

00591



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

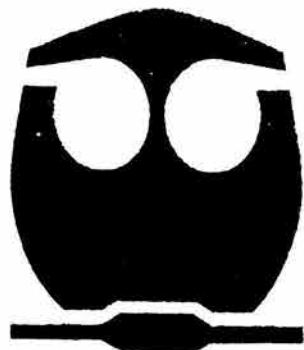
UNAM  
POSGRADO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN  
CIENCIAS BIOQUÍMICAS

“CARACTERIZACIÓN Y REGULACIÓN DE  
LA CINASA DE LA S6 DE EJES EMBRIONARIOS  
DE MAÍZ DURANTE LA GERMINACIÓN”

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTORADO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)  
P R E S E N T A:  
HOMERO REYES DE LA CRUZ



Tutor: DRA. ESTELA SÁNCHEZ DE JIMÉNEZ

MÉXICO, D. F.

Octubre de 2004



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.

## CONTENIDO

	Pagina
RECONOCIMIENTOS.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
ABREVIATURAS.....	iii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
I. ANTECEDENTES.....	1
1. MECANISMO DE SÍNTESIS DE PROTEÍNAS EN EUKARIONTES.....	1
1.1. Estructura del Ribosoma de eucariontes.....	1
1.2. Fases de la síntesis de proteínas.....	2
1.2.1. Iniciación.....	2
1.2.2. Elongación y Terminación.....	6
1.3. La síntesis de proteínas en plantas.....	7
2. CONTROL TRADUCCIONAL.....	8
2.1 Conjunto de mecanismos que regulan la traducción de los mRNAs.....	9
3. RUTAS DE SEÑALIZACIÓN QUE INCIDEN EN EL CONTROL TRADUCCIONAL.....	10
3.1. La fosforilación de la proteína ribosomal S6.....	14
3.2. La cinasa de la proteína S6 (S6K).....	16
3.3. El papel de la mTOR en la activación de la S6K.....	17
3.4. Efectores de la ruta de señalización que regula la síntesis de proteínas en plantas...	18
4. GERMINACIÓN DE SEMILLAS.....	20
4.1. Estructura de las Semillas de maíz.....	20
4.2. Germinación de maíz.....	21
5. EVENTOS MOLECULARES DURANTE LA GERMINACIÓN.....	22
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
III. HIPÓTESIS.....	28
IV. OBJETIVO GENERAL.....	28
V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
Material Biológico Usado.....	29
Tratamiento de los ejes embrionarios.....	29
Preparación de los extractos crudos de maíz.....	29
Preparación de las subunidades 40S, sustrato para medir la actividad de la S6K.....	29
Obtención de proteínas ribosomales.....	30
Identificación de la S6 cinasa de maíz (ZmS6K) por Western blot.....	30
Inmunoprecipitación de la ZmS6K.....	30
Medida de la actividad de la ZmS6K y análisis cinético.....	31
Determinación del estado de fosforilación de la ZmS6K y su actividad in vivo sobre la S6rp.....	31
Análisis bidimensional de los extractos crudos.....	32
Aislamiento y secuenciación del gen de la ZmS6K de maíz.....	33
VII. RESULTADOS.....	35
Identificación de la proteína cinasa S6 de maíz (ZmS6K).....	35
Ensayo de la actividad de la ZmS6K y su análisis cinético.....	35
Determinación del estado de fosforilación de la ZmS6K.....	39

Análisis bidimensional de la ZmS6K.....	42
Efecto de insulina, ZmIGF y AIA sobre la actividad de la ZmS6K.....	44
Efecto de rapamicina en la ruta de transducción de señales que conduce a la fosforilación de la S6. ....	45
Efecto de la rapamicina sobre la activación endógena de la ZmS6K.....	46
Aislamiento del gen de la ZmS6K de ejes embrionarios de maíz.....	49
Efecto de insulina y ZmIGF sobre la expresión del mRNA de la ZmS6K. ....	54
VIII. DISCUSIÓN.....	57
IX. CONCLUSIONES.....	62
X. PERSPECTIVAS.....	63
XI. REFERENCIAS.....	64
XII. ANEXOS.....	85

## RECONOCIMIENTOS.

Esta tesis Doctoral se realizó bajo la dirección de la Dra. Estela Sánchez de Jiménez en el laboratorio 103 del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Conjunto E, de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El comité tutorial que evaluó y asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Estela Sánchez de Jiménez

Dra. Ma. del Carmen Quinto Hernández

Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez

A las instituciones que hicieron posible la realización de este trabajo:

- Al departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas de la Facultad de Química, UNAM.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca crédito No. 126495, otorgada para poder realizar este trabajo.
- A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), UNAM: Proyectos IN301398 y 202900.
- Al Programa de Apoyo a Estudiantes de Posgrado (PAEP), UNAM: Proyecto 203324.

El Jurado del Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente: Dr. Federico E. Sánchez Rodríguez	Instituto de Biotecnología
Vocal: Dr. Fernando López Casillas	Instituto de Fisiología Celular
Vocal: Luis Alfonso Vaca Domínguez	Instituto de Fisiología Celular
Vocal: Dr. Omar Homero Pantoja Ayala	Instituto de Biotecnología
Secretario: Dra. Martha Robles Flores	Facultad de Medicina, UNAM
Suplente: Marina Macias Silva	Instituto de Fisiología Celular
Suplente: María Eugenia Torres Márquez	Facultad de Medicina, UNAM

## **AGRADECIMIENTOS.**

A la Dra. Estela Sánchez de Jiménez, por su incondicional apoyo y asesoría brindada durante el desarrollo de mi formación como investigador y sus invaluable consejos durante toda mi estancia en su laboratorio.

A la Dra. Carmen Quinto y al Dr. Luis Vaca por sus importantes sugerencias como integrantes del comité tutorial que me evaluó durante mis estudios de Doctorado.

A la Dra. María Eugenia Torres y a la Dra. Martha Robles, por sus sugerencias hechas en el comité tutorial ampliado.

A la Dra. Sara Hake y al Dr. Bruce Veit, por habernos regalado las bibliotecas de cDNA de “ear” y “seedlings” de maíz, respectivamente.

A todos mis compañeros de laboratorio 103, por haber hecho más agradable mi estancia durante todo el tiempo que me llevó terminar el Doctorado.

A Lety García y los Coordinadores del Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas por todo el apoyo recibido.

**Con especial agradecimiento a mi Madre y a mis Hermanos que contribuyeron a en gran medida a mi formación personal y profesional. A mi fallecido Padre por habernos inculcado, junto con mi madre, el estudio como medida de superación en la vida. A mi esposa Marbella y mi hija Nadia Zoé por haber sacrificado el tiempo que pudieran haber compartido conmigo y por haberme dado un motivo más para mi superación.**

## ABREVIATURAS.

**AIA** - ácido 3-indol acético

**atPK6** - cinasa de la S6rp de *Arabidopsis thaliana*

**atPK19** - cinasa de la S6rp de *Arabidopsis thaliana*

**cDNA** - ácido desoxiribonucleico complementario

**CAP** - <sup>7</sup>mGpppG; nucleótido modificado en el extremo 5' del mRNA

**4EBP** - proteína de unión al eIf4E

**eIF** - factor del inicio de la traducción en eucariontes

**eEF** - factores de elongación en eucariontes

**eRF** - factor de terminación de eucariontes

**FKBP12** - proteína de unión a rapamicina

**IGFs** - factores de crecimiento semejante a insulina

**IRES** - sitio interno de entrada del ribosoma

**MAP** - proteína cinasa activada por mitógenos

**mRNAs** - ácido ribonucleico mensajero

**mTOR** - cinasa blanco de rapamicina de mamíferos

**p70<sup>S6K</sup>** - cinasa de la S6rp de mamíferos

**PAGE** - electroforesis en geles de poliacrilamida

**PABP** - proteína de unión a la cola de poli A<sup>+</sup>

**PDK1** - proteína cinasa dependiente de fosfolípidos 1

**PI3K** - fosfatidilinositol 3-OH cinasa

**PKB** - proteína cinasa B

**S6rp** - proteína ribosomal S6

**SDS** - dodecil sulfato de sodio

**TOP** - tracto de pirimidinas

**5'TOP** - tracto de pirimidinas en la región 5'UTR

**Treo-229** - treonina en la posición 229

**Treo-389** - treonina en la posición 389

**5'UTR** - región 5' no traducible

**ZmIGF** - factor de crecimiento relacionado con insulina

**ZmS6K** - S6rp cinasa de maíz

## RESUMEN.

La regulación de la fosforilación de la proteína ribosomal S6 (S6rp), y las rutas de transducción de señales activadas por estímulos externos, que conducen a la activación de la cinasa de la S6 (S6K), parecen jugar un papel clave en la regulación de la traducción de los mensajes que codifican para las proteínas del aparato traduccional, llamados 5'TOP (del inglés, 5'UTR tract of oligopyrimidine). En mamíferos, S6rp es fosforilada por la p70<sup>S6K</sup> bajo estímulos mitogénicos y condiciones nutricionales favorables. En extractos crudos de ejes embrionarios de maíz se identificó una proteína de 62 kDa (ZmS6K) con anticuerpos contra la p70<sup>S6K</sup> de humano. ZmS6K demostró tener actividad sobre la proteína ribosomal S6 tanto *in vitro* como *in vivo* y sobre un péptido sintético que contiene los sitios fosforilables de la S6rp, con parámetros cinéticos similares a los de la p70<sup>S6K</sup>. La activación de la ZmS6K se llevó a cabo por fosforilación en múltiples sitios de la proteína. De igual forma, el incremento en la actividad de la proteína correlaciona con la fosforilación en el residuo equivalente a la treonina-389 de la p70<sup>S6K</sup>. Durante el proceso de germinación, el nivel de expresión de la proteína ZmS6K permanece casi constante, mientras que su mensajero se incrementa. Lo más importante, es que su actividad y su movilidad electroforética inducida por fosforilación y por otras posibles modificaciones postraduccionales se incrementa durante la germinación. El tratamiento de ejes embrionarios con factores de crecimiento como insulina, un factor endógeno de maíz inmunológica y bioquímicamente relacionado con insulina (ZmIGF) o AIA, induce un incremento en la fosforilación y en la actividad de la ZmS6K. El tratamiento de los ejes embrionarios con rapamicina, un inhibidor de la ruta de señalización que conduce a la fosforilación de la S6rp en mamíferos a nivel de la cinasa mTOR, inhibe también la fosforilación y la actividad de la ZmS6K, sugiriendo la presencia de una ruta de señalización regulada de manera semejante y la presencia de la proteína equivalente en plantas.

Por lo anterior se concluye que ZmS6K es la proteína ortóloga en maíz de la p70<sup>S6K</sup> de mamíferos, con un papel importante en la regulación del control traduccional que incide en el crecimiento y proliferación celular durante la germinación de maíz.



## ABSTRACT.

The regulation of ribosomal protein S6 (S6rp) phosphorylation and the signal transduction pathways activated by external stimuli that lead to the S6 kinase (S6K), seems to play a key role in the translation regulation of messengers that encodes for the translational apparatus proteins, called 5'TOP (5'UTR tract of oligopyrimidine) mRNAs. In mammals, S6rp is phosphorylated by p70<sup>S6K</sup> under mitogenic stimulation and favorable nutritional conditions. In crude extracts from maize embryonic axes, a 62 kDa protein was identified (ZmS6K) using anti-human p70<sup>S6K</sup> antibodies from rabbit. ZmS6K demonstrated to have activity on S6rp both, *in vitro* and *in vivo* and on a synthetic peptide that contains the S6rp fosforilable sites. The ZmS6K kinetic parameters were similar to those used in p70<sup>S6K</sup> activity assays. The ZmS6K activation was carried out by phosphorylation in multiple sites on the protein. In the same way, the increment in the Zm6K activity correlates with the phosphorylation in the equivalent p70<sup>S6K</sup> threonine-389 residue. During the germination process, the level of ZmS6K protein expression remains almost steady, while its messenger is increased. Most important, ZmS6K activity and electrophoretical mobility induced by phosphorylation and other possible postranslational modifications, increased during germination. Embryonic axes treatment with an immunological and biochemically insulin-related maize growth factor (ZmIGF), or IAA, induces an increment in ZmS6K activity and phosphorylation. Embryonic axes treatment with rapamycin, an inhibitor of the signal transduction pathway that drives to the S6rp phosphorylation in mammals at level of mTOR kinase, also inhibits the ZmS6K phosphorylation and activity, suggesting the presence of a similar signal transduction pathway in maize, as well as, the presence of the equivalent TOR protein in plants.

Taken together all this data, it is concluded that ZmS6K is the mammalian p70<sup>S6K</sup> ortholog protein in maize, with an important role in the translational control regulation that impacts growth and cellular proliferation during maize germination.

## **I. ANTECEDENTES.**

### **1. MECANISMO DE SÍNTESIS DE PROTEÍNAS EN EUKARIOTES.**

La síntesis de proteínas es uno de los procesos celulares de mayor consumo de energía, por lo que su regulación debe estar finamente acoplada al estado metabólico de las células (Warner, 1999; Pestova y Hellen, 2000; Rutter et al., 2002). La proliferación celular normalmente requiere que la célula en crecimiento ajuste su capacidad de biosíntesis de proteínas en respuesta a la disponibilidad de nutrientes, así como a la presencia de factores de crecimiento y otras señales químicas. Esta respuesta involucra cambios coordinados, ya sea en la velocidad de traducción, así como en la abundancia de la maquinaria de síntesis en sí, específicamente de los ribosomas. El acoplamiento estrecho entre contenido de ribosomas y velocidad de crecimiento es entendible desde dos puntos de vista. Primero, cuando las células están en sus velocidades máximas de crecimiento, bajo las condiciones óptimas, una alta concentración de ribosomas es necesaria para sustentar las demandas de biosíntesis de proteínas. Segundo, como la síntesis de ribosomas es energéticamente muy costosa, para conservar sus recursos, las células deben limitar la producción de nuevos ribosomas bajo condiciones en las cuales la demanda de síntesis de proteínas es baja, tal como ocurre cuando los nutrientes están en condiciones limitantes (Proud, 2002; Bougnet et al., 2003). La síntesis de proteínas es también uno de los procesos celulares más complejos, que involucra la acción concertada de muchas moléculas de RNA y proteínas en múltiples pasos secuenciales (Pestova y Hellen, 2000). Por tanto, antes de discutir los mecanismos que regulan la síntesis de proteínas, evento conocido como “control traduccional”, es necesario conocer el mecanismo general de síntesis de proteínas en eucariotes, haciendo énfasis en algunas diferencias de este mecanismo en plantas.

#### **1.1. Estructura del Ribosoma de eucariotes.**

Los ribosomas de eucariotes son complejos ribonucleoproteicos con un coeficiente de sedimentación 80S. Este complejo está formado por dos subunidades distintas con coeficientes de sedimentación de 60S (subunidad grande) y 40S (subunidad pequeña). La subunidad grande contiene alrededor de 50 proteínas diferentes y tres moléculas de rRNA de 5S, 5.8S y 28S respectivamente. Por otro lado, la subunidad pequeña consta de una molécula de rRNA de 18S y aproximadamente 30 proteínas diferentes (Lewin, 1997).

## 1.2. Fases de la síntesis de proteínas

### 1.2.1. Iniciación.

Los modelos utilizados para ilustrar el mecanismo de inicio de la traducción se han basado principalmente en los resultados de experimentos bioquímicos *in vitro* utilizando, en la gran mayoría de ellos, el mRNA de  $\beta$ -Globina como mensajero modelo con estructura CAP (un 7-metil GTP invertido como primera base en el extremo 5' del mRNA) (Pestota y Helen 2000). Aunque algunos pasos en el esquema ya han sido comprobados experimentalmente, es importante puntualizar que algunos pasos en el proceso de iniciación todavía se entienden pobremente por lo que el esquema se deberá considerar como modelo de trabajo. Específicamente, la iniciación de la traducción de un pequeño pero significativo grupo de mRNAs eucarióticos, que ocurre a través de IRES (del inglés, Internal Ribosomal Enter Site) (Jackson, 1995; Bonnal et al., 2003).

En todos los organismos, la síntesis de proteínas inicia con subunidades ribosomales separadas, liberadas después de terminar la traducción de un mRNA. La formación del ribosoma 80S inactivo es inhibida por las actividades anti-asociación de los factores eIF-1A y eIF-3, los cuales se unen a la subunidad 40S para prevenir su asociación con la 60S (Merrick, 1992; Hershey y Merrick, 2000; Preiss y Hentze 2003).

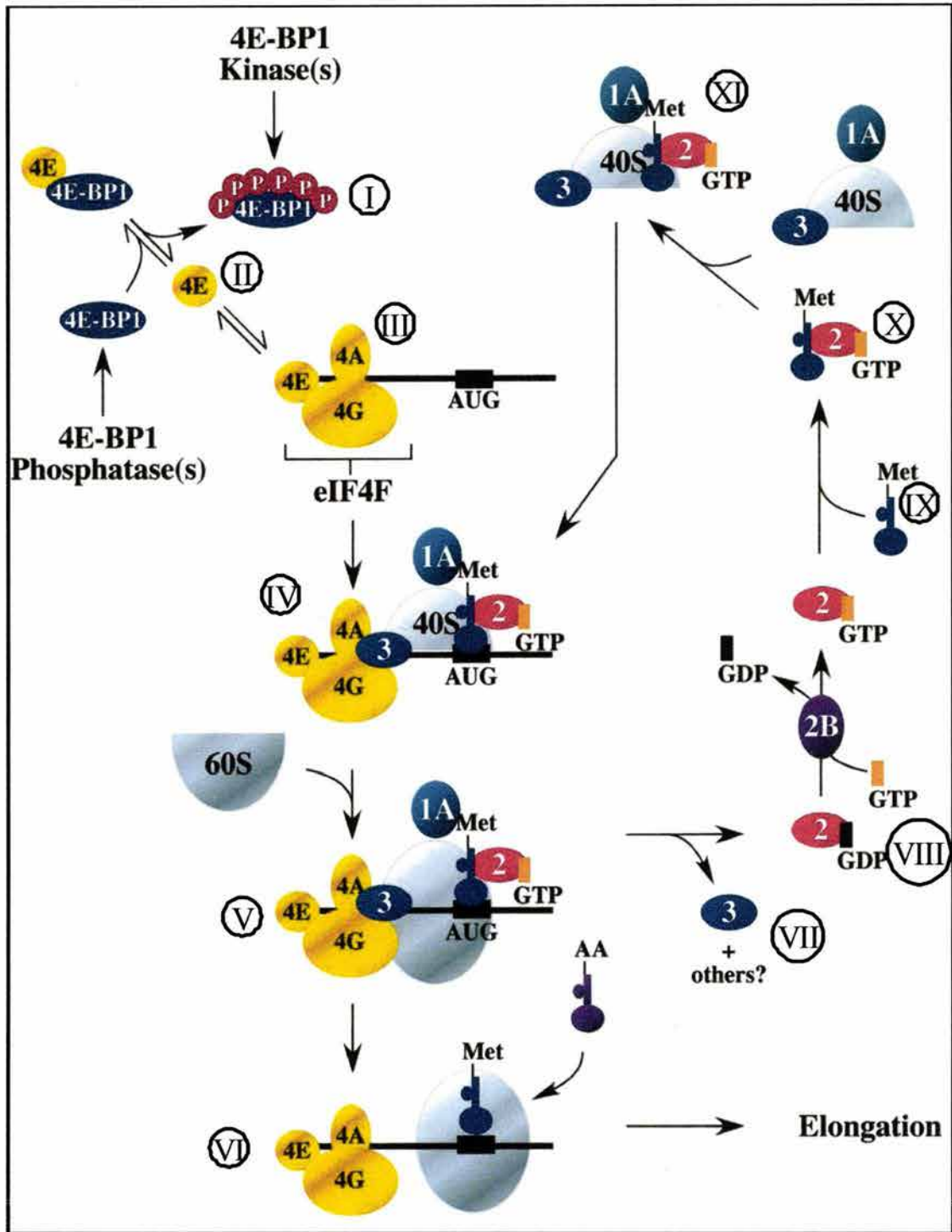
La gran mayoría de los mRNAs eucarióticos contiene una estructura CAP en su extremo 5' por lo que la eficiencia para reclutar estos mensajes hacia el ribosoma está determinada por la disponibilidad de factores que reconocen esta estructura del mRNA. El factor eIF-4E, como parte del complejo de iniciación eIF-4F, es el factor que reconoce la modificación 7-metil en la guanosina del extremo 5' terminal de la vasta mayoría de los mRNAs celulares, y su disponibilidad está determinada por una familia de proteínas de unión al eIF-4E, 4EBPs (del inglés 4E-Binding Proteins). El eIF-4E permanece secuestrado cuando las 4EBPs se encuentran desfosforiladas y forman un complejo estable con este factor.

En el modelo de la figura 1 se esquematiza el proceso de iniciación de la síntesis de proteínas: Cuando la 4EBP1 (también conocida como PHAS-I, del inglés Phosphorylable Heat and Acid-Stable inhibitor) es fosforilada a través de rutas de señalización activadas por estímulos que promueven el crecimiento (I), libera al factor eIF-4E (II); una vez liberado eIF-4E se une a la estructura 5' CAP de los mensajes (III) a través de su asociación con eIF4G, una proteína de 220 kDa que hace un contacto adicional con eIF-4A (III). El complejo

formado por eIF-4E, eIF-4G y eIF-4A se llama entonces eIF-4F (III). eIF-4A en sinergismo con eIF-4B tienen actividad de helicasas que desdoblan las estructuras secundarias formadas en las regiones 5' UTR de los mRNAs (Rozen et al., 1990; Lorsch y Herschlag, 1998). eIF-3 engancha al complejo preiniciador 43S (ver más adelante) al eIF-4G (IV) que a través de su interacción con la proteína de unión a la cola de poli A (PABP, del inglés Poly A) Binding Protein) circulariza el mRNA, aumentando así la probabilidad de reiniciar la traducción (Sachs et al., 1997; Gallie, 1998; Mazumder et al., 2003). Por otro lado, el tRNA iniciador, unido a una metionina por la aminoacil sintetasa respectiva (IX), forma un complejo ternario con eIF-2 y GTP (X), antes de unirse a la subunidad 40S. El tRNA iniciador tiene una secuencia y características estructurales únicas que no se encuentran en los tRNAs para metionina que funciona en la etapa de elongación, algunas de las cuales determinan su interacción con eIF-2 (Pestova y Hellen, 2000). La unión de la subunidad 40S con el complejo formado por el metionil-tRNA, eIF-2 y GTP, da origen al complejo de preiniciación 43S (XI). Una vez montado el complejo 43S al mRNA, con la ayuda de las helicasas, la subunidad 40S realiza un escaneado sobre el mensaje hasta llegar el codón AUG de inicio (IV) (complejo de iniciación 48S). La fase final del proceso de iniciación es la unión de la subunidad 60S al complejo 48S (V), formado por la subunidad 40S, el tRNA de inicio aminoacilado, eIF-2, GTP y el mRNA. El factor eIF5 interactúa con el factor eIF2 y activa la hidrólisis del GTP, la hidrólisis de GTP promueve la liberación de los factores de inicio del complejo (VII) y permite la unión de la subunidad 60S para formar el ribosoma 80S (VI). Entre los factores liberados se encuentra el factor eIF-2 unido a GDP (VIII), el cual posteriormente intercambia GDP por GTP para reiniciar el proceso y unirse a otro aminoacil tRNA. Con el tRNA iniciador firmemente unido al sitio P del ribosoma, éste queda listo para iniciar la síntesis de la cadena polipeptídica a través de la adición de aminoacil-tRNAs dirigida por los codones del mRNA.

Aunque el modo convencional para la traducción de los mRNAs eucarióticos es a través del sistema descrito anteriormente (traducción CAP-dependiente), estudios en la traducción de algunos mRNAs virales y eucarióticos con extremos 5'UTR raros ha sacado a la luz un modo alterativo de reclutamiento de los mRNAs a la subunidad 40S (Vagner al. 2001). Este proceso es llamado entrada interna del ribosoma y es mediado por una secuencia interna en el mRNA llamada sitio interno de entrada del ribosoma (IRES o elementos IRE).

Los IRES fueron identificados primero en mRNAs de picornavirus (Jang et al., 1988; Pelletier y Sonenberg, 1998) y subsecuentemente los elementos IRES se identificaron en otros grupos de virus y en algunos mRNAs celulares (Holcik et al., 2000; Hellen y Sarnow, 2001; Bonnal et al., 2003). Aunque el número de elementos IRES descubiertos se ha incrementado dramáticamente, las bases moleculares y el mecanismo de regulación de su traducción son pobremente entendidos (Choi et al., 2004), por lo que no se discutirán en este trabajo y solo se mencionarán como mecanismo alternativo del inicio de traducción.



**Figura 1.** Esquema representando el inicio de la síntesis de proteínas en eucariotes. Modelo tomado de Shah et al. 2000. Para detalles ver texto.

### 1.2.2. Elongación y Terminación.

La principal atención se ha centrado en entender el proceso de iniciación puesto que, como ya se mencionó, en este paso operan múltiples mecanismos de regulación. Por lo tanto, se ha puesto relativamente poca atención en los mecanismos que regulan la elongación y la terminación de la síntesis de proteínas (Browne y Proud, 2002). Sin embargo, la fase de elongación también ocupa un papel importante, dado que este proceso consume gran parte de la energía metabólica de la célula (al menos 4 enlaces de alta energía se consumen por cada aminoácido adicionado a la cadena polipeptídica naciente: dos para formar el aminoacil-tRNA ya que en este paso el ATP se hidroliza hasta AMP y dos moléculas de GTP se hidrolizan a GDP durante los eventos de unión al ribosoma) (Hershey, 1991). El final del proceso de iniciación deja al tRNA iniciador aminoacilado en el sitio P del ribosoma y al sitio A vacío, lo que sirve para que inicie el ciclo de elongación que adiciona un amino ácido al extremo carboxilo terminal de la cadena polipeptídica naciente por cada vuelta del ciclo (Ramakrishnan, 2002; Kapp and Lorsch, 2004).

La fase de elongación es desarrollada por cuatro proteínas llamadas factores de elongación (eEF-1 $\alpha$ ; eEF-1 $\beta$ ; eEF-1 $\gamma$  y EF-2 ) y es un proceso que involucra cuatro pasos principales: 1) la unión del aminoacil-tRNA al sitio A del ribosoma correspondiente al codón siguiente del mRNA, catalizada por el factor eEF-1 $\alpha$ -GTP; 2) la hidrólisis de GTP y la expulsión de eEF-1 $\alpha$ -GDP; 3) la formación del enlace peptídico, catalizada por el rRNA 28S en el centro peptidil transferasa de la subunidad 60S; y 4) la translocación del ribosoma impulsada por el factor eEF-2 con la hidrólisis de GTP. El proceso es rápido (un ribosoma incorpora hasta 6 aminoácidos por segundo) y sus características fundamentales son la fidelidad, el acoplamiento exacto del codón con el apropiado anticodón de cada aminoacil-tRNA; y la procesividad, la capacidad de sintetizar largas cadenas polipeptídicas sin la disociación prematura del peptidil-tRNA.

En contraste, la fase de terminación es relativamente simple. Cuando un codón de terminación (UAA, UGA o UAG) se posiciona en el sitio A del ribosoma, un factor de liberación (eRFs) ocasiona el rompimiento del peptidil-tRNA, liberando la proteína completada. Las bacterias poseen dos clases de RFs. RF1 y RF2 corresponden a la clase 1 y son específicos para cada codón de terminación: mientras que ambos responden al codón UAA, RF1 reconoce al codón UAG y RF2 reconoce al codón UGA (Scolnick et al., 1968;

Kapp and Lorsch, 2004). Los factores procarióticos RF1 y RF2 emplean una secuencia de amino ácidos lineal definida para el reconocimiento del codón de paro correspondiente (Ito et al., 2000). Se cree que el péptido anticodón y el codón forman una interacción que es análoga al apareamiento codón:anticodón entre el mRNA y el tRNA (Ito et al., 2000). La clase 2 de RFs en bacterias está constituida por el RF3, el cual no solo estimula las actividades de RF1 y RF2, si no que también es requerido para expulsarlos del ribosoma, después de la hidrólisis del peptidil-tRNA (Freistoffer et al., 1997; Kapp and Lorsch, 2004). En contraste, la clase 1 de RFs en eucariontes solo posee un eRF1. De acuerdo con esto, eRF1 tiene la capacidad preponderante de decodificar y promover la hidrólisis del peptidil-tRNA en respuesta a cualquiera de los tres codones de paro (Dontsova et al., 2000). Los eucariontes también poseen un simple RF de la clase 2, eRF3 (Frolova et al., 1996; Kapp and Lorsch, 2004). Aunque se asume que su función es similar al RF3 de bacterias, el papel de eRF3 en la terminación de la síntesis de proteína en eucariontes aún no ha sido completamente dilucidado (Inge-Vechtomov et al., 2003).

Tanto el mecanismo de síntesis de proteínas como las macromoléculas que intervienen en eucariontes y procariontes son similares en ambos sistemas. Sin embargo la fisiología y características de cada especie presentan diferencias, no tanto en la maquinaria de traducción, sino en los mecanismos que regulan el proceso.

### **1.3. La síntesis de proteínas en plantas.**

En el caso específico de plantas, el mecanismo de síntesis de proteínas y los factores que lo regulan son temas cuya investigación se ha incrementado en los últimos años (Browning, 1996; Gallie, 1996; Bailey-Serres, 1999; Dinkova et al., 2000). Se han realizado múltiples estudios sobre la actividad de los factores eIF-4F, -4A, -4G, -2 $\alpha$ , y algunos relacionados con su modificación por fosforilación (Browning et al., 1990; Webster et al., 1991; Le et al., 1997). Sin embargo, una de las características más importantes en plantas, respecto a mamíferos, ha sido el descubrimiento de dos isoformas antigénicamente distintas, pero funcionalmente similares para el complejo eIF4F denominadas eIFiso4F y eIF4F (Browning et al., 1992). Cada uno de estos complejos tiene componentes eIF4E y eIF4G diferentes, por lo cual en plantas hay dos isoformas eIF4E/eIFiso4E y dos isoformas eIF4G/eIFiso4G (Browning et al., 1998). Por otro lado, a pesar de que no existen homólogos de las proteínas de unión al factor eIF4E en plantas, recientemente se reportó que la



lipoxigenasa tipo 2 en *Arabidopsis thaliana* puede hacer interacciones físicas con el eIF4E y eIFiso4E a través de una región similar al motivo conservado de unión del eIF4E (Freire et al., 2000).

Los ribosomas de plantas tienen una arquitectura similar a los de mamíferos (Montesano y Glitz, 1988). Las proteínas ribosomales de las subunidades grande y pequeña del citoplasma han sido fraccionadas y catalogadas por electroforesis bidimensional (Scharf y Nover, 1987). Por otra parte, la estructura de las proteínas ribosomales de varias especies de plantas superiores, tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas, parece estar conservada (Gualerzi, et al., 1974). El grado de conservación de las proteínas ribosomales de las diferentes especies estudiadas es tal que los ribosomas de una especie pueden traducir los mensajes de otras. Un ejemplo característico lo representa el lisado de reticulocitos de conejo (Promega®) que puede traducir mensajes extraídos de plantas y el extracto de germen de trigo que puede traducir mensajes extraídos de mamíferos (Promega®).

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

1.- Las plantas tienen isoformas del factor eIF4F, el cual tiene una subunidad grande diferente (86 kDa vs. 220 kDa) y una proteína de unión al CAP diferente a la de animales.

2.- El factor eIF4A de plantas es fosforilado en respuesta a condiciones de hipoxia y esto parece estar coordinado con la inhibición de la síntesis de proteínas.

3.- Las plantas muestran un requerimiento de factores diferentes para la hidrólisis de ATP dependiente del RNA en el desdoblamiento del RNA de doble cadena dependiente de ATP, necesitando solamente eIF4F y eIF4A o eIFiso4F y eIF4A.

## **2. CONTROL TRADUCCIONAL.**

La expresión de la mayoría de los genes es regulada temporal y espacialmente. Esta regulación ocurre en múltiples pasos y a diferentes niveles: en la síntesis y degradación del RNA, incluyendo la transcripción, el procesamiento, transporte y estabilidad del mRNA; en la traducción, estabilidad de la proteína y modificaciones postraduccionales (Clemens and Bommer, 1999; Gingras et al., 2001).

## 2.1 Conjunto de mecanismos que regulan la traducción de los mRNAs.

En los últimos años se han logrado grandes avances en la comprensión de los mecanismos de control de la traducción, ya sea a través de la regulación de las proteínas que se unen a mRNAs específicos y regulan su traducción; o a través del control de las actividades de los componentes de la maquinaria traduccional (Rhoads, 1999; Prendergast, 2003).

El control de la expresión genética a nivel traduccional presenta las grandes ventajas de ser un control de respuesta rápida, reversible, de ajuste fino en la cantidad de proteínas, regulación coordinada de familias de proteínas, potencial para un control espacial y eficacia en sistemas que carecen del mecanismo de control transcripcional, especialmente en células sin núcleo (Mathews et al., 2000; Gingras et al., 2001). Además, la regulación de la síntesis de proteínas en eucariontes juega papeles críticos en el desarrollo, diferenciación, progresión del ciclo celular y la apoptosis (Mathews et al., 2000).

Después de la transcripción, procesamiento y exportación del núcleo al citoplasma, el mRNA está listo para su traducción. Sin embargo, dos transcritos presentes en cantidades idénticas pueden ser traducidos a velocidades muy diferentes. Este fenómeno es causado, en parte, por el hecho de que el ribosoma no se une directamente al mRNA, sino que el ribosoma es reclutado hacia el mRNA a través de la acción concertada de un gran número de factores eucarióticos del inicio de la traducción (eIFs) (Kozak, 1999; Shah et al., 2000).

