davanture, M., Moreau, M.,
723 Schepetilnikov, M., Chicher, J., Langella, O., Zivy, M., et al. (2016). The Arabidopsis
724 TOR Kinase Specifically Regulates the Expression of Nuclear Genes Coding for
725 Plastidic Ribosomal Proteins and the Phosphorylation of the Cytosolic Ribosomal
726 Protein S6. *Front Plant Sci* *7*, 1611.
- 727 Dong, Y., Silbermann, M., Speiser, A., Forieri, I., Linster, E., Poschet, G., Allboje Samami, A.,
728 Wanatabe, M., Sticht, C., Teleman, A.A., et al. (2017). Sulfur availability regulates
729 plant growth via glucose-TOR signaling. *Nat Commun* *8*, 1174.
- 730 Dong, P., Xiong, F., Que, Y., Wang, K., Yu, L., Li, Z., & Ren, M. (2015). Expression profiling
731 and functional analysis reveals that TOR is a key player in regulating photosynthesis
732 and phytohormone signaling pathways in Arabidopsis. *Front Plant Sci.* *6*, 677.
- 733 Duan, J., Li, J., Guo, S., and Kang, Y. (2008). Exogenous spermidine affects polyamine
734 metabolism in salinity-stressed *Cucumis sativus* roots and enhances short-term salinity
735 tolerance. *Journal of Plant Physiology* *165*, 1620–1635.
- 736 Enganti R, Cho SK, Toperzer JD, et al. (2017) Phosphorylation of Ribosomal Protein RPS6
737 Integrates Light Signals and Circadian Clock Signals. *Front Plant Sci.* *8*, 2210.
- 738 Franceschetti, M., Hanfrey, C., Scaramagli, S., et al. (2001). Characterization of monocot and
739 dicot plant S-adenosyl-l-methionine decarboxylase gene families including
740 identification in the mRNA of a highly conserved pair of upstream overlapping open
741 reading frames. *Biochem J.* *353*, 403-409.
- 742 Garrocho-Villegas, V., Aguilar C, R., and Sánchez de Jiménez, E. (2013). Insights into the
743 TOR-S6K signaling pathway in maize (*Zea mays* L.). Pathway activation by effector-
744 receptor interaction. *Biochemistry* *52*, 9129–9140.

- 745 Guerrero-González, M.L., Ortega-Amaro, M.A., Juárez-Montiel, M., and Jiménez-Bremont,
746 J.F. (2014). Arabidopsis Polyamine oxidase-2 uORF is required for downstream
747 translational regulation. *Plant Physiol. Biochem.* *108*, 381–390.
- 748 Gu, X., Orozco, J.M., Saxton, R.A., Condon, K.J., Liu, G.Y., Krawczyk, P.A., Scaria, S.M.,
749 Harper, J.W., Gygi, S.P., and Sabatini, D.M. (2017). SAMTOR is an S-
750 adenosylmethionine sensor for the mTORC1 pathway. *Science* *358*, 813–818.
- 751 Hanfrey, C., Elliott, K.A., Franceschetti, M., Mayer, M.J., Illingworth, C., and Michael, A.J.
752 (2005). A dual upstream open reading frame-based autoregulatory circuit controlling
753 polyamine-responsive translation. *J. Biol. Chem.* *280*, 39229–39237.
- 754 Hill, J.R., and Morris, D.R. (1992). Cell-specific translation of S-adenosylmethionine
755 decarboxylase mRNA. Regulation by the 5' transcript leader. *J. Biol. Chem.* *267*,
756 21886–21893.
- 757 Huang, Y., Lin, C., He, F., Li, Z., Guan, Y., Hu, Q., and Hu, J. (2017). Exogenous spermidine
758 improves seed germination of sweet corn via involvement in phytohormone
759 interactions, H₂O₂ and relevant gene expression. *BMC Plant Biol.* *17*, 1.
- 760 Hummel, I., Couée, I., El Amrani, A., Martin-Tanguy, J., Hennion, F. (2002). Involvement of
761 polyamines in root development at low temperature in the subantarctic cruciferous
762 species *Pringlea antiscorbutica*. *J. Exp. Bot.* *53*, 1463–1473.
- 763 Imai, A., Akiyama, T., Kato, T., Sato, S., Tabata, S., Yamamoto, K.T., and Takahashi, T.
764 (2004a). Spermine is not essential for survival of Arabidopsis. *FEBS Lett.* *556*, 148–
765 152.
- 766 Imai, A., Matsuyama, T., Hanzawa, Y., Akiyama, T., Tamaoki, M., Saji, H., Shirano, Y., Kato,
767 T., Hayashi, H., Shibata, D., et al. (2004b). Spermidine synthase genes are essential for
768 survival of Arabidopsis. *Plant Physiol.* *135*, 1565–1573.
- 769 Jiménez-Bremont, J.F., Ruiz, O.A., and Rodríguez-Kessler, M. (2007). Modulation of
770 spermidine and spermine levels in maize seedlings subjected to long-term salt stress.
771 *Plant Physiol. Biochem.* *45*, 812–821.
- 772 Jing, J., Guo, S., Li, Y., and Li, W. (2020). The alleviating effect of exogenous polyamines on
773 heat stress susceptibility of different heat resistant wheat (*Triticum aestivum* L.)
774 varieties. *Sci Rep* *10*, 7467.
- 775 Kravchenko, A., S. Citerne, I. Jéhanno, R. I. Bersimbaev, B. Veit, C. Meyer and A.-S. Leprince
776 (2015). Mutations in the Arabidopsis Lst8 and Raptor genes encoding partners of the
777 TOR complex, or inhibition of TOR activity decrease abscisic acid (ABA) synthesis.
778 *Biochem. Bioph. Res. Co.* *467*, 992-997.
- 779 Li, X., Cai, W., Liu, Y., Li, H., Fu, L., Liu, Z., Xu, L., Liu, H., Xu, T., and Xiong, Y. (2017).
780 Differential TOR activation and cell proliferation in Arabidopsis root and shoot apices.
781 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *114*, 2765–2770.
- 782 Liu, G.Y., and Sabatini, D.M. (2020). mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and
783 disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *21*, 183–203.

- 784 Mahfouz, M.M., Kim, S., Delauney, A.J., and Verma, D.P.S. (2006). Arabidopsis TARGET
785 OF RAPAMYCIN interacts with RAPTOR, which regulates the activity of S6 kinase in
786 response to osmotic stress signals. *Plant Cell* 18, 477–490.
- 787 Majumdar, R., Shao, L., Turlapati, S.A., and Minocha, S.C. (2017). Polyamines in the life of
788 Arabidopsis: profiling the expression of S-adenosylmethionine decarboxylase
789 (SAMDC) gene family during its life cycle. *BMC Plant Biol* 17.
- 790 Menand, B., Desnos, T., Nussaume, L., Berger, F., Bouchez, D., Meyer, C., and Robaglia, C.
791 (2002). Expression and disruption of the Arabidopsis TOR (target of rapamycin) gene.
792 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 6422–6427.
- 793 Montané, M.-H., and Menand, B. (2013). ATP-competitive mTOR kinase inhibitors delay plant
794 growth by triggering early differentiation of meristematic cells but no developmental
795 patterning change. *J. Exp. Bot.* 64, 4361–4374.
- 796 Moreau, M., Azzopardi, M., Clément, G., Dobrenel, T., Marchive, C., Renne, C., Martin-
797 Magniette, M.-L., Tacconnat, L., Renou, J.-P., Robaglia, C., et al. (2012). Mutations in
798 the Arabidopsis Homolog of LST8/GβL, a Partner of the Target of Rapamycin Kinase,
799 Impair Plant Growth, Flowering, and Metabolic Adaptation to Long Days. *Plant Cell*
800 24, 463–481.
- 801 Mostofa, M.G., Yoshida, N., and Fujita, M. (2014). Spermidine pretreatment enhances heat
802 tolerance in rice seedlings through modulating antioxidative and glyoxalase systems.
803 *Plant Growth Regul* 73, 31–44.
- 804 Ren, M., Venglat, P., Qiu, S., Feng, L., Cao, Y., Wang, E., Xiang, D., Wang, J., Alexander, D.,
805 Chalivendra, S., et al. (2012). Target of rapamycin signaling regulates metabolism,
806 growth, and life span in Arabidopsis. *Plant Cell* 24, 4850–4874.
- 807 Rodríguez, A.A., Maiale, S.J., Menéndez, A.B., and Ruiz, O.A. (2009). Polyamine oxidase
808 activity contributes to sustain maize leaf elongation under saline stress. *J. Exp. Bot.* 60,
809 4249–4262.
- 810 Ryabova, L.A., and Hohn, T. (2000). Ribosome shunting in the cauliflower mosaic virus 35S
811 RNA leader is a special case of reinitiation of translation functioning in plant and
812 animal systems. *Genes Dev* 14, 817–829.
- 813 Ryabova, L.A., Robaglia, C., and Meyer, C. (2019). Target of Rapamycin kinase: central
814 regulatory hub for plant growth and metabolism. *J. Exp. Bot.* 70, 2211–2216.
- 815 Saxton, R.A., and Sabatini, D.M. (2017). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and
816 Disease. *Cell* 168, 960–976.
- 817 Schepetilnikov, M., and Ryabova, L.A. (2017). Auxin Signaling in Regulation of Plant
818 Translation Reinitiation. *Front Plant Sci* 8, 1014.
- 819 Schepetilnikov, M., Kobayashi, K., Geldreich, A., Caranta, C., Robaglia, C., Keller, M., and
820 Ryabova, L.A. (2011). Viral factor TAV recruits TOR/S6K1 signalling to activate
821 reinitiation after long ORF translation. *EMBO J.* 30, 1343–1356.

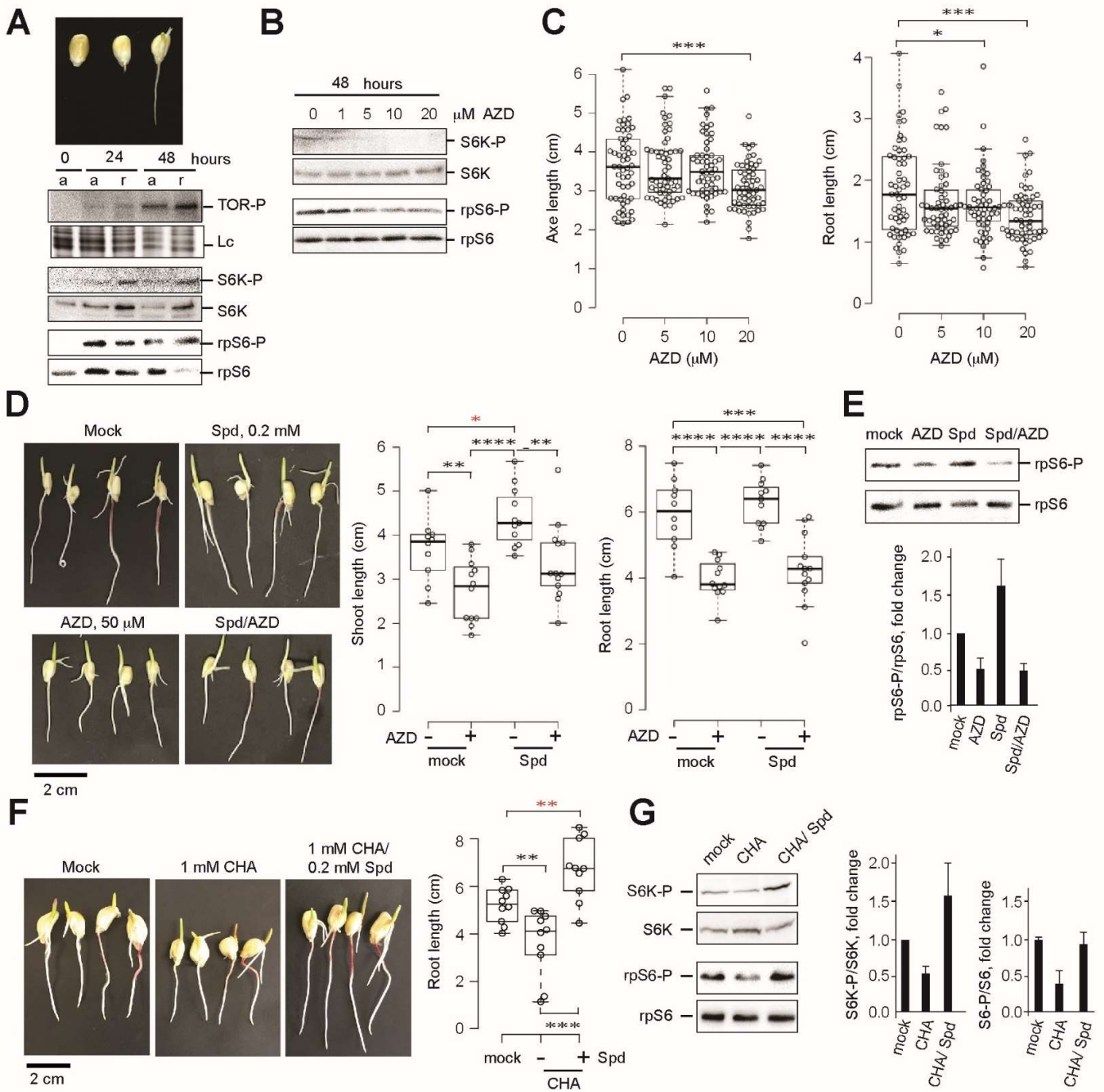
- 822 Schepetilnikov, M., Dimitrova, M., Mancera-Martínez, E., Geldreich, A., Keller, M., and
823 Ryabova, L.A. (2013). TOR and S6K1 promote translation reinitiation of uORF-
824 containing mRNAs via phosphorylation of eIF3h. *EMBO J.* 32, 1087–1102.
- 825 Schepetilnikov, M., Makarian, J., Srour, O., Geldreich, A., Yang, Z., Chicher, J., Hammann, P.,
826 and Ryabova, L.A. (2017). GTPase ROP2 binds and promotes activation of target of
827 rapamycin, TOR, in response to auxin. *EMBO J* 36, 886–903.
- 828 Shantz, L.M., Viswanath, R., and Pegg, A.E. (1994). Role of the 5'-untranslated region of
829 mRNA in the synthesis of S-adenosylmethionine decarboxylase and its regulation by
830 spermine. *Biochem J* 302, 765–772.
- 831 Shi, L., Wu, Y., and Sheen, J. (2018). TOR signaling in plants: conservation and innovation.
832 *Development* 145.
- 833 Tang, S., Zhang, H., Li, L., Liu, X., Chen, L., Chen, W., and Ding, Y. (2018). Exogenous
834 spermidine enhances the photosynthetic and antioxidant capacity of rice under heat
835 stress during early grain-filling period. *Funct. Plant Biol.* 45, 911–921.
- 836 Tiburcio, A.F., Altabella, T., Bitrián, M., and Alcázar, R. (2014). The roles of polyamines
837 during the lifespan of plants: from development to stress. *Planta* 240, 1–18.
- 838 Turck, F., Zilbermann, F., Kozma, S.C., Thomas, G., and Nagy, F. (2004). Phytohormones
839 Participate in an S6 Kinase Signal Transduction Pathway in Arabidopsis. *Plant. Physiol.*
840 134, 1527–1535.
- 841 Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., and Leunissen, J.A.M. (2007).
842 Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res* 35, W71–W74.
- 843 Xiong, Y., and Sheen, J. (2012). Rapamycin and glucose-target of rapamycin (TOR) protein
844 signaling in plants. *J. Biol. Chem.* 287, 2836–2842.
- 845 Xiong, Y., McCormack, M., Li, L., Hall, Q., Xiang, C., and Sheen, J. (2013). Glucose-TOR
846 signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature* 496, 181–186.
- 847 Yoo, S.-D., Cho, Y.-H., and Sheen, J. (2007). Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile
848 cell system for transient gene expression analysis. *Nat. Protoc.* 2, 1565–1572.
- 849 Woodhouse, M.R., Cannon, E.K., Portwood, J.L., Harper, L.C., Gardiner, J.M., Schaeffer,
850 M.L., and Andorf, C.M. (2021). A pan-genomic approach to genome databases using
851 maize as a model system. *BMC Plant Biol.* 21, 385.
- 852 Zabala-Letona, A., Arruabarrena-Aristorena, A., Martín-Martín, N., Fernandez-Ruiz, S.,
853 Sutherland, J.D., Clasquin, M., Tomas-Cortazar, J., Jimenez, J., Torres, I., Quang, P., et
854 al. (2017). mTORC1-dependent AMD1 regulation sustains polyamine metabolism in
855 prostate cancer. *Nature* 547, 109–113.
- 856