La eficiencia de traducción de un mRNA depende de los elementos estructurales propios de sus regiones 5' y 3' no traducibles (5'UTR y 3'UTR), así como de la disponibilidad y actividad de los factores que reconocen estas estructuras (Gingras et al., 1999). En la región 5'UTR, los elementos importantes son la estructura <sup>7</sup>mGpppG (CAP) (Gingras et al., 2001), la presencia de estructuras secundarias y la longitud de la región (Kozak, 1991), la presencia de codones de iniciación "río arriba" de la región codificante (Geballe, 1996; Morris y Geballe, 2000; Hernandez-Sánchez et al., 2003), así como la presencia de sitios de entrada interna al ribosoma (IRES) que son capaces de promover una traducción independiente de CAP (Gosert et al., 2000; Hellen y Sarnow, 2001; Henis-Korenblit et al., 2002; Kobayashi et al., 2003). En la región 3'UTR se han encontrado elementos que participan en la estabilidad y localización citoplásmica de los mRNAs (Sachs et al., 1997; Mazumder et al., 2003). La poliadenilación de este extremo tiene un papel

importante en la estabilización de mensajes, así como en su movilización a polisomas para su traducción (Stutz et al., 1998). La interacción sinérgica entre el extremo 5'CAP y la cola de poli A del extremo 3' permite incrementar la estabilidad y la eficiencia traduccional de los mensajes (Sachs et al., 1997; Gallie, 1998; Mazumder et al., 2003). Dicha interacción está determinada por la presencia de las proteínas afines a poli A (PABP) que interactúan con algunos de los factores de iniciación presentes en el extremo 5' del mensaje, especialmente con el factor eIF-4G (Hornstein et al., 1999). Existen ejemplos específicos durante el desarrollo de algunos organismos, que demuestran cómo el incremento en la longitud de la cola de poli A es capaz de determinar el momento en el cual un mensaje será traducido (Stutz et al., 1998).

En las últimas décadas se han realizado numerosas investigaciones relacionadas con los eventos que controlan la síntesis de proteínas a nivel de la iniciación, lo que ha permitido reconocer que la regulación a nivel del inicio de la traducción juega un papel fundamental en los patrones de expresión genética durante el crecimiento, desarrollo y diferenciación celular. La síntesis de proteínas depende tanto de la maquinaria de traducción así como de la cantidad y la estructura del mRNA, ya que la cantidad de ribosomas es un indicio de la capacidad de la célula para sintetizar proteínas (Pain, 1996). Por tanto la regulación de la síntesis del aparato traduccional en sí, es fundamental para controlar los procesos de diferenciación, crecimiento y proliferación celular.

La síntesis de las proteínas de la maquinaria traduccional propiamente, parece estar sujeta a un modo de regulación característico. Los mRNAs que codifican para la gran mayoría de las proteínas ribosomales y factores de traducción, exhiben una característica estructural definida: un tracto rico en pirimidinas, ubicado en seguida de la estructura 5'CAP. Esta firma de nucleótidos, designada TOP, (del inglés, tract of oligopyrimidine) (Meyuhas 2000), confiere selectividad traduccional a los mensajes, la cual es inducida en respuesta a un rango de estímulos mitogénicos (Shah et al., 2000) y/o nutricionales (Meyuhas 2000; Proud 2002).

### **3. RUTAS DE SEÑALIZACIÓN QUE INCIDEN EN EL CONTROL TRADUCCIONAL.**

La insulina y los factores de crecimiento semejantes a insulina (IGFs) son hasta ahora, unos de los efectores mejor caracterizados de la vía de transducción que regula la

síntesis de proteínas. Estudios extensivos de la biología de la insulina y de los IGFs, han mostrado que el sistema insulina/IGF está compuesto de dos subsistemas complementarios e interactuantes que gobiernan el crecimiento, el metabolismo, la reproducción y la longevidad (Saltiel y Kahn, 2001; Oldham y Hafen, 2003). Por un lado, la insulina, secretada por las células  $\beta$  del páncreas en respuesta a altas concentraciones de glucosa sanguínea, regula principalmente el metabolismo anabólico en tejidos clásicos sensibles a insulina como el hígado, el músculo y el tejido adiposo (Saltiel y Kahn, 2001). Por otro lado los IGFs, al ser regulados por de la hormona del crecimiento, son esenciales para regular el crecimiento y el tamaño corporal tanto de manera prenatal (IGF-I, e IGF-II) como postnatal (IGF-I) (Efstratiadis, 1998).

Los receptores para la insulina y los IGFs son miembros de una superfamilia de receptores para factores de crecimiento tipo cinasa de residuos de tirosina (Ulrich y Schlessinger, 1990). Estos receptores se activan con la unión de insulina o IGFs respectivamente, provocando su actividad intrínseca de cinasa de tirosina que inicia una cascada de reacciones que involucra múltiples rutas de señalización, tales como las rutas de la fosfatidil-inositol 3-cinasa (PI3K) y la de las proteínas cinasas activadas por mitógenos MAPKs (del inglés, Mitogen Activated Protein Kinases), responsables de los diversos efectos de estos factores de crecimiento, tales como los incrementos en la división celular, en el tamaño celular, en la síntesis de proteínas, en la migración celular y la inhibición de la apoptosis (Butler et al., 1998; Peruzzi et al., 1999; Imai y Clemmons, 1999).

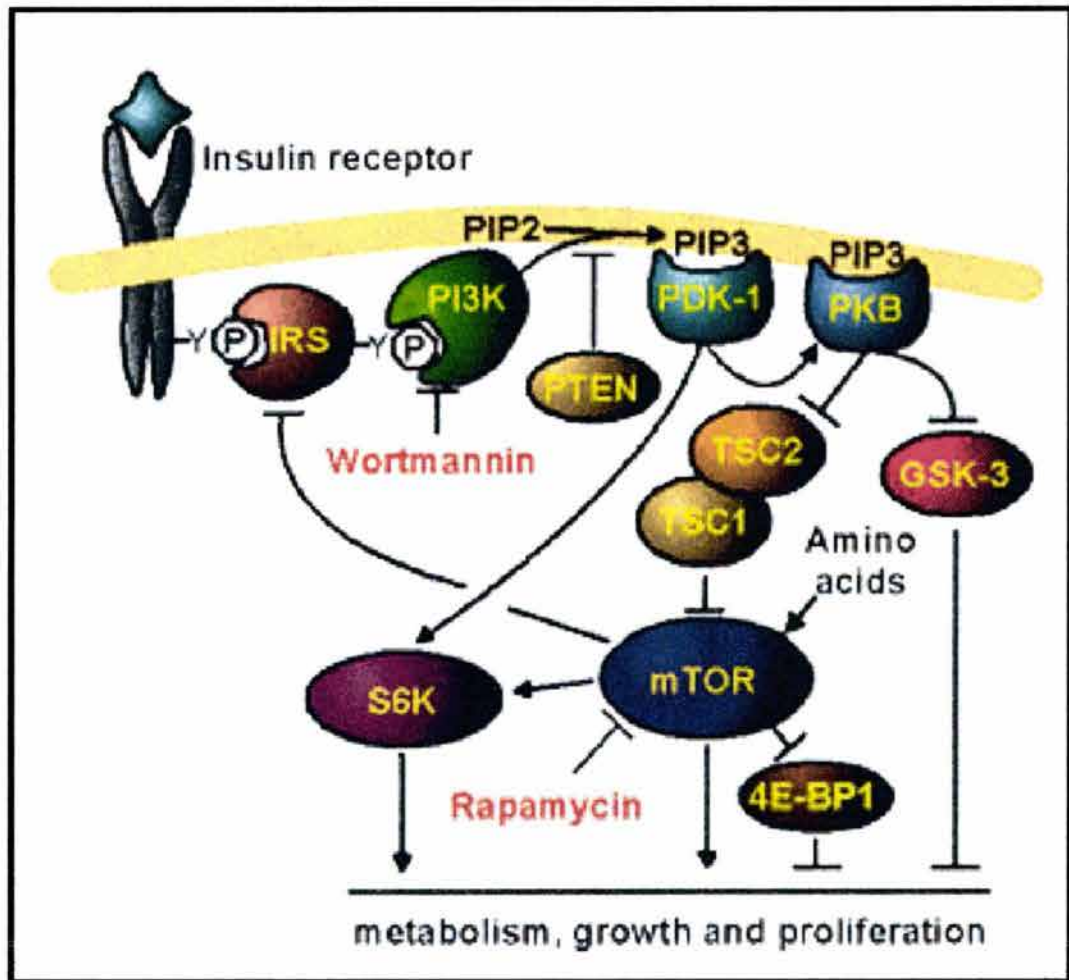
Los estudios en levaduras sobre el control de crecimiento celular han llevado a la conclusión de que se requiere alcanzar un tamaño mínimo, antes de empezar la división celular (Johnston et al., 1977; Kozma y Thomas, 2002). En este sistema, se ha demostrado que en condiciones que impiden el crecimiento celular, tales como la falta de nutrientes, la división celular se arresta, mientras que mutaciones que bloquean la progresión del ciclo celular, no inhiben el crecimiento celular (Kozma y Thomas, 2002). Estos estudios indican también que el crecimiento y la proliferación, aunque son procesos distintos, están sin embargo asociados, ya que la proliferación requiere previamente del crecimiento (Johnston et al., 1977; Kozma y Thomas, 2002). Los estudios en *Drosophila*, donde los reguladores específicos del ciclo celular se han manipulado, han llegado a la conclusión de que ocurre lo mismo en metazoarios (Weigmann et al., 1997; Neufeld et al., 1998). Estos estudios han

ayudado a volcar la atención, de la maquinaria del ciclo celular que dirige la proliferación celular en respuesta a mitógenos, a las rutas de señalización que controlan el crecimiento celular a través de la regulación de los eventos anabólicos requeridos para que la célula se duplique a sí misma exactamente. Estas rutas de señalización se han estudiado en gran detalle en los últimos años y se han elucidado gran parte de sus componentes en sistemas de mamíferos (Blume-Jensen y Hunter, 2001). Nuevamente, dos rutas de transducción de señales han emergido como sistemas críticos de la respuesta al crecimiento: la ruta de Ras/MAPK, que principalmente actúa a través de controlar la expresión de *myc*; y la ruta de PI3K, que actúa regulando la actividad de PI3K, PKB (o Akt), PKC, PKG, PKA, mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) y la p70<sup>S6K</sup> (Kozma y Thomas, 2002).

La ruta PI3K juega un papel primordial en los efectos metabólico y mitogénicos de la insulina y los IGFs (Sheperd et al., 1998; Ueki et al., 2002). La importancia de esta ruta en el crecimiento celular se descubrió inicialmente a partir de los estudios realizados en *Drosophila*, donde se demostró que la sobreexpresión de un alelo dominante negativo de PI3K en el ala, produce una disminución del tamaño celular; mientras que la sobreexpresión del alelo activado ocasiona un incremento del tamaño celular (Leevers et al., 1996). Estudios subsecuentes demostraron que mutaciones en cualquiera de los componentes de esta ruta de señalización, tiene efectos sorprendentes sobre el número y tamaño celulares (Leevers et al., 1996; Böhni et al., 1999; Huang et al., 1999; Goberdhan et al., 1999) a excepción de la dS6K, que solo afecta el tamaño celular (Montagne et al., 1999). El conocimiento previo acerca de la ruta PI3K se obtuvo a partir de estudios farmacológicos, bioquímicos y de transfección de células en cultivo en modelos animales (Vanheesevroeck et al., 1999). Sin embargo, los modelos generados para explicar cómo se relacionan los componentes específicos de esta ruta, son mucho más complicados de lo que se ha descrito.

En la figura 2 se presenta un modelo genérico donde se describe la ruta de transducción de señales inducida por insulina/IGFs: La unión de la insulina o de los IGFs a sus respectivos receptores ocasiona el reclutamiento y fosforilación de las proteínas acopladoras denominadas IRSs (del inglés “insulin substrate receptor”) para reclutar y acoplar a la PI3K a la membrana celular (Stocker y Hafen, 2000). Una vez acoplada a los IRSs, PI3K fosforila al lípido fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>), produciendo fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>) que a su vez funciona como segundo mensajero

modulando la activación de las cinasas PKB y PDK1 (Alessi et al., 1997; Stokoe et al., 1998). PDK1 media la fosforilación de PKB (Alessi et al., 1997; Stokoe et al., 1998) y S6K (Alessi et al., 1998; Pullen et al., 1998). Una vez activada por PIP<sub>3</sub> y PDK1, PKB media directamente la fosforilación y activación de GSK3 (Cross et al., 1995) y se ha argumentado que paralelamente PKB interviene en la activación de mTOR por un mecanismo aún desconocido. Una vez activada, mTOR regula el incremento en la fosforilación de 4EBP y de S6K (Burnett et al., 1998). Algunos efectores negativos pueden actuar en esta cascada de transducción de señales como son: la fosfatasa de fosfolípidos (PTEN) (Myers et al., 1997), las proteínas TSC (del inglés, Tuberous Sclerosis Complex) 1 (hamartina) y 2 (tuberina) (Tapon et al., 2001; Potter et al., 2001; Gao y Pand, 2001), el inhibidor del factor de iniciación 4E (4EBP1-3) y la rapamicina (Pause et al., 1994; Kozma y Thomas, 2002).



**Figura 2.** Modelo genérico representando la ruta de transducción de señales desencadenada por insulina. Modelo tomado de Kozma y Thomas 2002. Para detalles ver texto.

### 3.1. La fosforilación de la proteína ribosomal S6.

Existe una fuerte correlación entre la expresión de los mensajes TOP y el estado de fosforilación de la fosfoproteína ribosomal S6. La proteína S6 se localiza en la interfase entre las dos subunidades del ribosoma completo, aparentemente haciendo contacto con el rRNA ribosomal 28S de la subunidad 60S. Además, en esta región ocurren muchos procesos clave para la traducción, tales como la unión del mRNA y tRNA y la asociación momentánea de algunos de los factores de iniciación y elongación (Nygard y Nilsson, 1990; Morley y Thomas, 1991). De esta manera, la fosforilación de 5 posibles sitios en la proteína S6, puede servir para inducir o estabilizar cambios conformacionales en el ribosoma que puedan

permitir asociación diferencial del ribosoma con proteínas o mRNAs. Alternativamente, dada su localización, formas diferencialmente fosforiladas de S6 pueden interactuar directamente con mRNAs o con sus proteínas asociadas y conducir a una afinidad selectiva de la maquinaria de traducción para mRNAs específicos (Stewart y Thomas, 1994; Fumagalli y Thomas, 2000). Estas sugerencias tienen bases experimentales puesto que los ribosomas fosforilados en S6 tienen una gran capacidad de unir oligómeros de poliuridinas (Gressner y van de Leer, 1980).

La fosforilación de la proteína ribosomal S6 se ha estudiado a gran detalle y se ha mostrado su papel en la traducción preferencial de algunos mRNAs específicos a través de un mecanismo que no se conoce totalmente (Stewart y Thomas, 1994; Fumagalli y Thomas, 2000). La fosforilación de la proteína S6 es inducida por factores de crecimiento a través de las S6Ks, una familia de cinasas de serinas y treoninas sensibles a rapamicina (Ferrari y Thomas, 1994; Law et al., 2000). En una célula en división, S6K1, también conocida como p70<sup>S6K</sup>, es necesaria para la progresión del ciclo celular, más allá del “checkpoint” G<sub>1</sub> (Lane et al., 1993) y modula la activación transcripcional de E2F, un factor de transcripción (Brennan et al., 1999). Estudios en *Drosophila* han demostrado que p70<sup>S6K</sup> está involucrada en determinar el tamaño celular (Montagne et al., 1999); así mismo en ratón, la delección de p70<sup>S6K</sup> da como resultado un ratón pequeño (Shima et al., 1998).

La estructura de los ribosomas es altamente conservada en todos los organismos eucariontes. En las plantas existe también la proteína ribosomal S6 y se ha demostrado que su nivel de fosforilación está estrechamente regulado durante el desarrollo y en respuesta a cambios ambientales. La fosforilación de una proteína ribosomal de ~30 kD, presumiblemente la S6, varió en respuesta a diferentes estímulos en células de tomate (Scharf y Nover, 1982); *Arabidopsis* (Turck et al., 1998) y en ejes embrionarios de maíz donde se demostró su identidad por anticuerpos específicos (Beltrán-Peña et al., 2002). Además, se demostró que diferentes condiciones de estrés abiótico regulan la fosforilación de la S6 en puntas de raíces de maíz (Bailey-Serres y Freeling, 1990; William et al., 2003). Así mismo, la fosforilación de la S6 se encontró incrementada en ejes embrionarios de maíz estimulados con auxinas (Pérez et al., 1990; Beltrán-Peña et al., 2002) o insulina (Sánchez de Jiménez et al., 1999; García-Flores et al., 2001); así como en cotiledones de calabaza estimulados con citocininas (Yakovleva y Kulaeva, 1987).



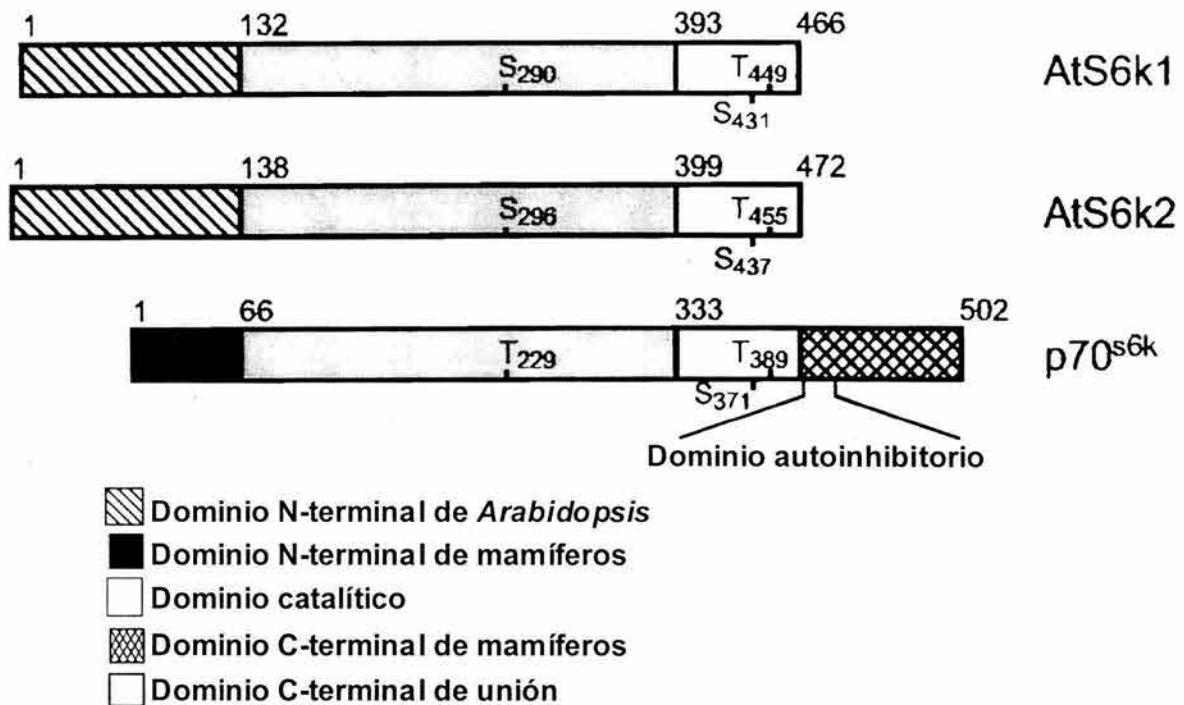
### 3.2. La cinasa de la proteína S6 (S6K).

p70<sup>S6K</sup> es una proteína cinasa que en mamíferos es activada por calcio y por estímulos que involucran a la vía de la fosfatidilinositol 3-cinasas (PI3K) (Vanhaesebroeck, 1997; Brennan et al., 1999), la cual regula *in vivo* la fosforilación múltiple de la proteína ribosomal S6 (Pullen y Thomas, 1997; Law et al., 2000). Se ha demostrado que la función de la p70<sup>S6K</sup> es importante porque al fosforilar eficientemente a la proteína S6, se establece una correlación positiva con la regulación de la traducción de los mRNAs 5'TOP (Fumagalli y Thomas, 2000). Esta clase de mRNAs codifican para muchos de los componentes de la maquinaria de síntesis de proteínas, en especial para las proteínas ribosomales, que representan del 20 al 30 % del total de mRNAs de la célula (Meyuhas et al., 1996). Dependiendo de cuáles y de cuántos sitios se encuentren fosforilados en la proteína S6, los ribosomas podrían llevar a cabo la traducción selectiva de estos mRNAs dando así, versatilidad a la respuesta celular. Además, la actividad de p70<sup>S6K</sup> está altamente regulada a través de la fosforilación de 8 posibles sitios presentes en la enzima, por diversas cinasas que la activan directamente (Pullen y Thomas, 1997) y que a su vez son activadas por cascadas de transducción de señales, las cuales se conocen cada vez más.

Los sitios de fosforilación de la p70<sup>S6K</sup> de mamíferos, también conocida como S6K1, se encuentran distribuidos en dos grupos en sitios bien definidos de la enzima. El primer grupo está compuesto de motivos de Ser/Treo-Pro y se encuentra en el extremo carboxilo de la S6K1 (Ferrari et al., 1992). Al segundo grupo pertenecen sitios claves para la regulación de la proteína. Estos sitios están flanqueado por grupos aromáticos (Pearson et al., 1995) y son el blanco selectivo de la desfosforilación e inactivación por el inmunosupresor rapamicina, así como del metabolito fúngico wortmanina (Pearson et al., 1995).

Las cinasas de proteínas son componentes comunes de rutas de transducción de señales en todos los eucariontes y diferentes especies las han adaptado para acoplar distintos estímulos a respuestas fisiológicas. Este paradigma se ejemplifica con la familia de cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) (Hirt, 1997). En plantas, participan en rutas de transducción de señales implicadas en respuesta a heridas, patogénesis y estrés abiótico, así como en aquellas que responden a las hormonas vegetales como auxinas, ácido absísico y etileno (Hirt, 1997). En contraste a la ruta de señalamiento de las MAP cinasas, en plantas se sugieren, pero no se han caracterizado homólogos de la p70<sup>S6K</sup>. Sin embargo, existen reportes

de genes aislados de *Arabidopsis*, con sondas de la enzima de mamíferos, donde se demostró que el producto de estos genes, expresados en líneas celulares de animales, sustituye la función de la p70<sup>S6K</sup> (Turck et al., 1998). Cabe resaltar además, que los alineamientos de las secuencias deducidas de aminoácidos de esos genes con los de mamíferos, demuestran que los residuos importantes para la activación de la proteína están conservados (Turck et al., 1998) (Figura 3).



**Figura 3.** Comparación estructural de los genes de *Arabidopsis*, AtS6k1 y AtS6k2, con el de la p70<sup>S6K</sup> de mamífero. Se indican los residuos fosforilables, serinas (S) y treoninas (T), esenciales para la activación de la p70<sup>S6K</sup> conservados en la proteína de plantas. Los números sobre los esquemas representan la posición de los aminoácidos dentro de la proteína. (Tomado de Turck et al. 1998).

### 3.3. El papel de la mTOR en la activación de la S6K.

La enzima TOR (target of rapamycin) fue originalmente identificada genéticamente en levaduras mutantes, resistentes al efecto inhibitorio sobre crecimiento celular del complejo inmunofilina-inmunosupresor FKBP (FK506 binding protein)-rapamicina (Heitman et al., 1991). mTOR, la contraparte estructural y funcionalmente conservada en mamíferos, fue descubierta basándose en sus propiedades de unión al complejo FKBP-rapamicina (Brown et al., 1994; Chiu et al., 1994) y recientemente homólogos de TOR se han encontrado

en los genomas de gusanos, moscas y plantas (Schmelzle y Hall 2000; Menand et al., 2002). El inmunosupresor y antibiótico rapamicina inhibe potentemente el crecimiento de diversas células evolutivamente distintas, sugiriendo que TOR tiene una función conservada en controlar el crecimiento celular. En respuesta a aminoácidos y factores de crecimiento, mTOR controla la maquinaria de traducción a través de la activación de la enzima p70<sup>S6K</sup> y la inhibición de la proteína de unión del factor eIF4E (4EBP o PHAS-I) (Thomas 2002). Como ya se mencionó, la activación de la p70<sup>S6K</sup> resulta en la fosforilación de la S6rp en la subunidad 40S del ribosoma y en la traducción de los mRNAs 5'TOP (Jefferies et al., 1997). Estos mRNAs constituyen una pequeña familia de transcritos abundantes (alrededor del 20 % de los mRNAs celulares) que codifican principalmente para proteínas ribosomales y componentes del aparato traduccional (Meyuhas et al., 1996; Meyuhas 2000; Grolleau et al., 2002). Por otra parte, TOR libera al factor eIF-4E de su inhibidor 4EBP, permitiendo así la traducción dependiente de CAP. De esta manera, al controlar la traducción de los mensajes 5'TOP y la traducción dependiente de CAP, mTOR regula la maquinaria traduccional bajo condiciones favorables para el desarrollo. Sin embargo, el desarrollo celular no es regulado pasivamente solo por la disponibilidad de nutrientes sino que en su regulación y control, participa una intrincada red de rutas de transducción de señales compaginadas con la fisiología celular general, que inducen la síntesis balanceada de macromoléculas. Existe además, una creciente evidencia de que TOR juega un papel central controlando varias de esas rutas, de esta forma TOR integra diversas señales que determinan el crecimiento celular.

El descubrimiento reciente de la TOR en *Arabidopsis* con un papel central en el desarrollo temprano de la planta (Menand et al., 2002), indica que TOR tiene una función evolutivamente conservada. Además, el hecho de que la rapamicina tenga un efecto negativo sobre la fosforilación de la proteína ribosomal S6 y sobre la movilización de mensajes tipo TOP en ejes embrionarios de maíz (García-Flores et al., 2001), sugiere fuertemente que TOR está también presente en maíz.

#### **3.4. Efectores de la ruta de señalización que regula la síntesis de proteínas en plantas.**

En plantas no hay reportes que indiquen la existencia de factores de crecimiento del tipo IGF-I e IGF-II, ni de las vías de transducción que estos factores pudieran estar regulando. Sin embargo, algunos estudios previos indican la presencia de péptidos

semejantes a los IGFs en diferentes plantas, a los que no se les ha relacionado con una función endógena determinada. Al respecto, se reportó en espinaca y *Lemna gibba*, la existencia de un péptido que es reconocido por anticuerpos contra insulina (Collier et al., 1987). Además se reportó una proteína de reserva en soya de 4 kDa, capaz de unirse a los receptores de insulina de bovino (Hirano et al., 1992). Posteriormente, se reportó la existencia de una proteína leg-insulina en hojas de Lupino (Ilgoutz et al., 1997) y recientemente se aisló un péptido de la fracción proteica de semillas de frijol de soya con una secuencia de aminoácidos semejante a un segmento de la cadena  $\beta$  de insulina de bovino (Oliveira et al., 1999). Experimentos con algunos de estos péptidos indican que son responsables de estimular la toma de glucosa en tejidos animales (Collier et al., 1987; Oliveira et al., 1999). Sin embargo, en ningún caso se ha estudiado el efecto regulatorio endógeno de estos péptidos en las plantas de origen. Existe sólo un reporte en el que se determinó un efecto estimulador de insulina en la germinación de semillas de sandía y pepino, lo cual indica que estos péptidos provocan un incremento en la actividad enzimática, que favorece considerablemente al desarrollo de la plántula (Goodman y Davis, 1993).

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

En trabajos recientes en nuestro laboratorio se identificó un péptido en extractos de ejes embrionarios de maíz con anticuerpos contra insulina (ZmIGF). Este péptido y la insulina misma mostraron efectos bioquímicos y fisiológicos importantes durante la germinación de maíz, característicos de la vía de señalización regulada por la insulina y los IGFs (García-Flores et al., 2001). Más aún, en el laboratorio se ha demostrado en ejes embrionarios de maíz, la presencia de una vía de transducción de señales estimulada por ZmIGF o insulina que supuestamente involucra a un homólogo de la  $p70^{S6K}$  (Sánchez de Jiménez y et al., 199) puesto que en ejes embrionarios estos factores inducen un incremento en la fosforilación de la proteína ribosomal S6. Además el tratamiento de ejes embrionarios con ZmIGF o insulina induce un incremento marcado en el reclutamiento de mensajeros tipo

5'TOP hacia polisomas, como son los de la misma proteína ribosomal S6 y del factor de traducción eIF iso4E (Reyes de la Cruz et al., 2004).

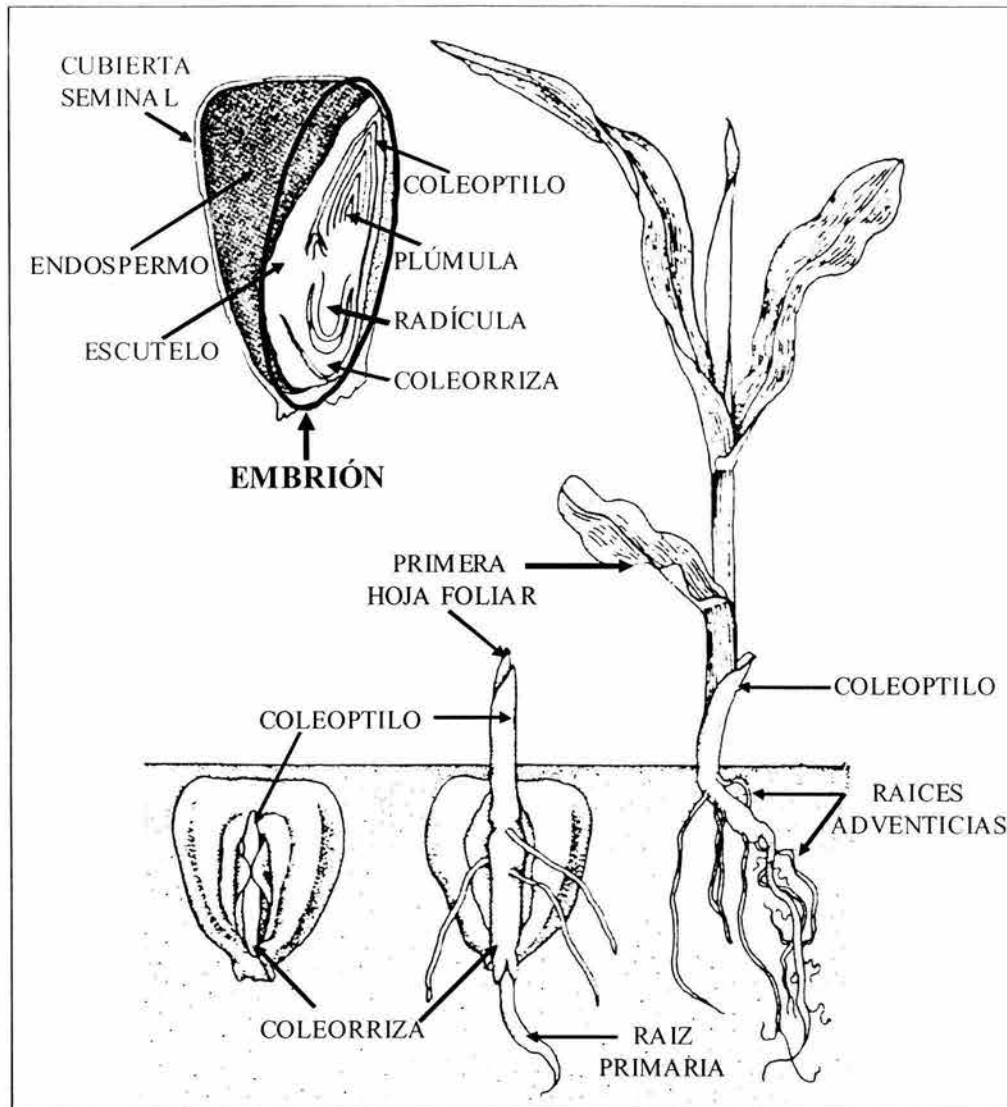
#### **4. GERMINACIÓN DE SEMILLAS.**

Las semillas han jugado una posición crítica en la evolución de las plantas superiores puesto que son la forma de dispersión de estos organismos. El éxito con el cual una planta superior se establece depende en gran parte de las propiedades fisiológicas y bioquímicas de sus semillas, debido a que en las etapas más tempranas del desarrollo, el establecimiento de la plántula depende de la calidad de los nutrientes almacenados en ellas (Bewley y Black, 1994). Por otro lado, la nutrición de las poblaciones humanas depende también, en gran parte, de las semillas por sus reservas alimenticias. Por ejemplo, las semillas de cereales y leguminosas son la mayor fuente alimenticia para estas poblaciones, cuya importancia recae en sus reservas constituidas de proteínas, azúcares y aceites almacenadas en ellas durante su desarrollo y maduración.

##### **4.1. Estructura de las Semillas de maíz.**

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

En la semilla de maíz existe un único embrión rodeado por un tejido de reserva llamado endospermo. El embrión está formado por el eje embrionario y el escutelo que lo rodea. El eje embrionario se divide en coleoptilo, mesocotilo (unido al escutelo) y radícula (Figura 4). El término mesocotilo se refiere al primer internodo, localizado debajo de la plúmula, entre el nudo del coleoptilo y el nudo escutelar, característica única de las gramíneas.



**Figura 4.** Representación esquemática de una semilla de maíz (*Zea Mays* L.) y diferentes etapas del desarrollo de la planta.

#### 4.2. Germinación de maíz.

En la literatura, el término germinación es utilizado libremente y en algunas veces en forma no ortodoxa, por lo que es indispensable aclarar su significado. La **GERMINACION** es un proceso que inicia con la captura de agua por la semilla (imbibición) y termina con la protrución de la radícula que usualmente coincide con la elongación del eje embrionario. Esto incluye numerosos eventos entre los que destacan la hidratación de las proteínas, cambios en las estructuras subcelulares, incremento en la respiración, síntesis de macromoléculas y elongación celular, la mayoría de los cuales no son únicos de este proceso.

Todos ellos combinados transforman el embrión deshidratado y en reposo, con un metabolismo casi indetectable, en un embrión con un metabolismo vigoroso que culmina con su crecimiento y desarrollo. En sentido estricto, la germinación no incluye el crecimiento de la plántula, pero sí del embrión. El momento exacto en el que finaliza la germinación ha sido causa de polémica, pero en general se ha considerado que la germinación culmina con la protrusión de una parte del embrión, que frecuentemente es la radícula (Bewley y Black, 1994). Este evento puede ser el resultado de la elongación celular, la división celular o de ambos.