KEY RESOURCES TABLE

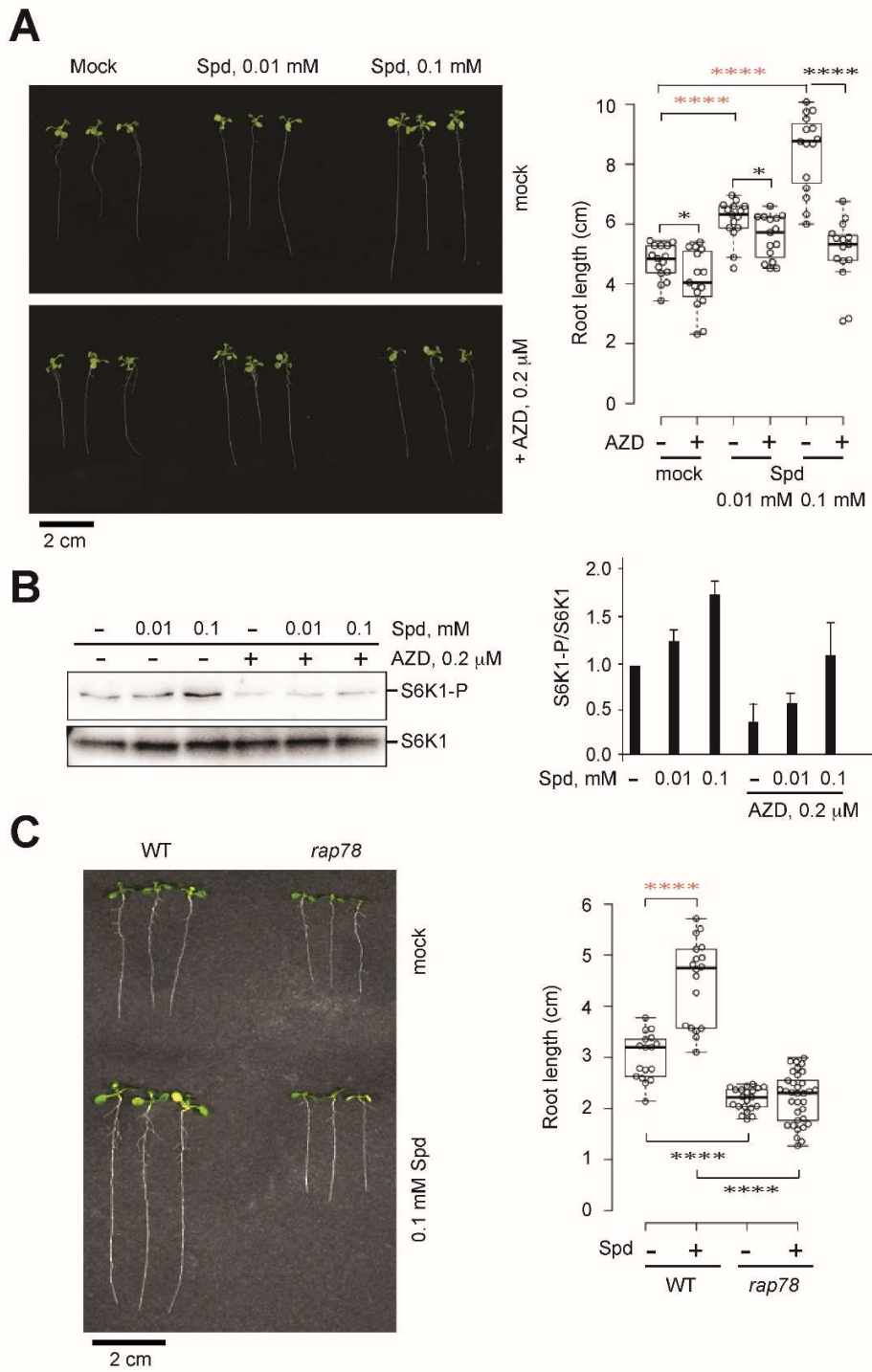
REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
AtrpS6	Enganti et al., 2018	N/A
AtrpS6-P(S240)	Enganti et al., 2018	N/A
AtS6K1/2	Agrisera	Cat#AS121855; RRID: AB_2832919
Goat anti-rabbit IgG:HRP	Southern Biotech	Cat#4030-05; RRID: AB_2687483
mTOR-P(S2448)	Santa Cruz Biotech	Cat# c-293133; RRID: AB_2861149
S6K1-P(T449)	Abcam	Cat# ab207399
Chemicals, peptides, and recombinant proteins		
1-Naphtalen Acetic Acid (1-NAA)	Sigma-Aldrich	Cat#N0640
AZD-8055	Chemdea	Cat#CD0348
Complete TM , EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Roche Molecular Diagnostics	Cat#04693132001
Cycloheximide	Sigma-Aldrich	Cat#01810
Cyclohexylamine (CHA)	Sigma-Aldrich	Cat#240648
Halt-Phosphatase Inhibitor Cocktail 100X	Thermo Scientific	Cat#78420
Heparin	Sigma-Aldrich	Cat#H3149
MES	Sigma-Aldrich	Cat#M3671
Murashige and Skoog (MS) medium	Sigma-Aldrich	Cat#M5519
Proteinase K	Sigma-Aldrich	Cat#P2308
Spermidine (Spd)	Sigma-Aldrich	Cat#S2626
Critical commercial assays		
Improm-II Reverse Transcriptase	Promega	Cat#A3800
Luminata Classic Western HRP Substrate	Merck Millipore	Cat#WBLUC0500
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix	Thermo Scientific	Cat#K0221
4-MUG for GUS detection	Sigma-Aldrich	Cat#M9130
Trizol reagent	Thermo Scientific	Cat#15596026
RNA Clean and Concentrator	Zymo Research	Cat#R1013
Experimental models: Organisms/strains		
Arabidopsis thaliana Columbia ecotype Col-0	ABRC	CS22625
Arabidopsis <i>tor</i> RNAi line 35-7	Deprost et al., 2007	N/A
Arabidopsis <i>s6k1-1</i> mutant line	ABRC	Salk_148694
Arabidopsis thaliana <i>raptor</i> mutant line <i>rap78</i>	Deprost et al., 2005	Salk_078159
Oligonucleotides		
Primers for maize transcripts, see Table S1	This paper	N/A
Recombinant DNA		
pAtCuAO1 5'UTR-GUS	This study	N/A
pmonoGFP	(Schepetilnikov et al., 2013)	N/A
pmonoGUS	(Schepetilnikov et al., 2013)	N/A
pZmPAO3 5'UTR-GUS	This study	N/A
Software and algorithms		
ImageJ	N/A	https://imagej.net

Excel	Microsoft	N/A
Gene Infinity – ORF Finder	N/A	http://www.geneinfinity.org/sms/sms_orffinder.html
BoxPlotR	N/A	http://shiny.chemgrid.org/boxplotr/
Primer3 Plus	Untergasser et al., 2007	http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi
Deposited Data		
Arabidopsis transcriptome for <i>tor</i> RNAi plants	Caldana et al., 2013	GSE38878
Arabidopsis transcriptome in response to Glucose	Xiong et al., 2013	GSE40245

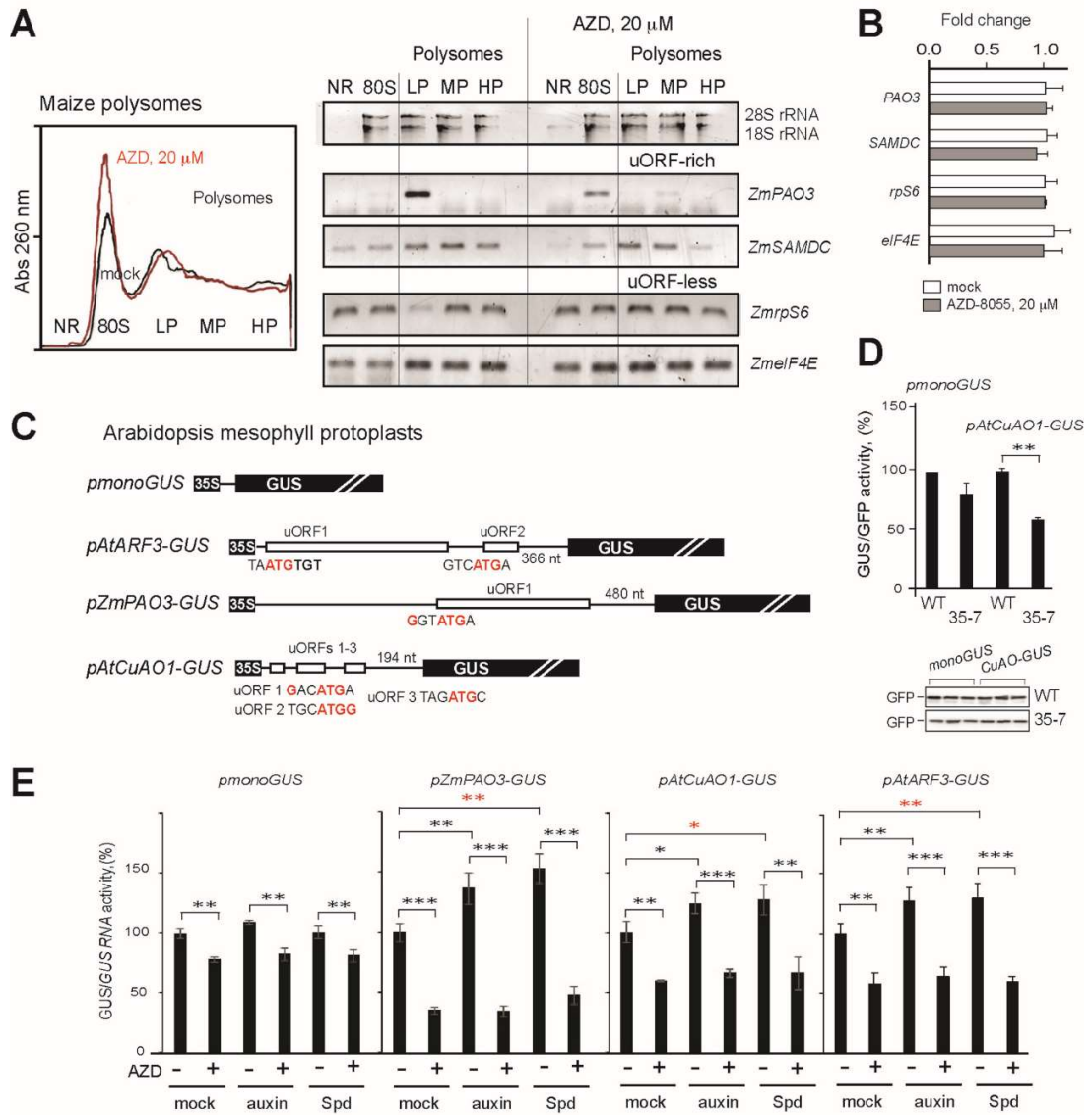
Salazar-Díaz et al. Figure 1



Salazar-Díaz et al. Figure 2

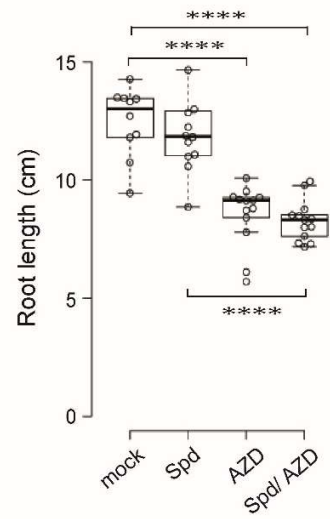
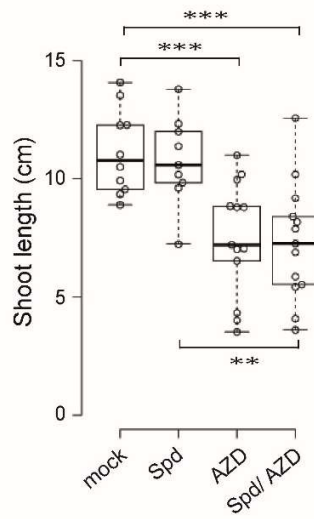


Salazar-Díaz et al. Figure 3

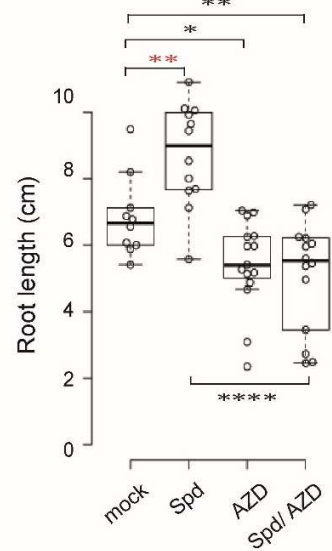
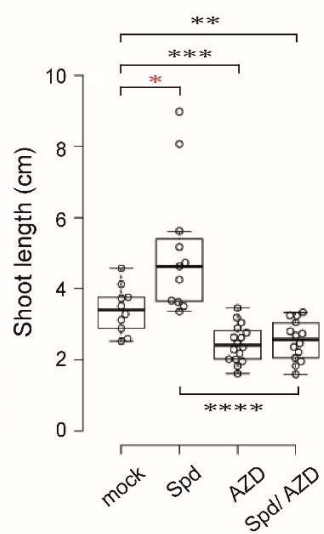


Salazar-Díaz et al. Figure 4

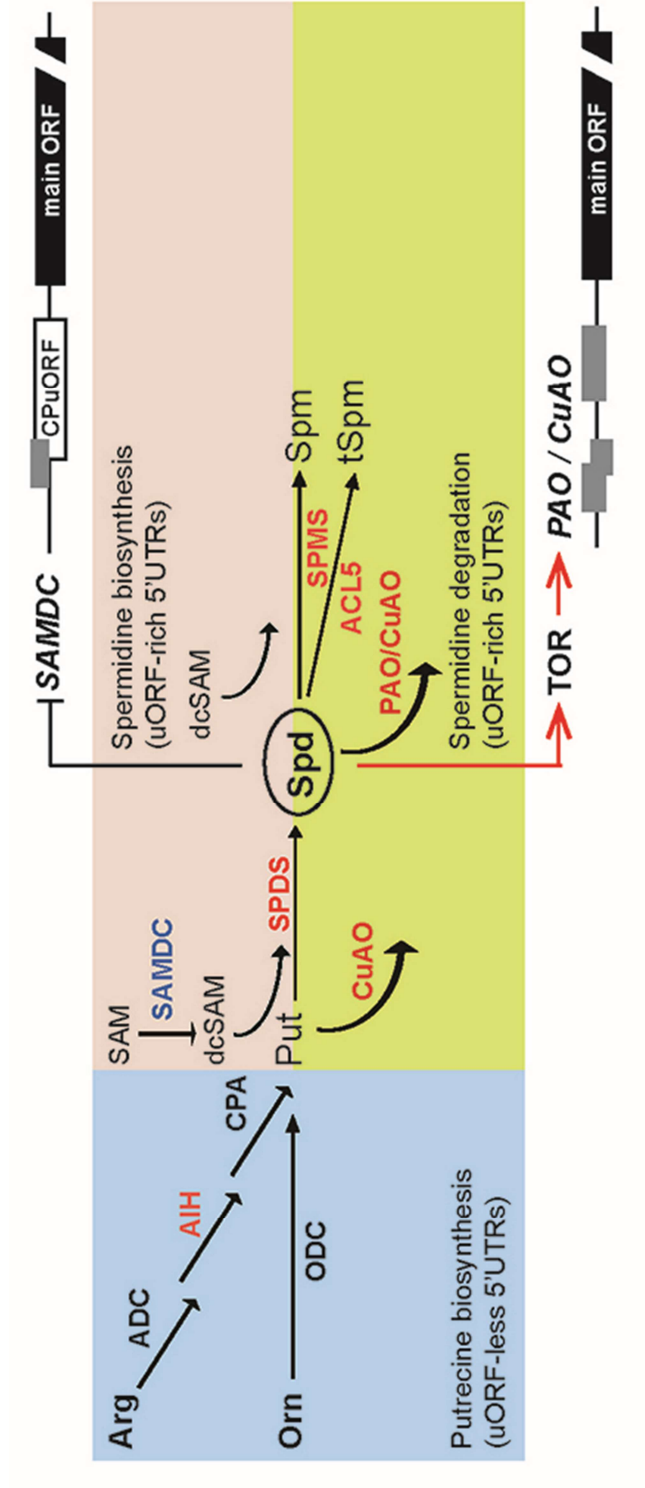
A Ambient temperature (28°C)



B Heat stress (42°C)



Salazar-Díaz et al. Figure 5



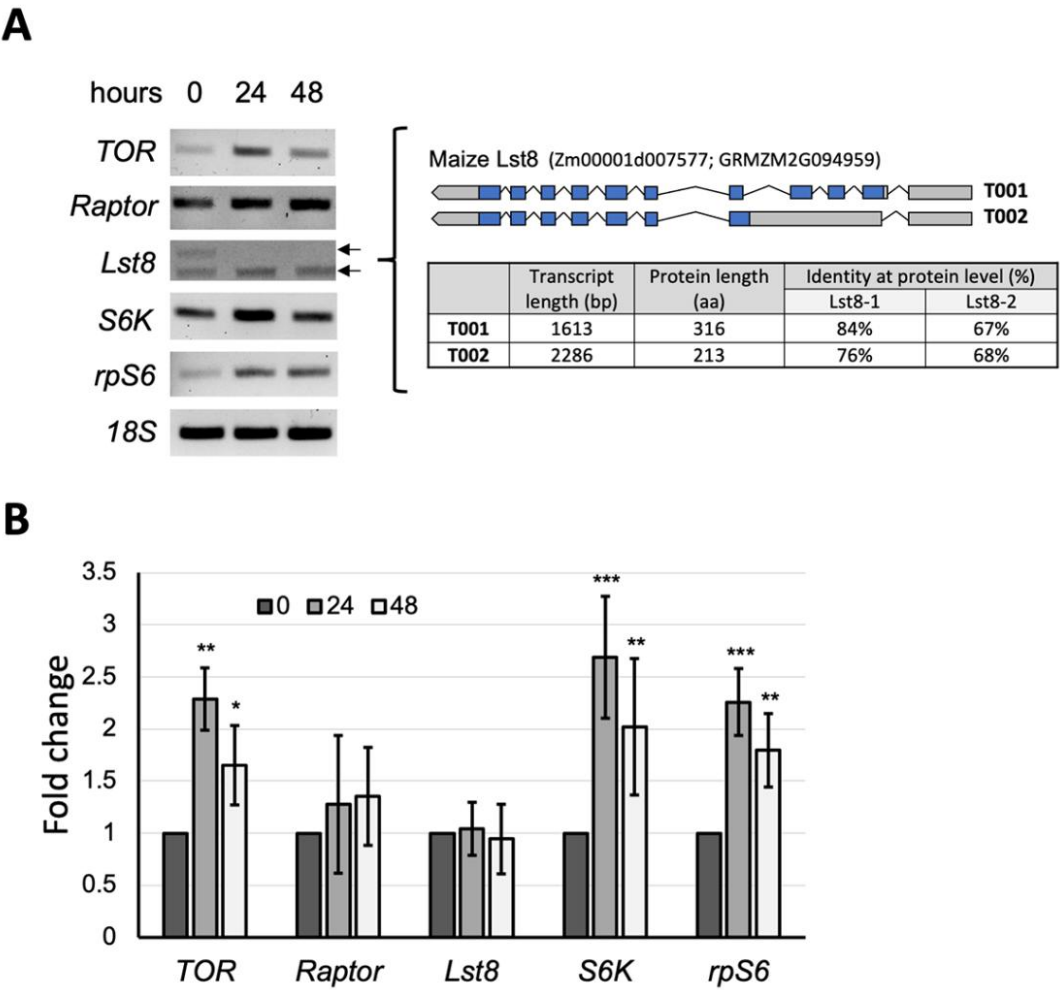


Figure S1. Accumulation of transcripts encoding TOR pathway components during maize seed germination. Related to Figure 1

(A) Transcript levels were measured at different imbibition hours as indicated by final point RT-PCR. Maize genes were identified by comparable analysis with Arabidopsis reported sequences and used to design specific primers (see **Table S1**). Arrows indicate the amplification of two isoforms for *Lst8* transcript. *Right panel* A putative alternative splicing event (T001 and T002) is indicated (Maize genome database- *Zea mays* B73_AGPv4; Woodhouse et al., 2021). Boxes represent exons, while lines represent introns; grey color refers to UTRs and blue to the coding region. T002 transcript corresponds to the larger amplification product, which would produce a shorter protein lacking 104 amino acids at the amino-terminal region. T001 renders a protein 84% identical to AtLst8-1 and 67% to AtLst8-2.

(B) Quantitative determination of transcript levels in three independent biological replicates during maize seed imbibition (0-48 h). Fold change was calculated for 24 h and 48 h with respect to 0 h, normalized by rRNA 18S. Bars represent S.D. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey HSD test, $p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$; $p < 0.001^{***}$. For maize *Lst8* quantitation included amplification of both bands.

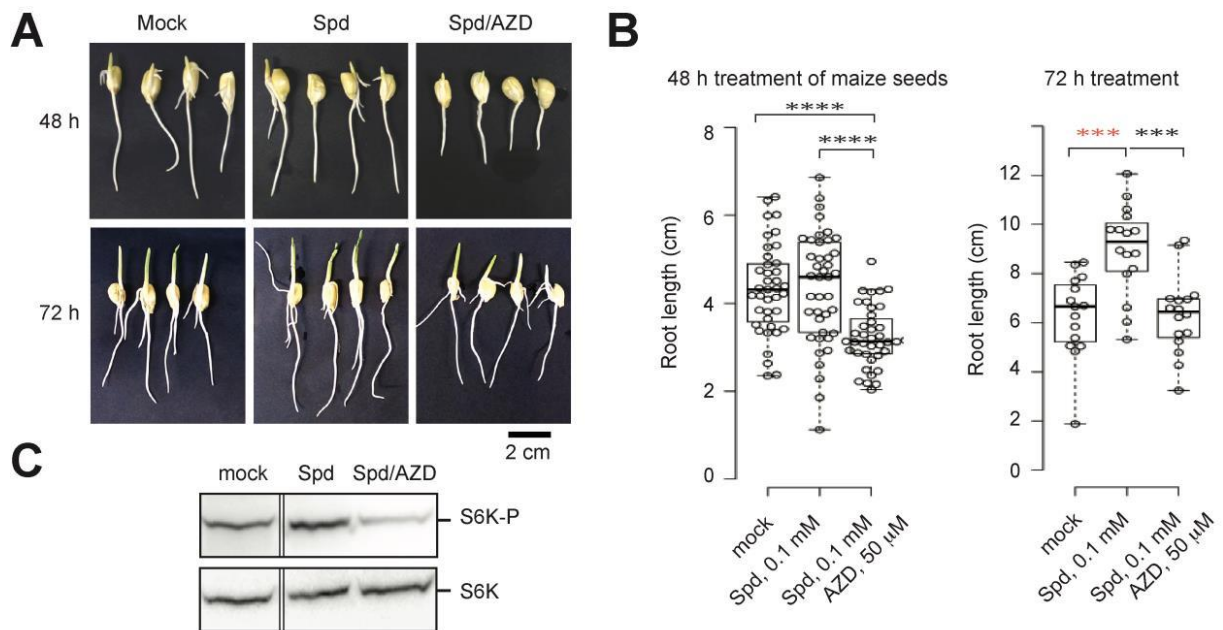


Figure S2. TOR activity is required for the Spd stimulatory effect on maize early seedling growth. Related to Figure 1

(A) Representative images of maize seeds imbibed in a rolled paper with water (Control), 0.1 mM Spd, or 0.1 mM Spd and 50 μM AZD-8055 for either 48 h or 72 h, at 28 °C, under a long-photoperiod.

(B) Quantification of root length was performed using the ImageJ software. Values are median ± SD; n = 30 for 48 h and n = 20 for 72 h treatments. Data information: Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey HSD test, $p < 0.01^{**}$; $p < 0.001^{***}$, $p < 0.0001^{****}$.

(C) Immunoblot analysis of S6K total levels and S6K-P in embryonic axes after treatment with 0.1 mM Spd or 50 μM AZD for 24 h (samples were run on the same gel and the solid line indicates removal of the extraneous lane).

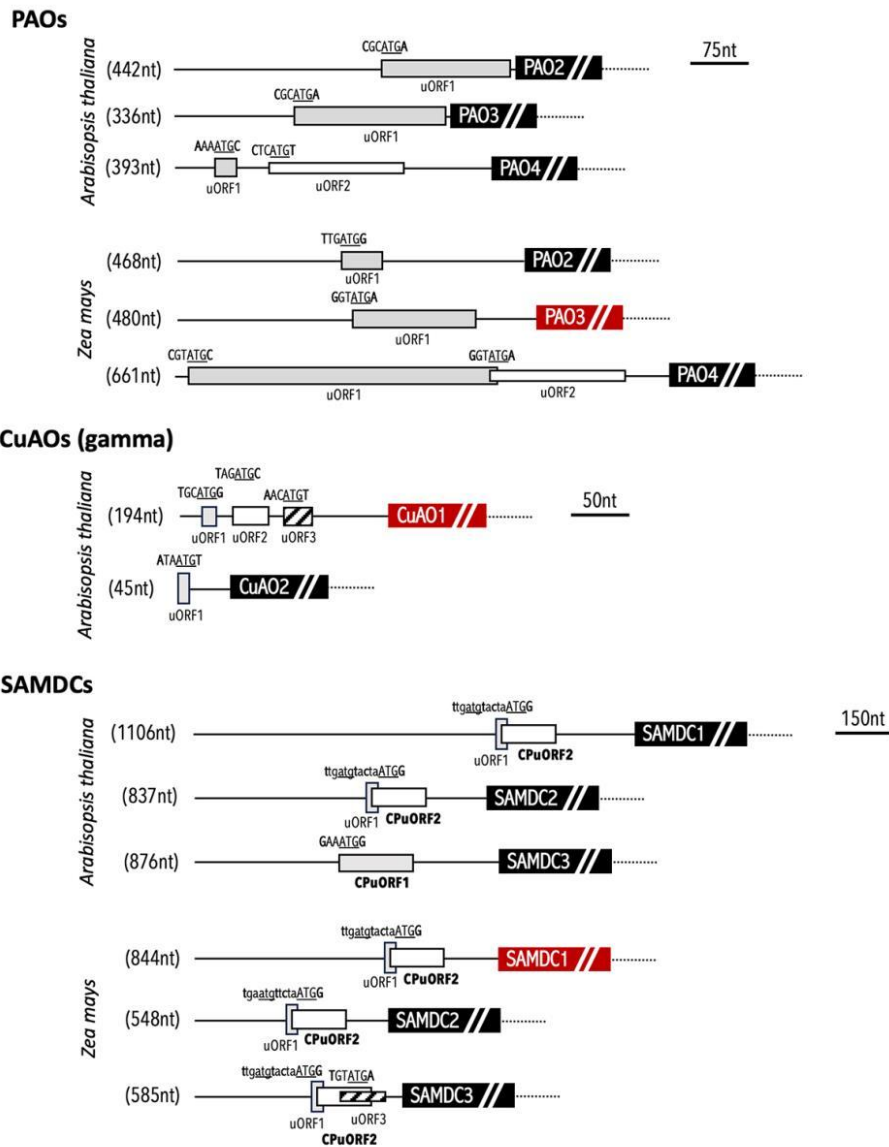


Figure S3. Schematic representation of *Arabidopsis thaliana* and *Zea mays* SAMDC, PAO and CuAO (gamma) 5'UTRs. Related to Figure 3

The 5'UTR length is indicated at the left of each transcript. Upstream open reading frames (uORFs) are shown as boxes at true positions with respect to the main ORF (see scale at the right of each set). For SAMDCs there is a conservation of tiny (uORF1) and small Conserved Peptide (CPuORF2), except for *Arabidopsis* SAMDC3. However, for the latter the single uORF is a CPuORF1. The red boxes highlight transcripts analyzed in this study.

Table S1. Maize genes and oligonucleotides used in RT-PCR analyses. Related to Figures 3 and S1.

Gene name	<i>Zea mays</i> ^a	<i>Arabidopsis thaliana</i> ^b	Oligo for <i>Zea mays</i> 5' – 3' ^c
TOR	Zm00001d037950	At1g50030	F: gatgcaagtccttcgcacaa R: ctctcggtagccactgctt
Raptor1A	Zm00001d023230	At5g01770	F: gatggtgtgaagaggctccc R: aaggaggaatgctgaccacc
Lst8	Zm00001d007577	At2g22040; At3g18140	F: cgtttgagagcatgcgttg R: ggcggatatgaggattgcca
S6K	Zm00001d022434	At3g08720; At3g08730	F: cacaaggaaccaacaagcg R: cftgaggctagagccggatg
rpS6-1	Zm00001d022180	At4g31700	F: aagtctgtccgtggttgcatt R: gaccctcatccttggtctc
SAMDC1	Zm00001d020543	At3g02470; At5g15950; At3g25570	F: aaccgttcaagccaacaag R: tgtcatgcacatctcaagcg
PAO3	Zm00001d001883	At1g65840	F: aattaccgcccagcacaatg R: tgtcatgcacatctcaagcg
eIF4E	Zm00001d041682	At4g18040	F: agatggacaaaggcctgaag R: aaccaccagcatgcatttg
Actin	Zm00001d011087	At5g09810; At3g12110; At3g53750; At2g37620	F: aacgagcttcgtgttcac R: gccactagcatagagtgataga

The conventional gene name is indicated.

^a Accession according to *Zea mays* B73_AGPv4 genome database annotation (Woodhouse et al., 2021).

^b The corresponding *Arabidopsis* accessions are given for each gene. In case of more than one accession, all shared similar identity score with respect to maize at amino acid level.