## **5. EVENTOS MOLECULARES DURANTE LA GERMINACIÓN.**

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

Durante la germinación se activan tres rutas metabólicas respiratorias: glucólisis, ruta de las pentosas y ciclo de Krebs (Botha et al., 1992). Aunque las mitocondrias de las semillas secas y recién embebidas son funcional y estructuralmente deficientes, se acepta que en dichas estructuras se lleva a cabo la fosforilación oxidativa y que esta ruta metabólica es la fuente principal de ATP al inicio de la imbibición (Ehrenshaft y Brambl, 1990). Desde el punto de vista molecular, la síntesis de proteínas es uno de los eventos más importantes y de ocurrencia temprana durante la germinación de las semillas de maíz, aún antes de la síntesis de RNAs mensajeros (Spiegel y Marcus, 1975; Sánchez de Jiménez y Aguilar, 1984; Bewley y Marcus,

1990). Hay muchas evidencias de que en embriones quiescentes de cereales, existen muchos de los componentes requeridos para el proceso de síntesis de proteínas (Bewley y Black, 1994). Sin embargo en esta etapa del desarrollo no hay polisomas formados, lo cual indica que no hay actividad de síntesis de proteínas (Sánchez de Jiménez et al., 1981). Se ha visto que a partir de la imbibición la cantidad de polisomas activos comienza a incrementarse rápidamente (Dommes y Van de Walle, 1990; Pramanick et al., 1992). En esta etapa temprana la traducción tiene lugar a partir de un conjunto de mRNAs muy específicos producidos durante la maduración de la semilla y que son almacenados en el eje embrionario en estado quiescente. Se ha considerado por numerosos autores que la traducción de estos mensajes ocurre de manera diferencial ya que algunos de ellos son traducidos en etapas muy tempranas de la germinación, otros se traducen de manera más tardía, mientras que algunos no se traducen y son degradados (Sánchez de Jiménez y Aguilar, 1984; Sánchez-Martínez et al., 1986; Bewley y Marcus, 1990).

La síntesis de proteínas es casi inmediata durante las primeras horas de germinación y se debe a la existencia de un control transcripcional de mensajes sintetizados y almacenados durante la maduración de las semillas, que codifican para proteínas que serán requeridas durante la germinación. Se ha visto que no hay una correlación entre la cantidad del mRNA y la velocidad de transcripción, o entre la cantidad de proteína y el nivel del mensaje. Por ejemplo en embriones de semillas de soya las velocidades de transcripción son diferentes a las cantidades de mRNAs, estas diferencias pueden ir de entre 100 a 10 000 veces (Walling et al., 1986). Se ha demostrado además que la síntesis de proteína se desarrolla espacial y temporalmente en tejidos específicos: en embriones de cebada con 4 a 5 horas de germinación, la síntesis de proteínas ocurre principalmente en el escutelo y hay poca actividad en los componentes del embrión como son la raíz, el nudo o el coleoptilo (Standart, 1993). Después de este tiempo, se observó un incremento de dicha síntesis en todos los componentes del embrión, registrándose las tasas más altas en el escutelo y en la raíz en desarrollo. Esto se correlaciona con la observación de que la raíz normalmente penetra la cubierta de la semilla después de las 6 horas de imbibición. En maíz se ha reportado que la síntesis de proteínas ocurre principalmente en el eje embrionario, el cual tiene altos niveles de mRNA, sin embargo en el escutelo ocurre lo contrario (Sánchez de Jiménez et al., 1981).

Se ha propuesto que existen dos clases de mRNAs en los embriones secos de semillas quiescentes: los mRNAs residuales, que se sintetizan durante el desarrollo de la semilla y no se



destruyen durante la maduración tardía y la desecación. Se piensa que no son esenciales para la germinación y son degradados al principio de la germinación; y mRNAs almacenados o conservados, que son sintetizados durante el desarrollo de la semilla, están disponibles y pueden ser traducidos después de la imbibición, a proteínas que tienen parte funcional en la germinación (Sánchez de Jiménez y Aguilar, 1984; Sánchez-Martínez et al., 1986; Bewley y Marcus, 1990).

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

La transcripción de genes que se inicia después de que se ha iniciado la traducción de los mensajes almacenados, es otro evento molecular temprano de la germinación (Bewley, 1997). Se considera que a medida que avanza el proceso germinativo, la síntesis de proteínas se hace más dependiente de la transcripción *de novo* de mRNAs. Algunos de estos nuevos mensajes también pueden codificar las mismas proteínas que los mensajes almacenados, pero muchos codificarán productos diferentes, probablemente esenciales para la división celular y el crecimiento posterior (Guy y Black, 1998; Dinkova et al., 2002).

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

En estas semillas, gran parte de las células que constituyen los meristemas del embrión se encuentran bloqueadas en la fase  $G_1$  del ciclo celular. Datos recientes han demostrado que durante las 4 primeras horas de germinación, ocurre una sincronización celular en la fase  $G_1$ , pero sólo parte de esta población entra a la fase S entre 12 y 15 horas después de iniciarse la imbibición. Se ha estimado que sólo el 20-30 % de todas las células entran a la fase S durante la etapa inicial de la germinación, y la población que lo hace se encuentra altamente sincronizada (Georgieva et al., 1994). La síntesis de DNA de tipo replicativo y la división celular son eventos

tardíos durante la germinación. La expansión de la radícula dentro de la semilla ocurre inicialmente por elongación celular y la emergencia puede o no estar acompañada de división celular (Baiza et al., 1989; Bewley y Black, 1994).

En síntesis, en los embriones de semillas de maíz la síntesis replicativa de DNA inicia alrededor de las 15 horas de germinación, precediendo a la protrusión de la radícula, sin embargo, las primeras figuras mitóticas empiezan a aparecer entre las 28 y 32 horas (Baiza et al., 1989) cuando la radícula ya ha protruido. Esto indica que la germinación no es producto de la división celular, y sugiere que el papel de la replicación de DNA es garantizar el crecimiento y desarrollo de los tejidos en una etapa postgerminativa (Cruz-García et al., 1998).

Estas características de las semillas permiten que la germinación sea un modelo apropiado para el estudio de la reactivación y el control de la proliferación celular en vegetales, es decir, permite investigar los mecanismos que regulan la reactivación del metabolismo a partir de un estado quiescente de la semilla hasta un estado metabólico totalmente restaurado. Por otra parte, desde un punto de vista molecular, permite elucidar cuales son los mecanismos que controlan la expresión genética y los factores involucrados en el proceso de proliferación celular en las etapas tempranas del desarrollo de las plantas, tomando como base los conocimientos generados de los estudios realizados en otros organismos eucariontes. Particularmente, es un modelo ideal para conocer los mecanismos que controlan la síntesis de proteínas, es decir, los mecanismos que regulan la traducción específica de mRNAs antes y en la iniciación de la división celular.

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Los antecedentes anteriores indican que en la germinación de semillas de maíz, se ponen de manifiesto varios de los mecanismos de regulación de la expresión genética a nivel de la traducción que están bien caracterizados en mamíferos (Rhoads, 1999; Meyuhas, 2000; Shah et al., 2000; Kimball y Jefferson, 2002) y que operan también en plantas (Sánchez de Jiménez et al., 1999). Esto hace que la germinación de maíz sea un sistema biológico idóneo para el estudio de los mecanismos de control traduccional. Las rutas de señalización activadas por factores de crecimiento que involucran la traducción selectiva de los mensajes 5'TOP y que correlaciona positivamente con la fosforilación de la proteína ribosomal S6, corresponde a uno de los mecanismos más estudiados del control traduccional en sistemas animales junto con los que regulan la fosforilación de la 4EBP1, que ocasiona la liberación del factor eIF-4E para permitir la traducción CAP dependiente y que operan durante el crecimiento y la proliferación celular. Por otro lado, en maíz se ha demostrado que en procesos que involucran al crecimiento y la proliferación celular de tejidos, existe una regulación del estado de fosforilación de la proteína ribosomal S6 (Sánchez de Jiménez et al., 1997; García-Flores et al., 2001; Williams et al., 2003) de manera similar a los mecanismos descritos en los mamíferos (Sánchez de Jiménez et al., 1999; García-Flores et al., 2001).

La secuenciación completa de los genomas de arroz y *Arabidopsis* y la secuenciación parcial de los genomas de otras plantas (Sorgo, Avena, Espárrago), han revelado la existencia de algunos componentes similares a los de las rutas de transducción de señales descritas en sistemas animales, entre los más importantes se encuentran: secuencias de proteínas similares a las de receptores de membrana de mamíferos, específicos para hormonas reguladoras de crecimiento; proteínas homólogas a la TOR y a la p70<sup>S6K</sup>. Sin embargo, a pesar de los avances hechos en la secuenciación del genoma de maíz, a excepción de algunos receptores semejantes a los específicos para reguladores de crecimiento en mamíferos, todavía no existe información acerca de proteínas cinasas semejantes a la TOR y a la p70<sup>S6K</sup>, que están directamente involucradas en la fosforilación de la proteína ribosomal S6 y que son componentes esenciales en las rutas de señalización que regulan el crecimiento y proliferación celular.

Con base en esto y conociendo la importancia que los mecanismos de control traduccional tienen en la germinación y en el futuro desarrollo de las plantas, se decidió

identificar la presencia de una proteína homóloga a la p70<sup>S6K</sup> en maíz e investigar algunos de los mecanismos que regulan su expresión y su actividad sobre la proteína ribosomal S6 durante la germinación de semillas de maíz, eventos bioquímicos esenciales para el crecimiento y proliferación de los tejidos meristemáticos de los ejes embrionarios de maíz.

### **III. HIPÓTESIS.**

La proliferación celular inducida por estímulos mitogénicos en células eucarióticas, está relacionada con la traducción específica de cierto tipo de mRNAs llamados 5'TOP, entre los que se han encontrado principalmente los que codifican para las proteínas del aparato traduccional. En mamíferos, la traducción de estos mensajes correlaciona positivamente con la fosforilación de la proteína ribosomal S6, a través de una ruta de señalización que involucra a la mTOR y a la p70<sup>S6K</sup>. Puesto que algunos factores de crecimiento como Insulina y la auxina (AIA) modulan el estado de fosforilación de la proteína ribosomal S6 en ejes embrionarios de maíz, se predice la existencia de una ruta similar y en particular la presencia de una cinasa de la proteína S6, funcionalmente similar a la p70<sup>S6K</sup>, necesaria para regular la traducción selectiva de proteínas durante la germinación y el inicio del crecimiento de la planta.

### **IV. OBJETIVO GENERAL.**

Caracterizar a la proteína S6K en ejes embrionarios de maíz (ZmS6K) y analizar los mecanismos que regulan su activación y/o expresión durante la germinación.

### **V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

1. Purificar la S6K de maíz (ZmS6K) a partir de proteínas citoplásmicas de ejes embrionarios de maíz.
2. Establecer un sistema que permita medir la actividad de la S6K de ejes embrionarios de maíz.
3. Determinar los parámetros cinéticos de la ZmS6K.
4. Determinar el efecto de reguladores de la vía de transducción en la actividad de la S6K en ejes embrionarios de maíz (insulina, ZmIGF, rapamicina, ácido indolacético).
5. Aislar el gen de maíz que codifique para la enzima homóloga de la p70<sup>S6K</sup> de mamíferos, la ZmS6K, a partir de RNA o DNA de ejes embrionarios.
6. Analizar el patrón de expresión de la ZmS6K en ejes embrionarios durante la germinación.
7. Hacer análisis de secuencias para determinar si la ZmS6K conserva los sitios importantes de regulación establecidos en la enzima de mamíferos.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS.

**Material Biológico Usado.** Para todos los experimentos de este trabajo se utilizaron semillas de maíz (*Zea mays* L. Var. Chalqueño). Las semillas se desinfectaron y se pusieron a germinar por diferentes periodos (0-48 h) y los ejes embrionarios se disectaron manualmente como se describe en García-Flores et al. 2001 (García-Flores et al., 2001).

**Tratamiento de los ejes embrionarios.** Para los experimentos en que se probó el efecto de los diversos compuestos, los ejes embrionarios se disectaron de las semillas germinadas por 24 ó 48 h y se incubaron en medio Murashige & Skoog (MS) líquido (Murashige y Skoog, 1962) en ausencia (control) o presencia, ya sea de insulina 200  $\mu\text{U}/\text{mL}$ , insulina 200  $\mu\text{U}/\text{mL}$  más rapamicina 100 nM, insulina 200  $\mu\text{U}/\text{mL}$  más wortmanina 1  $\mu\text{M}$ , ZmIFG 200  $\mu\text{U}/\text{mL}$ , ZmIGF 200  $\mu\text{U}/\text{mL}$  más rapamicina 100 nM, ZmIGF 200  $\mu\text{U}/\text{mL}$  más wortmanina 1  $\mu\text{M}$  o los inhibidores rapamicina o wortmanina solos, a las concentraciones señaladas. Los ejes se incubaron a  $25 \pm 2$  °C en agitación durante dos horas. Para experimentos de marcaje *in vivo*, los ejes fueron incubados en alguna de las condiciones anteriores y expuestos a [ $^{32}\text{P}$ ]-ortofosfato (400  $\mu\text{Ci}$ ; 10 mCi/ml) durante las 2 h de estímulo como se mencionará más adelante. Posteriormente los ejes fueron lavados con agua desionizada, congelados en Nitrógeno líquido y almacenados a  $-70$  °C o usados inmediatamente.

**Preparación de los extractos crudos de maíz.** Los ejes embrionarios se pulverizaron con nitrógeno líquido y se les adicionó 3ml de buffer de extracción [50 mM de HEPES, pH 7.6, 50 mM de Pirofosfato de Sodio, 1 mM de Vanadato de Sodio, 1 mM de Molibdato de Sodio, 4 mM de EDTA, 20 mM de EGTA, 1 mM de Benzamidina, 20 mM de fluoruro de Sodio, 80 mM de  $\beta$ -glicerofosfato, 200 mM de Manitol, 0.2 mM de PMSF, 2 mM de DTT y 0.7% de PVPP] por gramo de tejido. Los tejidos se homogeneizaron en vortex tres veces y se sometieron a una centrifugación a 27,000 x g, 30 minutos a 4° C. Las proteínas del sobrenadante se cuantificaron por el método de Bradford (Bradford, 1976) y a estos extractos se les consideró como extractos crudos.

**Preparación de las subunidades 40S, sustrato para medir la actividad de la S6K.** Para preparar las fracciones enriquecidas con subunidad 40S, se extrajeron ejes embrionarios de maíz sin germinar, donde la actividad metabólica es casi nula, no existe la formación de polisomas y la fosforilación de las proteínas ribosomales es muy baja. Se prepararon los

extractos crudos y el sobrenadante se filtró a través de dos capas de Miracloth y se sometió a una nueva centrifugación a 280,000 x g durante 3.5 horas a 4° C utilizando un colchón de sacarosa (0.5 M de Sacarosa y 800 mM de cloruro de potasio en buffer de extracción) (Beltrán-Peña et al., 1995). La pastilla de ribosomas se resuspendió en un buffer de disociación [Tris 20 mM, pH 7.6, 400 mM de cloruro de potasio, 3 mM de cloruro de Magnesio, 5 mM de β-mercaptoetanol y 5% de Sacarosa] con 2 mM de GTP y 2 mM de Puromicina, se incubaron a 37° C durante 45 minutos y se colocaron en un gradiente lineal de sacarosa (5-45 % de sacarosa en buffer de disociación). Los gradientes se centrifugaron a 19,000 x g durante 10 horas y las fracciones fueron separadas y medidas en espectrofotómetro a 260 y 280 nm.

**Obtención de proteínas ribosomales.** Para la obtención de proteínas ribosomales se utilizó la técnica de obtención de ribosomas arriba descrita, excepto que para obtener las proteínas ribosomales el extracto resuspendido en buffer de disociación se sometió a una extracción con ácido acético (Beltrán Peña et al., 1995).

**Identificación de la S6 cinasa de maíz (ZmS6K) por Western blot.** Los extractos crudos (100 µg de proteína) se resolvieron por electroforesis en SDS-PAGE al 15 % de poliacrilamida y las proteínas se transfirieron a membranas de Immobilon-P (Millipore). Las membranas se analizaron por la técnica de Western blot utilizando anticuerpos originados en conejo contra la p70<sup>S6K</sup> (anti-p70<sup>S6K</sup>) de humano (Santa Cruz Biotech.).

**Inmunoprecipitación de la ZmS6K.** Para la inmunoprecipitación de la enzima de maíz se siguió el método descrito por Turck et al. (Turck et al., 1998) con algunas modificaciones: se partió de 3 mg de proteínas citoplásmicas (500 µL de extracto crudo) diluidos en 500 µL de buffer A [10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.05 % Nonidet-P 40 p/v] más 2 mM benzamidina y 1 µM PMSF. El extracto diluido se mezcló con 5 µL de anticuerpo anti p70S6K (Santa Cruz Biotechnology) en una dilución final 1:200 y la mezcla se incubó toda la noche a 4° con agitación constante. A continuación se le adicionó 100 µL de proteína A sefarosa (Zymed) y se incubó a 4° C por 4 horas más. La mezcla se hizo pasar a través de una microcolumna hecha con una punta de micropipeta taponada con fibra de vidrio y se lavó tres veces con buffer B [100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM NaCl, 0.05 % Nonidet-P40 w/v, 0.25 % v/w Triton X-100] y dos veces con buffer A.

Finalmente la ZmS6K fue eluida con 300  $\mu$ L de buffer de muestra [60 mM Tris, pH 7.5, 2 % SDS w/v, 10 % Glicerol w/v].

**Medida de la actividad de la ZmS6K y análisis cinético.** La ZmS6K se obtuvo a través de la inmunoprecipitación descrita anteriormente excepto que la mezcla fue colectada en el fondo de los tubos Eppendorf por centrifugación en microfuga. El sobrenadante fue retirado y la pastilla que contenía la mezcla proteína A sefarosa-anticuerpo-ZmS6K fue lavada tres veces con buffer B, dos veces con Buffer A y resuspendida en 100  $\mu$ L buffer de reacción [50 mM de MOPS, pH 7.0, 5 mM de Cloruro de Magnesio, 1mM de DTT, 10 mM de *p*-nitrofenil fosfato y 1mM de Vanadato de Sodio]. Para medir la actividad de la ZmS6K se utilizaron 10  $\mu$ L de la mezcla proteína A sefarosa-anticuerpo-enzima y se le agregaron 300  $\mu$ M de ATP, 10  $\mu$ Ci de  $^{32}$ P- $\gamma$ -ATP (3000 Si/pool), 0.5  $\mu$ M de inhibidor de PKA, 4  $\mu$ M de inhibidor de PKC y 20  $\mu$ g de subunidad 40S ó 5  $\mu$ g de péptido RSK (péptido sintético que contiene los sitios fosforilables de la S6 (Law. et al., 2000), en un volumen de reacción final de 20  $\mu$ L. La reacción se incubó 25° C durante 30 minutos y se detuvo con la adición de 20  $\mu$ L de buffer de carga para SDS-PAGE calentando a ebullición por 3 minutos en baño de agua cuando la subunidad 40S fue usada como sustrato. La mezcla se analizó por SDS-PAGE al 15 % de poliacrilamida y por autorradiografía. Cuando el péptido RSK fue usado como sustrato, la reacción se detuvo al adicionar los 20  $\mu$ L de la reacción a discos secos de papel p81 (fosfocelulosa). Los papeles se lavaron extensivamente con ácido fosfórico al 0.85 % y finalmente con acetona. La marca incorporada en el sustrato se midió en un contador de centelleo líquido. Para determinar la Km de la ZmS6K por ATP y por el péptido RSK, se utilizaron diferentes concentraciones de estos compuestos (0-500  $\mu$ M ATP frío y 0-13.5 nM de RSK) y concentraciones fijas de  $^{32}$ P- $\gamma$ -ATP. La incorporación de marca radiactiva en el péptido RSK se midió de la manera antes mencionada.

**Determinación del estado de fosforilación de la ZmS6K y su actividad in vivo sobre la S6rp.** Dado que la actividad de la p70<sup>S6K</sup> correlaciona con la fosforilación en la treonina 389 (Pearson et al., 1995), la determinación del grado de fosforilación de la ZmS6K, se utilizó como indicador, para ello se utilizaron dos métodos: a) Por Western blot utilizando un anticuerpo comercial (Santa Cruz Biotechnology) que reconoce a la treonina en la posición 389 de la p70<sup>S6K</sup> (anti-p70<sup>S6K</sup> Treo-389); B) Por marcaje radiactivo, alimentando los ejes embrionarios con [ $^{32}$ P]-ortofosfato durante 2 h para fosforilar *in vivo* a la ZmS6K e

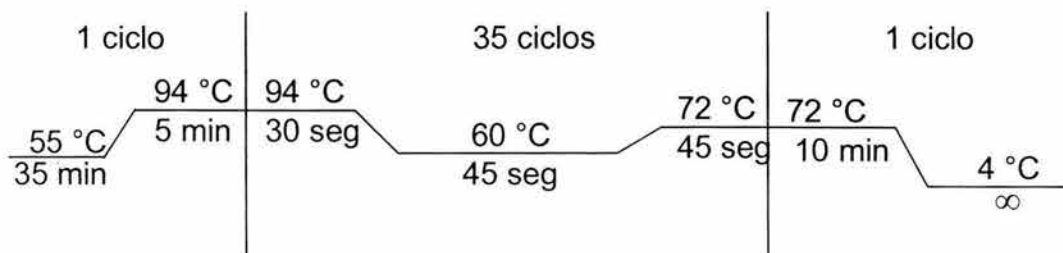


inmunoprecipitándola como ya se indicó. Al mismo tiempo, otro grupo de ejes embrionarios marcados con [ $^{32}\text{P}$ ] se utilizaron para extraer las proteínas ribosomales por el método descrito por Beltrán-Peña y col. (Beltrán-Peña et al., 1995). Finalmente, las proteínas marcadas con [ $^{32}\text{P}$ ], la ZmS6K y su sustrato la S6rp, se analizaron por SDS-PAGE y autorradiografía.

**Análisis bidimensional de los extractos crudos.** Para analizar los cambios en la movilidad electroforética de la ZmS6K y hacer un análisis más profundo del grado de fosforilación, los extractos crudos se resolvieron en geles en dos dimensiones. El análisis por isoelectroenfoque (IEF) en capilar de las proteínas de los extractos crudos obtenidos de ejes de diferentes horas de germinación, o de ejes tratados con los diferentes compuestos, se realizó de acuerdo a la técnica descrita por O'Farell (O'Farell, 1975). Brevemente, para 10 ml de gel se utilizaron 1.33 ml de acrilamida al 30% (acrilamida 28.38 %, N, N-metilen-bis-acrilamida 1.62 %), 5.5 g de Urea, 200  $\mu\text{L}$  de Nonidet-P 40 (NP-40), 500  $\mu\text{L}$  de anfolinas pH 3.5-10, 500  $\mu\text{L}$  de anfolinas pH 6-8, 10  $\mu\text{L}$  de TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletildiamina) y 20  $\mu\text{L}$  de APS (Persulfato de amonio) al 20%. Previo a su polimerización, el gel se cargó en los tubos capilares de vidrio de (14 X 0.2 cm), bloqueados por un extremo con parafilm, llenados hasta aproximadamente 11 cm con el gel y el resto con agua desionizada. Una vez polimerizado el gel, se retiró el parafilm, se eliminó el agua de los tubos y se montaron en el equipo de electroforesis en capilar (Hofer). Se agregaron 30  $\mu\text{L}$  de amortiguador de lisis [Urea 9.5 M, NP-40 2% (v/v), anfolinas 2% (pH 3.5-10 1%, pH 6-8 1%) y  $\beta$ -mercaptoetanol 5 % (v/v)] y 30  $\mu\text{L}$  de amortiguador K [Urea 6 M y anfolinas 2% (pH 3.3-10 1%, pH 6-8 1%)] en la parte superior de los tubos y el resto se llenó con amortiguador ánodo (NaOH 0.02 M). Se adiciona amortiguador cátodo ( $\text{H}_3\text{PO}_4$  0.01 M) a la bandeja inferior del equipo de electroforesis en capilar (hasta cubrir aproximadamente 1 cm de la parte inferior de los tubos capilares) y amortiguador ánodo a la bandeja superior del equipo hasta cubrir completamente la parte superior de los tubos capilares, evitando la formación de burbujas en ambos extremos de los tubos. El equipo se conectó a una fuente de poder y se corrió a 200 V, 30 min; 300 V, 30 min y 400 V 1 h. Al finalizar la corrida, se retiró el amortiguador ánodo sin desmontar el equipo de electroforesis y se lavó la parte superior de los tubos capilares con agua desionizada. Los extractos crudos (150-200  $\mu\text{g}$  de proteína) se mezclaron 1:1 con amortiguador de lisis y se cargaron en la parte superior de los tubos pre-corridos, se adiciona 30  $\mu\text{L}$  de amortiguador K y amortiguador ánodo hasta llenar los

tubos capilares. El equipo de electroforesis se conecta nuevamente a la fuente de poder y se corre a 400 V durante 18-20 h. Tiempo transcurrido, se desmonta el equipo de electroforesis, los geles se retiran de los tubos capilares y se colocan en 5 mL de amortiguador O [Tris 0.06M pH 6.5, SDS 2 % (p/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 5 % (v/v) y glicerol 10 % (v/v)] en tubos de vidrio de 16 X 150 con tapa y se almacenan por lo menos 2 h a  $-20^{\circ}$  C. Las proteínas separadas por IEF se resolvieron por SDS-PAGE al 12 % de poliacrilamida (Laemli 1970). Los geles se transfirieron a membranas de PVDF y se analizaron por Western blot y/o autorradiografía, utilizando el anticuerpo anti-p70<sup>S6K</sup> (Santa Cruz Biotechnology).

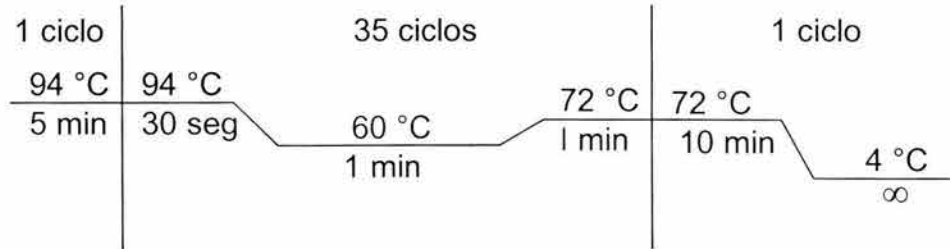
**Aislamiento y secuenciación del gen de la ZmS6K de maíz.** Para el aislamiento del gen que codifica para la proteína ZmS6K se extrajo y purificó RNA total y poly A<sup>+</sup> de ejes embrionarios de maíz, por los métodos de TRizol<sup>®</sup> (Gibco-BRL) y Poly A Track System<sup>®</sup> (Promega), respectivamente. Posteriormente se hicieron alineamientos de las secuencias de nucleótidos de las S6K de mamíferos y de los genes de *Arabidopsis thaliana*, sorgo y avena, disponibles en la base de datos de National Center of Biotechnological Information (NCBI). A partir de estos alineamientos se seleccionaron las secuencias de nucleótidos de las regiones más conservadas de los genes, para usarlos como iniciadores en la técnica de RT-PCR. Las secuencias de los oligonucleótidos son: 5'-tgctcacagatttggcc-3' (sentido) y 5'-cctccatgaccttcttcgacctcgcgttcttccagt-3' (antisentido). Para la técnica de RT-PCR se utilizó el Kit TITAN one step RT-PCR (Roche) o el Kit RT-PCR one step (Invitrogen<sup>®</sup>). Los parámetros utilizados para esta técnica se describen en el diagrama siguiente:



Para obtener la secuencia completa del gen, se diseñó el oligonucleótido 5'-gtgaagctcattcctcctgagagg-3' en sentido y antisentido. Utilizando como templado una biblioteca de cDNA obtenida de elote, amablemente proporcionada por la Dra. Sara Hake (Universidad de California, Berkeley), se procedió a realizar la técnica de PCR utilizando los

oligonucleótidos arriba mencionados y los oligonucleótidos universales T3 y T7 de los brazos del vector donde se encuentra clonada la biblioteca.

Los parámetros utilizados para la técnica de PCR se describen el diagrama siguiente:



A partir de las secuencias obtenidas de los extremos 5' y 3' se diseñaron los oligonucleótidos 5'-gatccattctcttgcggtccaac-3' (sentido) y 5'-accagcttgccaaacaccattatg-3' (antisentido) para utilizarlos para la técnica de RT-PCR, usando como templado RNA poly A<sup>+</sup> de ejes embrionarios extraídos de semillas germinadas por 24 h. Los parámetros utilizados para estas reacciones fueron semejantes a los descritos anteriormente para la técnica de RT-PCR, excepto que el tiempo de amplificación a 72 °C fue de 2 minutos.

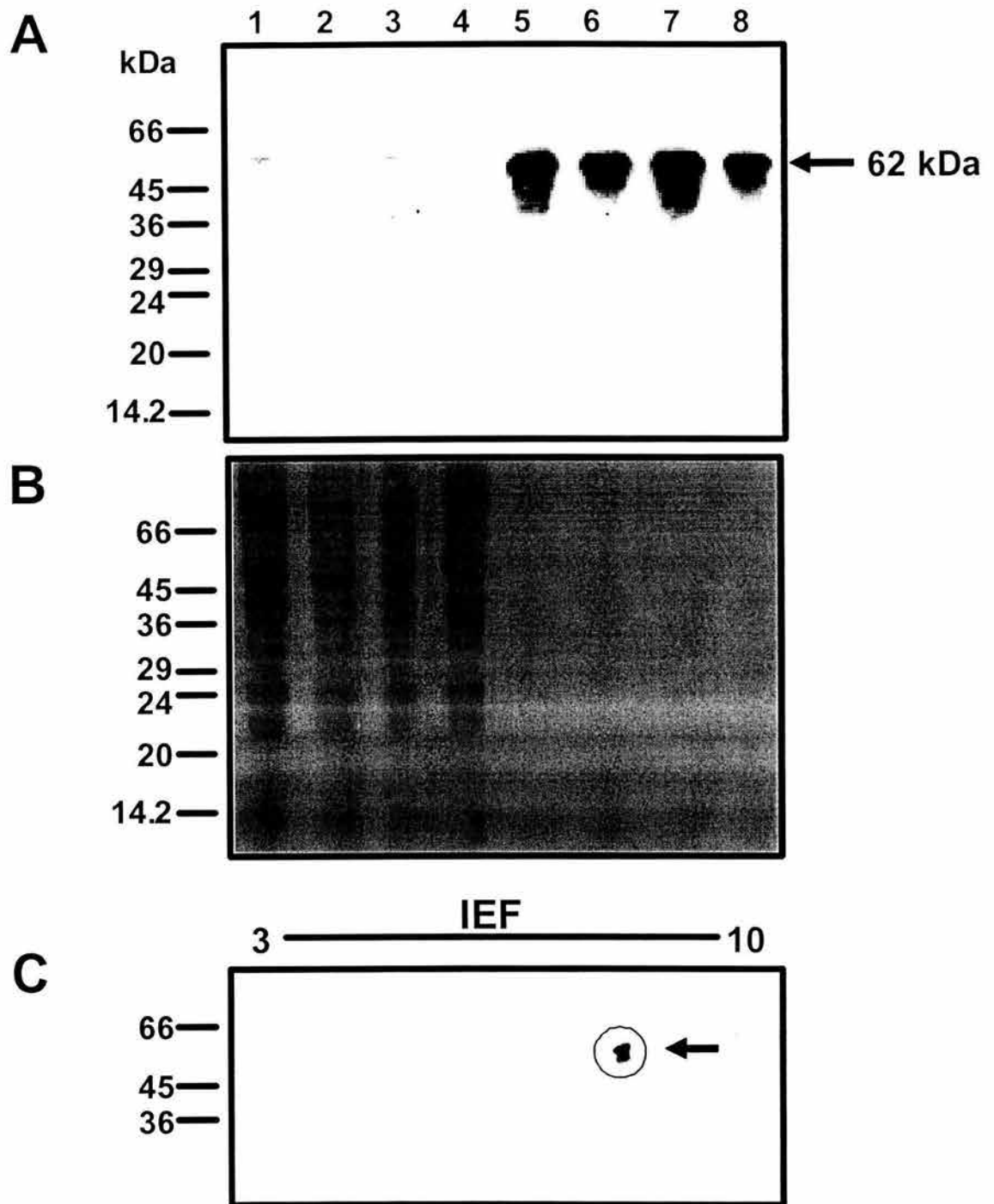
Las reacciones de RT-PCR y PCR se realizaron en un termociclador GeneAmp<sup>®</sup> PCR system 9700 (Applied Biosystems).