^c Oligos used as primers for amplification were designed with Primer3 Plus (Untergasser et al., 2007)

Table S2. Information for SAMDC, PAO and CuAO (gamma) 5' UTR regions annotated for *Arabidopsis thaliana* (www.arabidopsis.org) and *Zea mays* (www.maizegdb.org) databases. When citation was not available, the uORF presence was revised at Gene Infinity – ORF Finder. Related to Figures 3 and 5

<i>Arabidopsis thaliana</i>				<i>Zea mays</i> ^a			
Gene name	Accession	uORFs	References	Gene name	Accession	uORFs	References
S-adenosylmethionine decarboxylases (SAMDC)							
<i>SAMDC1</i>	At3g02470	2; CPuORF2	Hanfrey et al., 2005; von Arnim et al., 2014	<i>SAMDC1</i>	Zm00001d020543	2; CPuORF2	Franceschetti et al., 2001
<i>SAMDC2</i>	At5g15950	2; CPuORF2		<i>SAMDC2</i>	Zm00001d051056	2; CPuORF2	
<i>SAMDC3</i>	At3g25570	1; CPuORF1		<i>SAMDC3</i>	Zm00001d025773	3; CPuORF2	
<i>SAMDC4</i>	At5g18930	0		<i>SAMDC4</i>	Zm00001d003157	0	
FAD-dependent amine oxidases (PAO)							
<i>PAO1</i>	At5g13700	0	Guerrero-González et al., 2014; von Arnim et al., 2014	<i>PAO1</i>	Zm00001d024281	0	Guerrero-González et al., 2014
<i>PAO2</i>	At2g43020	1		<i>PAO2</i>	Zm00001d026334	1	
<i>PAO3</i>	At3g59050	1		<i>PAO3^b</i>	Zm00001d001883	1	
<i>PAO4</i>	At1g65840	2		<i>PAO4</i>	Zm00001d026586	2	
<i>PAO5</i>	At4g29720	0		<i>PAO5</i>	Zm00001d043681	0	
Copper-containing amine oxidases (CuAO)*							
<i>CuAO1</i>	At1g62810	3	von Arnim et al., 2014	<i>CuAO</i>	Zm00001d025103	0	
<i>CuAO2</i>	At3g43670	1					

^a Accession according to *Zea mays* B73_AGPv4 genome database annotation

^b The maize PAO3, as designated by Guerrero-González et al., 2014, actually contains only one uORF and displays higher amino acid identity to *Arabidopsis* PAO4 according to *Zea mays* B73_AGPv4 genome database annotation (Woodhouse et al., 2021).

* Only gamma CuAOs were analyzed

Table S3. Effect of TOR inhibition on transcript levels of polyamine pathway enzymes. Related to Figures 3 and 5

Information according to global transcriptome analyses available for *Arabidopsis thaliana*.

	References			Dong et al., 2015	Caldana et al., 2013	Xiong et al., 2013
	Gene name	Accession	uORFs	AZD-8055 ^a	<i>tor</i> RNAi ^a	Glucose ^b
Putrescine biosynthesis	<i>ADC1</i>	At2g16500	0	ns	ns	ns
	<i>ADC2</i>	At4g34710	0	2.86	ns	ns
	<i>AIH</i>	At5g08170	2	ns	ns	0.8
	<i>CPA</i>	At2g27450	0	ns	ns	ns
Polyamine biosynthesis	<i>SPDS1</i>	At1g23820	1	ns	ns	Ns
	<i>SPDS2</i>	At1g70310	4	ns	ns	ns
	<i>SPMS</i>	At5g53120	2-4	ns	ns	ns
	<i>SAC51</i>	At5g64340	6	ns	ns	ns
	<i>SAMDC1</i>	At3g02470	2	ns	ns	ns
	<i>SAMDC2</i>	At5g15950	2	ns	ns	ns
	<i>SAMDC3</i>	At3g25570	3	ns	ns	ns
	<i>SAMDC4</i>	At5g18930	NA	ns	ns	ns
Polyamine degradation	<i>ACL5</i>	At5g19530.1 At5g19530.2	1 3	ns	ns	ns
	<i>PAO1</i>	At5g13700	0	ns	ns	ns
	<i>PAO2</i>	At2g43020	1	ns	ns	ns
	<i>PAO3</i>	At3g59050	1	ns	ns	ns
	<i>PAO4</i>	At1g65840	2	ns	ns	ns
	<i>PAO5</i>	At4g29720	2	ns	ns	ns
	<i>CuAO1</i>	At1g62810.1 At1g62810.2	3 6	ns	ns	ns
	<i>CuAO2</i>	At3g43670	1	ns	ns	ns

^a These data were obtained under TOR activity down-regulation

^b These data were obtained under TOR activity up-regulation

ns: fold change of transcript level with respect to control plants was not significant

NA: non-available

Data S1. Related to Star Methods and Figures. The red box indicates the portion of the blot shown in the corresponding Figure.

Fig. 1A

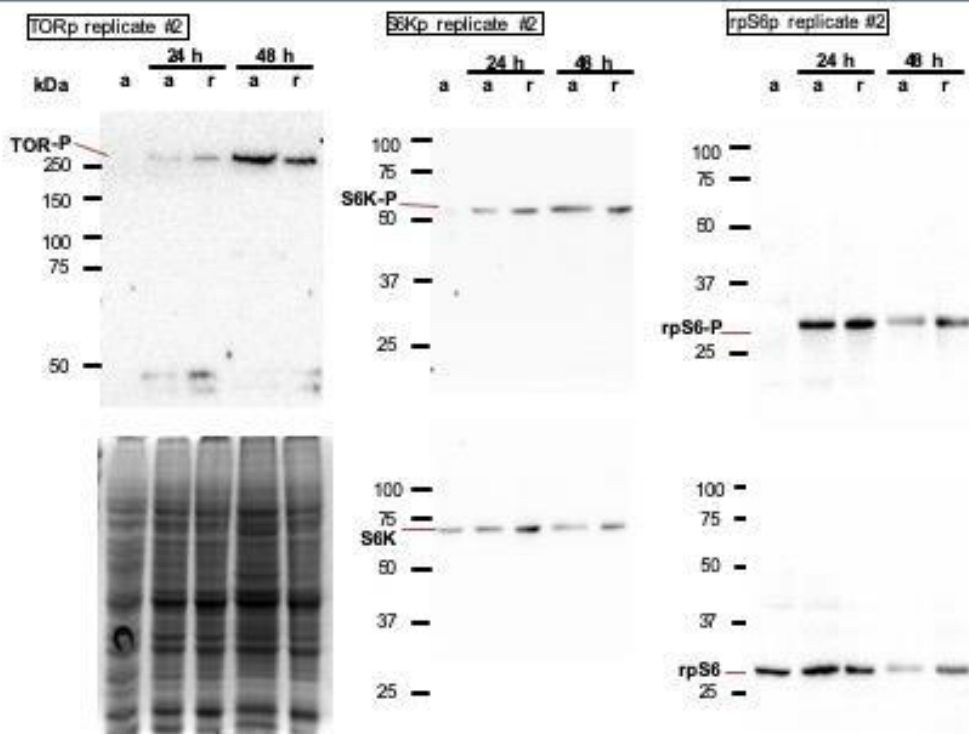
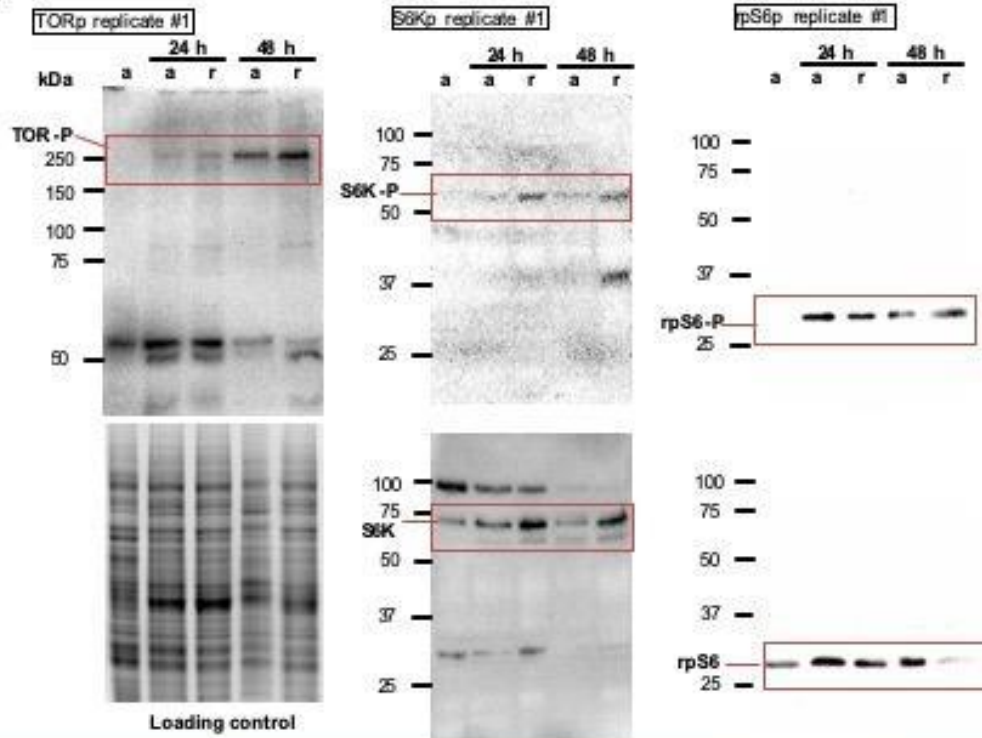


Fig. 1B

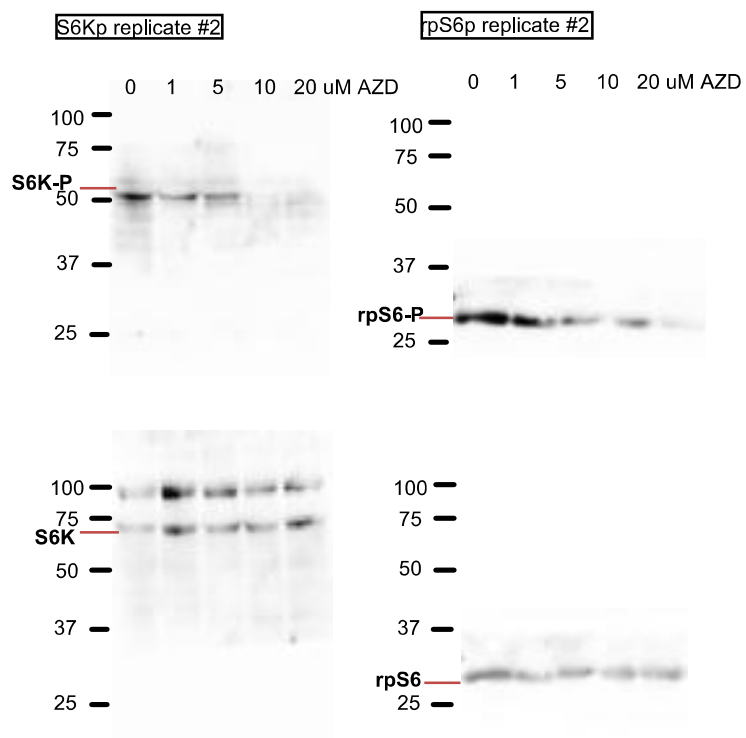
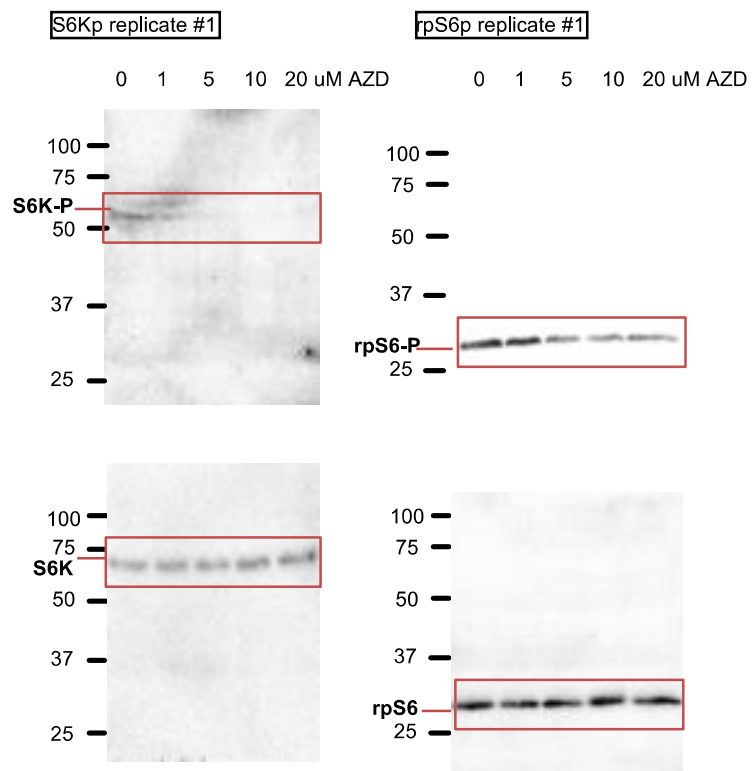