## VII. RESULTADOS.

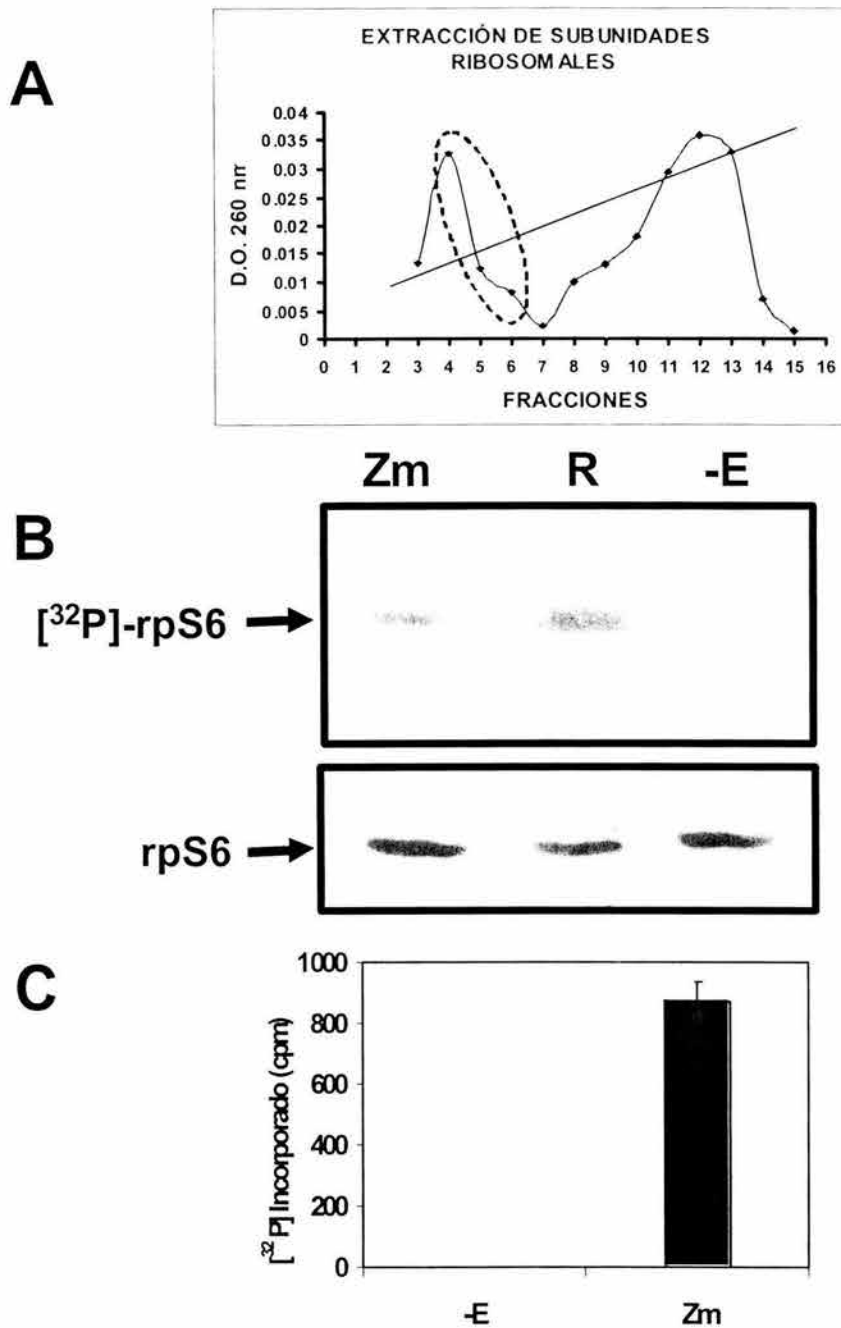
**Identificación de la proteína cinasa S6 de maíz (ZmS6K).** A partir de extractos crudos de ejes embrionarios de maíz germinados por 24 horas, se logró identificar un péptido de 62 kDa (Figura 5A, carril 1) mediante la técnica de Western blot, utilizando un anticuerpo comercial contra la p70<sup>S6K</sup> de humano (Santa Cruz Biotech.). Asimismo, se aisló un péptido de los extractos crudos de maíz por inmunoprecipitación utilizando los mismos anticuerpos, el cual mostró tener la misma masa molecular que el péptido identificado en el Western blot (Figura 5A, carril 2). La presencia de éste péptido se corroboró a través de electroforesis en 2 dimensiones donde se demostró la presencia de dos manchas muy cercanas con masa molecular y punto isoeléctrico similares al de la p70<sup>S6K</sup> de mamíferos (Figura 5C).

**Ensayo de la actividad de la ZmS6K y su análisis cinético.** Para establecer si el péptido de 62 kDa (ZmS6K) tenía actividad de cinasa sobre la S6, se estableció un sistema *in vitro* para medir su actividad, utilizando la proteína inmunoprecipitada de ejes embrionarios de semillas germinadas por 24 h. Como control positivo se utilizó la enzima inmunoprecipitada de extractos proteicos de hígado de rata por el mismo procedimiento y como control negativo se colocó una mezcla de reacción con todos los componentes excepto la ZmS6K. La actividad se midió utilizando [<sup>32</sup>P]- $\gamma$ -ATP y fracciones enriquecidas con subunidad ribosomal 40S (Figura 6A) o el péptido RSK como sustratos. Las reacciones se llevaron a cabo y se analizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados de la actividad obtenidos utilizando como sustrato a la subunidad 40S de ejes de maíz (Figura 6B), son igualmente positivos que los obtenidos utilizando como sustrato un fragmento de la proteína ribosomal S6 que contiene los sitios fosforilables de la proteína (péptido RSK) (Law et al., 2000) (Figura 6C). Estos resultados demuestran que la proteína inmunoprecipitada de los ejes embrionarios de maíz es capaz de incorporar [<sup>32</sup>P] a la proteína ribosomal S6 en la subunidad 40S (Figura 6B, panel superior), como se comprobó por Western blot utilizando anticuerpos contra la proteína ribosomal S6 (Figura 6B panel inferior), y con la incorporación de [<sup>32</sup>P] al péptido RSK, demostrándose así que la proteína inmunoprecipitada corresponde a la ZmS6K de ejes embrionarios. Es de hacer notar que en la mezcla de reacción se utilizaron como inhibidores específicos para otras cinasas de la misma familia como son la PKA y la PKC, péptidos que se unen y bloquean el sitio catalítico de estas

enzimas. Esto fue con la finalidad de descartar la posibilidad de que la PKAs o la PKC pudiera fosforilar a los sustratos utilizados.



**Figura 5. Identificación de la ZmS6K en ejes embrionarios de maíz.** **A)** Western blot realizado en extractos crudos de ejes embrionarios de maíz (carriles 1-4) y proteínas inmunoprecipitadas utilizando el anticuerpo anti-p70<sup>S6K</sup> (carriles 5-8). **B)** Tinción de Coomassie del SDS-PAGE realizado a los extractos crudos (carriles 1-4) y a los inmunoprecipitados de los ejes embrionarios (carriles 5-8). **C)** Western blot de uno de los inmunoprecipitados (carril 5) en una electroforesis en 2-D, realizada utilizando el anticuerpo anti p70<sup>S6K</sup>.

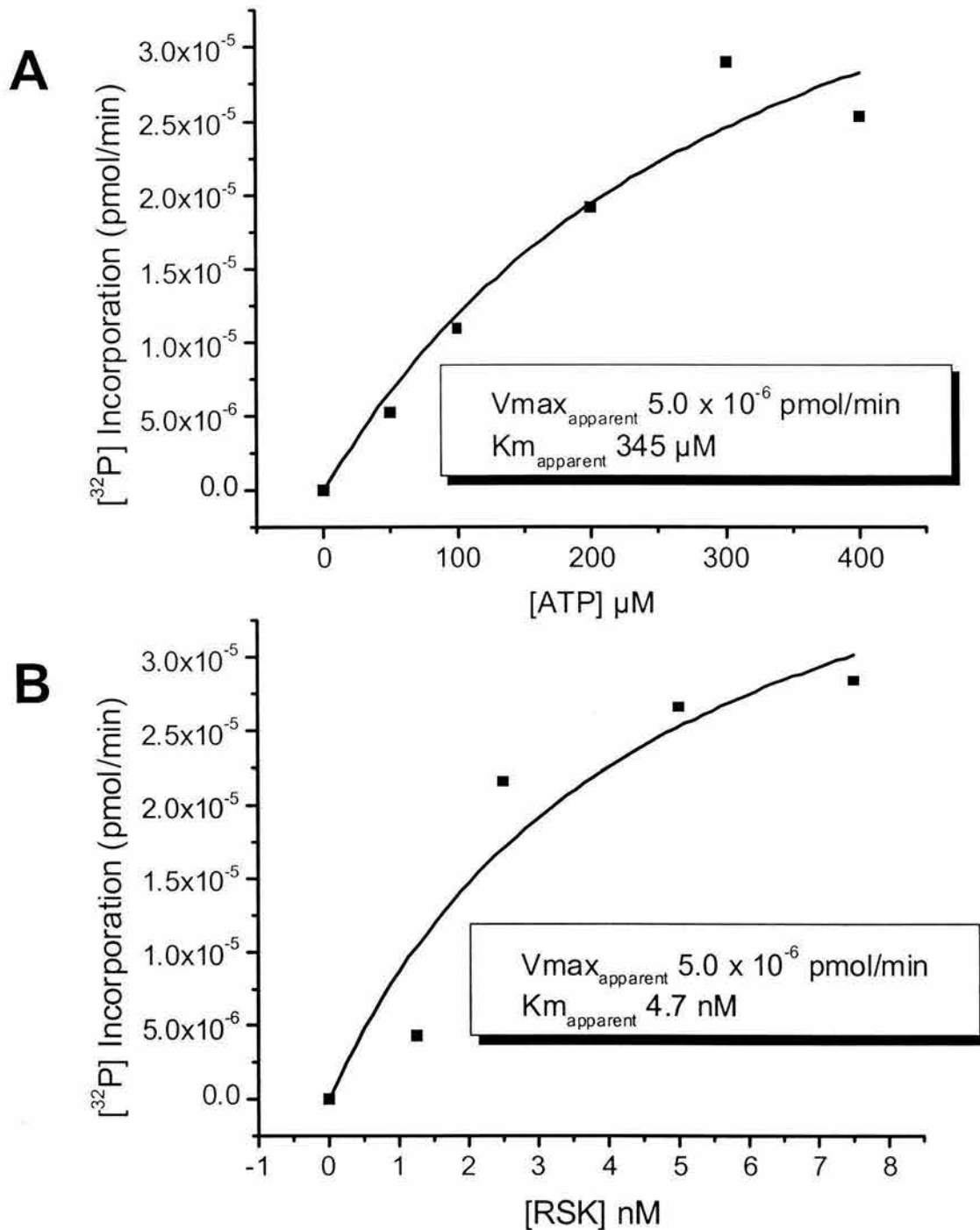


**Figura 6. Ensayo de actividad de la ZmS6K.** A) Gráfica representando las lecturas de las fracciones obtenidas de ribosomas separados con puromicina y GTP puestas en un gradiente lineal de sacarosa. La línea recta representa el gradiente (5-45 % de sacarosa) y el óvalo indica las fracciones enriquecidas con subunidad 40S. B) Autorradiografía de un SDS-PAGE de la actividad utilizando las fracciones enriquecidas con subunidades 40S de ejes embrionarios de semillas quiescentes. Zm, reacción con ZmS6K inmunoprecipitada de ejes de 24 h; R, reacción utilizando la p70<sup>S6K</sup> inmunoprecipitada de rata; -E, reacción sin ZmS6K (Panel superior). Las subunidades fueron analizadas por Western blot utilizando un anticuerpo anti-prS6 (panel inferior). C) Ensayo de actividad utilizando como sustrato el péptido RSK.

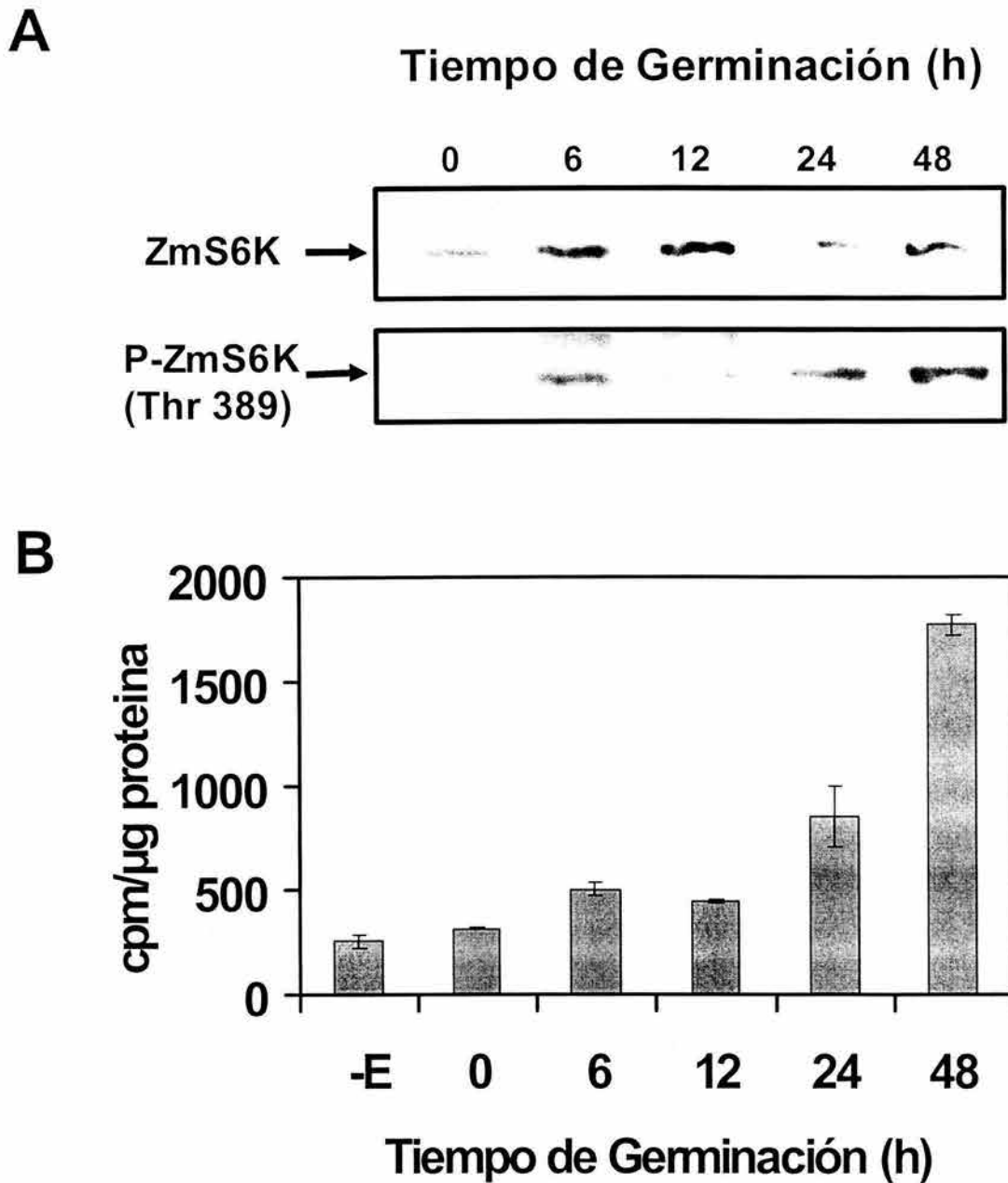
Para conocer más a fondo las propiedades de la enzima se realizó un análisis cinético de la actividad de la enzima ZmS6K. Utilizando diferentes concentraciones de los sustratos de la ZmS6K (ATP y RSK) se lograron establecer valores aproximados de las Kms para cada uno de los sustratos (Figura 7). Así, los valores de la Km aparente para ATP es de aproximadamente 345  $\mu$ M (Figura 7A) y la de RSK de 4.7 nM (Figura 7B). Estos parámetros resultaron ser aceptablemente parecidos a los que se utilizan para la p70<sup>S6K</sup> (350  $\mu$ M para ATP, 5 nM para RSK) (Law et al., 2000) y sirvieron de base para elegir las concentraciones utilizadas en el ensayo para determinar la actividad de la ZmS6K en los subsecuentes experimentos.

**Determinación del estado de fosforilación de la ZmS6K.** En mamíferos la p70<sup>S6K</sup> se activa por fosforilación en sitios previamente caracterizados (Dennis et al., 1996), y la secuencia de aminoácidos de la enzima probable, deducida de las clonas de *Arabidopsis*, conserva los sitios equivalentes más importantes para la activación (Turck et al 1998). Con esta información, se procedió a determinar si la activación de la ZmS6K se debía a la fosforilación específica de un residuo equivalente al implicado en la activación de la enzima de mamíferos (Dennis et al., 1996). Para esto, se utilizó un anticuerpo comercial dirigido contra la región donde se encuentra una treonina en la posición 389 de la enzima de mamíferos (Santa Cruz Biotech.; Cell Signaling Co.). Este anticuerpo sólo reconoce esta región de la proteína si la treonina correspondiente está fosforilada. Con esta finalidad se realizó el siguiente experimento: Se prepararon extractos crudos de ejes embrionarios de maíz extraídos de semillas quiescentes (0 h) y germinadas durante 6, 12, 24, y 48 h (Figura 8). Los extractos crudos se analizaron por Western blot con el anticuerpo desarrollado contra la proteína completa y con el anticuerpo antes mencionado, para determinar tanto el contenido total de ZmS6K como la cantidad de ZmS6K fosforilada en la treonina equivalente a la Treo-389, respectivamente. Se logró demostrar que en ejes embrionarios extraídos de semillas germinadas de 6 a 48 h, existe un péptido fosforilado que es reconocido con el anticuerpo anti-p70<sup>S6K</sup> (Treo-389) (Figura 8 A, panel inferior) y que corresponde al péptido reconocido por el anticuerpo desarrollado contra la proteína completa (Figura. 8 A, panel superior). A pesar de que la proteína está presente en ejes embrionarios de semillas quiescentes (Figura 8 A, 0 h, panel superior), la ZmS6K no se detecta fosforilada (Figura 8 A, 0 h, panel inferior).





**Figura 7. Determinación de los parámetros cinéticos de la ZmS6K.** **A)** Determinación de la  $K_m$  aparente para ATP utilizando diferentes concentraciones de ATP frío (0-500  $\mu\text{M}$ ) y 5  $\mu\text{Ci}$  de  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP marcado. **B)** Determinación de la  $K_m$  aparente para el péptido RSK utilizando 300  $\mu\text{M}$  de ATP frío, 5  $\mu\text{Ci}$  de  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP y diferentes concentraciones del péptido (0-10 nM). Los datos fueron analizados con el programa Origin 5.0 y ajustados con la ecuación de Michaelis-Menten.

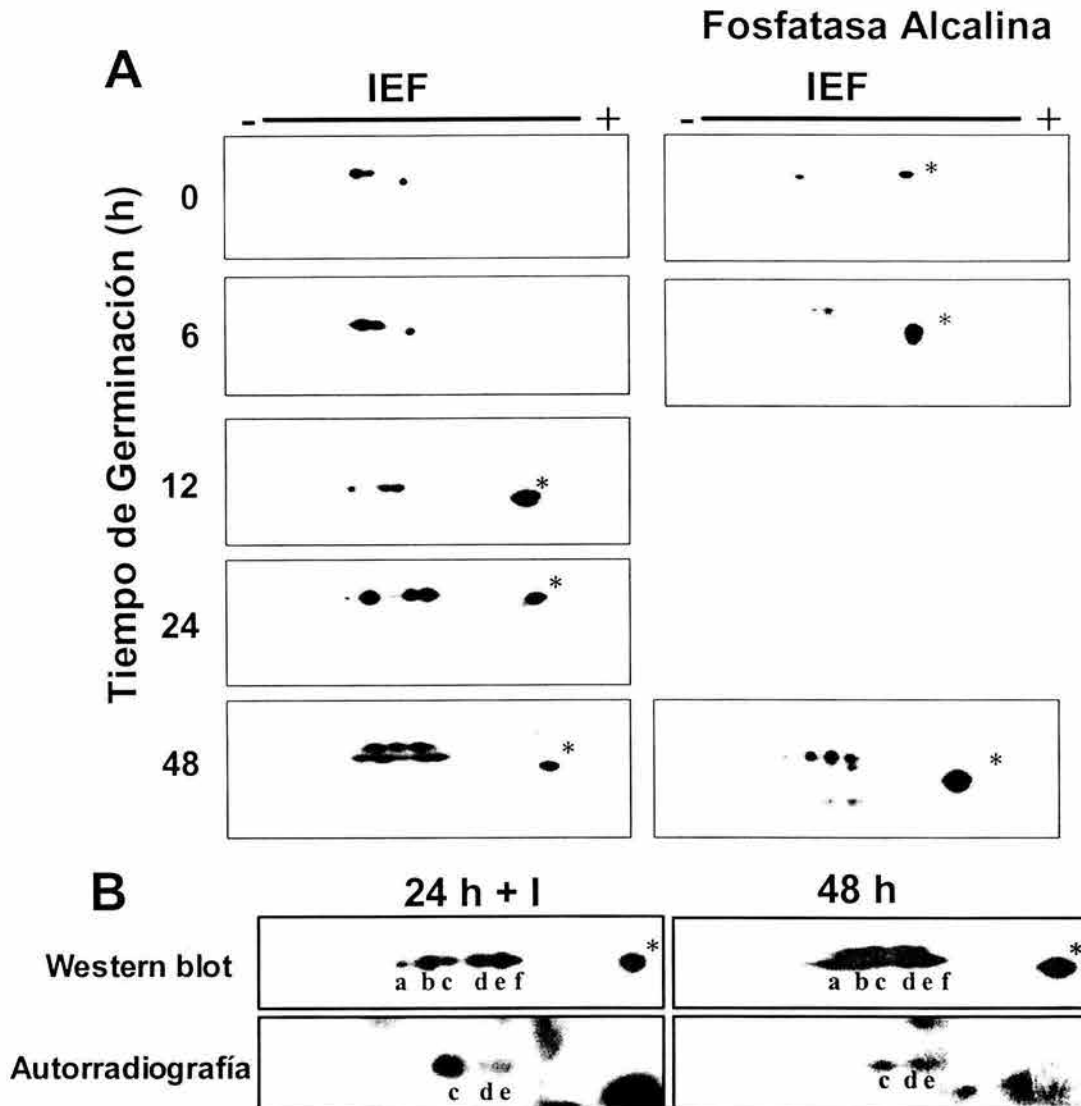


**Figura 8. Activación de la ZmS6K por fosforilación.** **A)** Extractos crudos de ejes embrionarios extraídos de semillas con diferentes periodos de germinación fueron resueltos por electroforesis en SDS-PAGE y analizados por Western blot, utilizando como primer anticuerpo el anti-p70<sup>S6K</sup> (panel superior) o el anti-fosfo-p70<sup>S6K</sup> (Treo-389) (panel inferior). **B)** Ensayo de actividad realizado a la ZmS6K inmunoprecipitada de los extractos de A) utilizando como sustrato el péptido RSK y [<sup>32</sup>P]-γ-ATP. Los datos representan la media ± el error estándar de tres experimentos independientes.

Por otro lado, se inmunoprecipitó a la ZmS6K de los ejes extraídos de las semillas germinadas de 0-48 h, y se determinó la actividad *in vitro* utilizando como sustrato al péptido RSK (figura 8 B). Los resultados de estos experimentos concuerdan con los del Western blot realizado con el anticuerpo anti-p70<sup>S6K</sup> (Treo-389) y demuestran que la actividad del péptido correlaciona positivamente con su grado de fosforilación. Por otra parte estos resultados demuestran que el grado de fosforilación y la actividad de la ZmS6K, se incrementan durante el proceso de germinación.

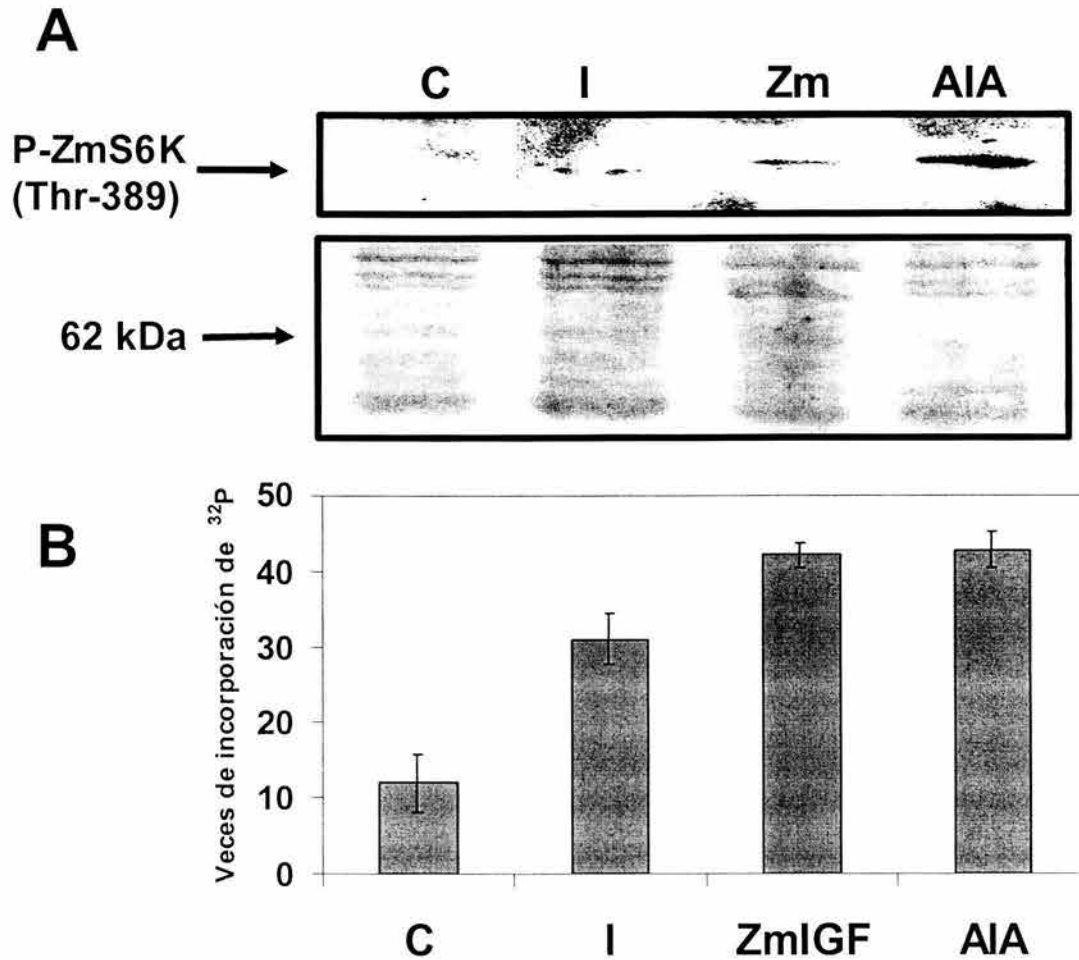
**Análisis bidimensional de la ZmS6K.** Reportes previos han indicado que la activación completa de la p70<sup>S6K</sup> se lleva a cabo después de la fosforilación de otros residuos además de la Treo-389 (Law et al., 2000). Para un análisis más profundo del estado de fosforilación de la ZmS6K se hicieron geles en 2 dimensiones (2-D) de extractos crudos de ejes embrionarios de maíz extraídos de semillas germinadas durante diferentes períodos de tiempo (0-48 h). Los geles se transfirieron a membranas de PVDF y se analizaron por la técnica de Western blot, utilizando el anticuerpo que reconoce a la proteína completa (Figura 9). Los resultados demuestran la presencia de dos manchas con puntos isoeléctricos de ~6, similares a la p70<sup>S6K</sup> (6.02) y una masa molecular de ~62 kDa, en los extractos proteicos provenientes de ejes de semillas sin germinar (Figura 9A, 0 h). Conforme avanza el período de germinación el número de manchas se va incrementando hacia la región ácida del gel (polo +) (Figura 9 A, 12-48 h), algunas de las cuales desaparecen por tratamiento previo de los extractos con fosfatasa alcalina (Figura 9 A, fosfatasa alcalina), sugiriendo que estas corresponden a formas fosforiladas de la proteína. Para confirmar si el cambio en el punto isoeléctrico de las manchas es debido exclusivamente a la fosforilación de la proteína o si hay otras modificaciones postraduccionales de la proteína, se hicieron geles en 2-D de extractos proteicos de ejes embrionarios alimentados con [<sup>32</sup>P]-ortofosfato, durante 2 h. Los geles se transfirieron nuevamente a membranas y se analizaron por autorradiografía y Western blot (Figura 9 B). Los resultados demuestran que con las condiciones utilizadas, al menos tres manchas (c, d y e) vistas por la técnica de Western blot, coinciden con tres manchas presentes en las autorradiografías (Figura 9 B). Con esto se pudo corroborar que la ZmS6K es una proteína cinasa activada por fosforilación de manera similar a lo que ocurre con miembros de la familia de la p70<sup>S6K</sup> de mamíferos. Un análisis de la secuencia deducida de aminoácidos de la ZmS6K (ver más adelante) con el programa ScanProsite (ExPASy Molecular Biology

Server) reveló la presencia de posibles sitios de glicosilación y miristilación, lo que ayudaría a explicar la presencia de las otras manchas con diferente peso molecular.



**Figura 9. Análisis en 2-D de la ZmS6K.** A) Western blot de extractos crudos (200 µg de proteína) de ejes embrionarios extraídos de semillas con diferentes periodos de germinación resueltos por electroforesis en 2-D, utilizando como primer anticuerpo el anti-p70<sup>S6K</sup> (Panel de la izquierda). Los extractos (200 µg de proteína) fueron previamente tratados con 5 U de fosfatasa alcalina por 2 h, resueltos por electroforesis en 2-D y analizados por Western blot (panel de la derecha) **B**) Extractos crudos (200 µg de proteína) de ejes embrionarios extraídos de semillas germinadas por 22 h estimulados con insulina 200 µU/mL por 2 h más (Izquierda) y 46 h sin estímulo (derecha), fueron alimentados con <sup>32</sup>P-ortofosfato durante 2 h, resueltos por electroforesis 2-D y analizados por Western blot (paneles superiores) y autorradiografía (paneles inferiores). Las letras indican la posición equivalente de las manchas en los dos análisis. Los asteriscos indican una proteína reconocida inespecíficamente por el anticuerpo.

**Efecto de insulina, ZmIGF y AIA sobre la actividad de la ZmS6K.** La activación de la p70<sup>S6K</sup>, se lleva a cabo a través de rutas de señalización desencadenadas por diferentes factores de crecimiento. Uno de los factores de crecimiento más estudiados es la insulina y los factores de crecimiento semejantes a insulina (IGFs) (Rhoads et al., 1999) y en maíz el ZmIGF (García-Flores et al., 2001). Con la finalidad de determinar el efecto de algunos de estos reguladores del crecimiento sobre la actividad de la ZmS6K, se realizaron los siguientes experimentos. Se extrajeron ejes embrionarios de semillas de maíz germinadas por 22 h, los ejes se incubaron en medio MS en ausencia (control) o en presencia de insulina 200  $\mu$ U/mL, la auxina ácido 3-indolacético (AIA) 20  $\mu$ M y ZmIGF 200  $\mu$ U/mL (Figura 10). Estos reguladores se utilizaron porque ya se había demostrado que inducen la fosforilación de la S6rp e inducen la síntesis selectiva de proteínas en ejes embrionarios de maíz (Sánchez de Jiménez et al., 1999; García-Flores et al., 2001; Beltrán-Peña et al., 2002). La ZmS6K se inmunoprecipitó de los extractos proteicos provenientes de los ejes embrionarios estimulados, utilizando como sustrato al péptido RSK. Los resultados de estos experimentos demuestran que cuando se estimulan los ejes embrionarios de maíz con insulina, AIA o el ZmIGF se induce un incremento en la actividad de la S6K (Figura 10 A). Un análisis por Western blot de los extractos proteicos de lo ejes estimulados, utilizando el anticuerpo anti-fosfo Treo-389, muestra que la activación de la ZmS6K inducida por los factores correlaciona positivamente con el grado de fosforilación de la proteína (Figura 10 B).



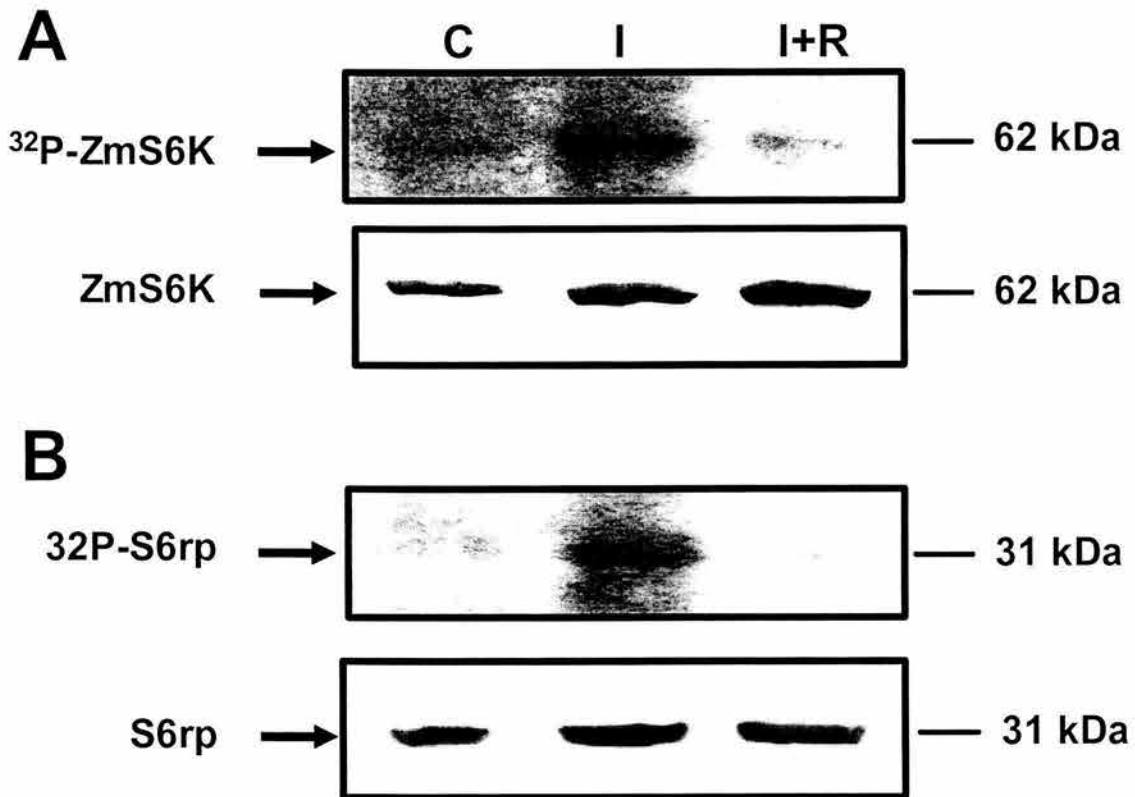
**Figura 10. Efecto de reguladores de insulina, ZmIGF y AIA sobre la actividad de la ZmS6K.** A) Western blot de extractos crudos de ejes embrionarios extraídos de semillas germinadas por 22 h. Los ejes embrionarios fueron estimulados por 2 h sin (C) y con insulina 200  $\mu$ U/mL (I), ZmIGF 200  $\mu$ U/mL y ácido Indol acético 20  $\mu$ M (AIA); utilizando el anticuerpo anti-fosfo p70<sup>S6K</sup> (Treo-389)(panel superior). Tinción Coomassie de los extractos proteicos resueltos pro SDS-PAGE (panel inferior). **B)** Ensayo de actividad realizados a la ZmS6K inmunoprecipitada de los extractos de A). Los datos son la media  $\pm$  el error estándar de tres experimentos independientes.

**Efecto de rapamicina en la ruta de transducción de señales que conduce a la fosforilación de la S6.** Para poder dilucidar algunos de los componentes de la ruta de señalización que conducen a la activación *in vivo* de la ZmS6K y demostrar que ésta proteína es la responsable de la fosforilación *in vivo* de la S6rp, se midió el efecto de la rapamicina, un inhibidor indirecto de la fosforilación de la proteína ribosomal S6, a nivel de la mTOR, la enzima encargada de activar a la p70<sup>S6K</sup>. Con esta finalidad se realizó el siguiente

experimento. Ejes embrionarios extraídos de semillas de maíz germinadas por 22 h fueron colocados en medio MS en presencia de insulina 200  $\mu$ U/mL con o sin la rapamicina 0.1  $\mu$ M. Los ejes se incubaron y se alimentaron con [ $^{32}$ P]-ortofosfato durante 2 h. Posteriormente, los ejes embrionarios se lavaron y se dividieron en dos grupos por cada tratamiento. De un grupo se extrajeron las proteínas citoplásmicas y se inmunoprecipitó a la ZmS6K y del otro grupo se extrajeron las proteínas ribosomales. Las proteínas marcadas con [ $^{32}$ P] de ambos grupos (ZmS6K y ribosomales), se separaron por SDS-PAGE y se analizaron por autorradiografía (Figura 11). Los resultados muestran que la fosforilación de la ZmS6K se ve incrementada en presencia de insulina (Figura 11A, I). Este incremento en la fosforilación se ve inhibido en ejes embrionarios tratados con rapamicina (Figura 11A, I+R). Por otro lado el análisis de las proteínas ribosomales muestra una banda de  $\sim$ 30 kDa, fosforilada *in vivo* (Figura 11B). Con un Western blot, utilizando el anticuerpo anti-S6rp, se corroboró que la banda marcada corresponde a la S6rp. Estos resultados muestran también que el estado de fosforilación de la S6rp correlaciona positivamente con el de la activación de la ZmS6K, indicando que S6rp es un sustrato *in vivo* de la ZmS6K.

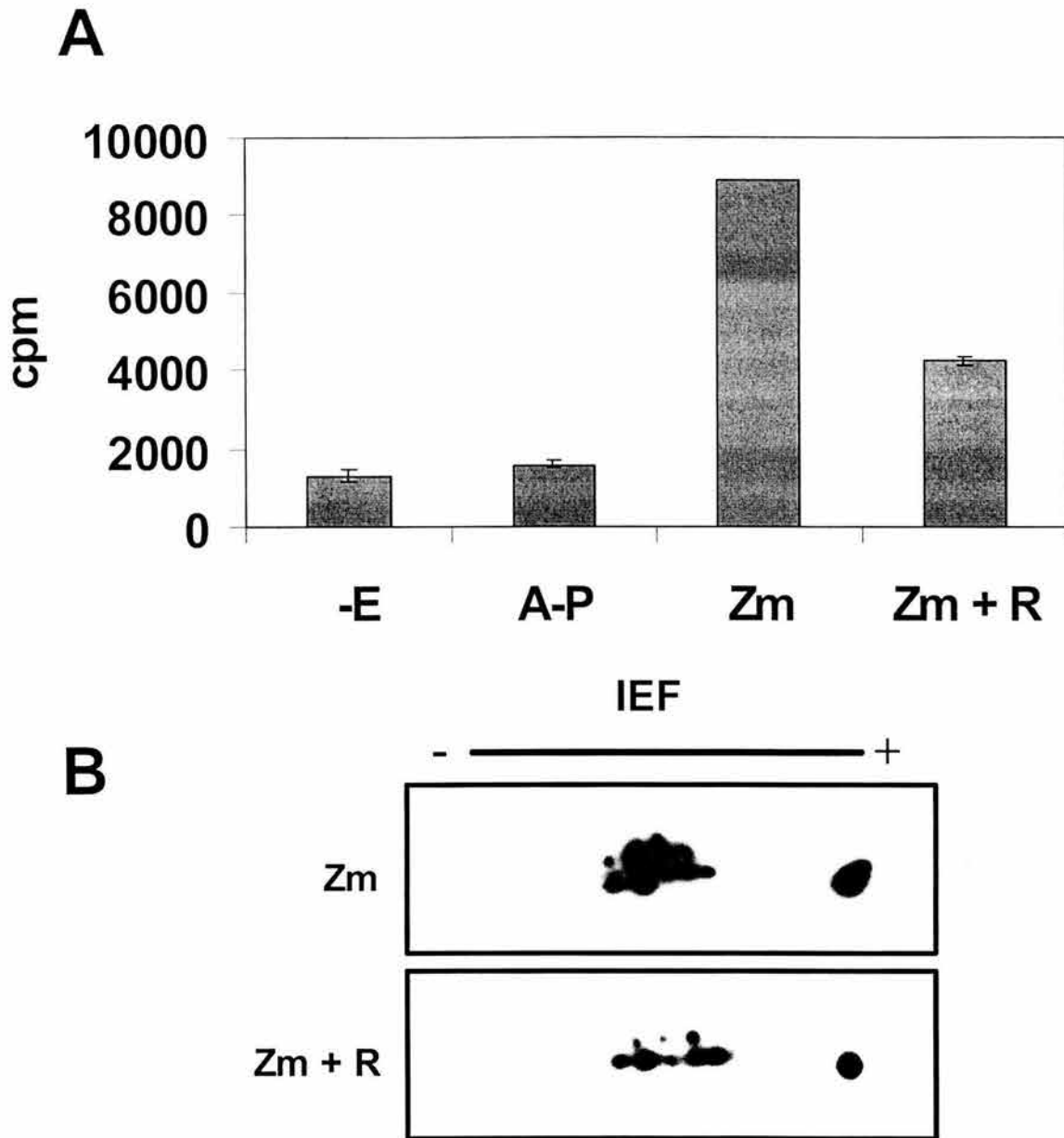
**Efecto de la rapamicina sobre la activación endógena de la ZmS6K.** Los resultados anteriores muestran que la rapamicina tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad de la ZmS6K inducida por insulina. Para determinar el efecto de la rapamicina sobre la activación endógena de la ZmS6K en la germinación, se realizó el siguiente experimento. Ejes embrionarios disectados de semillas germinadas por 46 h fueron incubados en ausencia y en presencia de rapamicina durante 2h. Se prepararon los extractos crudos, se inmunoprecipitó la ZmS6K y se analizó su actividad *in vitro*, utilizando como sustrato el péptido RSK (Figura 12 A). Por otro lado, los extractos crudos se resolvieron en una electroforesis en 2-D y se analizaron por Western blot, utilizando el anticuerpo anti-p70<sup>S6K</sup> (Figura 12 B). Como controles de los ensayos de actividad se utilizó la mezcla de reacción sin enzima (Figura 12 A, -E) y la mezcla de reacción sin sustrato con la finalidad de determinar si la enzima es capaz de autofosforilarse (Figura 12 A, A-P). Los resultados de este experimento demuestran que la rapamicina tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad endógena de la ZmS6K (Figura 12 A). Este efecto sobre la actividad coincide con el efecto inhibitorio sobre la fosforilación de la ZmS6K, puesto que la movilidad electroforética y la intensidad de las manchas vistas en el análisis por Western blot de los extractos de semillas

de 48 h (Figura 12 B, panel superior), disminuye con el tratamiento con rapamicina (Figura 12 B, panel inferior).



**Figura 11. Efecto de rapamicina sobre la activación de la ZmS6K inducida por insulina.** A) Autorradiografía de la ZmS6K de extractos de ejes embrionarios estimulados con agua (C), Insulina 200  $\mu\text{U}/\text{mL}$  en ausencia (I) y en presencia de rapamicina 100 nM (I+R). La ZmS6K fue inmunoprecipitada y separada por SDS-PAGE (Panel superior). Western blot de los extractos crudos utilizando el anticuerpo anti-p70<sup>S6K</sup> (panel inferior). B) Autorradiografía de las proteínas ribosomales extraídas de un “set” de ejes embrionarios tratados como en A) analizada por SDS-PAGE (panel superior). Western blot de las proteínas ribosomales utilizando el anticuerpo anti-rpS6 (panel inferior).

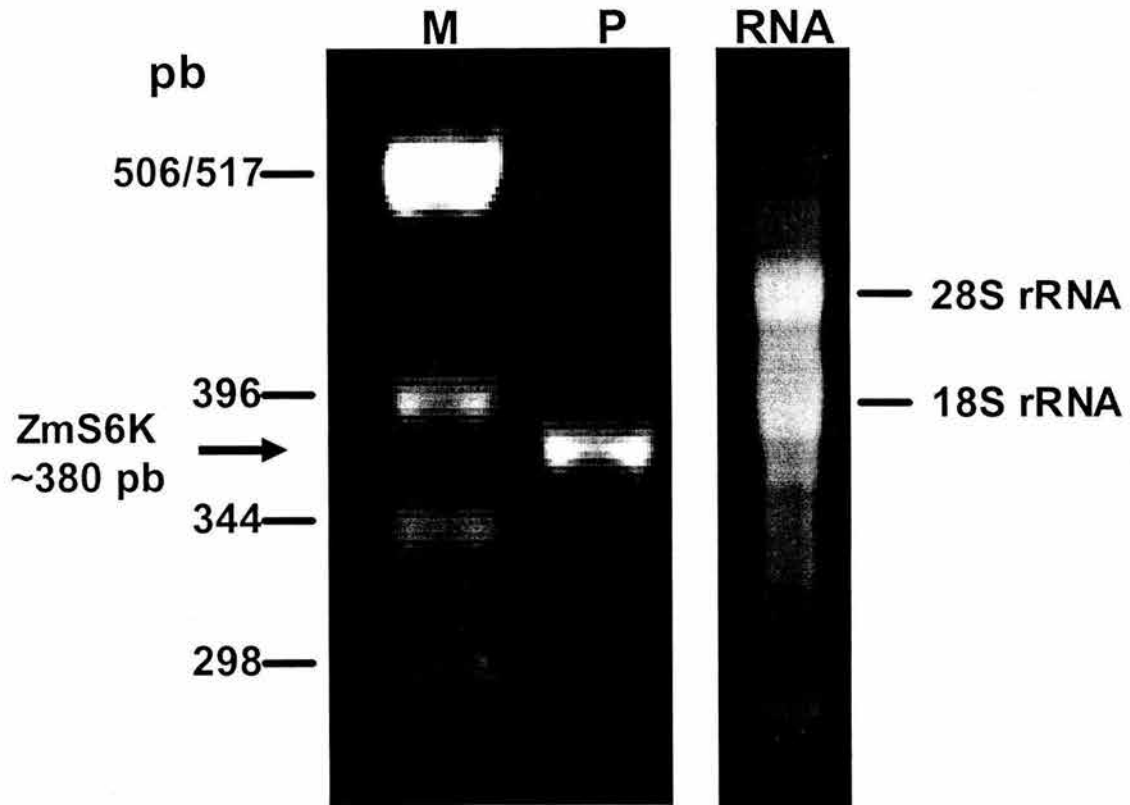




**Figura 12. Efecto de la rapamicina sobre la activación endógena de la ZmS6K. A)** Ensayo de actividad de la ZmS6K inmunoprecipitada de ejes embrionarios de maíz extraídos de semillas de 46 h de germinación y tratados sin (Zm) y con rapamicina 100 nM (Zm+R). Como control de la reacción se utilizó una mezcla de reacción sin enzima (-E) y una mezcla de reacción sin sustrato (A-P) y como sustrato el péptido RSK. Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar de las cpm incorporadas en el péptido RSK de tres experimentos independientes. **B)** Western blot de los extractos crudos de los ejes embrionarios de A) resueltos por electroforesis en 2-D, utilizando el anticuerpo anti p70<sup>S6K</sup>.

**Aislamiento del gen de la ZmS6K de ejes embrionarios de maíz.** Con los oligonucleótidos diseñados con las secuencias conservadas de las S6Ks, homólogos de la p70<sup>S6K</sup>, de *Arabidopsis thaliana*, de sorgo y de avena, se logró amplificar por RT-PCR (ver métodos), un fragmento de ~380 pb, utilizando como templado RNA poly A<sup>+</sup> de ejes embrionarios de maíz, obtenidos de semillas germinadas durante 24 h (figura 13). La secuenciación de éste fragmento de cDNA, resultó en un fragmento de 330 pb que tiene un 98 % de identidad con los posibles genes ortólogos de sorgo, 79% con el gen de avena y 74% con el gen de *Arabidopsis* (Figura 14). Además, un análisis de las secuencias deducidas de aminoácidos de los diferentes genes, logró demostrar que el fragmento de maíz tiene un 94% de identidad con la proteína de sorgo, un 78% con la de avena y un 71% con la de *Arabidopsis* (Figura 15). Los resultados anteriores sugieren fuertemente que el fragmento de 330 pb, corresponde al ortólogo de la p70<sup>S6K</sup> de maíz (ZmS6K), por lo que se procedió a obtener la secuencia completa del gen. Para esto se diseñaron oligonucleótidos específicos de la secuencia del fragmento de 330 pb y se utilizó una biblioteca de cDNA de “ear”, granos de elote, tejido de embriogénesis temprana de maíz, amablemente proporcionada por la Dra. Sara Hake (Universidad de California, Berkeley), de acuerdo al diagrama de la figura 16. Utilizando la técnica de PCR, los oligonucleótidos diseñados con la secuencia de 330 pb, oligonucleótidos diseñados con los brazos del vector (T3 y T7) y como templado la biblioteca de cDNA, se logró obtener los fragmentos correspondientes a los extremos 5' y 3' del gen de la ZmS6K. Con la secuencia obtenida de estos fragmentos se diseñaron oligonucleótidos correspondientes al extremo 3' del gen, cerca de la cola de poli A, y del extremo 5'. Con estos oligonucleótidos, y utilizando como templado RNA poly A<sup>+</sup> de ejes de 24 h, por la técnica de RT-PCR se logró obtener un fragmento de 1632 pb (Figura 17). El codón de inicio y parte del extremo 5' no traducible (5'UTR) se obtuvieron por RT-PCR utilizando un oligonucleótido (5'-caggaaaagcactggcatccagcat-3') diseñado de las regiones conservadas de los extremos 5'UTR de los genes putativos de sorgo y *Arabidopsis* y usando como templado RNA poly A<sup>+</sup> de ejes embrionarios. En resumen, se logró aislar un fragmento de 1861 pb que comprende la región codificante de la ZmS6K. La secuencia deducida de este gen codifica una proteína de 488 aminoácidos con una masa molecular teórica de 54.1 kDa y

un punto Isoeléctrico de 6.19. Este gen se publicó en la base de datos del NCBI (ver anexos) con número de acceso AY389497.



**Figura 13. Fragmento del gen de la ZmS6K.** Producto de PCR (P) producido por la técnica de RT-PCR, utilizando oligonucleótidos diseñados por alineamiento de las S6Ks putativas de plantas y de mamíferos, y utilizando como templado RNA poly A<sup>+</sup> de ejes embrionarios obtenidos de semillas germinadas por 24 h. Marcadores de peso molecular (M) en pares de bases (pb). RNA representa una electroforesis del RNA total de ejes embrionarios de 24 h de germinación, utilizado para la extracción del RNA poly A<sup>+</sup>.

ZmS6K	-----	
Sorgo S6k 94%	CATAGGGATCTCAAGCCC GAAAACATCCTTCTGGATGCTGATGGCCATGCCATGCTCACA	468
Avena s6k 78%	CATAGA GATCTGAAGCCTGAGAACATCTTACTGGATGCTCGTGGCCATGCTATGCTGACC	873
ATPK 6 73%	CACAGA GATCTGAAA CCCGAAAACATACTCATGGATACA GATGGCCACGTGATGCTAACA	822
ATPK 19	CATAGA GATCTTAAA CCTGAAAACATACTCATGGACGTAGATGGCCATGTGATGTTAACT	840
ZmS6K	-----ACCAGA -CAAAC TCAATGTGTGGCAC	26
Sorgo S6k	GACTTTGGCCTT GCGAAGGAA TTCTGTGAAAATACCAGATCAAAC TCGATGTGT -GGCAC	527
Avena s6k	GATTTTGGCCTGCGCAAAGGAGTTCGATGAGAACACTAGA TCAAAT TCAATGTGC -GGCAC	932
ATPK 6	GATTTTGGT TTA GCAAAGGAA TTTGAA GAAAACACA AGATCAAAC TCCATGTGC -GGAAC	881
ATPK 19	GATTTTGGT TTA GCAAAA GAA TTTGAA GAAAACACA AGA TCAAAC TCCATGTGT -GGGAC	899
	****	
ZmS6K	TCTCGAGTACATGGCCCGGAAATGTCTTGGCCGGGGCATGATAAGGCTGCTGACTG	86
Sorgo S6k	TCTCGAGTACATGGCCCGGAAATGTCTTGGCCGGGGCATGATAAGGCTGCTGACTG	587
Avena s6k	CGTGGAGTATATGGCCCGAGAAATGTTCAGGGCCGTGGTCA TGA TAA GGC TGCAGA CTG	992
ATPK 6	TACGGAGTATATGGCACC TGAATGT TCGAGGAAA AGGACA TGA TAA AGC AGC TGA CTG	941
ATPK 19	TACGGAGTATATGGCCCGTGA GATGT TCGTGGAAA AGGACA TGA TAA GGC TGC CGA CTG	959
	*****	
ZmS6K	GTGGAGCGTGGGAATCCTGCTGTTTGA AATGCTTACAGGCAA GCCCCCATTGTGGG--	144
Sorgo S6k	GTGGAGCGTGGGAATCCTGCTGTTTGA AATGCTTACAGGCAA GCCCCCATTGTGGG--	645
Avena s6k	GTGGAGTGTGGGATCCTTCTTTT CGAAATGCTTACGGCAA GCCCCTATT TTTTGGTGG	1052
ATPK 6	GTGGAGCGTAGGGATCTTCTGTATGA GATGCTCACAGGAAA GCCACC GTT TCTCGGG--	999
ATPK 19	GTGGAGTGTAGGAATCCTTCTGTATGA GATGCTCAC TGGAAA GCCGCC GTT TCTCGGG--	1017
	*****	
ZmS6K	-AATAGGAGAAAGTTCAGCA GAA GAT TATAAAAAGACAAACTGAA GCTTCC TTCATT TCT	203
Sorgo S6k	-AATAGGAGAAAGTTCAGCA GAA GAT TATAAAAAGACAAACTGAA GCTTCC TTCATT TCT	704
Avena s6k	TAA CAGGAGCAA AATTCAGCA GAA GATAGT GAGGGA GAA GAT GAA GCTTCC GTCGTA TTT	1112
ATPK 6	-AGCAAAGGAAA GATACA GCA GAA AATGTGAA GGA CAA GATCAA GCTTCC GCA GTT TCT	1058
ATPK 19	-AGCAAAGGAAA GATACA GCA GAA AATCGT TAA GGA CAA GATCAA GCTTCC ACA GTT TGT	1076
	* * * * *	
ZmS6K	GTC TAGTGAAGCTCA TTC CCT CCTGAGAGG CCTGCTACA CAA GGA ACCCAA CAA GCGGCT	263
Sorgo S6k	GTC TAGTGAAGCTCA TTC CCT CCTGAGAGG CCTGCTACA CAA GGA ACCCAA CAA GCGGCT	764
Avena s6k	GTC TAGTGAAGTCA TTC TTTGCTTAAAGGCTACTGCA CAAAGAAGCTGGTAA GCGACT	1172
ATPK 6	GTC TAA TGAAGCTCA TGC AATACTGAA AGGCTGCTGCA AAAAGA GCCAGAAAGGCGACT	1118
ATPK 19	GTT TAA TGAAGCTCA TGC CTTGCTGAA AGGCTGCTGCA AAAAGA GCCAGAAAGGAGACT	1136
	** * * * *	
ZmS6K	GGG CAGCTGCCCGGAGG CAGCAA CGA GATAAAAA CCA CAA GTG GTTCAA GCCAATCAA	323
Sorgo S6k	GGG CAGCTGCCCGGAGG CAGCAA CGA GATAAAAA CCA CAA GTG GTTCAA GCCAATCAA	824
Avena s6k	GGGAAGCGTCTGGGCGG CAGCGA TGA AATAAA GAA CCA CAA GTG GTTCAA AGCAGTAAA	1232
ATPK 6	TGGAAGTGGACTGAGCGGAGCAGA GGA GATAAAAACA CCAATG GTTCAA GGAATAAA	1178
ATPK 19	GGGAAGTGGACC GAGCGGAGCAGA GGA GATAAAAACA CCAATG GTTCAA GGC GATAAA	1196
	** * * * *	
ZmS6K	CTGGAAA-----	330
Sorgo S6k	CTGGAGGAA GCTGGA GGC CCGGCA GATCCA GCCGAGCTTTCGGCC GAA CGT CGC CGGGCT	884
Avena s6k	CTGGAA GAGACTCGA GGC TCGACA GATCCA GCCAAGCTTCTGCCC GAA TGT TGC CGGGCA	1292
ATPK 6	CTGGAA GAA GCTGGA GGC TAGAGAAGT GATGCCAAG TTTCAA GCCGGAAGTATC GGAAG	1238
ATPK 19	CTGGAA GAA GCTGGA GGC TAGAGAAGTACA ACCAAG TTTCAA GCCGCGG GTTTC GGAAG	1256
	*****	
ZmS6K	-----	
Sorgo S6k	TACTGTATCGC CAA CTTGCA CGA GTGCTGGACGAA GACGCCCGT GCTGGA CTC TCCGGT	944
Avena s6k	GACCTGCAT TGC AAA CTTTGA CGA GTGCTGGACGAGTATGCCGGT GCTGGA CTC TCCAGT	1352
ATPK 6	GCAATGCATAGCAAA TTTTGA CAA GTGTTGGACTGACATGCTGT TTTGGA TTC TCCGGC	1298
ATPK 19	ACAATGCATAGCTAA TTTTGA CAA GTGTTGGACTGACATGCTGT TTTGGA TTC TCCAGC	1316

Figura 14. Alineamiento del fragmento del gen de la ZmS6K. Alineamiento de la secuencia obtenida del fragmento de 330 pb con las secuencias de nucleótidos de los genes putativos correspondientes a las S6Ks de plantas. Los asteriscos indican los nucleótidos idénticos en todas las secuencias.

<u>ZmS6K</u>		-----
Sorgo s6k	94%	-----
Avena s6k	78%	MVSEI PSVTTTHTHGPKLFRGMILLPKGPDVILPENVEFDNDVFGPVAVHTPTEASI 60
ATPK6	71%	MVSSQRVPVKNK-----IQKQQYLSISP SNSVLKDDVELEFSDVFGPLP----- 43
ATPK19		MVSSQCSVANKNQTG--KPFQKHL SLSISP PKSVLGDNLELQFSDVFGPMPPE----- 50
<u>ZmS6K</u>		-----
Sorgo s6k		-----
Avena s6k		VTPDSPAPLAESGEEVYNDPVVITKRS HSLVGP TLLVSQSLP LSKLTLHESSESSDLLEC 120
ATPK6		-----EEANDIAYDEPAVVYSRS HSLVGP CSLDSHSLKLTCLTLETEDSIDLVEC 94
ATPK19		-----ANS EEA CDVAYDEPAVVYSRS HSLVGP SLVVSHSLKMNKLTLETEDSIDLVEC 104
<u>ZmS6K</u>		-----
Sorgo s6k		-----MT EDEGIGLDDLQI LKLVGQGAF GKVFQVRKK 32
Avena s6k		LSKEKQSNQ EALSDEELSN-----TK ENEAVGLDNFEV LKLVGQGAF GKVVQVRMK 171
ATPK6		LEGESLKENDDFSGNDDSDNEKALEGDLVKVSGVVGIDD FEVMKVVGK GAF GKVVQVRKK 154
ATPK19		VEGESIKENDEFSGNDDT DSEKSP E-----EVSGVVGIED FEVLKVVQGAF GKVVQVRKK 160
<u>ZmS6K</u>		-----
Sorgo s6k		NTSEIYAMKVMRKDR ILEKNHSEYMKAERE ILT KVDHPFIVQLRYAFQTKYRLYLVLDFI 92
Avena s6k		GTS EYIYAMKVMRKDK ILEKNHAEYMKAERD ILT KVDHPFVVQLRY SFQTKYRLYLVLDFV 231
ATPK6		ETS EYIYAMKVMRKDH IMEKNHAEYMKAERD ILT KIDHPFIVQLKY SFQTKYRLYLVLDFI 214
ATPK19		DTS EYIYAMKVMRKDK IVEKNHAEYMKAERD ILT KIDHPFIVQLKY SFQTKYRLYLVLDFI 220
<u>ZmS6K</u>		-----
Sorgo s6k		NGGHLF FQLYKQGLF -RELAR IYTA EI VSAVAHLHANGIMHRDLK PEN ILLDADGHAMLT 151
Avena s6k		NGGHLF FQLYQQGLF REELAR IYTA EI VSAVAHLHANGIMHRDLK PEN ILLDARGHAMLT 291
ATPK6		NGGHLF FQLYHQGLF REDLARVYTA EI VSAVSHLHEKGI MHRDLK PEN ILMDDTGHVMLT 274
ATPK19		NGGHLF FQLYHQGLF REDLARVYTA EI VSVVSHLHEKGI MHRDLK PEN ILMDDVGHVMLT 280
<u>ZmS6K</u>		-----
Sorgo s6k		-----TRSTSCVGTLEYMAPEIVLGRGHDKAADWWSVGI LLLFEMLTGKPPFVG- 48
Avena s6k		DFGLAK EFCENTRSNSMC GTLEYMAPEIVLGRGHDKAADWWSVGI LLLFEMLTGKPPFVG- 210
ATPK6		DFGLAK EFCENTRSNSMC GTV EYMAPEIVQGRGHDKAADWWSVGI LLLFEMLTGKPPFVG- 351
ATPK19		DFGLAK EFCENTRSNSMC GTT EYMAPEIVRGKGHDKAADWWSVGI LLLYEMLTGKPPFLG- 333
		DFGLAK EFCENTRSNSMC GTT EYMAPEIVR GKGHDKAADWWSVGI LLYEMLTGKPPFLG- 339
		***. *. ** ***** *.*****.*****. *
<u>ZmS6K</u>		-----
Sorgo s6k		NREKVQQKI IKDKLKLPS FLS SEAHSLLRGLLHKEPNKRLGSCPGGSNEIKNHKWFKPIN 108
Avena s6k		NREKVQQKI IKDKLKLPS FLS SEVHSLLRGLLHKEPNKRLGSCPGGSNEIKNHKWFKPIN 270
ATPK6		NRDKIQQKI VREKMKLPS YLS SEVHSLLRGLLHKEAGKRLGSGLGGSEIKNHKWFKA VN 411
ATPK19		SKGKIQQKI VKDKIKLPQFLSNEAHAILKGLLQKEPERRLGSGLSGAEI KQHWFKGIN 393
		SKGKIQQKI VKDKIKLPQFVFN EAHAILKGLLQKEPERRLGSGPSGAEI KKHWFKA IN 399
		.: *:
<u>ZmS6K</u>		-----
Sorgo s6k		WK----- 110
Avena s6k		WRKLEARQIQPSFRPNVAGLT CIANLH ECWTKT PVL DSPVSTPAGGAQQ--LRGVHLRQA 328
ATPK6		WKRLEARQIQPSFCPNVAGQT CIANFDECWTSMPVLDSPVAS PVAADSN--FVGFYSYVRP 469
ATPK19		WKKLEAREVMPSFKPEVSGRQCIANFDKCWTDMSVLDSPASS PSSDPKANPFTNFTYVRP 453
		WKKLEAREVQPSFKPAVSGRQCIANFDKCWTDMSVLDSPASS PNSDAKANPFTNFTYVRP 459
		*:
<u>ZmS6K</u>		-----
Sorgo s6k		RADP----- 332
Avena s6k		APFFQKPSPLG- 480
ATPK6		PPSFLHQSTTTL 465
ATPK19		PHSFLHRTT SNL 471

Figura 15. Alineamiento del fragmento del gen de la ZmS6K. Alineamiento de la secuencia deducida de aminoácidos del fragmento del gen de la ZmS6K con las secuencias deducidas de aminoácidos de los genes putativos de plantas. La flecha indica la Serina correspondiente a la Treonina 229 de la p70<sup>S6K</sup>. Los asteriscos indican los aminoácidos idénticos. Los puntos indican los aminoácidos conservados.

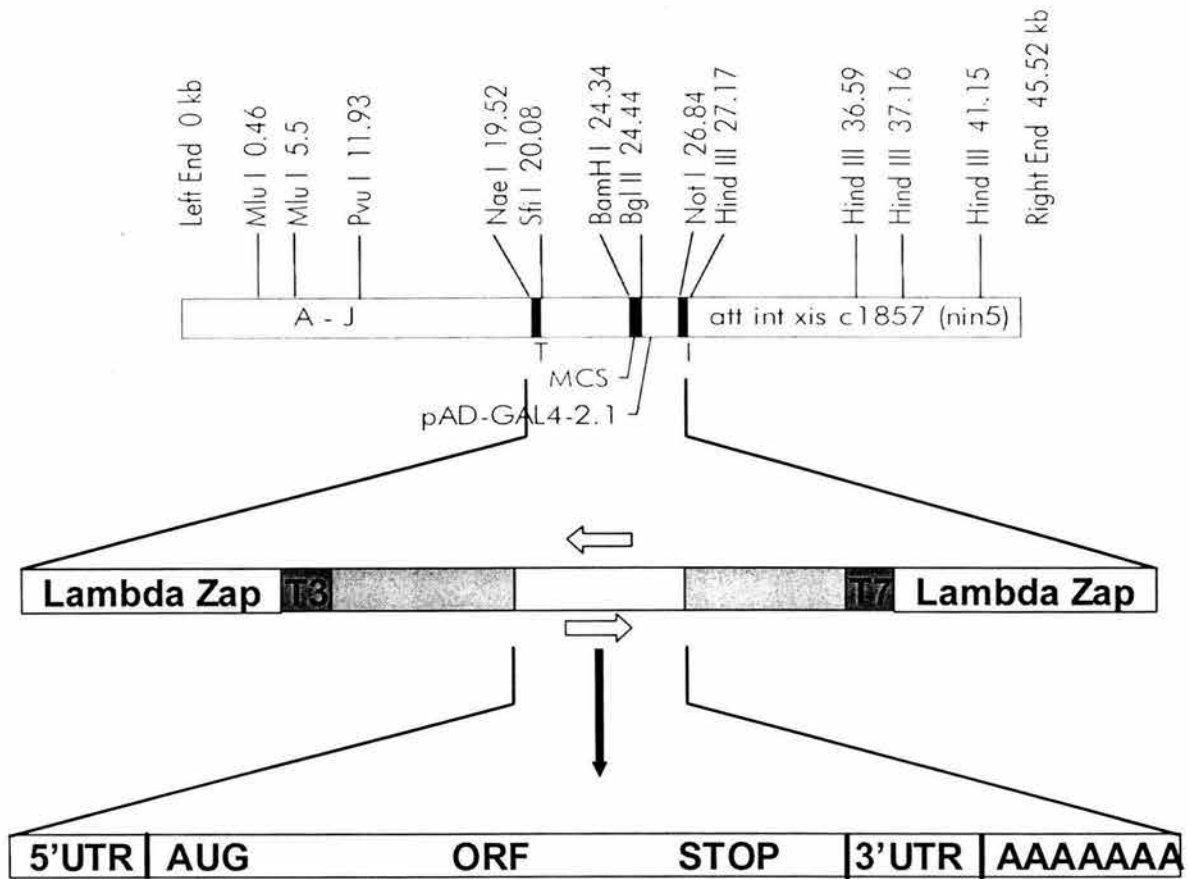
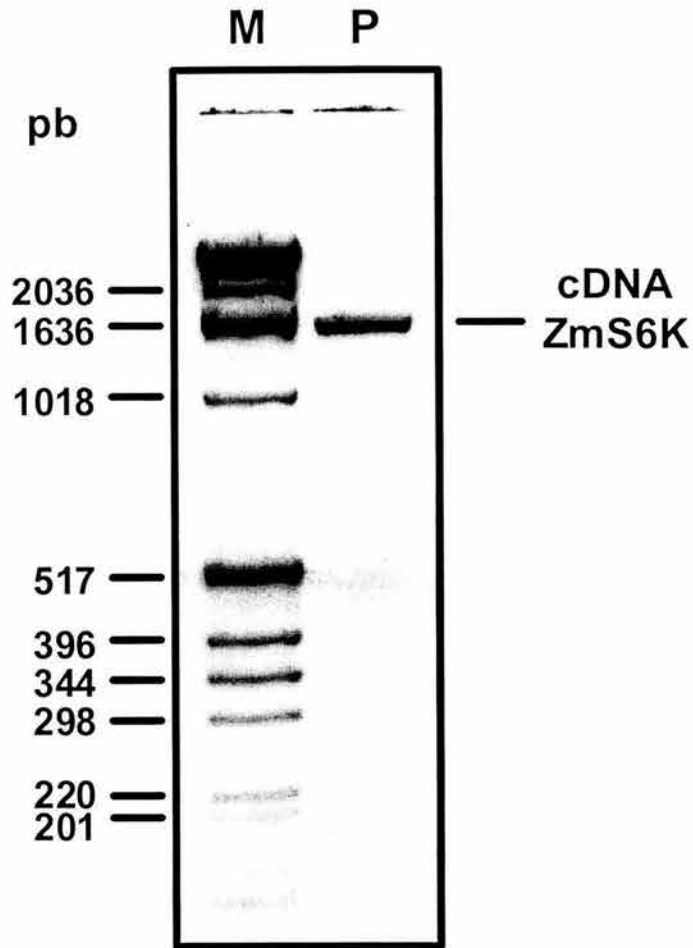


Figura 16. Secuenciación de los extremos 5' y 3' del gen de la ZmS6K. Diagrama representando al gen de la ZmS6K clonado en la biblioteca de cDNA del tejido "ear" (grano de elote de maíz) en el vector Lamba ZAP (Promega)(Panel superior). Las flechas huecas en el diagrama de enmedio representan los oligos diseñados con el fragmento de 330 pb.