Fig. 1E

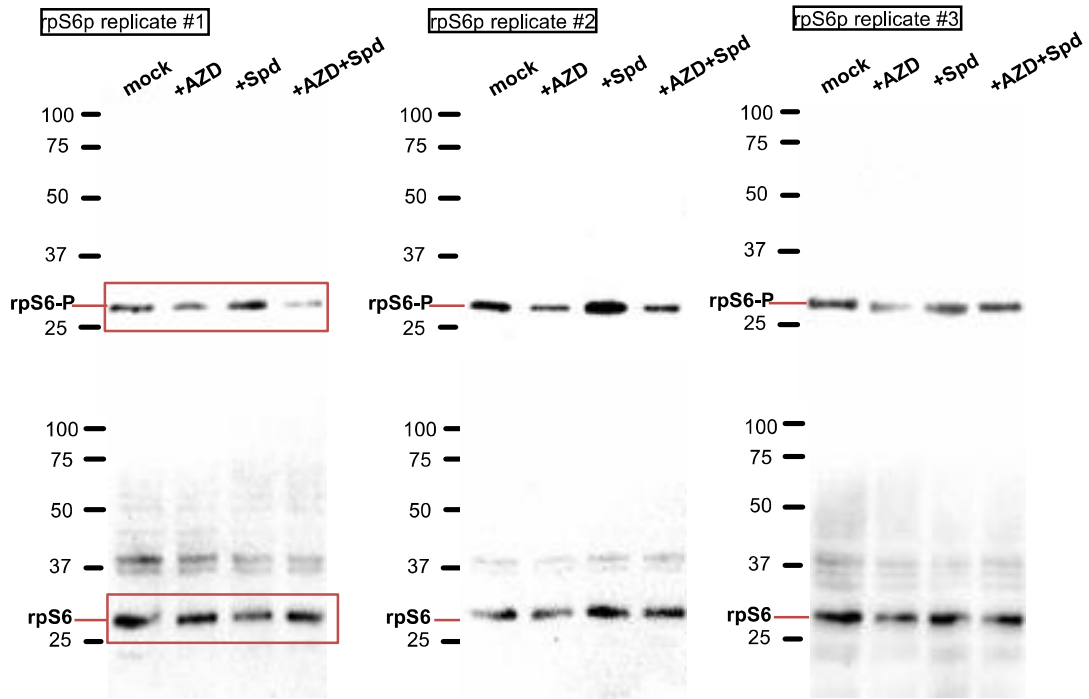


Fig. 1G

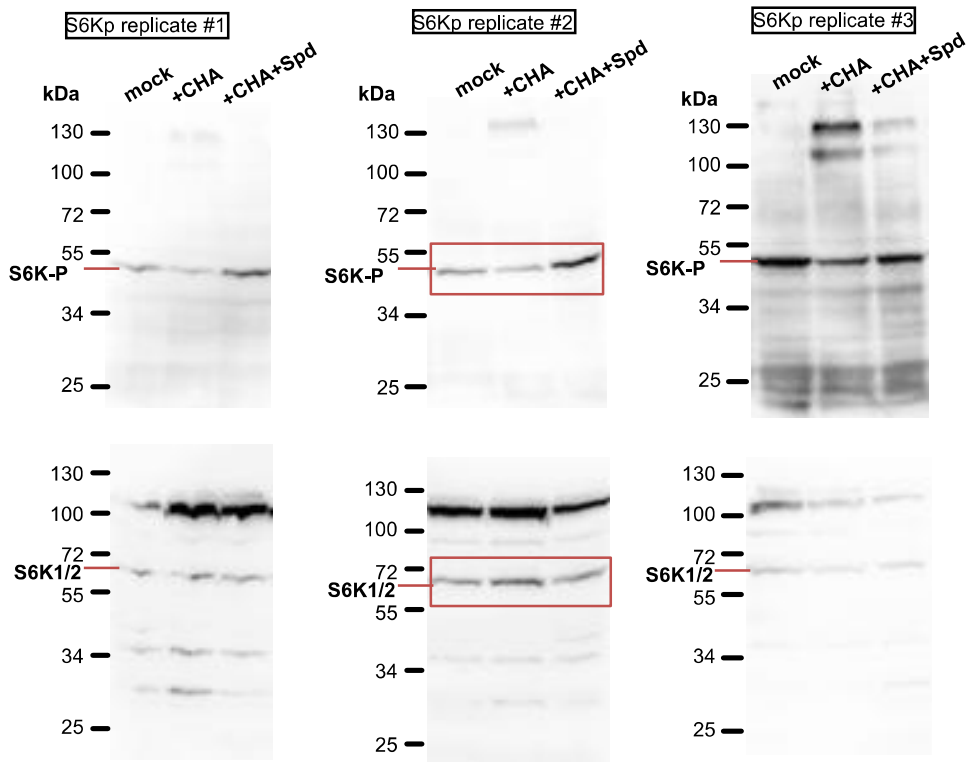
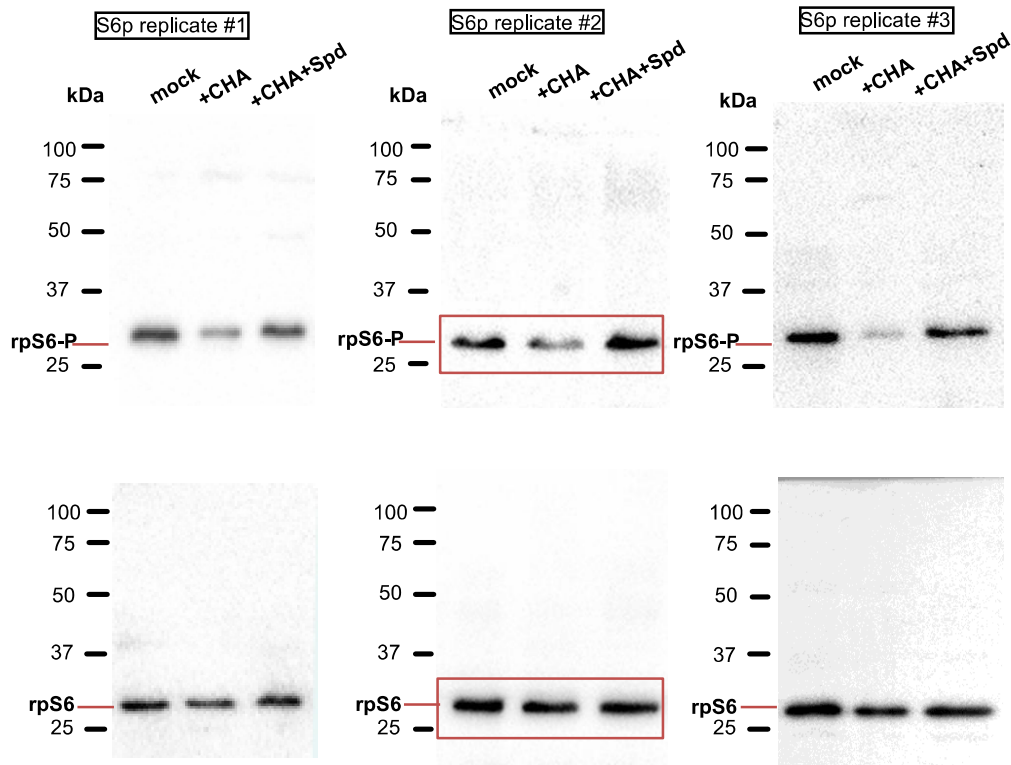


Fig. 1G



Related to Fig. 1A Replicate immunoblot analyses of phosphorylated TOR (TOR-P); S6K-P/ S6K and rpS6-P/ rpS6 in whole embryonic axes and root tissues. Loading control by Coomassie staining.

Related to Fig. 1B Replicate immunoblot analyses of phosphorylated S6K-P/ S6K and rpS6-P/ rpS6 in whole embryonic axes without (DMSO, solvent) or with AZD-8055 added for 3 h to dissected axes from 45 h-imbibed seeds.

Related to Fig. 1E Replicate Immunoblot analyses of phosphorylated rpS6-P/ rpS6 in root tips from 24 h-imbibed seeds treated with water (mock), or 0.2 mM Spd with (+) or (-) without 50 μ M AZD-8055 (AZD) for 48 h at 28 $^{\circ}$ C.

Related to Fig. 1G Replicate Immunoblot analyses of phosphorylated S6K-P/ S6K and rpS6-P/ rpS6 in whole embryonic axes from 24 h-imbibed seeds treated with 1 mM CHA alone or together with 0.2 mM Spd for 24 h at 28 $^{\circ}$ C.

Fig. 2B

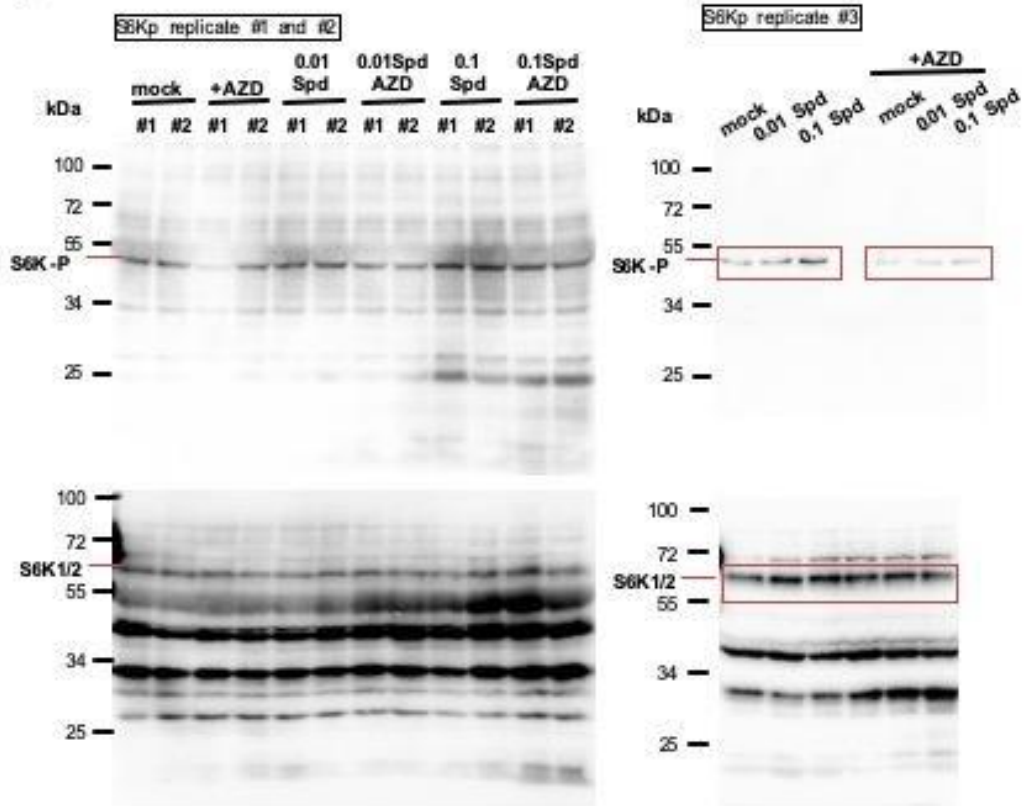
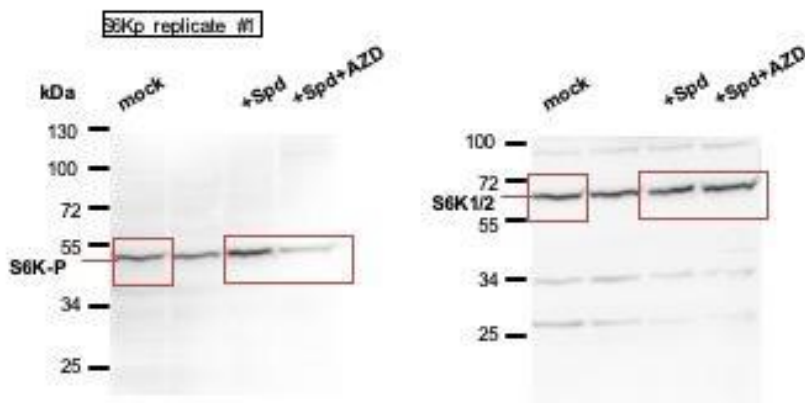
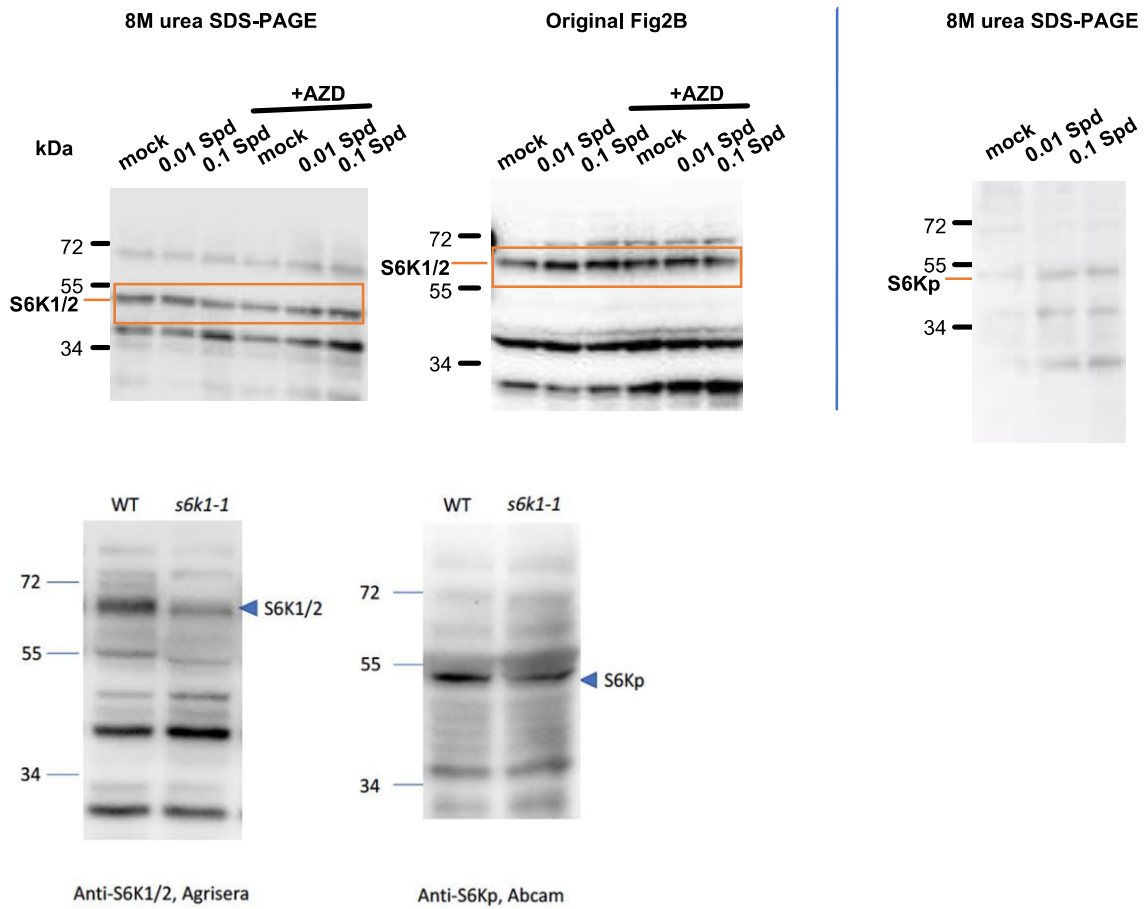


Fig. S2C



Related to Fig. 2B Replicate Immunoblot analyses of phosphorylated S6K-P/ S6K in *Arabidopsis thaliana* 14 days-old seedlings grown at 22 °C under long photoperiod in control MS (mock) or supplemented with Spd (0.01 or 0.1 mM) without (–) or with 0.2 μM AZD-8055.

Related to Fig. S2C Replicate Immunoblot analysis of phosphorylated S6K-P/ S6K in embryonic axes after treatment with 0.1 mM Spd alone or 50 μM AZD for 24 h.



Related to Fig. 2B, S2C and STAR Methods Comparison of total S6K migration on 8M urea SDS-PAGE and common SDS-PAGE (Fig. 2B). The band with different mobility on both immunoblots is highlighted by square. At right, immunoblot of phosphorylated S6K-P on 8M urea SDS-PAGE. The lower panels represent immunoblots on SDS-PAGE, showing the mobility of total S6K (left) and phosphorylated S6K-P (right) from wild type Col-0 (WT) and mutant (*s6k1-1*) Arabidopsis seedlings.

TOR (TARGET OF RAPAMYCIN): EMPERADOR EN LA TOMA DE DECISIONES QUE REGULA EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE LAS PLANTAS*

Kenia Salazar Díaz¹ y Tzvetanka D. Dinkova^{1,2}

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

²Autor de correspondencia: cesy@unam.mx

RESUMEN

La señalización por la vía de Target Of Rapamycin (TOR) es esencial en la integración de estímulos ambientales, disponibilidad de nutrientes y energía con el control por factores de crecimiento, señales de desarrollo y diferenciación en organismos eucariontes. En las plantas, su descubrimiento y caracterización son más recientes y se ha estudiado poco en especies relevantes agrónomicamente. Específicamente, se describió una vía similar a la del complejo TORC1 de mamíferos pero con particularidades del linaje vegetal que involucran la respuesta a fitohormonas y a la luz, la adaptación a estrés y el control del ciclo de vida de la planta. TOR tiene un gran impacto en el perfil metabólico, la proliferación/diferenciación celular y la regulación de la expresión genética en respuesta a glucosa, auxinas y estrés. Aquí se describen los componentes principales de la vía TOR en la planta modelo *Arabidopsis*, la señalización río arriba de TOR, los procesos que regula y algunos de los hallazgos que la presentan como un blanco atractivo para el mejoramiento de cultivos.

ABSTRACT

The Target Of Rapamycin (TOR) pathway is essential for the integration of environmental signals, nutrients and energy availability with growth factors control on development and differentiation in eukaryotic organisms. Discovery and characterization of the pathway in plants is more recent and has been poorly studied in crops. Specifically, a pathway similar to that corresponding to the mammalian TORC1 complex was described, but with peculiarities of the plant lineage involving responses to phytohormones and light, stress adaptation and plant life span control. TOR has important impacts on the metabolic profile, cell proliferation/differentiation balance and coordination of gene expression in response to glucose, auxins and stress. Here we describe the main components of the TOR pathway discovered in the model plant *Arabidopsis*, upstream of TOR signaling, downstream processes regulation, and present some of the findings as an attractive target for crop improvement.

Introducción

En organismos eucariontes existe una vía de señalización conservada que actúa como regulador maestro para integrar la disponibilidad de nutrientes y energía con el crecimiento (1, 2). La proteína central de esta vía es la cinasa TOR (*Target Of*

Rapamycin) que fue descrita por primera vez en levaduras, donde se identificó como blanco de la rapamicina, una molécula con actividad antifúngica aislada de una bacteria del suelo en la Isla de Pascua (Rapa Nui) (3). En células de animales y levaduras TOR forma dos complejos proteicos denominados TORC1 y TORC2. El primero está

PALABRAS

CLAVE:

Crecimiento, desarrollo, plantas, TOR, transducción de señales.

KEY WORDS:

Development, growth, plants, signal transduction, TOR.

constituido por la cinasa TOR, LST8 (*Lethal with Sec Thirteen8*) y RAPTOR (*Regulatory Associated Protein of mTOR*) y regula el crecimiento celular, la traducción y autofagia. El complejo TORC2, además de la cinasa y LST8, está integrado por la proteína RICTOR (*Rapamycin Insensitive Companion of mTOR*), y a diferencia de TORC1 es insensible a la rapamicina. TORC2 regula el crecimiento polarizado de la célula, el citoesqueleto de actina y la proliferación celular (4, 5). La mutación de cualquiera de los componentes principales de TORC1,2 es letal desencadenando el arresto del crecimiento durante el desarrollo embrionario.