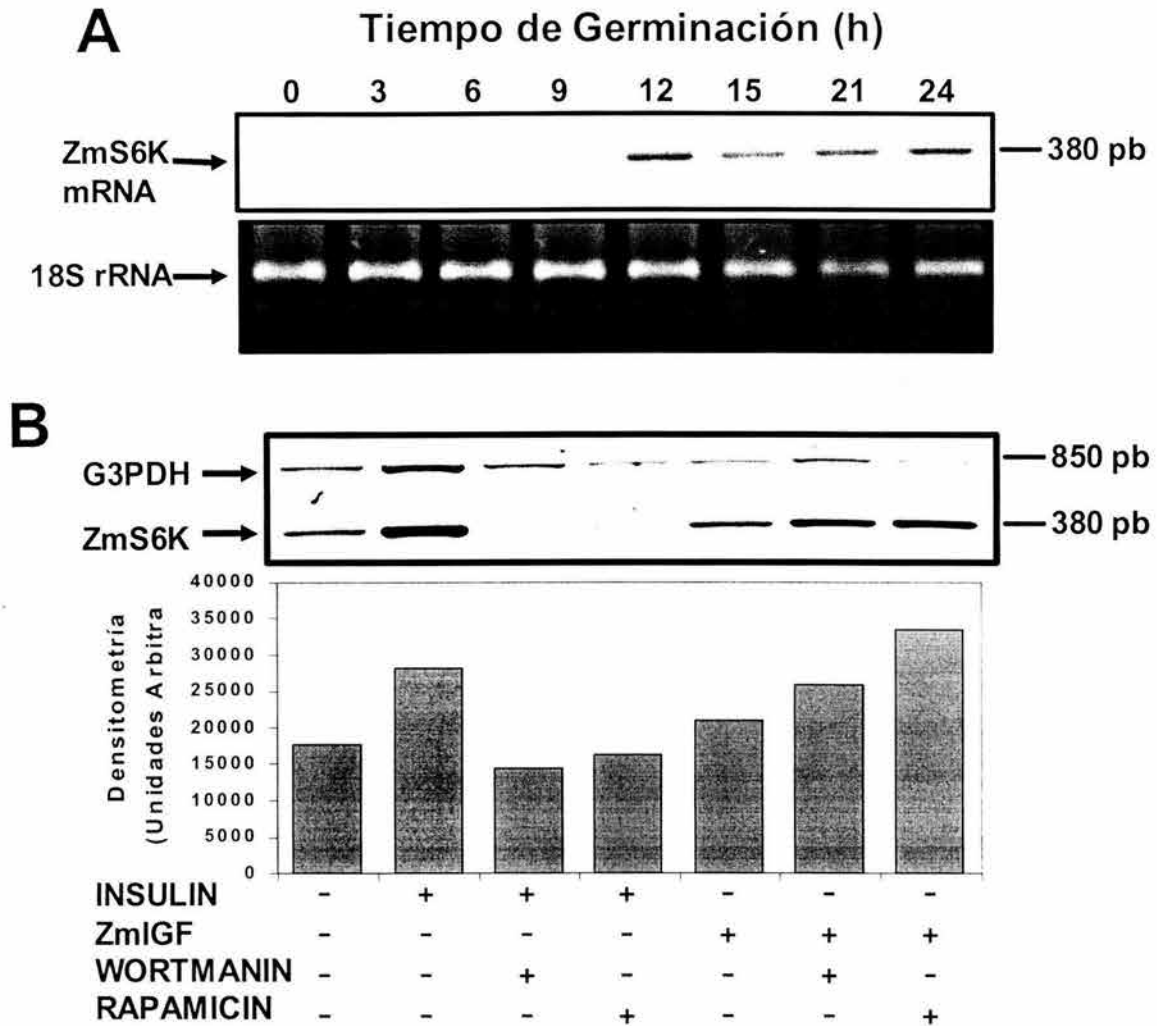


**Figura 17. Secuenciación de los extremos 5' y 3' del gen de la ZmS6K.** Fragmento de PCR (P) obtenido con oligonucleótidos diseñados de los extremos 5' y 3' respectivamente de la ZmS6K clonada en la biblioteca de cDNA. El fragmento se obtuvo por la técnica de RT-PCR, utilizando como templado RNA poli A<sup>+</sup> de ejes de semillas germinadas por 24 h. Estándares de peso molecular en pb (M).

**Efecto de insulina y ZmIGF sobre la expresión del mRNA de la ZmS6K.** Con el fragmento inicial de 330 pb obtenido anteriormente se realizaron los estudios para analizar los patrones de expresión del gen de la S6K de maíz durante la germinación y la regulación de la expresión del gen por los reguladores de crecimiento insulina y ZmIGF y los inhibidores de la ruta de transducción de señales rapamicina y wortmanina (Figura 18). Para este fin se realizó el siguiente experimento. Se extrajeron ejes embrionarios de maíz de semillas quiescentes (0 h) y germinadas durante 3, 6, 9, 12, 15, 21 y 24 h o de semillas

germinadas por 22 h y estimuladas con insulina 200  $\mu\text{U}/\text{mL}$ , insulina 200  $\mu\text{U}/\text{mL}$  más rapamicina 0.1  $\mu\text{M}$ , insulina 200  $\mu\text{U}/\text{mL}$  más wortmanina 1  $\mu\text{M}$ , ZmIGF 200  $\mu\text{U}/\text{mL}$ , ZmIGF + rapamicina o wortmanina en concentraciones idénticas a las anteriores. Se extrajo el RNA total de cada grupo de ejes y se realizaron estudios de expresión mediante la técnica de RT-PCR semicuantitativo. Los resultados obtenidos demuestran que la expresión del gen incrementa conforme se incrementa el tiempo de germinación (Figura 18 A). Con respecto al efecto de los factores de crecimiento e inhibidores, los resultados demuestran que la insulina incrementa la expresión del gen y la rapamicina reduce su expresión (Figura 18 B).





**Figura 18. Análisis de la expresión del gen de la ZmS6K.** A) Se analizó la expresión del gen de la ZmS6K durante la germinación por la técnica de RT-PCR semicuantitativo, utilizando los oligonucleótidos con los que se obtuvo el fragmento de 330 pb y como templado 100 ng de RNA total de ejes embrionarios extraídos de semillas germinadas en los tiempos indicados (panel superior). El rRNA 18 S se utilizó como un control de la cantidad del RNA usado para el ensayo (panel inferior). B) Se analizó la expresión de la ZmS6K por RT-PCR semicuantitativo, utilizando los oligonucleótidos de A) y como templado RNA total de ejes embrionarios de 22 h de germinación estimulados o no con 200  $\mu$ U/mL de insulina por 2 h, en ausencia y presencia de 100 nM de rapamicina (panel superior). G3PDH representa el producto de RT-PCR de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa de maíz, como control de la cantidad de RNA total utilizado. Análisis densitométrico de los productos de PCR (panel inferior) ajustados con el producto de la G3PDH.

## VIII. DISCUSIÓN.

En este trabajo se caracteriza por primera vez, una proteína cinasa de ejes embrionarios de maíz (ZmS6K) que fosforila a la S6rp en la subunidad 40S del ribosoma. Esta proteína es ortóloga de la p70<sup>S6K</sup> de mamíferos, enzima clave en la vía de transducción de señales que regula el crecimiento celular en animales (Schmelzle and Hall, 2000). ZmS6K es una proteína de ~62 kDa con estructura similar a la de la p70<sup>S6K</sup>, como lo demostró su reconocimiento por anticuerpos contra la p70<sup>S6K</sup> de humano (Figura 5). Además, esto lo apoya un fragmento de cDNA de 1861 pares de bases, el cual codifica para un péptido de 488 aminoácidos, de masa molecular y punto isoeléctrico teóricos similares a los de la p70<sup>S6K</sup>, con la firma característica de una cinasa de serinas y treoninas. ZmS6K muestra un 48 % de identidad con la p70<sup>S6K</sup> y un 62 % a los genes potenciales reportados en *Arabidopsis* para S6 cinasa. Es importante resaltar que, la secuencia deducida de aminoácidos del cDNA de maíz, conserva los dos sitios importantes para la regulación de la actividad de la p70<sup>S6K</sup>, los sitios equivalentes a la Treo-389 y a la Treo-229 (Dennis, 1996). Sin embargo, la evidencia más fuerte es la demostración de que ZmS6K posee actividad sobre la proteína ribosomal S6 de la subunidad 40S de ejes embrionarios de maíz (Figura 6 B) a la cual fosforila en forma selectiva, así como a un péptido sintético (péptido RSK) diseñado como sustrato de la p70<sup>S6K</sup> por contener los sitios fosforilables de la S6rp (Law et al., 2000) (Figura 6 C). La afinidad de la ZmS6K por ATP y por el péptido RSK resultó ser semejante a la de la p70<sup>S6K</sup> (Law et al., 2000) (Figura 7).

La cantidad de proteína ZmS6K durante la germinación permanece constante (Figura 8 A), sin embargo es muy importante resaltar que su actividad es nula en el estado quiescente en los ejes de 0 h de germinación y se incrementa considerablemente conforme avanza la germinación, siendo muy activa en los ejes germinados por 48 h (Figura 8 B). Estos datos sugieren un papel importante para esta enzima durante la germinación. Al respecto, la ruta de señalización que involucra la fosforilación de la S6rp correlaciona con el incremento en la síntesis de proteínas ribosomales, indispensable para el crecimiento y proliferación celular en mamíferos (Jefferies et al., 1997; Rhoads, 1999; Thomas 2002). Además, muchos estudios indican que la estimulación mitogénica de células quiescentes induce la activación de la p70<sup>S6K</sup> y consecuentemente la fosforilación de la S6rp. En paralelo, las semillas quiescentes tienen un metabolismo prácticamente nulo, sin embargo, durante la germinación el

crecimiento celular (elongación) es uno de los eventos más evidentes, seguido por la proliferación celular en los tejidos meristemáticos del embrión, los cuales requieren de más ribosomas para crecer. La traducción concomitante de los mensajes 5'TOP bajo esas condiciones de estimulación, ha conducido a que varios autores propongan que la fosforilación de la S6rp, seguida de la activación de la p70<sup>S6K</sup>, incrementa la afinidad de los ribosomas por los mensajes 5'TOP facilitando así su iniciación en la traducción en estos sistemas experimentales (Thomas y Thomas, 1986; Jefferies et al., 1997). Esta hipótesis ha sido respaldada por múltiples evidencias correlativas derivadas de experimentos en hígado de rata en regeneración y la inanición de células en cultivo (Meyuhas, 2000). Estudios en *Drosophila* y ratón han llevado a la conclusión de que la activación de la S6K y la fosforilación de la S6rp son importantes para determinar el tamaño celular, puesto que la inactivación de los genes que codifican para la S6K, induce genotipos característicos: moscas pequeñas (Montagne et al., 1999) y ratones pequeños (Shima et al., 1998) con número de células similares a los animales normales.

La activación total de la p70<sup>S6K</sup> se ha correlacionado con la fosforilación de la enzima hasta en 8 sitios específicos en dominios determinados (Pullen y Thomas, 1997). Particularmente, existen evidencias de que la fosforilación en el residuo de treonina en la posición 389 (Treo-389) induce un cambio conformacional en la proteína que deja accesible a la treonina 229 (Treo-229) en el dominio catalítico, indispensable para la activación completa de la enzima. El grado de fosforilación de la ZmS6K en el residuo equivalente a la Treo-389 de la p70<sup>S6K</sup> se incrementa también durante la germinación (Figura 8 A). Por otro lado, los análisis por Western blot de los extractos de ejes embrionarios resueltos por electroforesis en 2D muestran cambios importantes en la movilidad electroforética de la proteína conforme avanza el periodo de germinación (Figura 9 A). Algunos de estos sitios desaparecen por el tratamiento previo de los extractos con fosfatasa alcalina (Figura 9 A), indicando que algunas de estas modificaciones son por fosforilación (Figura 9 B). Todos estos datos sugieren que existe un incremento en la actividad de los componentes de la cascada de transducción de señales que conducen a la fosforilación de esos residuos y al incremento en la actividad de la ZmS6K y que el mecanismo que regula la actividad de la enzima de maíz es similar a la de mamíferos.

El análisis de la secuencia deducida del gen de la ZmS6K, realizada por el programa ScanProsite (Expassy Molecular Biology Server), indica que la proteína tiene 4 sitios putativos de N-glicosilación y 4 de N-miristilación, lo que podría explicar la presencia de las distintas manchas en los geles bidimensionales, además de las modificaciones por fosforilación (Figura 9 y 12).

Estudios *in vivo* realizados en ejes embrionarios marcados con [<sup>32</sup>P]-ortofosfato, demuestran que la fosforilación de la ZmS6K se incrementa cuando los ejes son estimulados con insulina (Figura 11 A), evento que coincide con el incremento en la fosforilación de la proteína ribosomal S6 (Figura 11 B), sugiriendo que la ZmS6K es la proteína encargada de fosforilar *in vivo* a la S6 en ejes embrionarios de maíz. El incremento en la fosforilación de ambas proteínas es inhibido por el tratamiento de los ejes con rapamicina (Figura 11) así como la activación de la ZmS6K (Figura 12), sugiriendo fuertemente la presencia en maíz de la proteína homóloga a la mTOR, al igual que en *Arabidopsis* (Menand et al., 2002).

La activación de la cascada de señalización que conduce al incremento en la actividad de la p70<sup>S6K</sup> está muy estudiada en mamíferos y la insulina y los IGFs son unos de los compuestos que activan esta cascada (Rhoads, 1999). El tratamiento de ejes embrionarios con insulina (Sánchez de Jiménez et al., 1999), con el ZmIGF (García-Flores et al., 2001) o con auxinas (Beltrán-Peña et al., 2002) ha demostrado inducir un incremento en la fosforilación de la S6rp. En este trabajo se demostró que el tratamiento de ejes embrionarios con todos estos compuestos, como se esperaba, incrementa tanto la fosforilación en el residuo equivalente a la Treo-389, como la actividad de la ZmS6K (Figura 10).

La fosforilación de la proteína ribosomal S6 es uno de los eventos más tempranos detectados en los estímulos mitogénicos. La fosforilación de esta proteína ha atraído la atención porque correlaciona temporalmente con la iniciación de la síntesis de proteínas, y ha sugerido que ribosomas con altas proporciones de S6rp tienen una ventaja selectiva para movilizar los mensajes que codifican las proteínas ribosomales (mensajes 5'TOP) hacia polisomas (Jefferies et al., 1994). Esto hace que se produzca más maquinaria de síntesis de proteínas necesaria para hacer frente a la incrementada demanda de síntesis de proteína durante el crecimiento y la división celulares (Meyuhas et al., 2000). Es importante mencionar que algunos autores han indicado que la transmisión correcta de la señal inducida por mitógenos/IGFs es dependiente de un estado energético positivo de los tejidos blanco, en

los cuales la falta de aminoácidos no permite que la señal sea eficientemente transducida (Tang et al., 2001; Stolovich et al., 2002). Por otro lado, existe evidencia de que el grado de fosforilación de la S6rp en plantas puede ser regulado durante respuestas a estrés ambiental y durante el desarrollo. El estrés por calor indujo una disminución en la fosforilación de una proteína de 30 kDa de ribosomas de células en cultivo de tomate (Scharf y Nover, 1982) en *Arabidopsis* (Turk et al., 1998) y en ejes embrionarios de maíz (Beltrán-Peña et al., 2002). La privación de oxígeno indujo también una disminución en la fosforilación de la S6rp de raíces de maíz (Bailey-Serres y Freeling, 1990; Williams et al., 2003). Por el contrario, incrementos en la fosforilación de la S6rp se ha visto en cotiledones de calabaza estimulados con 6-bencilaminopurina (Yakovleva y Kulaeva, 1987) y en ejes embrionarios de maíz estimulados con auxinas (Pérez et al., 1990; Beltrán-Peña et al., 2002) o con insulina (Sánchez de Jiménez et al., 1999; García-Flores et al., 2001). La regulación de la traducción de los mensajes que codifican para proteínas relacionadas con el aparato traduccional en correlación con la fosforilación de la S6rp también se ha estudiado en plantas (Turck et al., 2004; Reyes de la Cruz et al., 2004). En *Arabidopsis* se demostró el incremento en la movilización de los mensajes de la S6rp y de la S18Arp hacia polisomas en correlación con el incremento en la actividad de la S6K y la fosforilación de la S6rp (Turck et al., 2004). Por otro lado, en ejes embrionarios de maíz se observó lo mismo con el mensaje de la S6rp y el mensaje del factor del inicio de la traducción eIFiso4E (Reyes de la Cruz et al., 2004) indicando que plantas y animales comparten el efecto que tiene la ruta de señalización que modula la fosforilación de la S6rp sobre la traducción.

Los datos presentados en este trabajo en relación a la regulación de la ZmS6K por rapamicina, el reciente descubrimiento de la proteína TOR en *Arabidopsis* y las observaciones anteriores expuestas, sugieren fuertemente que en plantas existe también una ruta de señalización regulada por factores de crecimiento, similar a la ruta de señalización de mamíferos que regula el crecimiento y en la cual ZmS6K tiene un papel predominante. Aunque en términos generales estas vías tienen un papel semejante en plantas y mamíferos, también existen diferencias que plantean diferentes opciones para las plantas. Esto es así que en contraste con los sistemas de mamíferos, los transcritos de las proteínas ribosomales de plantas, generalmente no inician con el tracto de polipirimidinas (Turck et al., 2004; Williams et al., 2003). Tal es el caso de la proteína S28A, las dos copias de la proteína S6 de

*Arabidopsis* (Turck et al., 2004), y las dos copias de la S6 de maíz, aunque al menos estas últimas poseen trectos de polipirimidinas dentro de la región 5'UTR (Williams et al., 2003) sin empezar en la base +1 como en los mensajes de mamíferos (Meyuhas et al., 2000). Esta situación es similar al modelo de *D. melanogaster*, donde los transcritos de las proteínas ribosomales del insecto son susceptibles del control traduccional aún cuando muchas de ellas no poseen la secuencia 5'TOP (Meyuhas et al., 1996). Sería interesante entonces, el profundizar en los mecanismos directamente involucrados en la traducción de los mensajeros de las proteínas ribosomales en plantas, dilucidando los elementos *cis* y *trans* involucrados en esa regulación y en los componentes del aparato traduccional susceptibles a modulación por las cascadas de transducción de señales desencadenadas durante los eventos de demanda de síntesis de proteínas, como el crecimiento y proliferación celular. También es importante dilucidar otros componentes de esta ruta de señalización en la que podrían participar otros posibles efectores involucrados en la regulación de la expresión genética y en el ciclo celular de las células vegetales.

## IX. CONCLUSIONES.

Los datos obtenidos con este trabajo permitieron llegar a las siguientes conclusiones:

1. Se identificó y purificó la ZmS6K de ejes embrionarios de maíz, ortóloga de la p70<sup>S6K</sup> de mamíferos. Se determinó su actividad de cinasa, la cual resultó ser específica sobre la proteína ribosomal S6 en la subunidad 40S.
2. ZmS6K es activada por fosforilación en el residuo equivalente a la Treo-389 de la p70<sup>S6K</sup>.
3. La actividad y la fosforilación de la ZmS6K se incrementan conforme avanza el periodo de germinación, sugiriendo un papel clave durante este proceso.
4. Además de la fosforilación, la ZmS6K está sujeta a otros cambios postraduccionales (glicosilaciones y miristilaciones), sin cambiar prácticamente la cantidad de la proteína durante la germinación.
5. Insulina y ZmIGF regulan la expresión del mRNA de la ZmS6K e inducen su actividad y su fosforilación.
6. La activación y fosforilación de la ZmS6K son sensibles a rapamicina lo que implica que una proteína ortóloga de la mTOR está presente en maíz.
7. Los ejes embrionarios de maíz expresan por lo menos un gen completo de la ZmS6K con alto grado de identidad al de la p70<sup>S6K</sup> de mamíferos.

## X. PERSPECTIVAS.

Aunque no es nuevo el descubrir que muchos de los mecanismos del metabolismo basal y de los mecanismos que regulan el crecimiento y proliferación de las células eucarióticas se han conservado a lo largo de la evolución en las diversas especies, sí es novedoso el descubrir que cada especie las ha acoplado en forma diferente para su sobrevivencia. También es novedoso el dilucidar, que por la dirección antropocéntrica que se le ha dado a la investigación, algunos mecanismos que se creían exclusivos de células animales, operan también en plantas. En el caso de la ruta de transducción de señales en cuestión, es necesario hacer notar que en mamíferos, los dos sustratos mejor caracterizados de la mTOR son la 4EBP y la p70<sup>S6K</sup>. De esta forma, por un lado mTOR regula la traducción CAP dependiente y por otro lado la traducción de los mensajes del aparato traduccional.

Es importante destacar también que, aunque ya se ha reportado la presencia de la proteína TOR en *Arabidopsis*, hasta la fecha no se han reportado proteínas homólogas a la 4EBP. Además, las plantas poseen dos isoformas del factor eIF4E, por lo que la regulación a nivel traduccional sería diferente. Por otro lado, hasta la fecha no se ha reportado en plantas la presencia de una cinasa semejante a la PI3K, una de las enzimas iniciadoras de la cascada de traducción de señales dependiente de factores de crecimiento, además de que se desconocen tanto el receptor como el primer sustrato que recibe la señal después del receptor.

Por lo anterior, sería importante profundizar en el conocimiento en maíz, acerca de la presencia y el papel de la proteína TOR, de otros componentes importantes en la ruta de señalización, de otras rutas que pudieran hacer “cross talk” con esta y de los posibles efectores de esas rutas para profundizar en el conocimiento acerca de como las células vegetales pueden acoplar los estímulos externos, a los que son más sensibles que las animales, a las modificaciones que sufre el aparato traduccional para regular la expresión genética a este nivel durante los periodos en que se llevan a cabo los procesos de crecimiento, proliferación y diferenciación celular.



## XI. REFERENCIAS.

Alessi, D.R., James, S.R., Downes, C.P., Holmes, A.B., Gaffney, P.R.J., Reese, C.B., and Cohen, P. (1997) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B  $\alpha$ , *Curr. Biol.* 7, 261-269.

Alessi, D.R., Kozlowski, M.T., Weng, Q.P., Morrice, N., and Avruch, J. (1998) 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphorylates and activates the p70 S6 kinase *in vivo* and *in vitro*, *Curr Biol* 8, 69-81.

Bailey-Serres, J. (1999) Selective translation of cytoplasmic mRNAs in plants, *Trends in Plant Sci.* 4, 142-148.

Bailey-Serres, J., and Freeling, M. (1990) Hypoxic stress-induced changes in ribosomes of maize seedling roots, *Plant. Physiol.* 94, 1237-1243.

Baiza, A.M., Vázquez-Ramos, J., and Sánchez de Jiménez, E. (1989) DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissue during germination, *J. Plant Physiol.* 135, 426-421.

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

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

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

Beltrán-Peña, E., Ortiz-López, A., and Sánchez de Jiménez, E. (1995) Synthesis of ribosomal proteins from stored mRNAs early in seed germination. *Plant Mol. Biol.* 28, 327-336.

Bewley, J. D. and Black, M. (1994) Physiology of development and germination. In *Seeds*. Bewley JD, Black M, eds. Second Edition, Plenum Press, New York and London, pp 147-148.

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

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

Blume-Jensen, P., Hunter, T. (2001) Oncogenic kinase signaling, *Nature* 411, 355-365.

Böhni, R., Riesgo-Escovar, J., Oldham, S., Brogiolo, W., Stocker, H., Andrus, B.F., Beckingham, K., and Hafen, E. (1999) Autonomous control of cell and organ size by CHICO, a *Drosophila* homolog of vertebrate IRS1-4, *Cell* 97, 865–875.

Bonnal, S., Boutonnet, C., Prado-Lourencio, L., and Vagner, S. (2003) IRESdb: The internal ribosome entry site database, *Nucleic Acids Res.* 31, 427-428.

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

Bougnet, A., Tee, A.R., Taylor, P.M., and Proud, C.G. (2003) Regulation of targets of mTOR (mammalian target of rapamycin) signaling by intracellular amino acid availability, *Biochem. J.* 32, 555-566.

Bradford, K.J. (1995) Water relations in seed germination. In *Seed development and germination*. Kigel J and Gallie G eds. Marcel Dekker, New York, pp 351-396.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Braun, D.M., and Walker, J.C. (1996) Plant transmembrane receptors: new pieces in the signaling puzzle. *Trends Biochem. Sci.* 21, 70–73.

Brennan, P., Babbage, J.W., Thomas, G., and Cantrell, D. (1999) p70(s6k) integrates phosphatidylinositol 3-kinase and rapamycin-regulated signals for E2F regulation in T lymphocytes, *Mol. Cell. Biol.* 19, 4729-4738.

Brown, E.J., Albers, M.W., Shin, T.B., Ichikawa, K., Keith, C.T., Lane, W.S., and Schreiber, S.L. (1994). A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex, *Nature* 369, 756-758.

Browne, G.J., Proud, C.G. (2002) Regulation of peptide-chain elongation in mammalian cells, *Eur. J. Biochem.* 269, 5360-5368.

Browning, K.S. (1996) The plant translation apparatus, *Plant Mol. Biol.* 32, 107-144.

Browning, K.S., Goss, D.J., Roth, D.A., and Gallie, D.R. (1998) The translational machinery of plants. In *A look beyond transcription: mechanisms determining mRNA stability and translation in plants*. Bailey-Serres J, Gallie DR, eds. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, pp 68-87.

Browning, K.S., Humphreys, J., Hobbs, W., Smith, G.B., and Ravel, J.M. (1990) Determination of the amount of protein synthesis initiation and elongation factors in wheat germ, *J. Biol. Chem.* 265, 17967-17973.

Browning, K.S., Webster, C., Roberts, J.K.M., and Ravel, J.M. (1992) Identification of an isozyme form of protein synthesis initiation factor 4F in plants, *J. Biol. Chem.* 267, 10096-10100.

Burnett, P.E., Barrow, R.K., Cohen, N., Zinder, S.H., and Sabatini, D.M. (1998) RAFT1 Phosphorylation of the Translational Regulators p70 S6 Kinase and 4E-BP1, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 1432-1437.

Butler, A.A., Blakesley, V.A., Poulakis, V., Tsokos, M., Wood, T.L., LeRoit, D., and Poulakis, V. (1998) Stimulation of tumor growth by recombinant human insulin growth factor I (IGF-I) is dependent on the dose and the level of IGF-I receptor expression, *Cancer Res.* 58, 3021-3027.

Chiu, M.I., Katz, H., and Berlin, V. (1994). RAPT1, a mammalian homolog of yeast Tor, interacts with the FKBP12/rapamycin complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 12574-12578.

Choi, K., Kim, J.H., Li, X., Paek, K.Y., Ha, S.H., Ryu, S.H., Wimmer, E., and Jang, S.K. (2004) Identification of cellular proteins enhancing activities of internal ribosomal entry sites by competition with oligodeoxynucleotides, *Nucleic Acids Res.* 32, 1308-1317.

Clemens, M.J., and Bommer, U.-A. (1999) Translational control: the cancer connection, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31, 1-23.

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

Cross, D.A.E., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovic, M., and Hemmings, B.A. (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B, *Nature* 378, 785-789.

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

Dennis, P.B., Pullen, N., Kozma, S.C., and Thomas, G. (1996) The principal rapamycin-sensitive p70S6K phosphorylation sites, T-229 and T-389, are differentially regulated by rapamycin-insensitive kinase kinases, *Moll. Cell. Biol.* 16, 6242-6251.

Dinkova, T. D., Aguilar, R., and Sanchez de Jiménez, E. (2002) Translational control by differential CAP-dependency in selected subpopulation of maize-stored mRNAs. In *The Biology of Seeds: Recent Research Advances*. Nicolas G., Bradford K J, Come D., Pritchard HW, eds. CAB International, UK, pp 181-189.

Dinkova, T.D., Aguilar, R., and Sánchez de Jiménez, E. (2000) Expression of Maize initiation factor eIFiso4E is regulated at translation level, *Biochem. J.* 351, 325-331.

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

Dontsova, M., Frolova, L., Vassilieva, J., Piendl, W., Kisselev, L., and Garber, M. (2000) Translation termination factor aRF1 from the archaeon *Methanococcus jannaschii* is active with eukaryotic ribosomes, *FEBS Lett.* 472, 213-216.

Efstratiadis, A. (1998) Genetics of mouse growth, *Int. J. Dev. Biol.* 42, 955-976.

Ehrenshaft, M., and Brambl, R. (1990) Respiration and mitochondrial biogenesis in germination embryos of maize, *Plant Physiol.* 93, 295-304.

Ferrari, S., and Thomas, G. (1994) S6 phosphorylation and the p70s6k/p85s6k, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 29, 385-413.

Ferrari, S., Bannwarth, W., Morley, S.J., Totty, N.F., and Thomas, G. (1992) Activation of p70<sup>s6k</sup> is associated with phosphorylation of four clustered sites displaying Ser/Thr-Pro motifs, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 7282-7285.

Freire, M.A., Tourneur, C., Granier, F., Camonis, J., El Amrani, A., Browning, K.S., and Robaglia, C. (2000) Plant lipoxygenase 2 is a translation initiation factor-4E-binding protein, *Plant. Mol. Biol.* 44, 129-140.

Freistroffer, D.V., Pavlov, M.Y., MacDougall, J., Buckingham, R.H., and Ehrenberg, M. (1997) Release factor RF3 in *E. coli* accelerates the dissociation of release factors RF1 and RF2 from the ribosome in a GTP-dependent manner, *EMBO J.* 16, 4126-4133.

Frolova, L., Le Goff, X., Zhouravleva, G., Davydova, E., Philippe, M., and Kisselev, L. (1996) Eukaryotic polypeptide chain release factor eRF3 is an eRF1- and ribosome-dependent guanosine triphosphatase, *RNA*, 334-341.

Fumagalli, S., and Thomas, G. (2000) S6 rp Phosphorylation and signal transduction. In *Translational Control of Gene Expression*. Hershey JWB, Mathews MB, Sonenberg N, eds. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 695-717.

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

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

Gao, X., and Pan, D. (2001) TSC1 and TSC2 tumor suppressors antagonize insulin signaling in cell growth, *Genes Dev.* 15, 1383-1392.

García-Flores, C., Aguilar, R., Reyes de la Cruz, H., Albores, M., and 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.

Geballe, A.P. (1996) Translational control mediated by AUG codons. In *Translational Control of Gene Expression*. Sonenberg N, Hershey JWB, Mathews MB, eds. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 173-197.

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

Gingras, A.C., Raught, B., and Sonenberg, N. (1999) eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation, *Annu. Rev. Biochem.* 68, 913-963.

Gingras, A.C., Raught, B., and Sonenberg, N. (2001) Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR, *Genes Dev.* 15, 807-826.

Goberdhan, D.C., Paricio, N., Goodman, E.C., Mlodzik, M., and Wilson, C. (1999) *Drosophila* tumor suppressor PTEN controls cell size and number by antagonizing the Chico/PI3-kinase signaling pathway, *Genes Dev.* 13, 3244-3258.

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

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

Gressner, A.M., and van de Leur, E. (1980) Interaction of synthetic polynucleotides with small rat liver ribosomal subunits possessing low and highly phosphorylated protein S6, *Biochem. Biophys. Acta.* 608, 459-468.

Grolleau, A., J. Bowman, B. Pradet-Balade, Puravs, E., Hanash, S., García-Sanz, J.A., and Beretta, L. (2002) Global and specific translational control by rapamycin in T cells uncovered by microarrays and proteomics, *J. Biol. Chem.* **277**, 22175-22184.

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

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

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

Hellen, C.U., and Sarnow, P. (2001) Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules, *Genes Dev.* **15**, 1593-1612.

Henis-Korenblit, S., Shani, G., Sines, T., Marras, L., Shohat, G., Kimchi, A. (2002) The caspase-cleaved DAP5 protein supports internal ribosome entry site-mediated translation of death proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 5400-5405.

Hernandez-Sanchez, C., Mansilla, A., de la Rosa, E.J., Pollerberg, G.E., Martinez-Salas, E., and de Pablo, F. (2003) Upstream AUGs in embryonic proinsulin mRNA control its low translation level, *EMBO J.* **22**, 5582-5592.

Hershey, J.W.B. (1991) Translational control in mammalian cells, *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 171-755.

Hershey, J.W.B., and Merrick, W.C. (2000) The pathway and mechanism of initiation of protein synthesis. In *Translational Control of Gene Expression*. Sonenberg N, Hershey JWB, Mathews MB, eds. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 33-88.



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

Hirt, H. (1997) Multiples roles of MAP kinases in plants signal transduction. *Trends Plant. Sci.* 2, 11-15.

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

Holcik, M., Sonenberg, N. and Korneluk, R.G. (2000) Internal ribosome initiation of translation and the control of cell death, *Trends Genet.* 16, 469-473.

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

Huang, H., Potter, C.J., Tao, W., Li, D.M., Brogiolo, W., Hafen, E., Sun, H., and Xu, T. (1999) PTEN affects cell size, cell proliferation and apoptosis during *Drosophila* eye development, *Development* 126, 5365-5372.

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

Imai, Y., and Clemmons, D.R. (1999) Role of phosphatidylinosito 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways in stimulation of vascular smooth muscle cell migration and desoxiribonucleic acid synthesis by insulin growth factor I, *Endocrinology* 140, 4228-4235.

Inge-Vechtormov, S., Zhouravleva, G., and Philippe, M. (2003) Eukaryotic release factors (eRFs) history, *Biol. Cell.* 95, 195-209.

Ito, K., Uno, M., and Nakamura, Y. (2000) A tripeptide “anticodon” deciphers stop codons in messenger RNA, *Nature* 403, 680 – 684.

Jackson, R.J., and Kaminski, A. (1995) Internal initiation of translation in eukaryotes: The picornavirus paradigm and beyond, *RNA* 1, 985-1000.

Jang, S.K., Krausslich, H.G., Nicklin, M.J., Duke, G.M., Palmenberg, A.C. and Wimmer, E. (1988) A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during *in vitro* translation, *J. Virol.* 62, 2636-2643.

Jefferies, H.B., Fumagalli, S., Dennis, P.B., Reinhard, C., Pearson, R.B., and Thomas, G. (1997). Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k, *EMBO J.* 16, 3693-3704.

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

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

Johnson, G.C., Pringle, J.R., and Hartwell, L.H. (1977) Coordination of growth with cell division in the yeast *Sacchramyces cereviceae*, *Exp. Cell Res.* 105, 79-98.

Kapp, L.D., and Lorsch, J.R. (2004) The molecular mechanics of eukaryotic translation, *Annu. Rev. Biochem.* 73, 657–704.

Kimball, S.R., and Jefferson, L.S. (2002) Control of protein synthesis by amino acid availability, *Curr. Opin. Clin. Metab. Care* 5, 63-67.