A partir de su descripción en levaduras y células animales, la proteína TOR y su compleja vía de señalización comenzaron a describirse en otros eucariontes. Diez años después de su identificación, en el año 2002, se describió TOR en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (6). Hasta el momento, en plantas solo se ha identificado un complejo similar a TORC1, ya que no presentan homólogos a RICTOR. Aunque las funciones de TOR en plantas están conservadas con respecto a otros eucariontes, la señalización río arriba y los mecanismos efectores del complejo requieren elementos específicos que permitan la adaptación al entorno y a señales de desarrollo para la iniciación de nuevos órganos. La investigación actual se centra en el estudio de los estímulos que regulan la actividad de TOR, los efectos de la vía en el crecimiento y aunque menos explorado, la identificación de blancos específicos de plantas. En este artículo presentamos los avances en la identificación de proteínas de la vía TOR en plantas, los principales procesos moleculares que regula y su impacto en el crecimiento y desarrollo en respuesta a estímulos hormonales, nutrientes y condiciones del entorno abiótico.

La vía TOR sensora del metabolismo central está conservada en eucariontes

Los organismos eucariontes sensan las condiciones de su ambiente y en respuesta a estas se produce la adaptación de su metabolismo y cambios en el comportamiento. Algunas de estas variaciones están relacionadas con el entorno biótico o abiótico como infecciones por patógenos, cambios de temperatura, incremento en la competencia por nutrientes, entre otras. La vía TOR se encuentra altamente conservada en eucariontes y es un eje central que percibe el estatus de la célula y en respuesta regula la expresión génica, la distribución de recursos energéticos y nutricionales y permite la adaptación del organismo.

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se encontró que la rapamicina inhibe el ciclo celular

en la fase G1 y que mutaciones en los genes *fpr1* y *tor1;2* confieren resistencia a su inhibición, por lo que se propusieron como los blancos del fármaco (Figura 1). El gen *fpr1* codifica una prolina isomerasa que participa en el plegamiento de proteínas, denominada FKBP debido a que se une y es inhibida por la molécula FK506. FK506 y la rapamicina tienen actividad inmunosupresora, pero afectan diferentes vías de señalización (3). Por otro lado, se identificaron dos mutantes en genes parálogos denominados *tor1-1* y *tor2-1* que codifican una proteína de la familia PIKK (cinasas similares a PI3K: fosfatidilinositol-3-cinasa) con actividad treonina/serina cinasa.

En células animales se utilizó un acercamiento bioquímico para la identificación de la proteína blanco de rapamicina. En una purificación por afinidad, se encontró asociada al complejo FKBP/rapamicina una proteína, la cual inicialmente se denominó FRAP (*FKBP Rapamycin Associated Protein*). El aislamiento del transcrito permitió demostrar que su secuencia era muy similar a TOR1;2 de levadura y que la proteína es un ligando directo del complejo FKBP/rapamicina (7). TOR se compone de 5 dominios conservados (Fig. 1). El dominio HEAT está formado por repeticiones de aproximadamente 40 aminoácidos que se pliegan en dos α -hélice antiparalelas y está involucrado en la interacción proteína-proteína. El dominio FAT se compone de repeticiones HEAT y tetratricopéptido e interactúa con el dominio cinasa a través de residuos conservados. FRB es el sitio de unión del complejo FKBP12-rapamicina y regula la entrada de sustratos al sitio activo. FATC es un dominio de andamiaje y participa en la conformación del sitio activo. En células animales este dominio es esencial para la actividad catalítica de TOR.

TOR se asocia a RAPTOR y LST8 para formar el complejo TORC1, principal regulador de procesos anabólicos que permiten el crecimiento celular, como la biogénesis de ribosomas, síntesis de DNA y transcripción en respuesta a nutrientes y factores de crecimiento (8). RAPTOR es importante para la localización del complejo en lisosomas y su activación, así como para el reconocimiento de sustratos. LST8 es necesario para la conformación del sitio activo, la actividad catalítica de TOR y posiblemente para la regulación de la entrada de sustratos al sitio activo (9,10). TORC2 contiene LST8 y la proteína reguladora RICTOR en lugar de RAPTOR. La unión de RICTOR bloquea la asociación de TORC2 con FKBP-12 confirniéndole insensibilidad a la rapamicina. TORC2 también es activado en respuesta a factores de crecimiento e insulina pero controla procesos diferentes a TORC1 como el metabolismo de la glucosa, lipogénesis y migra-

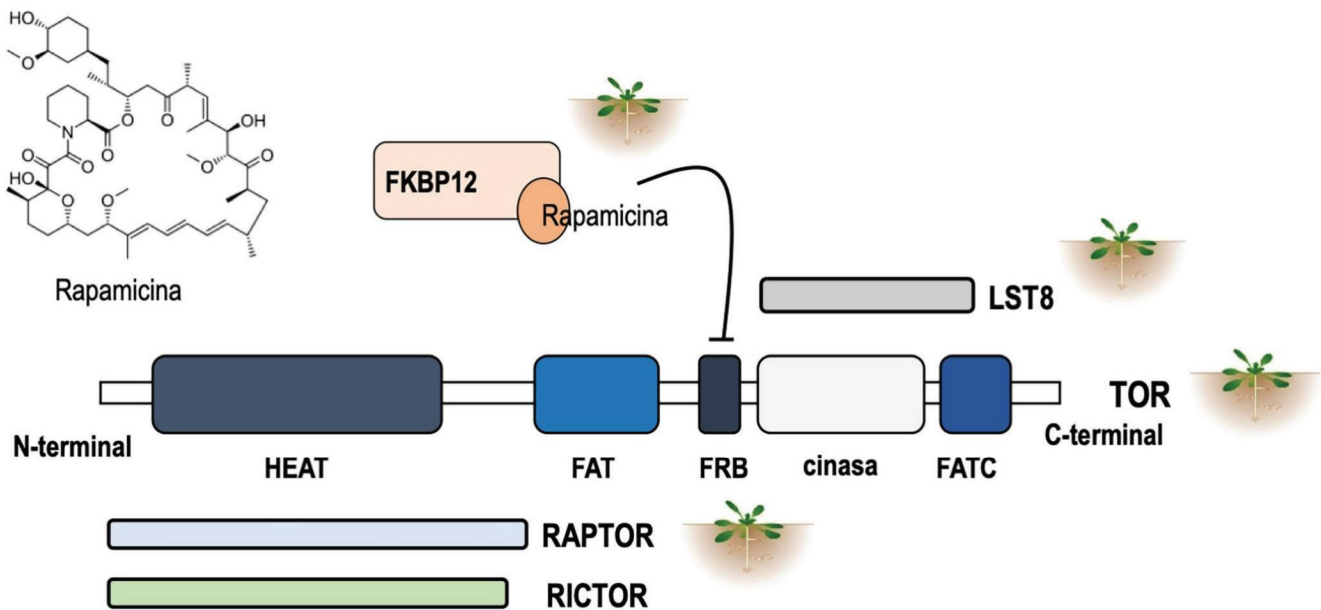


Figura 1. Representación esquemática de los dominios de la proteína TOR y los principales miembros del complejo TORC. TOR se compone de cinco dominios conservados: el dominio HEAT (Huntington, EF3A, ATM, TOR), involucrado en la interacción con otras proteínas y la asociación a membranas; el dominio FAT (Frap, ATM, and TRRA), que participa en el plegamiento del dominio catalítico; el dominio FRB (FKBP12-rapamycin binding domain), importante para la regulación de la proteína; el dominio cinasa; y FATC (FAT del C-terminal), que participa en el control de la accesibilidad de sustratos. La proteína RAPTOR interactúa con el dominio HEAT de TOR y LST8 se une a FATC y al dominio cinasa conformando el complejo TORC1 de animales que es sensible a la rapamicina. Por el contrario, el complejo TORC2 que contiene RICTOR es insensible a la rapamicina. Se indican en la figura las proteínas que presentan homólogos en plantas: FKBP12, RAPTOR, LST8 y TOR.

ción celular a través de sus principales blancos, entre los que se han descrito, la proteína Akt/PKB (*protein kinase B*) y PKC (*protein kinase C*) (11). TOR es esencial para el crecimiento en animales y levadura. La mutación de cualquiera de los componentes principales de TORC1,2 en animales es letal desencadenando el arresto del crecimiento durante el desarrollo embrionario.

A diferencia del acercamiento bioquímico que se utilizó para estudios en animales y levadura, en las plantas se utilizó un método genético para la identificación de TOR. A partir de su similitud con la secuencia codificante de mTOR, se identificó un transcrito y el gen codificante en *Arabidopsis* At1g50030, y maíz NM-001111823 (6,12). AtTOR forma parte de un complejo proteico similar a TORC1 ya que contiene LST8 y RAPTOR. Al igual que en animales, mutantes homocigotas de *tor* no son viables. RAPTOR y LST8 están codificadas por dos genes en *Arabidopsis*. Las mutantes de solo uno de los genes RAPTOR o LST8 son viables, aunque presentan crecimiento reducido. Este fenotipo es similar al que presentan mutantes reducidas en *tor*, en cuanto a crecimiento, desarrollo y perfiles metabólicos (13-15). En plantas, no se han identi-

ficado ortólogos de RICTOR, por lo que se considera que de existir otros complejos TORC en células vegetales, estos serían esencialmente diferentes al complejo TORC2 de animales y levadura.

Tanto RAPTOR como LST8 están relacionados con respuestas a estímulos ambientales. RAPTOR es esencial para el crecimiento post-embrionario en *Arabidopsis* y es blanco de un importante sensor del déficit energético en la célula, denominado SnRK (*Snf1-related kinase*). Su fosforilación conduce a la disociación del complejo y pérdida de actividad. Por otro lado, la mutación en LST8 reduce el crecimiento de la plántula principalmente en condiciones de fotoperiodo largo, y se ha propuesto que la proteína está implicada en la adaptación a cambios de fotoperiodo y deficiencia de fosfato en células vegetales (14-16).

El complejo TOR en plantas controla el crecimiento y desarrollo

Estudios fisiológicos, análisis metabólicos y perfiles de expresión en mutantes reducidas en *tor* por RNAi, *lst8* o *raptor*, así como en presencia de inhibidores ATP competitivos de TOR, señalan a la

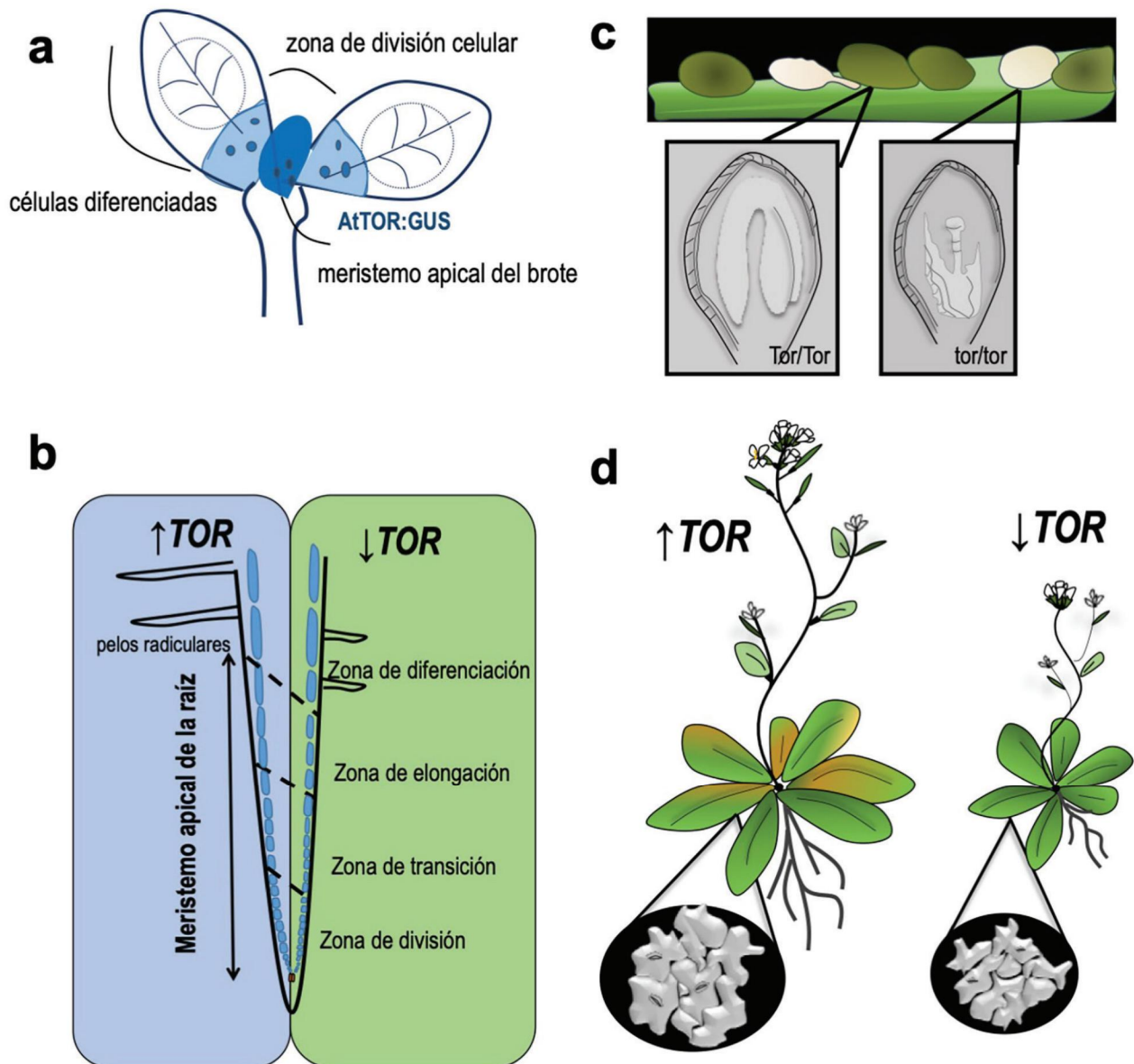


Figura 2. TOR es esencial en el control del crecimiento y desarrollo de las plantas. a) TOR se expresa en zonas meristemáticas del brote, acorde a la actividad del reportero beta-glucuronidasa (GUS; coloración azul) bajo el control del promotor del gen fusionado a la región codificante de TOR de *Arabidopsis thaliana*, AtTOR:GUS (6). b) Cambios en los niveles de TOR modifican la estructura de la raíz. La disminución de la actividad TOR reduce el tamaño del meristemo, adelanta la diferenciación y reduce el crecimiento de pelos radiculares. c) TOR se requiere para el desarrollo embrionario y su ausencia produce el arresto del crecimiento en las primeras divisiones celulares. d) La sobreexpresión de TOR estimula el crecimiento y tamaño celular, e induce la floración y senescencia de la planta, mientras que su inhibición reduce el crecimiento y desencadena retraso en el desarrollo.

vía como un importante actor en la regulación del metabolismo, proliferación y diferenciación celular. TOR se expresa principalmente en los meristemos y controla su tamaño (Fig. 2a,b), mediante la regulación del crecimiento celular en la zona de división, el número de células en proliferación y el paso de células a la zona de diferenciación (Fig. 2b) (17,18).

La inhibición de TOR afecta el crecimiento de la raíz primaria, raíces laterales e hipocotilo mientras que su sobreexpresión conduce a hojas y raíces más grandes (19, 20). Estos fenotipos coinciden con las funciones de TORC1 en mamíferos, por lo que se confirmó la conservación de la vía como regulador central del crecimiento en plantas.

La mutación homocigota de *tor* es letal y provoca el arresto del desarrollo embrionario en las primeras etapas de división (Fig. 2c). La sobreexpresión de TOR induce la floración, senescencia y el llenado temprano de las silicuas (Fig. 2d) (20). Por el contrario, mutantes inducibles por RNAi de *tor*, o nulas para *raptor* o *lst8* presentan retraso en la aparición de hojas y en la floración (13, 14, 19).

TOR regula la síntesis de proteínas, la expresión génica, el ciclo celular, y el metabolismo

Para un crecimiento acelerado se requiere la síntesis activa de proteínas para generar los componentes celulares necesarios para la elongación y división celular. En mamíferos y levadura, se demostró que TOR regula la biogénesis de ribosomas y el inicio de la traducción dependiente de 5'CAP (Fig. 3). La proteína cinasa de S6 (S6K) es un importante

blanco de TOR en la regulación traduccional, ya que controla la producción de rRNA (RNA Polimerasa I) y el inicio de la traducción (eIF4B). Además, TOR controla el inicio de la traducción inactivando a las proteínas 4E-BP (*eIF4E-Binding Proteins*) que inhiben la traducción al secuestrar el factor de unión a 5'CAP eIF4E (*eukaryotic initiation factor 4E*) e impedir el reclutamiento de mRNA por la maquinaria traduccional. La fosforilación de 4E-BP por TOR libera a eIF4E promoviendo la traducción, principalmente de transcritos que son poco reconocidos por la maquinaria traduccional (factores de crecimiento, promotores de mitosis, entre otros) (21).

La función de la vía en la regulación traduccional también se conserva en plantas, donde se ha descrito su importancia para la biogénesis ribosomal y la traducción de mRNA específicos (Fig. 3). En *Arabidopsis thaliana*, TOR se une al promotor del rDNA y desencadena su transcripción (22). Se propuso

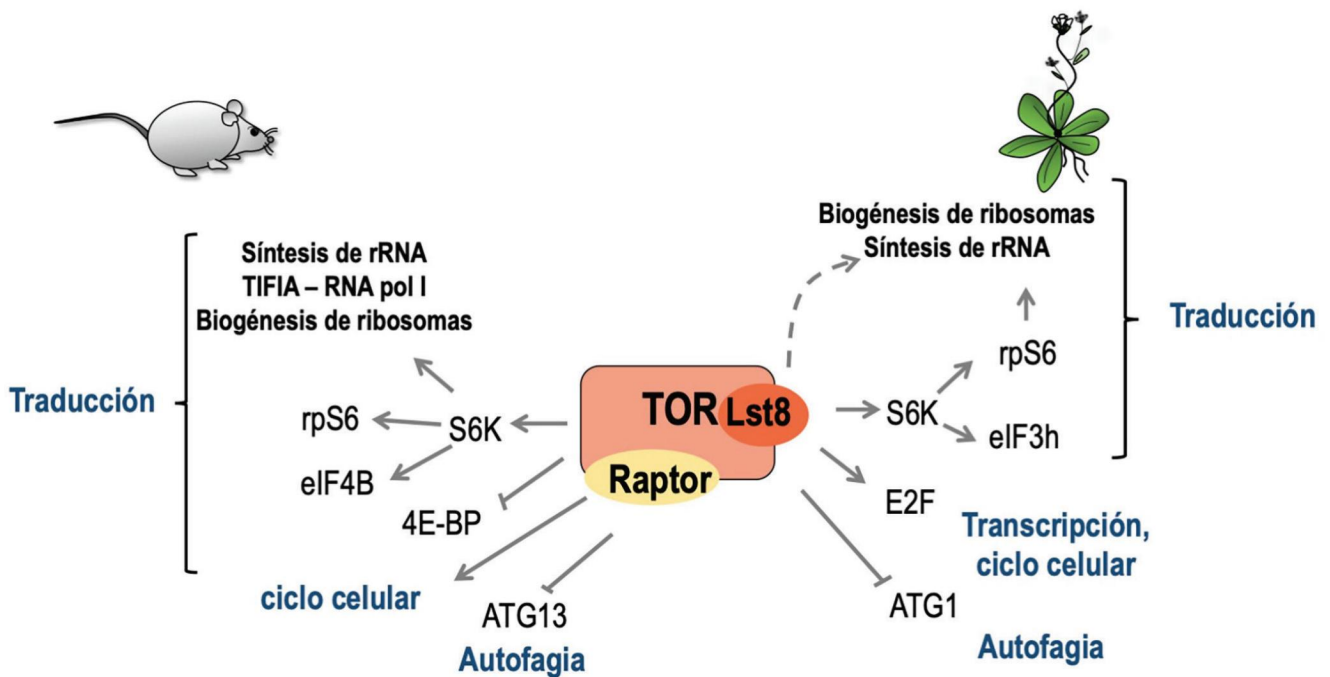


Figura 3. Conservación de procesos regulados por TOR en plantas y animales. TOR controla la traducción, transcripción y autofagia en plantas y animales. Algunos de los principales blancos de TOR se encuentran conservados, como S6K (proteína cinasa de S6) y S6 (proteína ribosomal de la subunidad pequeña). Estas proteínas están involucradas en la biogénesis de ribosomas. Además, TOR activa la transcripción de RNA ribosomal, en animales y plantas. Algunos blancos de la vía TOR involucrados en traducción en animales, como el factor de traducción eIF4B que participa en el escrutinio del 5' UTR de mRNA por la maquinaria traduccional y el factor transcripcional TIFIA que se requiere para la síntesis de RNA ribosomales (rRNA) por la RNA polimerasa I, no se han explorado en plantas. Además, las plantas no presentan homólogos de 4E-BP (proteínas de unión al factor eIF4E) que controlan la traducción de mensajeros importantes para la proliferación celular. Por otra parte, se han descrito mecanismos específicos de plantas que involucran blancos novedosos de TOR como el factor transcripcional E2F de fase S del ciclo celular y el factor de inicio de la traducción eIF3h (*eukaryotic translation initiation factor 3h*) que participa en la traducción de mensajeros que contienen uORF (marco abierto de lectura río arriba del ORF principal). Las proteínas ATG (proteínas relacionadas con autofagia) participan en la formación de autofagosomas y son inhibidas por TOR, tanto en animales como en plantas.

que TOR controla la expresión de rDNA a través de la fosforilación de la proteína ribosomal S6 (rpS6) la cual en estado inactivo (desfosforilación) interactúa con una desacetilasa de histonas que reprime la apertura de cromatina en esa zona. Cuando rpS6 se fosforila por TOR, se promueve la apertura de la cromatina en esa zona. Además, en la plántula de Arabidopsis y ejes embrionarios de maíz se comprobó que TOR participa en la síntesis de proteínas ribosomales (24, 25). La regulación a la baja de la vía TOR conlleva a un decremento en la abundancia de fracciones traduccionalmente activas – polirribosomas – aunque su efecto es menos notable que en células animales (19, 26). En las plantas no se han identificado homólogos conservados de las proteínas 4E-BP, lo que conlleva a un vínculo más débil de la vía con el inicio de la traducción. Sin embargo, TOR participa en la traducción del factor de inicio de la traducción eIF4E el cual se requiere para la traducción de transcritos presentes en la semilla seca de maíz (27).

En Arabidopsis, TOR se requiere de manera específica para la traducción de mRNAs que contienen secuencias regulatorias en el 5' UTR denominadas uORF (*upstream Open Reading Frame*) (28). Los uORF inhiben la traducción del marco abierto de lectura principal (mORF) codificado en el mensajero. Su reconocimiento y traducción pueden desacoplar a la maquinaria de traducción del transcrito y anclar el ribosoma hacia el final de la secuencia del uORF impidiendo su avance hacia el mORF o propiciar la desestabilización del mensajero. Los transcritos que contienen uORF codifican para proteínas regulatorias, de señalización y factores transcripcionales que participan en la adaptación a estrés y el control del crecimiento y desarrollo (29, 30). Se propuso que TOR activo mantiene el estado de fosforilación de sus blancos en los complejos traduccionales, que son importantes para que el ribosoma continúe el escrutinio de la región 5' UTR después de la traducción del uORF y alcance el codón de inicio del mORF. Hasta el momento se conoce que la fosforilación de S6K, rpS6 y el factor de inicio de la traducción eIF3h son importantes para este proceso (Fig. 3).

Además de la traducción, TOR tiene un fuerte impacto en la regulación transcripcional en plantas, los principales blancos a nivel de abundancia de transcrito están involucrados en la biogénesis de ribosomas, fotosíntesis, autofagia, respuestas a fitohormonas, metabolismo de la pared celular, síntesis de DNA y regulación transcripcional (31-33). Un blanco fundamental de la vía para la regulación transcripcional, es el factor de transcripción E2F, quien funciona como regulador de la entrada a fase S del ciclo celular. Este es directamente fosforilado por TOR, y su activación conlleva a la inducción de

la maquinaria de replicación y la proliferación celular (33, 34).

El extenso impacto de TOR en la regulación de la expresión génica y la señalización celular en plantas conduce a importantes cambios metabólicos. La disminución de su actividad en plántulas de Arabidopsis desencadena un redireccionamiento del flujo de carbono y el uso de nitrógeno en la célula (35). Por un lado, se produce la disminución de procesos anabólicos de consumo de energía como la síntesis de proteínas y DNA. En condiciones normales de suministro de nutrientes y luz, esto conduce a la acumulación de ácidos orgánicos, triacilgliceroles y almidón, funcionando estos últimos como sumidero del carbono celular. Además, en plantas mutantes de *Ist8* y reducidas en *tor* por microRNA artificial (amiR), se encontró un aumento de aminoácidos aromáticos y de cadena ramificada. No existe evidencia de que estos cambios se deban al aumento de la síntesis de aminoácidos (35). Sin embargo, se sugiere que podría relacionarse con la degradación de proteínas debido a la inducción de la autofagia en condiciones de inhibición de TOR y a la disminución de su incorporación en proteínas debido a la represión traduccional (19). Interesantemente, también se observaron cambios en el metabolismo de poliaminas, las cuales participan en el reciclaje de nitrógeno y son esenciales para el crecimiento de la planta.

Componentes de la vía y señalización de entrada a TOR en plantas

El complejo TOR de Arabidopsis es un centro de integración de señales nutrimentales, hormonales y de crecimiento, que traduce esta información a través de sus blancos, descritos anteriormente, permitiendo la adaptación sistémica a los cambios del entorno. Los actores proteicos de la vía de señalización de entrada a TOR han sido poco caracterizados en plantas. Es importante señalar que algunos de los componentes principales de las rutas de señalización que convergen en TOR en mamíferos no tienen ortólogos en plantas (36, 37). No obstante, la disponibilidad de genomas secuenciados ha permitido explorar la homología y proponer posibles integrantes de la ruta en plantas (Fig. 4).

En células animales el fosfatidil-inositol-3-fosfato (PI3P) es un importante señalizador celular que activa a la proteína PDK (*phosphoinositide-dependent kinase*) desencadenando la activación de TOR. Sin embargo, las plantas carecen de homólogos para la principal cinasa productora de PI3P de animales, una PI3K de clase I. Por otro lado, las proteínas PI3K de clase III, como la Vps34 (*vacuolar protein sorting 34*), catalizan la forma-

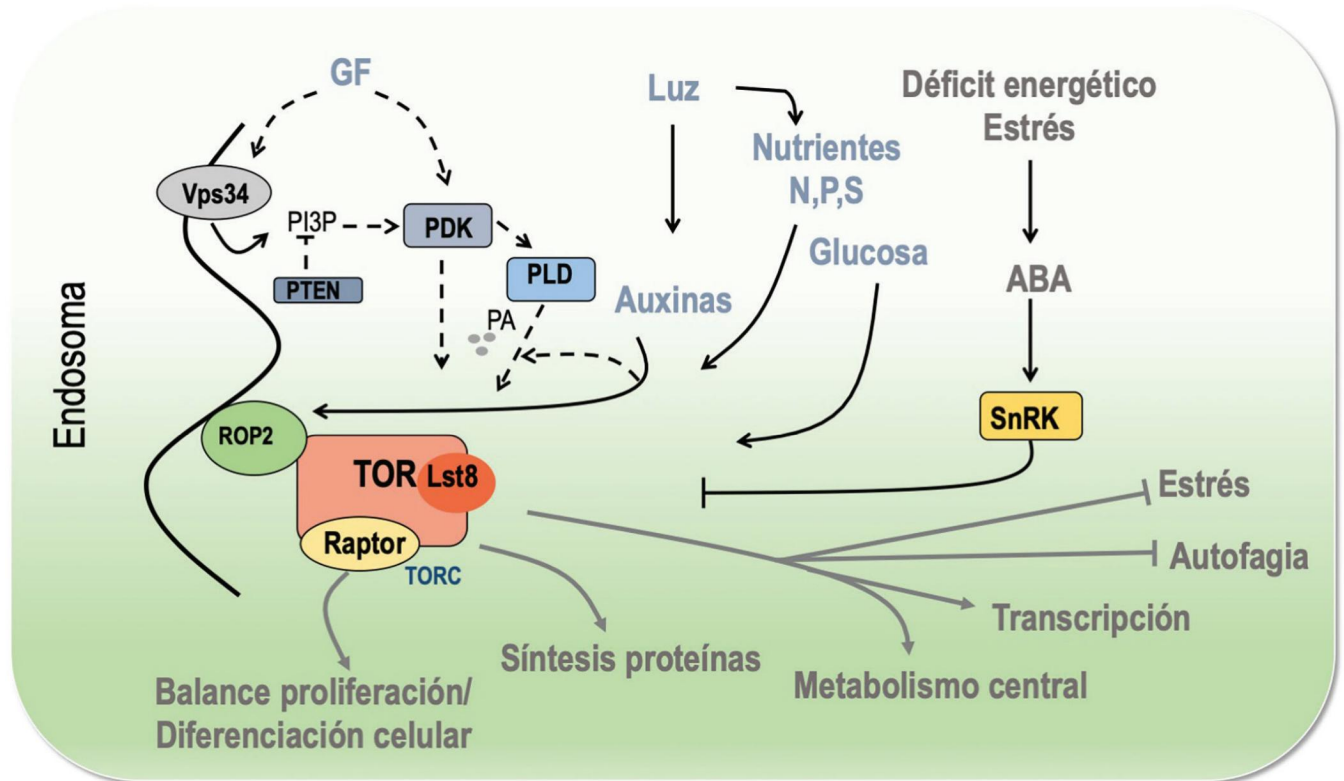


Figura 4. Componentes y señalización de entrada a la vía TOR en plantas y procesos a los que regulan. TORC recibe las señales relacionadas con la disponibilidad de nutrientes, energía, factores de crecimiento (GF) y condiciones de estrés en la célula y mediante el control de la actividad de sus proteínas blanco regula la expresión génica, el metabolismo, la proliferación celular y la adaptación a estrés en las plantas. Aunque la conexión entre factores de crecimiento y TOR no se conoce con detalle en plantas (flechas discontinuas), se ha propuesto un rol para la producción localizada de fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P) por Vps34 (vacuolar protein sorting-34) y la activación de la proteína cinasa dependiente de fosfoinositolo (PDK). PDK podría activar directamente al complejo TORC, o a través de la producción de ácido fosfatídico (PA), un activador directo de TOR en animales, por la enzima fosfolipasa-D (PLD). Por otra parte, la fosfatasa PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10) se ha propuesto como punto de control para la abundancia de PI3P. Una señal bien caracterizada en plantas, es la activación de TOR por auxinas. En este caso, la localización del complejo en endosomas permite su activación por la pequeña GTPasa ROP (proteína similar a Rho) en respuesta a la hormona vegetal. En condiciones de déficit energético y estrés otra fitohormona, ácido abscísico (ABA), activa la cinasa SnRK (cinasa similar a Snf1) que fosforila a Raptor e inhibe la formación del complejo y su actividad.

ción de PI3P a partir de fosfatidilinositol y tienen secuencias homólogas en plantas (36, 37). Estas cinasas se relacionan con el tráfico vesicular, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y respuesta a estrés. Aunque el vínculo directo entre Vps34 y TOR no se ha descrito en plantas, las mutantes de ambos genes comparten fenotipos como la inhibición del crecimiento de pelos radiculares y la acumulación de prolina. La PDK de *Arabidopsis* se une a una amplia gama de fosfolípidos, específicamente a fosfoinositolo, cuya abundancia es controlada por la fosfatasa PTEN (*phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*). Sin embargo, la función de estas proteínas en la

señalización hacia TOR no se ha comprobado aún en plantas. En células animales, en respuesta a altos niveles de nutrientes se produce ácido fosfatídico (PA) que activa TOR a través de su unión al dominio FRB. En plantas, se ha propuesto que la señalización por fitohormonas induce la producción de ácido fosfatídico derivado de PI3P por la enzima fosfolipasa D (PLD) (38) lo cual podría contribuir a la activación de TOR (37).