Kobayashi, N., Saeki, K., Yuo, A. (2003) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 induce cell cycle progression through the synthesis of c-Myc protein by internal ribosome entry site-mediated translation via phosphatidylinositol 3-kinase pathway in human factor-dependent leukemic cells. *Blood* 102, 3186-3195.

Kozak, M. (1999) Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes, *Gene* 234, 187-208.

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

Kozma, S.C., and Thomas, G. (2002) regulation of cell size in growth, development and human disease: PI3K, PKB and S6K, *Bioessays* 24, 65-71.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685.

Lane, H.A., Fernandez, A., Lamb, N.J., and Thomas, G. (1993) p70s6k function is essential for G1 progression, *Nature* 363, 170-172.

Law, B.K., Waltner-Law, M.E., Entingh, A.J., Chytil, A., Aakre, M.E., Nørgaard, P., and Moses, H.L. (2000) Salicylate-induced growth arrest is associated with inhibition of p70s6k and downregulation of c-Myc, cyclin D1, cyclin A, and proliferating cell nuclear antigen, *J. Biol. Chem.* 275, 38261-38267.

Le, H., Browning, K.S., and Gallie, D.R. (1997) The phosphorylation state of wheat translation initiation factors eIF4B, eIF4A and eIF2 is differentially regulated during seed development and germination, *J. Biol. Chem.* 273, 20084-20089.

Leevers, S.J., Weinkove, D., MacDougall, L.K., Hafen, E., and Waterfield, M.D. (1996) The *Drosophila* phosphoinositide 3-kinase Dp110 promotes cell growth, *EMBO J.* 15, 6584–6594.

Lewin, B. (1997) Protein synthesis. In *Genes VI*. Lewin B, eds. Oxford University Press, New York. Pp 179-212.

Lorsch, J.R., and Herschlag, D. (1998) The DEAD box protein eIF4A. 1. A minimal kinetic and thermodynamic framework reveals coupled binding of RNA and nucleotide, *Biochemistry* 37, 2180-2193.

Mathews, M.B., Sonenberg, N., and Hershey, J.W.B. (2000) Origin and principles of translational control. In *Translational Control of Gene Expression*. Sonenberg N, Hershey JWB, Mathews MB, eds. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 1-32.

Mazumder, B., Seshadri, V., Fox, P.L. (2003) Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means, *Trends Biochem. Sci.* 28, 91-8.

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.

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

Meyuhas, O. (2000) Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level, *Eur. J. Biochem.* 267, 6321-6330.

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

Montagne, J., Stewart, M. J., Stocker, H., Hafen, E., Kozma, S.C., and Thomas, G. (1999) *Drosophila* S6 kinase: A regulator of cell size, *Science* 285, 2126-2129.

Montesano, L., and Glitz, D.G. (1998) Wheat germ cytoplasmic ribosomes, *J. Biol. Chem.* 263, 4932-4938.

Morley, S.J., and Thomas, G. (1991) Intracellular messengers and the control of protein synthesis, *Pharmacol. Ther.* 50, 291-319.

Morris, D.R., and Geballe, A.P. (2000) Upstream Open Reading Frames as Regulators of mRNA Translation, *Mol. Cell. Biol.* 20, 8635-8642.

Murashige, T., and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture, *Physiol. Plant.* 15, 473-497.

Myers, M.P., Stolarov, J.P., Eng, C., Li, J., Wang, S.I., Wigler, M.H., Parsons, R., and Tonks, N.K. (1997) P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 9052-9057.

Neufeld, T.P., de la Cruz, A.F., Johnson, L.A., and Edgar, B.A. (1998) Coordination of growth and cell division in the *Drosophila* wing, *Cell* 93, 1183-1193.

Nygard, O., and Nilsson, L. (1990) Kinetic determination of the effects of ADP-ribosylation on the interaction of eukaryotic elongation factor 2 with ribosomes, *J. Biol. Chem.* 265, 6030-6034.

O'Farrell, P.H., 1975. High resolution of two dimensional electrophoresis of protein, *J. Biol. Chem.* 250, 4007-4021.

Oldham, S., and Hafen, E. (2003) Insulin/IGF and target of rapamycin signaling: a TOR de force in growth control, *Trends Cell Biol.* 13, 79–85.

Oliveira, A. A. E., Elenir, A. A. O., Machado, T. O. L., Gomes, M. V., Neto, X. J., Pereira, C. A., Vieira, H. J. G., Fernández, S. V. K., and Javier-Filho, J. (1999) Jack bean seed coat contains a protein with complete sequence homology to bovine insulin, *Protein Peptide Lett.* 6, 15–21.

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

Pause, A., Belsham, G.J., Gingras, A.-C., Donzé, O., Lin, T.A., Lawrence J.C. Jr., and Sonenberg, N. (1994) Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5-cap function, *Nature* 371, 762-767.

Pearson, R.C., Dennis, P.B., Han, J.-W., Williamson, N.A., Kozma, S.C., Wettenhall, E.H., and Thomas, G. (1995) The principal target of rapamycin-induced p70<sup>s6k</sup> inactivation is a novel phosphorylation site within a conserved hydrophobic domain, *EMBO J.* 14, 5279–5287.

Pelletier, J. and Sonenberg, N. (1988) Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA, *Nature* 334, 320-325.

Pérez, L., Aguilar, R., Méndez, A., and Sánchez de Jiménez, E. (1990) Phosphorylation of ribosomal proteins induced by auxins in maize embryonic tissues, *Plant. Physiol.* 94, 1270-1275.

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

Peruzzi, F., Prisco, M., Drews, M., Salmoni, P., Grassili, E., Romano, G., Calabretta, B., and Baserga, R. (1999) Multiple pathways on the insulin growth factor 1 receptor in protection from apoptosis, *Mol. Cell. Biol.* 19, 7203-7215.

Pestova, T.V., and Hellen, C.U.T. (2000) The structure and function of initiation factors in eukaryotic protein synthesis, *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 651-674.

Potter, C.J., Huang, H., and Xu, T. (2001) Drosophila tsc1 functions with tsc2 to antagonize insulin signaling in regulating cell growth, cell proliferation, and organ size, *Cell* 105, 357-368.

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

Preiss, T., and Hentze, M.W. (2003) Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation, *BioEssays* 25, 1201-1211.

Prendergast, C.G. (2003) Signal transduction: Putting translation before transcription, *Cancer Cell* 4, 244-245.

Proud, C.G. (2002) Regulation of mammalian translation factors by nutrients, *Eur. J. Biochem.* 269, 5338-5349.

Pullen, N., and Thomas, G. (1997) The modular phosphorylation and activation of p70<sup>S6K</sup>, *FEBS Lett.* 410, 78-82.

Pullen, N., Dennis, P.B., Andjelkovic, M., Dufner, A., Kozma, S., Hemmings, B.A., and Thomas, G. (1998) Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1, *Science* 279, 707-710.

Ramakrishnan, V. (2002) Ribosome Structure and the mechanism of translation, *Cell* 108, 557-572.

Rhoads, R.E. (1999) Signal transduction pathways that regulates eukaryotic protein synthesis, *J. Biol. Chem.* 274, 30337-30340.

Rozen, F., Edery, I., Meerovitch, K., Merrick, W.C., and Sonenberg, N. (1990) Bidirectional RNA helicase activity of eukaryotic translation initiation factor 4A and 4F, *Mol. Cell. Biol.* 10, 1134-1144.

Rutter, J., Probst, B.L., and McKnight, S.L. (2002) Coordinate regulation of sugar flux and translation by PAS kinase, *Cell* 111, 17-28.

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

Saltiel, A.R., and Kahn, C.R. (2001) Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism, *Nature* 414, 799-806.

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

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



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

Sánchez de Jiménez, E., Beltrán-Peña, E., and Ortiz-López, A. (1999) Insulin-stimulated ribosomal protein synthesis in maize embryonic axes during germination, *Physiol. Plant.* 105, 148-155.

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

Scharf, K.D., and Nover, L. (1982) Heat-shock induced alterations of ribosomal protein phosphorylation in plant cell cultures, *Cell* 30, 427-437.

Scharf, K.-D., and Nover, L. (1987) Control of ribosome biosynthesis in plant cell cultures under heat shock conditions. II. Ribosomal proteins, *Biochem. Biophys. Acta* 909, 47-57.

Schmelzle, T., and Hall, M.N. (2000). TOR, a central controller of cell growth, *Cell* 103, 253-262.

Scolnick, E., Tompkins, R., Caskey, T., and Nirenberg, M. (1968) Release factors differing in specificity for terminator codons, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 61, 768-774.

Shah, O.J., Anthony, J.C., Kimball, S.R., and Jefferson, L.S. (2000) 4E-BP1 and S6K1: translational integration sites for nutritional and hormonal information in muscle, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 279, E715-E729.

Shepherd, P.R., Withers, D.J., and Siddle, K. (1998) Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signaling, *Biochem. J.* 333, 471-490.

Shima, H., Pende, M., Chen, Y., Fumagalli, S., Thomas, G., and Kozma, S.C. (1998) Disruption of the p70(s6k)/p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase, *EMBO J.* 17, 6649-6659.

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

Standart, N. (1993) The RNA-protein partners in mRNP, *Mol. Biol. Rep.* 18, 135-142.

Stewart, M.J., Thomas, G. (1994) Mitogenesis and protein synthesis: a role for ribosomal protein S6 phosphorylation?, *Bioessays* 16, 809-815.

Stocker, H., and Hafen, E. (2000) Genetic control of cell size. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 529-535.

Stokoe, D., Stephens, L.R., Copeland, T., Gaffney, P.R.J., Reese, C.B., Painter, G.F., Holmes, A.B., McCormick, F., and Hawkins, P.T. (1998) Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B, *Science* 277,567-570.

Stolovich, M., Tang, H., Hornstein, E., Levy, G., Cohen, R., Baie, S.S., Birnbaum M.J., and Meyuhas, O. (2002) Transduction of growth or mitogenic signals into translational activation of TOP mRNAs is fully reliant on the phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathway but requires neither S6K1 nor rpS6 phosphorylation, *Mol. Cell Biol.* 22, 8101-8113.

Stutz, A., Conne, B., Huarte, J., Gubler, P., Volkel, V., Flandin, P., and Vassalli, J.D. (1998) Masking, unmasking, and regulated polyadenylation cooperate in the translational control of a dormant mRNA in mouse oocytes. *Genes Dev.* 12, 2535-48.

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

on PI3-kinase-mediated signaling, is partially inhibited by rapamycin, and is independent of S6K1 and rpS6 phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 21, 8671-8683.

Tapon, N., Ito, N., Dickson, B.J., Treisman, J.E., and Hariharan, I.K. (2001) The *Drosophila* tuberous sclerosis complex gene homologs restrict cell growth and cell proliferation, *Cell* 105, 345-355.

Thomas, G. (2002) The S6 kinase signaling pathway in the control of development and growth, *Biol. Res.* 35, 305-313.

Thomas, G., and Thomas, G. (1986) Translational control of mRNA expression during the early mitogenic response in Swiss mouse 3T3 cells: identification of specific proteins, *J. Cell Biol.* 103, 2137-2144.

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

Turck, F., Kozma, S.C., Thomas, G., and Nagy, F. (1998) A heat sensitive *Arabidopsis thaliana* kinase substitutes for human p70<sup>s6k</sup> function *in vivo*, *Mol. Cell. Biol.* 18, 2038-2044.

Turck, F., Zilbermann, F., Kozma, S.C., Thomas, G., and Nagy, F. (2004) Phytohormones participate in an S6 kinase signal transduction pathway in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* 134, 1527-35.

Ueki, K., Yballe, C.M., Brachmann, S.M., Vicent, D., Watt, J.M., Kahn, C.R., Cantley, L.C. (2002) Increased insulin sensitivity in mice lacking p85 beta subunit of phosphoinositide 3-kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 419-424.

Ullrich, A., and Schlessinger, J. (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity, *Cell* 61, 203-212.

- Vagner, S., Galy, B., and Pyronet, S. (2001) Irresistible IRES, *EMBO reports* 2, 893-898.
- Vanhaesebroeck, B., and Alessi, D.R. (2000) The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB, *Biochem. J.* 346, 561-576.
- Vanhaesebroeck, B., and Waterfield, M.D. (1999) Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases, *Exp. Cell. Res.* 253, 239-54.
- Vanhaesebroeck, B., Jones, G.E., Allen, W.E., Zicha, D., Hooshmand-Rad, R., Sawyer, C., Wells, C., Waterfield, M.D., Ridley, A.J. (1999) Distinct PI(3)Ks mediate mitogenic signaling and cell migration in macrophages, *Nat. Cell. Biol.* 1, 69-71.
- Vanhaesebroeck, B., Leever, S.J., Panayotou, G., and Waterfield, M.D. (1997) Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers, *Trends Biochem. Sci.* 22, 267-72.
- Walker, J.C. (1994) Structure and function of receptor-like protein kinases of higher plants, *Plant. Mol. Boil.* 26, 1599-1609.
- Walling, L., Drews, G.N., and Goldberg, R.B. (1986) Transcriptional and post-transcriptional regulation of soybean seeds protein mRNA level, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 2123-2127.
- Warner, J. R. (1999) The economics of ribosomal biosynthesis in yeast, *Trends Biochem. Sci.* 24, 437-440.
- Watanabe, Y., Barbashov, S.F., Kamatsu, S., Hemming, A.M., Miyahi, M. Tsunasawa, S., and Hirano, H. (1994) A peptide that simulates phosphorylation of the plant insulin-binding protein isolation, primary structure and cDNA cloning, *Eur. J. Biochem.* 224, 167-172.

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

Weigmann, K., Cohen, S.M., and Lehner, C.F. (1997) Cell cycle progression, growth and patterning in imaginal discs despite inhibition of cell division after inactivation of *Drosophila* Cdc2 kinase, *Development* 124, 3555-3563.

Williams, A.J., Werner-Fraczek, J., Chang, I.-F., and Bailey-Serres, J. (2003) Regulated phosphorylation of 40S ribosomal protein S6 in root tips of maize, *Plant. Physiol.* 132, 2086-2097.

Yakovleva, L.A., and Kulaeva, O.N. (1987) The effect of phytohormones on phosphorylation of ribosomal proteins in detached pumpkin cotyledons, *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 182, 359-365.

## **XII. ANEXOS.**

## Functional Characterization of a Maize Ribosomal S6 Protein Kinase (ZmS6K), a Plant Ortholog of Metazoan p70<sup>S6K</sup> †

Homero Reyes de la Cruz, Raúl Aguilar, and Estela Sánchez de Jiménez\*

Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM, Ciudad Universitaria 04510, México DF, Mexico

Received July 11, 2003; Revised Manuscript Received October 27, 2003

**ABSTRACT:** Ribosomal protein S6 (S6rp) is phosphorylated by the p70<sup>S6K</sup> enzyme in mammals, under mitogen/IGF regulation. This event has been correlated with an increase in 5' TOP mRNA translation. In this research, a maize S6 kinase (ZmS6K) was isolated from maize (*Zea mays* L.) embryonic axes by human p70<sup>S6K</sup> antibody immunoprecipitation. This enzyme, a 62 kDa peptide, proved to be specific for S6rp phosphorylation, as revealed by *in vivo* and *in vitro* kinase activity using either the 40S ribosomal subunit or the RSK synthetic peptide as the substrates. ZmS6K activation was achieved by phosphorylation on serine/threonine residues. Specific phospho-Threo recognition by the p70<sup>S6K</sup> antibody directed to target phospho-Threo residue 389 correlated with ZmS6K activation. The ZmS6K protein content remained almost steady during maize seed germination, whereas the ZmS6K activity increased during this process, consistent with ZmS6K phosphorylation. Addition of insulin to germinating maize axes proved to increase ZmS6K activity and the extent of S6rp phosphorylation. These events were blocked by rapamycin, an inhibitor of the insulin signal transduction pathway in mammals, at the TOR (target of rapamycin) enzyme level. We conclude that ZmS6K is a kinase, structurally and functionally ortholog of the mammalian p70<sup>S6K</sup>, responsible for *in vivo* S6rp phosphorylation in maize. Its activation is induced by insulin in a TOR-dependent manner by phosphorylation on conserved serine/threonine residues.

A substantial proportion of total cellular energy is devoted to the synthesis of new ribosomes during growth and proliferation (1). This costly metabolic process must be closely monitored and regulated as a function of nutritional, hormonal, and developmental states (2). The mRNAs that encode most ribosomal proteins, termed 5' TOP<sup>1</sup> mRNAs, are characterized by the presence of a 5'-terminal oligopyrimidine track (3, 4). Translation of these messages is selectively stimulated by mitogen/IGF (insulin-like growth factor) and also by amino acids, through a signal transduction pathway, at present not completely understood. Under mitogen/IGF stimulation, phosphorylation of the S6 ribosomal protein (S6rp) on the 40S ribosomal subunit has been elucidated (5, 6). It has also been stated that activation of S6rp kinase (p70<sup>S6K</sup>) is another pathway target in mammals (7, 8) and in other eukaryotes (S6rpK) (9, 10). This activation depends on the phosphorylation of specific enzyme target sites by a process that involves the TOR (target of rapamycin) kinase (11).

In plants, information about this kind of signal transduction pathway is scarce. However, it has been shown that insulin

(12) or an insulin-related peptide isolated from maize (ZmIGF) (13) induces seedling growth, as well as S6rp phosphorylation and ribosomal protein synthesis in germinating embryos, suggesting the presence of a mitogen/IGF-induced pathway in plants, similar to the one regulating cell growth and proliferation in animals.

Despite the fact that S6K has not yet been characterized in plants, reports indicate that S6rp phosphorylation is tightly regulated in these organisms, during physiological (14) as well as stress (15) conditions. Two clones designated AtS6k1 and AtS6k2 have been isolated from an *Arabidopsis thaliana* cDNA library (16). These clones were found to be identical to two previously identified clones termed Atpk1/ATPK6 (17, 18) and ATPK19 (17), respectively. Database analysis of AtS6k1 and AtS6k2 showed a high level of conservation of catalytic domains compared with p70<sup>S6K</sup>. AtS6k2, ectopically expressed in the human 293 cell line, phosphorylated mammalian and plant ribosomal S6 protein *in vitro* and *in vivo* (16), demonstrating that AtS6K2 might correspond to the mammalian p70<sup>S6K</sup>.

Because of the relevance of the mitogen/IGF-induced pathway in regulating growth in a wide range of eukaryotes, and probably also in plants (13), further investigations were undertaken. Thus, the objective of this research was to isolate and characterize an S6 protein kinase from germinating maize embryonic axes (ZmS6K) and to determine if this enzyme is functionally equivalent to the mammalian p70<sup>S6K</sup>. Data presented herein demonstrate that ZmS6K is a TOR-dependent activated kinase, regulated through an insulin/IGF-stimulated signal transduction pathway, similar to that reported in other eukaryotes.

\* This work was supported by DGAPA-UNAM Grant-IN202900 and PAEP-UNAM Grant 203324. R. C. H. was recipient of CONACYT fellowship No. 129464.

\* Corresponding author: estelas@servidor.unam.mx, Conjunto "E", Paseo de la Investigación Científica, Circuito Institutos, Ciudad Universitaria 04510, México D. F., MÉXICO. Tel: (52) 55 56225278, Fax: (52) 55 56225329.

<sup>1</sup> Abbreviations: S6rp, S6 ribosomal protein; ZmS6K, maize S6 kinase; mTOR, mammalian target of rapamycin; 5' TOP, 5' UTR track of oligopyrimidines.

## MATERIALS AND METHODS

**Biological Material.** Seeds and embryonic axes of maize (*Zea mays* L. cv. Chalqueño) were used for all experiments. Maize seeds were germinated in water-imbibed cotton at  $24 \pm 2$  °C in darkness. After the stated period (0–48 h), embryonic axes were manually dissected and frozen in liquid nitrogen.

**Preparation of Maize Axes Extract.** Axes (400 mg) were placed in Murashige-Skoog medium (MS) (19) and incubated for the stated period, then frozen in liquid N<sub>2</sub>, ground in a mortar, and homogenized in 8 mL of freshly prepared extraction buffer [50 mM HEPES (pH 7.6), 50 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 1 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 4 mM EDTA, 20 mM EGTA, 20 mM NaF, 80 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 200 mM mannitol, 2 mM DTT, 0.2 mM PMSF, and 1 mM benzamide]. The homogenate was centrifuged at 27000g and 4 °C for 30 min and the supernatant likewise at 280000g for 3.5 h on a sucrose cushion (1.5 M sucrose and 800 mM KCl in extraction buffer). The new supernatant was termed the axes extract.

**ZmS6 Kinase Immunoprecipitation.** ZmS6K was obtained from the axes extract. Five hundred microliters of axes extract (3 mg of cytoplasmic protein) was diluted in Eppendorf tubes with 500  $\mu$ L of buffer A [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 0.05% (w/v) Nonidet-P40] with 2 mM benzamide and 1  $\mu$ M PMSF, and 5  $\mu$ L of p70<sup>S6K</sup> antibody (Santa Cruz Biotechnology catalog no. SC-230) was added to the mixture. The immunoprecipitated mixture was incubated at 4 °C overnight with constant shaking. Then 100  $\mu$ L of protein A–Sepharose beads (Zymed Laboratories catalog no. 10-1141) was added to the mixture and the mixture incubated at 4 °C for a further 4 h. The immunoprecipitated mixture was passed through a microcolumn using a micropipet tip blocked with glass fiber. The protein A–Sepharose–antibody–protein complex was washed three times with buffer B [100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM NaCl, 0.05% (w/v) Nonidet-P40, and 0.25% (v/v) Triton X-100] and twice with buffer A and eluted with 300  $\mu$ L of sample buffer [60 mM Tris-NaOH (pH 7.5), 2% (w/v) SDS, and 10% (w/v) glycerol].

**40S Ribosomal Subunit Preparation.** Maize ribosomes from quiescent seeds were obtained as described previously (20) except that the ribosome suspension was layered on a 10 mL hyperbolic sucrose cushion (from 5 to 45% sucrose in extraction buffer) and centrifuged at 19000g and 4 °C overnight in a Beckman rotor SW40. The gradient was fractionated, and the fractions were read at 260 nm. The fractions enriched with the 40S ribosomal subunit were centrifuged again at 360000g and 4 °C for 2 h; the supernatant was discarded, and the pellet was washed and dissolved with 40  $\mu$ L of resuspension buffer (20). The 40S ribosomal suspension was frozen and thawed three times prior to being used as a kinase substrate.

**ZmS6 Kinase Assay and Kinetic Analysis.** The protein kinase assay was performed using the immunoprecipitate obtained as described above with some modifications. The protein A–Sepharose–antibody–protein kinase complex was collected at the bottom of Eppendorf tubes by top-speed centrifugation in a microfuge. Then the supernatant was discarded and the pellet washed three times with buffer B (1 mL) and then twice with buffer A. The pellet was

resuspended in dilution buffer [50 mM MOPS (pH 7.2), 10 mM *p*-nitrophenyl pyrophosphate, 1 mM DTT, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, and 0.1% (w/v) Triton X-100]. Ten microliters of this complex was used for a routine kinase assay (21) in a reaction mixture containing reaction buffer [50 mM MOPS (pH 7.0), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 10 mM *p*-nitrophenyl pyrophosphate, and PKC and PKA specific inhibitors (500 and 150 ng, respectively)], 100  $\mu$ M ATP, 5  $\mu$ Ci (3000 Ci/mmol) of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP, and either 40  $\mu$ g of 40S maize ribosomal subunit or 5 nM RSK peptide (Calbiochem Co. catalog no. 559280) in a final volume of 20  $\mu$ L. The reaction mixture was incubated for 30 min at  $24 \pm 2$  °C, and then the reaction was stopped. (A) With the 40S ribosomal subunit as the substrate, addition of 5  $\mu$ L of 5 $\times$  SDS–PAGE sample buffer [0.05 M Tris-HCl (pH 6.8), 0.02 M EDTA, 10% (v/v) glycerol, 1% (w/v) SDS, 1% (w/v)  $\beta$ -mercaptoethanol, and 0.002% (w/v) bromophenol blue], and boiling for 3 min. After electrophoresis, the SDS–PAGE gel was Coomassie stained and dried, and the autoradiography was obtained. (B) With the RSK peptide as the substrate, the reaction was stopped by applying 20  $\mu$ L of the reaction mixture to p81 phosphocellulose paper circles (Whatman Co. catalog no. 3698323), and then the mixture was extensively washed with 0.85% (v/v) phosphoric acid for 24 h and finally washed with acetone. The papers were dried at room temperature and placed in vials for liquid scintillation counting. For the determination of kinetic parameters, RSK and ATP were used as substrates at different concentrations (0–13.5 nM and 0–500  $\mu$ M, respectively).

**In Vivo ZmS6K and S6rp Phosphorylation.** Two sets of maize embryonic axes from seeds germinated for 22 h were dissected and incubated in 1 mL of MS medium for a further 2 h with 400  $\mu$ Ci of [<sup>32</sup>P]orthophosphate (10 mCi/mL, Amersham Pharmacia Biotech), in the presence or absence of 200 microunits/mL insulin. In some experiments, rapamycin (0.1  $\mu$ M) was applied 15 min before insulin addition. One set of axes was used to obtain ZmS6K as indicated above. The other set was homogenized in liquid nitrogen with a mortar and pestle and the powder mixed with extraction buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.8), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM KCl, 1 mM PMSF, 5 mM NaF, 0.5% 2-mercaptoethanol, 1% Triton X-100, and 0.25 M sucrose]. The mixture was clarified by centrifugation at 27000g and 4 °C for 30 min, and the supernatant was layered on a sucrose cushion (0.5 M sucrose and 0.8 M KCl in extraction buffer) and centrifuged at 280000g for 3.5 h to obtain the ribosomes. The ribosome pellet was resuspended in buffer [20 mM Hepes (pH 6.5), 20 mM KOH, 5 mM magnesium acetate, 125 mM potassium acetate, and 5% 2-mercaptoethanol], and ribosomal proteins were extracted with acetic acid, precipitated with acetone, and resuspended in water. The <sup>32</sup>P-labeled proteins (ribosomal and immunopurified proteins) were analyzed by SDS–PAGE and autoradiography.

**Two-Dimensional Electrophoresis Analysis of ZmS6K.** Two-dimensional electrophoresis analysis of axes extracts (200  $\mu$ g of protein) from seeds germinated for 0, 6, 12, 24, and 48 h was performed according to the method of O'Farrell (22) using a pH gradient from 3.5 to 10 and 12% SDS–polyacrylamide gels. Equal amounts of proteins from the same set of axes were treated with 4 units of alkaline phosphatase (Sigma Chemical Co. catalog no. P-0762). The polyacrylamide gels were transferred to PVDF membranes



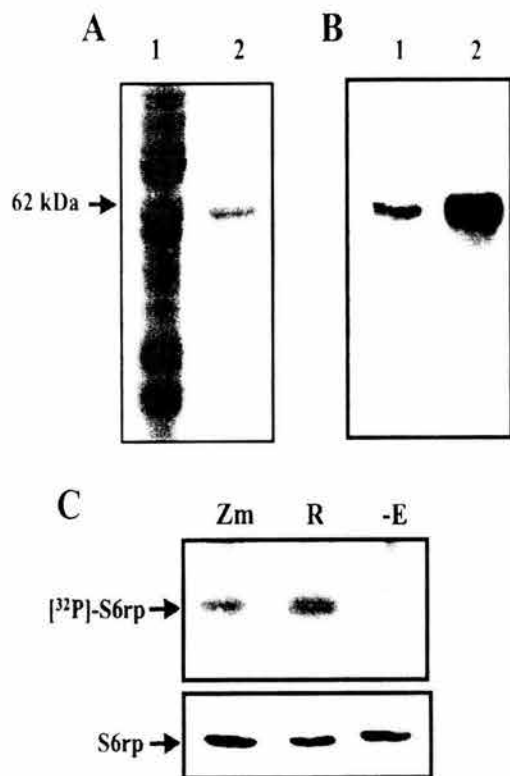


FIGURE 1: Immunoprecipitation and activity of a maize peptide S6rpK (ZmS6K). Maize axes extract from 24 h germinated seeds (lanes 1) or ZmS6K immunoprecipitated from the maize extracts by anti-human p70<sup>S6K</sup> antibody (lanes 2) were resolved by SDS-PAGE. A) Coomassie stained gel and B) analyzed by Western blot using anti-human p70<sup>S6K</sup> antibody. The 62 kDa band corresponds to ZmS6K protein. Protein kinase activity was assessed in the 62 kDa maize immunoprecipitated peptide (ZmS6K) by an *in vitro* assay. Substrates used: 5  $\mu$ Ci [<sup>32</sup>P]- $\gamma$ -ATP, and maize 40S ribosomal subunit (20  $\mu$ g) in the assay buffer in a final volume of 20  $\mu$ L. The reaction was incubated 30 min at 24 °C and the products were analyzed by SDS-PAGE and auto-radiography (C, upper panel). ZmS6K (Zm), rat p70<sup>S6K</sup> (R) or none (-E) indicates the source of enzyme. The arrow points to [<sup>32</sup>P]-S6rp (31 kDa). Western blot analysis of a similar gel was performed with S6rp antibody to identify the 31 kDa band (C, lower panel).

(Millipore Co. catalog no. IPVH0010) and assayed by Western blot analysis using anti-human p70<sup>S6K</sup> (Santa Cruz Biotechnology).

## RESULTS

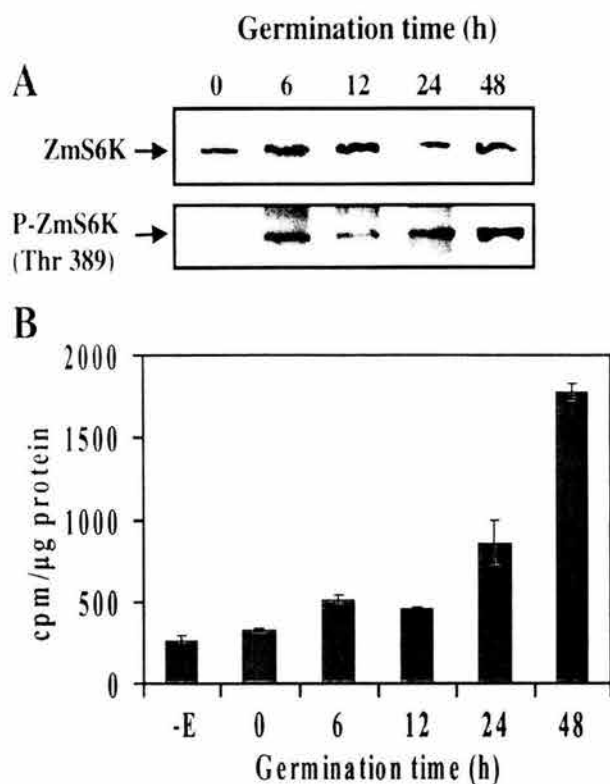
**Immunoprecipitation of a Maize Peptide Recognized by the Anti-Human p70<sup>S6K</sup> Antibody.** To isolate and characterize the maize S6 kinase protein, extracts from germinating maize embryonic axes were immunoprecipitated with the anti-human p70<sup>S6K</sup> antibody and further purified with protein A-Sepharose and successive buffer detergent washes to eliminate the antibody (Materials and Methods). SDS-PAGE (Figure 1A) and Western blotting (Figure 1B) were performed on both the crude extract and immunoprecipitated protein. A protein with an apparent molecular mass of 62 kDa that cross-reacted with the anti-human p70<sup>S6K</sup> antibody was observed in both cases. Serum from nonimmunized rabbit and antibody against maize eIF4G were also tested, with negative results (data not shown).

**Full-Length ZmS6K cDNA Sequence.** The ZmS6K gene sequence was obtained by RT-PCR using maize RNA poly

A+ as a template and oligonucleotide primers designed from the most conserved regions of the S6Ks cDNA sequences. The RNA was obtained from embryonic axes dissected from maize seeds germinated for 48 h. This cDNA sequence (NCBI GenBank entry AY389497) was analyzed with the Translate and ScanProsite tools (ExpASY Molecular Biology Server). Results indicate that the ZmS6K cDNA sequence encodes a 488-amino acid protein with a theoretical molecular mass of 54.1 kDa and an isoelectric point of 6.19, compared with the corresponding parameters for p70<sup>S6K</sup> (56.1 kDa and a pI of 6.02, respectively) (pI/MW tool). The ZmS6K nucleotide sequence predicts a protein that contains a serine/threonine protein kinase signature and that is 48% identical to human p70<sup>S6K</sup> (NCBI GenBank entry P23443) and 62% identical to *A. thaliana* ATPK6 (NCBI GenBank entry AY096555). Most importantly, the protein conserves two of the main target residues essential for the activation of p70<sup>S6K</sup> in animals: Thr-389 (Thr-468 in ZmS6K) and Thr-229 (Ser-308 in ZmS6K).

**The 62 kDa Protein Has S6 Kinase Activity (ZmS6K).** To determine if the 62 kDa protein has S6 kinase activity, an *in vitro* assay system was established. Immunoprecipitated ZmS6K from maize extract germinated for 24 h was used as the enzyme source, and [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP and the 40S ribosomal subunit were used as substrates (Figure 1C). ZmS6K activity was indicated by the amount of <sup>32</sup>P incorporated in S6rp. This was determined by autoradiography of the electrophoresed 40S ribosomal proteins (Figure 1C, Zm). Rat liver p70<sup>S6K</sup> isolated in the lab by p70<sup>S6K</sup> antibody immunoprecipitation was used as a positive control of the assay (Figure 1C, R), using also maize 40S subunits as the substrate. A negative control without enzyme was also set (Figure 1C, -E). Results of the autoradiography indicated incorporation of <sup>32</sup>P in only a 31 kDa protein from the set of 40S ribosomal subunit proteins, both with maize and rat enzyme but not in the negative control (Figure 1C, top panel). This band was further identified as S6rp by Western blot analysis with the rat S6rp antibody (Figure 1C, bottom panel).