Entre las señales más estudiadas río arriba de TOR en plantas se encuentra la disponibilidad de nutrientes (luz, azúcares) y la presencia de hormonas vegetales como las auxinas (ácido indolacético y análogos) o el ácido abscísico (ABA) (39). La glucosa

y la luz son indispensables para la activación de TOR en el meristemo apical del brote, lo que permite la transición de la plántula al estadio fotoautotrófico (34). Aunque no se conocen los actores en la señalización de glucosa y luz hacia TOR, la activación de la cinasa depende de la obtención, a partir de la glucosa, de energía en forma de ATP en la mitocondria. La proteína SnRK es un importante sensor de la disponibilidad de energía en forma de ATP en la célula, señalándola como un candidato en la regulación de TOR mediada por glucosa.

La disponibilidad de nutrientes provenientes del suelo controla el crecimiento de la planta e impacta en la actividad de TORC1. La deficiencia de nitrógeno disminuye la actividad de TOR, mientras que la sobreexpresión de TOR permite a la planta mantener su crecimiento en exceso de nitrógeno (19). Por otro lado, existe una estrecha conexión entre la asimilación de fósforo, la producción de energía y la respuesta a estrés. Aunque en las plantas no se conoce cómo impactan los niveles de fosfato en la actividad de TOR, estudios en el alga unicelular *C. reinhardtii* muestran que la deficiencia de fosfato disminuye los niveles de LST8 y la actividad de TOR (16). Además, la deficiencia de azufre produce fenotipos asociados con la regulación de TOR a la baja, tales como la disminución en la actividad fotosintética, RNA ribosomales y la inducción de la autofagia. Curiosamente, estos defectos son parcialmente revertidos por la adición de glucosa al medio y la restauración de la actividad de TOR (40).

En la incipiente raíz de *Arabidopsis*, la glucosa y las auxinas dirigen el crecimiento a través de TOR. Las auxinas activan las proteínas ROP (*Rho like proteins*), GTPasa similares a Rho de animales, que se unen a TOR a través de un dominio rico en lisinas, induciendo la asociación del complejo a la membrana de endosomas y su activación (Fig. 4) (41). A su vez TOR controla la producción de auxinas y su maquinaria de percepción y respuesta, formando un lazo de retroalimentación positiva (28, 31). Particularmente, se describieron los factores transcripcionales de respuesta a auxinas como blancos traducionales de TOR, en concordancia con la interconexión entre ambas vías en la generación de raíces secundarias, la activación del meristemo apical del brote y la proliferación de células en cultivo (31, 34, 42).

Las condiciones de estrés afectan la actividad de TOR. La señalización mediada por ABA induce la actividad de la proteína SnRK que fosforila a RAPTOR e inhibe al complejo TOR. Así mismo, plantas mutantes de *raptor* o *tor* RNAi presentan una notable sensibilidad en la germinación bajo tratamiento con ABA o estrés osmótico, respectivamente (13, 43). Por el contrario, la sobreexpresión de TOR protege a las plántulas del estrés osmótico, salino

y ante la deficiencia de agua. Por lo que se ha propuesto que TOR protege la actividad fotosintética e induce la expresión de genes de señalización y protección en la respuesta a estrés, aliviando así la restricción de crecimiento impuesta por el estrés (44).

Conclusiones y perspectivas

La vía TOR tiene un importante impacto en el control metabólico y genético, así como en el crecimiento de organismos vegetales y su respuesta a factores ambientales y señales de desarrollo. La mayor parte de la información disponible para plantas proviene del modelo *Arabidopsis thaliana*, donde se han descrito los homólogos de la vía de señalización por TOR y algunos de los procesos moleculares que controla. Estos hallazgos demuestran que aunque se conservan muchos de los efectos de la vía, en comparación con otros eucariontes, existen diferencias esenciales que contribuyen a la plasticidad inherente de las plantas en respuesta a señales de fitohormonas, disponibilidad de nutrientes y luz. Los estudios existentes presentan a la vía como un llamativo blanco para el mejoramiento de cultivos y procesos biotecnológicos (Fig. 5). Por un lado la reducción de la actividad de TOR impacta en el flujo de carbono favoreciendo la acumulación de fuentes de biocombustible como el almidón y triacilglicerol y fijación del nitrógeno. Además, importantes moléculas en la señalización y respuesta a estrés como la prolina, trehalosa y poliaminas son reguladas por la actividad de TOR permitiendo la adaptación de la planta a estas condiciones. Uno de los mayores retos en el desarrollo de cultivos resistentes a estrés es mantener la biomasa y el rendimiento. De acuerdo a hallazgos pioneros, la sobreexpresión de AtTOR en *Arabidopsis* y arroz favorece el tamaño de la inflorescencia y el número de semillas. Sin embargo, la manipulación de la vía TOR podría inducir cambios en la duración del ciclo de vida de la planta representando una desventaja en campo. Por lo tanto, el desarrollo de sistemas inducibles de expresión o silenciamiento de los componentes de la vía y su expresión tejido específica podría proporcionar resultados más refinados. Hasta el momento existen pocos avances en el estudio de la vía TOR en plantas agrónomicamente importantes como cereales y leguminosas. La caracterización del(los) complejo(s) TOR vegetal, sus interactores, blancos y señales que lo regulan, así como la implementación de métodos globales de caracterización metabólica y proteómica de mutantes de la vía en cultivos de interés agronómico, permitirán entender las funciones de TOR dentro de la planta e impulsar estrategias de mejoramiento.

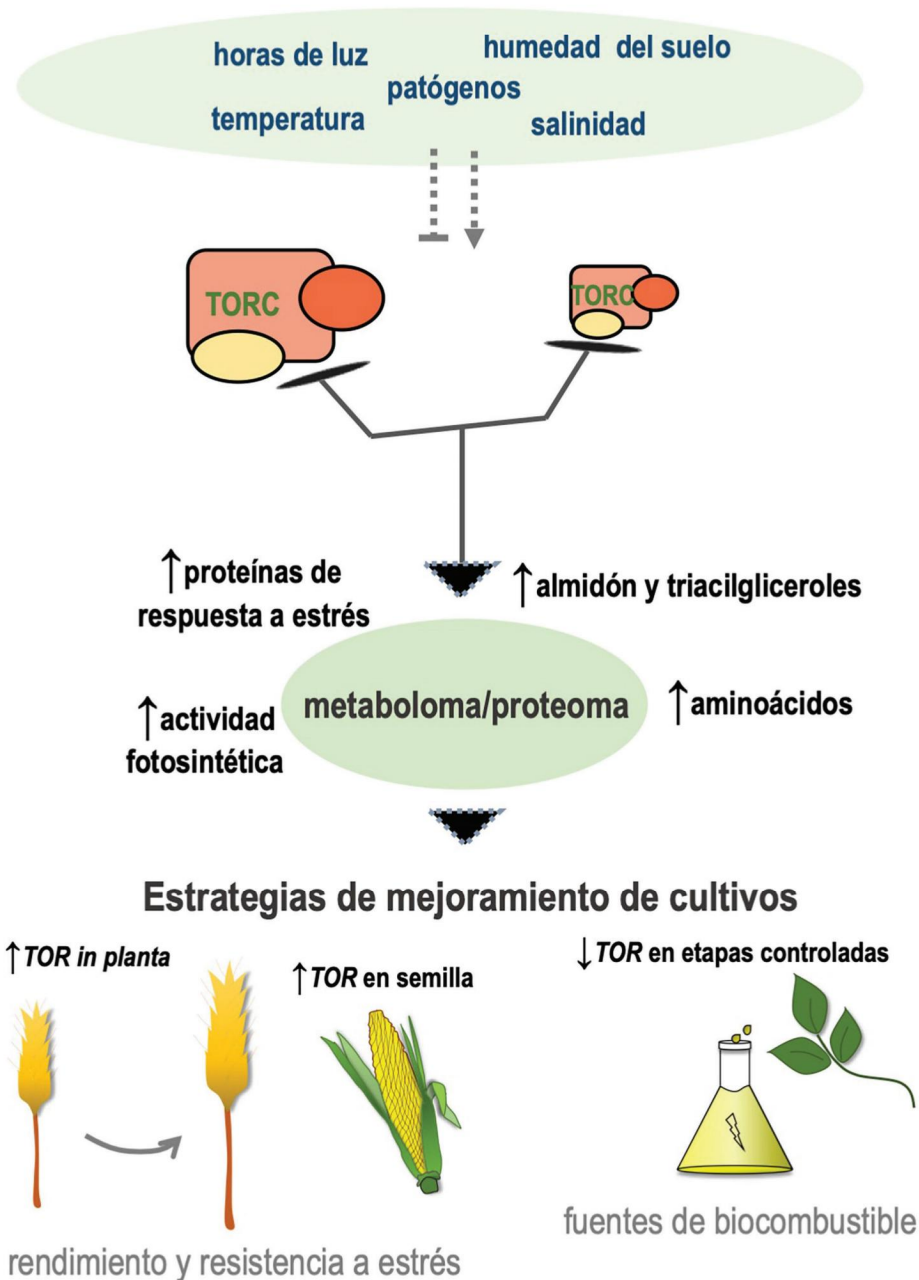



Figura 5. Aproximaciones futuras a la vía de TOR en cultivos y su aplicación en procesos biotecnológicos. TOR percibe una variedad de señales ambientales que impactan en su actividad y a través de sus blancos en el metaboloma y proteoma de la planta. La modificación de la actividad del complejo TOR en determinadas etapas de desarrollo o tejidos particulares en cultivos de interés agronómico, así como el estudio de sus efectos a nivel del metabolismo central en la planta, permitirán el diseño de estrategias para el mejoramiento de cultivos y sus usos biotecnológicos. Algunas posibilidades atractivas serían la obtención de plantas con mayor crecimiento y/o rendimiento y el aumento en la producción de fuentes de biocombustible como almidón y triacilgliceroles.

Agradecimientos

El trabajo desarrollado por las autoras sobre la regulación de la vía TOR en la germinación y establecimiento de la plántula de maíz ha sido

parcialmente financiado por el proyecto PAPIIT-UNAM IN214118 y por Facultad de Química proyecto PAIP 5000-9118. Kenia Salazar Díaz fue receptora de una beca doctoral del CONACyT (registro 576830). 

REFERENCIAS

- Fonseca, B.D., Graber, T.G., Hoang, H.D., González, A., Hernández, G., Alain, T., Swift, S.L., Weisman, R., Meyer, C., Robaglia, C., et al. (2016). Evolution of TOR and translation control. En: *Evolution of the Protein Synthesis Machinery and Its Regulation*. Editor: Springer International Publishing, Suiza, pp 327–411.
- Shi, L., Wu, Y., and Sheen, J. (2018). TOR signaling in plants: conservation and innovation. *Development* 145.
- Heitman J, Movva NR, Hall MN (1991). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 253:905-909.
- Martin, D.E., and Hall, M.N. (2005). The expanding TOR signaling network. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17:158–166.
- Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Kim, D.-H., Guertin, D.A., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr. Biol.* 14:1296–1302.
- Menand, B., Desnos, T., Nussaume, L., Berger, F., Bouchez, D., Meyer, C., and Robaglia, C. (2002). Expression and disruption of the Arabidopsis TOR (target of rapamycin) gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 6422–6427.
- Sabers, C.J., Martin, M.M., Brunn, G.J., Williams, J.M., Dumont, F.J., Wiederrecht, G., and Abraham, R.T. (1995). Isolation of a Protein Target of the FKBP12-Rapamycin Complex in Mammalian Cells. *J. Biol. Chem.* 270:815–822.
- Wullschleger, S., Loewith, R., and Hall, M.N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124:471–484.
- Schalm, S.S., and Blenis, J. (2002). Identification of a conserved motif required for mTOR signaling. *Curr. Biol.* 12:632–639.
- Yang, H., Rudge, D.G., Koos, J.D., Vaidialingam, B., Yang, H.J., and Pavletich, N.P. (2013). mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature* 497:217–223.
- Luo, Y., Xu, W., Li, G., and Cui, W. (2018). Weighing In on mTOR Complex 2 Signaling: The Expanding Role in Cell Metabolism. *OXID* 2018:15.
- Agredano-Moreno, L.T., Reyes de la Cruz, H., Martínez-Castilla, L.P., and Sánchez de Jiménez, E. (2007). Distinctive expression and functional regulation of the maize (*Zea mays* L.) TOR kinase ortholog. *Mol Biosyst* 3:794–802.
- Anderson, G.H., Veit, B., and Hanson, M.R. (2005). The Arabidopsis AtRaptor genes are essential for post-embryonic plant growth. *BMC Biol.* 3:12.
- Moreau, M., Azzopardi, M., Clément, G., Dobrenel, T., Marchive, C., Renne, C., Martin-Magniette, M.-L., Taconnat, L., Renou, J.-P., Robaglia, C., et al. (2012). Mutations in the Arabidopsis Homolog of LST8/GβL, a Partner of the Target of Rapamycin Kinase, Impair Plant Growth, Flowering, and Metabolic Adaptation to Long Days. *Plant Cell* 24:463–481.
- Salem, M.A., Li, Y., Bajdzienko, K., Fisahn, J., Watanabe, M., Hoefgen, R., Schöttler, M.A., and Giavalisco, P. (2018). RAPTOR Controls Developmental Growth Transitions by Altering the Hormonal and Metabolic Balance. *Plant Physiol.* 177:565–593.
- Couso, I., Pérez-Pérez, M.E., Ford, M.M., Martínez-Force, E., Hicks, L.M., Umen, J.G., and Crespo, J.L. (2020). Phosphorus Availability Regulates TORC1 Signaling via LST8 in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* 32:69–80.
- Díaz-Granados, V.H., López-López, J.M., Flores-Sánchez, J., Olguin-Alor, R., Bedoya-López, A., Dinkova, T.D., Salazar-Díaz, K., Vázquez-Santana, S., Vázquez-Ramos, J.M., and Lara-Núñez, A. (2020). Glucose modulates proliferation in root apical meristems via TOR in maize during germination. *Plant Physiology and Biochemistry* 155:126–135.
- Montané, M.-H., and Menand, B. (2013). ATP-competitive mTOR kinase inhibitors delay plant growth by triggering early differentiation of meristematic cells but no developmental patterning change. *J. Exp. Bot.* 64:4361–4374.
- Deprost, D., Yao, L., Sormani, R., Moreau, M., Leterreux, G., Nicolai, M., Bedu, M., Robaglia, C., and Meyer, C. (2007). The Arabidopsis TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO Rep.* 8. 864–870.
- Ren, M., Venglat, P., Qiu, S., Feng, L., Cao, Y., Wang, E., Xiang, D., Wang, J., Alexander, D., Chalivendra, S., et al. (2012). Target of rapamycin signaling regulates metabolism, growth, and life span in Arabidopsis. *Plant Cell* 24:4850–4874.
- Ma, X.M., and Blenis, J. (2009). Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10:307–318.
- Ren, M., Qiu, S., Venglat, P., Xiang, D., Feng, L., Selvaraj, G., and Datla, R. (2011). Target of rapamycin regulates development and ribosomal RNA expression through kinase domain in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 155:1367–1382.