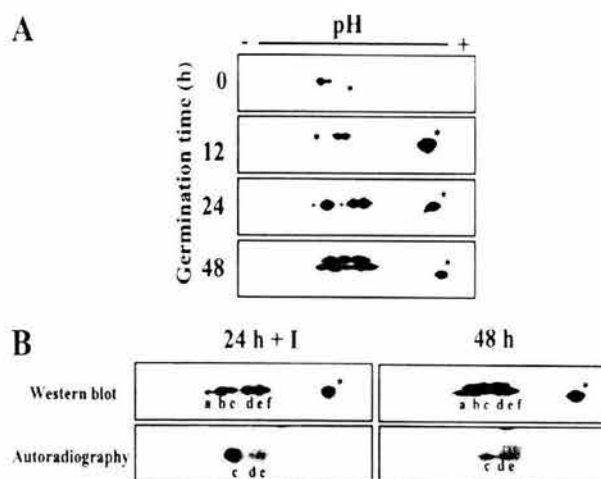
**ZmS6K Activity Correlates with Phosphorylation on Equivalent Threo Residue 389.** Previous reports have demonstrated that p70<sup>S6K</sup> kinase activity correlates with the enzyme phosphorylation on Threo residue 389 (8, 23, 24). To analyze this, the following experiment was set up. Maize axes extracts from different germination periods (from 0 to 48 h) were resolved by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using either anti-human p70<sup>S6K</sup> to measure total ZmS6K protein content or anti-phospho Threo residue 389 antibodies to test whether the equivalent Threo residue in the ZmS6K protein is phosphorylated. Results indicated that the ZmS6K protein level was similar for all germination periods that were tested (from 0 to 48 h) (Figure 2A, top panel). On the other hand, phosphorylation on equivalent phosphorylated Threo residue 389 was not observed in quiescent axes (0 h) but started to be noticed ~6 h later, and the level of phosphorylation increased toward the end of germination (Figure 2A, bottom panel), suggesting that the activity of this enzyme is developmentally regulated during germination. To confirm that ZmS6K activity correlates with phosphorylation on equivalent Threo residue 389, an *in vitro* assay was set up with the RSK peptide as the substrate, measuring the amount of <sup>32</sup>P incorporated into RSK. Different concentrations of the synthetic RSK peptide



**FIGURE 2:** ZmS6K expression and activation during germination. Embryonic axes extracts from seeds germinated for 0, 6, 12, 24 and 48 h were SDS-PAGE resolved and analyzed by Western blot either with anti-human p70<sup>S6K</sup> (top panel) or anti 389 phospho Thr-389 p70<sup>S6K</sup> (lower panel). B) Immunoprecipitates from the same embryonic axes extracts were analyzed by *in vitro* ZmS6K activity using RSK peptide (5 μg) and [<sup>32</sup>P]-γ-ATP (5 μCi) as substrates. Results are shown as mean values ± standard error of three independent measurements of the incorporated [<sup>32</sup>P]. These experiments were reproduced three times with similar results.

and [<sup>32</sup>P]ATP were tested to define the assay conditions (see Materials and Methods), and the substrate concentrations that were chosen were based on the obtained kinetic parameters. These concentrations turned out to be very close to those reported for the mammalian enzyme (25) (data not shown). Thus, the ZmS6 kinase activity was determined in each of the axes extracts from the germination experiment described above. Results showed zero ZmS6K activity in quiescent axes and very low activity after germination for 6 h, slowly increasing toward the end of this period (48 h) (Figure 2B). These data indicate a positive correlation between the phosphorylation status determined by the Threo residue 389 antibody (Figure 2A, bottom panel) and the amount of <sup>32</sup>P incorporated *in vitro* into the RSK substrate (Figure 2B), which confirms the dependence of the ZmS6K activity on phosphorylation on equivalent Threo residue 389.

Full activation of the mammalian p70<sup>S6K</sup> can be reached after multiple phosphorylation steps of different sites besides Threo residue 389 (8, 23, 34). Thus, the phosphorylation status of the ZmS6K protein during germination was further analyzed. To this end, embryonic axes extracts from germinated seeds at different germination times were resolved by two-dimensional (2D) gel electrophoresis within a pH range of 3.5–10 in the first dimension and analyzed by SDS-PAGE and Western blot with anti-human p70<sup>S6K</sup> antibody



**FIGURE 3:** 2-D electrophoretic analysis of the S6K phosphorylated forms during germination. A) Crude extracts from embryonic axes germinated for the indicated periods were prepared. Two hundred μg of proteins were analyzed by 2D electrophoresis and Western blot using the anti-human p70<sup>S6K</sup> antibody. B) Maize embryonic axes from 22 or 46 h germinated seeds were incubated in MS medium for 2 h in the presence of [<sup>32</sup>P]-orthophosphate. The incubation system for the 22 h axes also contained insulin 200 μU mL<sup>-1</sup>. Crude extracts from each axes set were prepared and the same amount of proteins as in A) were resolved in the 2D electrophoresis and analyzed by Western blot (upper panels) and autoradiography (lower panels). The asterisk marks a protein that was nonspecifically recognized by the antibody.

(Figure 3). In quiescent axes (0 h), the basal ZmS6K shows two spots. However, as germination progresses, more spots appear toward the acidic pH (five well-defined spots after germination for 24 h and at least eight after 48 h) (Figure 3A), suggesting the appearance of posttranslationally modified ZmS6K forms. To test this possibility, two sets of maize embryonic axes dissected from seeds germinated for either 22 or 46 h were incubated in MS medium in the presence of [<sup>32</sup>P]orthophosphate for 2 h. During this period, the 22 h axes were stimulated with insulin, which is known to result in S6rp phosphorylation in maize axes (12, 13). Extracts from both sets of axes were resolved by 2D gel electrophoresis and analyzed by autoradiography and Western blotting (Figure 3B). The Western blot revealed five spots in the extract from insulin-stimulated axes (Figure 3B, top left panel) and eight spots in the 48 h axes extract (Figure 3B, top right panel) as observed previously (Figure 3A, 24 and 48 h). On the other hand, the autoradiography showed three spots (Figure 3B, bottom panels, c–e) in both axes extracts, indicating that spots a and b correspond to the unphosphorylated ZmS6K whereas ZmS6K spots c–e are due to phosphorylation. Notice that there is a spot toward the right side of the Western blot (labeled with an asterisk), which seems to be due to unspecific antibody recognition since it is not phosphorylated.

#### *Insulin Stimulates ZmS6K Activity in Germinating Axes.*

Insulin and insulin-like growth factors (IGFs), widely distributed among eukaryotic organisms (26), stimulate a signal transduction pathway that targets p70<sup>S6K</sup> activation and the subsequent S6rp phosphorylation on the 40S ribosomal subunit (5). Because it has been shown that insulin induces maize S6rp phosphorylation in growing tissues (12), the insulin effect on ZmS6K activity was measured in maize embryonic axes germinated for 24 h. For these experiments,

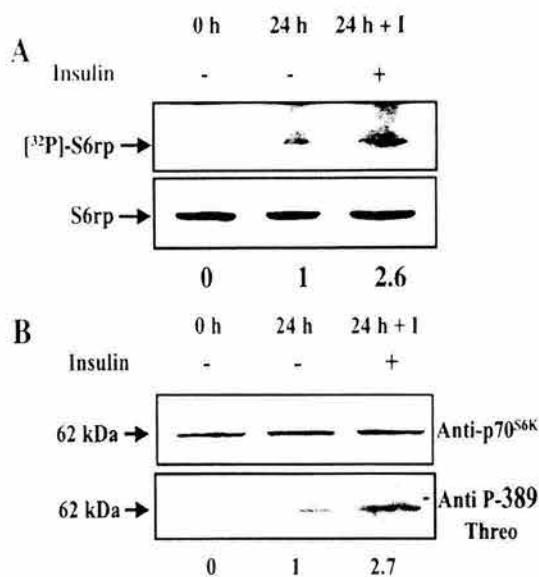


FIGURE 4: Insulin stimulates ZmS6K activity. Maize seeds were 24 h germinated, their axes were dissected and incubated in MS medium without (24 h) or with  $200 \mu\text{M L}^{-1}$  insulin (24 h + I). Quiescent (nongerminated) axes extract (0 h) was also set as control. ZmS6K was obtained from axes extracts by immunoprecipitation with anti-human p70<sup>S6K</sup> antibody and ZmS6K activity was *in vitro* assessed using 40S ribosomal subunit as substrate and the same amount of immunoprecipitated ZmS6K from each axes extract. The ribosomal proteins were resolved by SDS-PAGE and autoradiography (A, upper panel) and analyzed by Western blot with anti-S6rp antibody (A, lower panel). Each of the maize extracts from (A) were further analyzed by Western blot either with anti-human p70<sup>S6K</sup> antibody to assess total amount of ZmS6K protein (B, top panel) or with antibody raised against the target phospho 389-Threo p70<sup>S6K</sup> region (B, lower panel). The numbers stand for fold of 24 h + I increment as compared with the 24 h control, determined by densitometry.

axes were or were not stimulated with insulin. At the end, ZmS6K was immunoprecipitated from the axes extracts and its activity measured *in vitro* using 40S ribosomal subunits as the substrate and the same amount of ZmS6K protein in each case (Figure 4A). ZmS6K, immunoprecipitated from nongerminating axes (0 h), was also set as a control. Results showed that ZmS6K activity increased nearly 3-fold (2.6) after insulin stimulation with respect to the value of the axes not stimulated for 24 h, as indicated by the intensity of the  $[^{32}\text{P}]$ S6rp bands resolved on SDS-PAGE and autoradiography (Figure 4A, top panel) and measured by densitometry. On the other hand, the immunoprecipitated ZmS6K from the 0 h extract did not show S6rp phosphorylation, indicating the lack of ZmS6K activity in quiescent axes, as shown previously (Figure 2A, bottom panel). Identification of the S6rp in the gels, the endogenous substrate of ZmS6K, was performed by Western blotting with the anti-S6rp antibody (Figure 4A, bottom panel). The endogenous phosphorylation status of ZmS6K in the 24 h nonstimulated and insulin-stimulated maize extracts was further determined. To this end, the same axes extracts from the above experiment were analyzed by Western blotting with both the anti-p70<sup>S6K</sup> antibody that recognizes the ZmS6K protein (Figure 4B, top panel) and the anti-phospho Threo residue 389 antibody that recognizes only the ZmS6K phosphorylated in the equivalent position (Figure 4B, bottom panel). An increased level of ZmS6K phosphorylation was found in the extract from

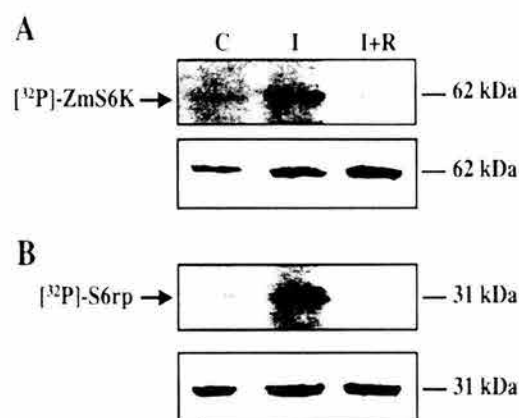


FIGURE 5: Rapamycin inhibition of ZmS6K and S6rp phosphorylation from *in vivo* insulin-stimulated axes. Maize embryonic axes from 22 h germinated seeds were incubated in MS medium with either  $200 \mu\text{M L}^{-1}$  insulin (I),  $200 \mu\text{M L}^{-1}$  insulin plus  $100 \text{ nM}$  rapamycin (I+R) or deionized water (C) and  $[^{32}\text{P}]$ -orthophosphate ( $400 \mu\text{Ci}$ ) for 2 h more. Autoradiography (A, top panel) and Western blot with p70<sup>S6K</sup> antibody (A, lower panel) of immunoprecipitated ZmS6K from each axes set. Ribosomal proteins obtained from the same axes set resolved by SDS-PAGE and analyzed by autoradiography (B top panel) and Western blot of these proteins using anti-S6rp antibody (B, lower panel).

insulin-stimulated maize axes (2.7-fold) as compared with phosphorylation of the ZmS6K in the 24 h control (Figure 4B, bottom panel), whereas both extracts exhibited similar amounts of ZmS6K protein (Figure 4B, top panel). The extract from quiescent axes (0 h) did not exhibit reaction with the anti-phospho Threo residue 389 antibody but exhibited almost the same amount of ZmS6K protein by its reaction with the anti-p70<sup>S6K</sup> antibody. These data indicate that maize ZmS6K is activated after insulin stimulation of maize axes and confirmed that its activity correlates with the level of ZmS6K phosphorylation on the equivalent target threonine residue of the p70<sup>S6K</sup> enzyme, as reported for the mammalian kinase (29).

**Effect of Rapamycin on ZmS6K Activity and Phosphorylation.** TOR (target of rapamycin) kinase is a main target of the insulin/IGF-stimulated signal transduction pathway that regulates S6K activation in animals (11). To test whether ZmS6K activation is also TOR-dependent, an experiment was designed where embryonic axes from seeds germinated for 24 h were insulin-stimulated either alone or in the presence of rapamycin (applied 15 min before the insulin stimulus). This immunosuppressant drug is an inhibitor of the insulin/IGF-stimulated signal transduction pathway at the TOR level (4, 27). A nonstimulated axes group was also set as a control. The axes were fed with  $[^{32}\text{P}]$ orthophosphate for 2 h as described in Materials and Methods. At the end of this period, half of the axes were used to isolate ribosomal proteins and the other half to immunoprecipitate the ZmS6K. The two groups of proteins were SDS-PAGE resolved and their autoradiographies revealed with a phosphorimager. Results show an increased level of phosphorylation on ZmS6K as well as on S6rp in the insulin-stimulated axes (top panels of parts A and B of Figure 5, respectively), whereas the nonstimulated axes showed low phosphorylation levels in both proteins. The protein load controls in the SDS-PAGE gels showed similar amounts of the tested proteins by Western blotting with the corresponding antibodies

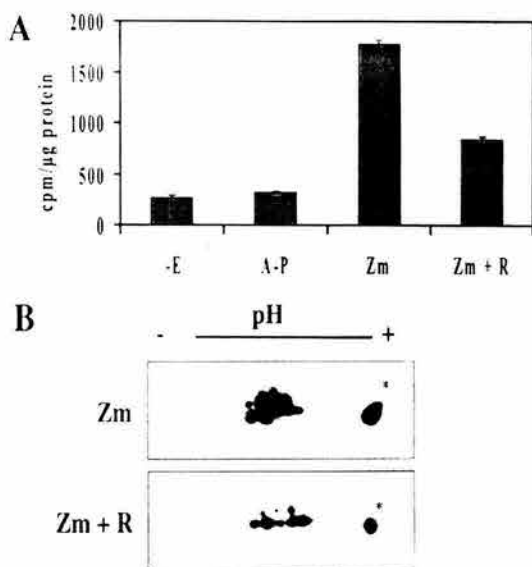


FIGURE 6: Rapamycin effect on endogenous ZmS6K activity from maize. A) *In vitro* ZmS6K activity measurements made with RSK (5  $\mu$ g) peptide and [ $^{32}$ P]- $\gamma$ -ATP (5  $\mu$ Ci) as substrates in axes extracts from 48 h germinated seeds incubated either with (Zm + R) or without (Zm) rapamycin. Controls correspond to reaction mixture without enzyme (-E) or without substrate (A-P), respectively. B) 2-D electrophoresis and Western blot analysis of axes extracts prepared as in Figure 3 using the same p70<sup>S6K</sup> antibody.

(bottom panels of parts A and B of Figure 5, respectively). On the other hand, the levels of ZmS6K and S6rp phosphorylation in the axes that were insulin-stimulated in the presence of rapamycin did not show an increment, but their levels were similar to the control (top panels of parts A and B of Figure 5). These data indicate that rapamycin blocked the insulin stimulatory effect on ZmS6K and as a consequence on S6rp. The positive correlation observed between *in vivo* ZmS6K activation and S6rp phosphorylation indicates that ZmS6K is the enzyme responsible for *in vivo* S6rp phosphorylation, and also that a similar TOR kinase may lay upstream of the ZmS6K within the corresponding signal transduction pathway in maize.

Further, the effect of rapamycin on ZmS6K endogenous activity was analyzed. Axes from seeds germinated for 48 h, where ZmS6K is already fully active (Figure 2), were incubated with or without rapamycin under similar conditions as described above. ZmS6K was immunoprecipitated from the two sets of 48 h axes and its activity measured *in vitro* with RSK and [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP. As seen in Figure 6A, rapamycin inhibited ZmS6K endogenous activity, to a significant extent (more than half) compared with the enzyme from axes not incubated with rapamycin (Figure 6A). A control without RSK substrate was also set to test whether ZmS6K is capable of autophosphorylation. Figure 6A (A-P) shows that this is not the case.

To complete these data, analysis of the phosphorylated status of the 48 h axes ZmS6K, with or without rapamycin, was performed by isoelectrofocusing and Western blotting on maize extracts from axes germinated for 48 h with the anti-human p70<sup>S6K</sup> antibody. Results showed that the samples not treated with rapamycin for 48 h presented at least eight strong spots within the acidic pH range (Figure 6B, top panel). With rapamycin present, however, many of these

spots were not present in the pattern, and the intensity of the most acidic spots decreased relative to the control (Figure 6, bottom panel). From this result, it can be concluded that rapamycin inhibits ZmS6K endogenous activity as well.

## DISCUSSION

This research characterizes, for the first time in plants, the role of a protein kinase (ZmS6K) specific for S6rp phosphorylation in maize ribosomes. cDNAs encoding for putative S6Ks have, however, been reported previously for *Arabidopsis*, where two cDNAs were found, namely AtpK1/ATPK6 and AtpK2/ATPK19 (16, 17, 18). For maize, our data indicate one main active ZmS6K multiphosphorylated protein, as judged by the higher mobility toward the acidic IEF pH region observed after enzyme activation (Figures 3 and 6B), coincident with the [ $^{32}$ P] incorporation found on the most acidic spots (Figure 3B, lower panels). Furthermore, this spots were not present when maize extract were alkaline phosphatase treated (data not shown). All these data are consistent with the seven putative phosphorylation sites predicted by the ScanProsite analysis of the ZmS6K cDNA sequence. This analysis also indicates four N-glycosylation and four N-myristoylation sites, suggesting that other ZmS6K posttranslational modifications, besides phosphorylation, might account for the spots that migrate above the normal ZmS6K molecular mass (Figure 3, 48 h and Figure 6B).

The 62kDa maize ZmS6K presents several similarities with the correspondent mammalian enzyme. Indeed, ZmS6K and p70<sup>S6K</sup> proteins share structural and functional characteristics, such as specific recognition by the same anti-human p70<sup>S6K</sup> antibody (Figure 1B), and substrate specificity: the endogenous S6rp on the 40S ribosomal subunit (Figs. 1C, and 4A) and the synthetic RSK peptide (Figs. 2B and 6A) (8, 28). Furthermore, both enzymes seem to have a similar activation mechanism. ZmS6K showed several phosphorylated sites in the active enzyme (Figures 2 and 3) that positively correlates with its activity and the phosphorylation on a target site recognized by the 389-Threo specific antibody residue (Figures 2 and 4 lower panels), correspondent with p70<sup>S6K</sup> activation (8, 23, 24, 29). Moreover, both enzymes proved to be highly sensitive to rapamycin inhibition indicating its dependency on TOR kinase activity, an enzyme located upstream p70<sup>S6K</sup> within the insulin/IGF signal transduction pathway (Figures 5 and 6) (11). All these data clearly indicate that ZmS6K is the ortholog maize enzyme of the human p70<sup>S6K</sup>.

Several studies have shown that the S6K signaling pathway induced by mitogens/IGFs plays a critical role in animal cell growth (10, 30, 31). This pathway is known to induce the activation of the rapamycin-sensitive mTOR and p70<sup>S6K</sup> enzymes, and correlates with the increase of specific translation of the 5'TOP mRNA messengers (32), that results in the regulation of cell growth and proliferation (33, 34). In maize, an insulin-related growth factor (ZmIGF), with structural and functional similarities to insulin, has been isolated and purified from maize embryonic axes (13). Moreover, ZmIGF as well as insulin have proved to stimulate S6rp phosphorylation and ribosomal protein synthesis in maize axes, as well as to accelerate seed germination and seedling growth (12, 13). These data strongly suggest that ZmIGF is the endogenous effector of a signal transduction pathway that regulates cell growth and proliferation in maize.

This interpretation is further supported by the results from the insulin-stimulated axes experiments, showing significant *in vivo* and *in vitro* increments on ZmS6K activity in a rapamycin-sensitive manner (Figs. 4A and 5).

The above data and the recent finding of a TOR gene in *A. thaliana* (35), showing high level of identity with the human mTOR gene (36, 37), strengthen our interpretation that maize, and probably plants in general, regulate cell growth and proliferation through a similar pathway as animal eukaryotes.

In summary a maize protein kinase, ZmS6K, structurally and functionally ortholog to the mammalian p70<sup>S6K</sup> is reported. ZmS6K showed to be specifically activated by phosphorylation, subject to regulation by insulin stimulation and inhibited by rapamycin. This information strongly suggests that this enzyme is part of an endogenous insulin-like growth factor (ZmIGF)-stimulated signal transduction pathway that regulates cell growth and proliferation in maize tissues.

## REFERENCES

- Wamer, J. R. (1999) The economics of ribosomal biosynthesis in yeast, *Trends Biochem. Sci.* **24**, 437–440.
- Rutter, J., Probst, B. L., and McKnight, S. L. (2002) Coordinate regulation of sugar flux and translation by PAS kinase. *Cell* **111**, 17–28.
- Meyuhas, O., and Horstein, E. (2000) Translational control of TOP mRNAs, in *Translational Control of Gene Expression* (Hershey, J. W. B., Mathews, M. B., Sonenberg, N., Ed.) pp 671–695, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Grolleau, A., Bowman, J., Pradet-Balade, B., Puravs, E., Hanash, S., Garcia-Sanz J. A., and Beretta, L. (2002) Global and specific translational control by rapamycin in T cells uncovered by microarrays and proteomics. *J. Biol. Chem.* **277**, 22175–22184.
- Fumagalli, S., and Thomas, G. (2000) S6 Phosphorylation and signal transduction, in *Translational Control of Gene Expression* (Hershey, J. W. B., Mathews, M. B., Sonenberg, N., Ed.) pp 695–717, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Kimball, S. R., and Jefferson, L. S. (2002) Control of protein synthesis by amino acid availability, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **5**, 63–67.
- Stewart, M. J., and Thomas, G. (1994) Mitogen and protein synthesis: A role for ribosomal protein S6 phosphorylation? *BioEssays* **16**, 809–815.
- Law, B. K., Waltner-Law, M. E., Entingh, A. J., Chytil, A., Aakre, M. E., Nørgaard, P., and Moses, H. L. (2000). Salicylate-induced growth arrest is associated with inhibition of p70<sup>S6K</sup> and down-regulation of c-Myc, cyclin D1, cyclin A, and proliferating cell nuclear antigen, *J. Biol. Chem.* **275**, 38261–38267.
- Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K., Oshiro, N., Hidayat, S., Tokunaga, C., Avruch, J., and Yonezawa, K. (2002) Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action, *Cell* **110**, 177–189.
- Montagne, J., Stewart, M. J., Stocker, H., Hafen, E., Kozma, S. C., and Thomas, G. (1999) *Drosophila* S6 kinase: A regulator of cell size, *Science* **285**, 2126–2129.
- Schmelzle, T., and Hall, M. N. (2000) TOR, a central controller of cell growth, *Cell* **103**, 253–262.
- Sánchez de Jiménez, E., Beltrán-Peña, E., and Ortiz-López, A. (1999) Insulin-stimulated ribosomal protein synthesis in maize embryonic axes during germination, *Physiol. Plant.* **105**, 148–155.
- García-Flores, C., Aguilar, R., Reyes de la Cruz, H., Albores, M., and 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.
- Pérez-Méndez, A., Aguilar, R., Briones, E., and Sánchez de Jiménez, E. (1993) Characterization of ribosomal protein phosphorylation in maize axes during germination, *Plant Sci.* **94**, 71–79.
- Scharf, K. D., and Nover, L. (1982) Heat-shock induced alterations of ribosomal protein phosphorylation in plant cell cultures, *Cell* **30**, 427–437.
- Turck, F., Kozma, S. C., Thomas, G., and Nagy, F. (1998) A heat-sensitive *Arabidopsis thaliana* kinase substitutes for human p70<sup>S6K</sup> function in vivo, *Mol. Cell Biol.* **18**, 2038–2044.
- Mizoguchi, T., Hayashida, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Kamada, H., and Shinozaki, K. (1995) Two genes that encode ribosomal-protein S6 kinase homologs are induced by cold or salinity stress in *Arabidopsis thaliana*, *FEBS Lett.* **358**, 199–204.
- Zhang, S.-H., Broome, M. A., Lawton, M. A., Hunter, T., and Lamb, C. J. (1994) *atpk1*, a novel ribosomal protein kinase gene from *Arabidopsis*. II Functional and biochemical analysis of encoded protein, *J. Biol. Chem.* **269**, 17593–17599.
- Murashige, T., and Skoog, C. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco cultures, *Physiol. Plant.* **15**, 473–479.
- Beltrán-Peña, E., Aguilar, R., Ortiz-López, A., Dinkova, T. D., and Sánchez de Jiménez, E. (2002) Auxin stimulates S6 ribosomal protein phosphorylation in maize thereby affecting protein synthesis regulation, *Physiol. Plant.* **115**, 291–297.
- Lane, H. A., and Thomas, G. (1991) Purification and properties of mitogen-activated S6 kinase from rat liver and 3T3 cells, *Methods Enzymol.* **200**, 268–291.
- O'Farrell, P. H. (1975) High resolution of two-dimensional electrophoresis of proteins, *J. Biol. Chem.* **250**, 4007–4021.
- Belham, C., Comb, M. J., and Avruch, J. (2001) Identification of the NIMA family kinases NEK6/7 as regulators of the p70 ribosomal S6 kinase, *Curr. Biol.* **11**, 1155–1167.
- Zhang, Y., Dong, Z., Namura, M., Zhong, S., Chen, N., Bode, A. M., and Dong, Z. (2001) Signal transduction pathways involved in phosphorylation and activation of p70S6K following exposure to UVA irradiation, *J. Biol. Chem.* **276**, 20913–20923.
- Law, B. K., Nørgaard, P., Gnudi, L., Kahn, B. B., Poulson, H. S., and Moses H. L. (1999) Inhibition of DNA synthesis by a farnesyltransferase inhibitor involves inhibition of the p70<sup>S6K</sup> pathway, *J. Biol. Chem.* **274**, 4743–4748.
- White, M. F. (1998) The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin action, *Mol. Cell Biochem.* **182**, 3–11.
- Brown, E. J., Albers, M. W., Shin, T. B., Ichikawa, K., Keith, C. T., Lane, W. S., and Schreiber, S. L. (1994) A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex, *Nature* **369**, 756–758.
- Shah, O. J., Kimball, S. R., and Jefferson, S. (2000) Among translational effectors, p70<sup>S6K</sup> is uniquely sensitive to inhibition by glucocorticoids, *Biochem. J.* **347**, 389–397.
- Dennis, P. B., Pullen, N., Kozma, S. C., and Thomas, G. (1996) The principal rapamycin-sensitive p70<sup>S6K</sup> phosphorylation sites, T-229 and T-389, are differentially regulated by rapamycin-insensitive kinase kinases, *Moll. Cell Biol.* **16**, 6242–6251.
- Shima, H., Pende, M., Chen, Y., Fumagalli, S., Thomas, G., and Kozma, S. C. (1998) Disruption of the p70s6k/p85s6k gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase, *ENBO J.* **17**, 6649–6659.
- Thomas, G. (2002) The S6 kinase signaling pathway in the control of development and growth, *Biol. Res.* **35**, 305–513.
- Kozma, S. C., and Thomas, G. (2002) Regulation of cell size in growth, development and human disease: PI3K, PKB, and S6K, *BioEssays* **24**, 65–71.
- Zhang, H., Stallock, J. P., Ng, J. C., Reinhard, D., and Neufeld, T. P. (2000) Regulation of cellular growth by the *Drosophila* target of rapamycin dTOR, *Genes Dev.* **14**, 2712–2724.
- Proud, C. G. (2002) Regulation of mammalian translation factors by nutrients, *Eur. J. Biochem.* **269**, 5338–5349.
- Menard, 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.
- Scott, P. H., Brunn, G. J., Kohn, A. D., Roth, R. A., and Lawrence, J. C., Jr. (1998) Evidence of insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin mediated by protein kinase B signaling pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 7772–7777.
- Huffman, T. A., Mothe-Satney, I., and Lawrence, J. C., Jr. (2002) Insulin-stimulated phosphorylation of lipin mediated by the mammalian target of rapamycin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 1047–1052.

BI035222Z



Entrez

PubMed

Nucleotide

Protein

Genome

Structure

PMC

Taxonomy

BL



# Nucleotide

Search Nucleotide

for

Go

Clear

Limits

Preview/Index

History

Clipboard

Details

Display

default

Show: 20

Send to

File

Get Subsequence

F

1: AY389497. Zea mays cultivar...[gi:37575480]

Links

LOCUS AY389497 1861 bp mRNA linear PLN 16-JAN-2004

DEFINITION Zea mays cultivar Chalqueno ribosomal protein S6 kinase mRNA, complete cds.

ACCESSION AY389497

VERSION AY389497.1 GI:37575480

KEYWORDS .

SOURCE Zea mays

ORGANISM [Zea mays](#)

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; Liliopsida; Poales; Poaceae; PACCAD clade; Panicoideae; Andropogoneae; Zea.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1861)

AUTHORS Reyes De La Cruz,H., Aguilar,R. and Sanchez De Jimenez,E.

TITLE Functional Characterization of a Maize Ribosomal S6 Protein Kinase (ZmS6K), a Plant Ortholog of Metazoan p70(S6K)

JOURNAL Biochemistry 43 (2), 533-539 (2004)

PUBMED [14717609](#)

REFERENCE 2 (bases 1 to 1861)

AUTHORS Reyes de la Cruz,H. and Sanchez de Jimenez,E.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (12-SEP-2003) Departamento de Bioquimica, Facultad de Quimica, UNAM, Conjunto E, Paseo de la Investigacion Cientifica, Circuito Institutos, Ciudad Universitaria, DF 04510, Mexico

FEATURES

Location/Qualifiers

source

1..1861

/organism="Zea mays"

/mol\_type="mRNA"

/cultivar="Chalqueno"

/db\_xref="taxon:4577"

/tissue\_type="scutellum-eliminated embryonic axes"

/dev\_stage="48 hour germinated seeds"

/note="authority: Zea mays L."

CDS

158..1624

/note="ZmS6K; expressed in the embryonic axes during germination"

/codon\_start=1

/product="ribosomal protein S6 kinase"

/protein\_id="AAQ93804.1"

/db\_xref="GI:37575481"

/translation="MVSSQPSSLTILAQGNHCPVKILLPMGPPDVSSDNVEYDFS  
DVGSTPVQTPTNLCGFGPESPAPTAESNEEFYSDPVVIINRSHSLVGPSTLVSRSLR  
LSKLSLKGNEGSSSELVKCLSEEKEGDQGLSDEDLGNAMTEDGGIGLDDLEILKLVGQ  
GAFGKVFQVRKNTSEIYAMKVMRKDRILEKNHSEYMKAEEREILTKVDHPFIVQLRYS  
FQTKYRLYLVLDFINGGHLFFQLYKQGLFREELARIYTAEIVSAVAHLHANGIMHRDL  
KPENILLDADGHAML TDFGLAKEFCENTRSNSMCGTLEYMAPEIVLGRGHDKAADWWS

VGILLFEMLTGKPPFVGNREKVQKIIKDKLKLPSFLSSEAHSLLRGLLHKEPNKRLG  
SCPGGSNEIKNHKWFKPINWRKLEARQIQPSFRPNVAGLTCIANFDDDECWTKTPVLD  
SPVSTPAGGGHSNFAGFTYVRPAPILEEVNASGSRLKD"

ORIGIN

```
1 tctcttattc aacagcgaac agaagcatca tctttctctg ccttttcgcg ggatacttgg
61 gaattcctgg tgaaggttc gctggaggaa gcctaattta gtcttcactg tagtanaaat
121 ttggcctaaa gagttttag gctttcaagc ttcagaaatg gtttcttctc agccatcctc
181 tctgactgca atcctcgcac agggccca cactgcca gtcaagatac tcctcccaat
241 ggggccccca gatgtcgtct cctcagataa tgttgagtac gatttctctg atgtttttgg
301 ttccaccccg gtccaaacac caacaaacct ttgtggtttt ggtccggaga gtcctgcacc
361 tactgctgag tccaatgaag aattttacag tgatcctggt gtcacatca accgatcaca
421 ttctctgtc ggtccaacat cacttgctcag ccgctccttg cgacttagca agcttagtct
481 aggaaaaaac gagggatcat cggaaactgt caagtgcctc tcagaagaaa aggaagggga
541 ccaagggcag ctgagtgtg aagatctggg taatgctatg acagaggatg ggggcattgg
601 gcttgatgac ttagaaatct tgaagcttgt tggccaaggg gcattcggtg aagtatttca
661 ggtgagaaaag aaaaacacct cagagatata tgcaatgaaa gttatgagga aggacaggat
721 actagaaaaa aaccattctg aatatatgaa ggccgagaga gagatattga caaaagtcga
781 ccaccctttc atagtgcagc tgaggtaact atttcagacg aaatatcgac tttaccttgt
841 cctggacttc ataaacgggg ggcacttttt ctttcagctc tacaagcaag gattatttag
901 ggaggagctt gcaagaatct atacagctga aattgtatct gctgtagcgc atcttcatgc
961 taatggaatt atgcataggg atctcaagcc cgaaaacatc cttctggatg ctgatggcca
1021 tgccatgctc acagactttg gccttgcgaa ggagttctgt gaaaatacca gatcaaacctc
1081 aatgtgtggc actctcgagt acatggcccc ggaaattggt cttggccggg ggcatagata
1141 ggctgctgac tgggtggagcg tgggaatcct gctgtttgaa atgcttacag gcaagcccc
1201 atttgttggg aatagggaga aagttcagca gaagattata aaagacaaac tgaagcttcc
1261 ttcatctctg tctagtgaag ctcatccct cctgagaggc ctgctacaca aggaaccaca
1321 caagcggctg ggcagctgcc ccggaggcag caacgagata aaaaaccaca agtggttcaa
1381 gccaatcaac tggaggaagc tggaggcccc gcagatccag ccgagcttcc ggccgaacgt
1441 cgccgggctt acctgtatcg ccaacttcca cgacgacgag tgctggaaga agacgcccgt
1501 gctggactct ccggtaaagc cccccgctgg tggcgggcac agcaacttcc cggggttcc
1561 ctacgtcagg cccgcgccga tccttgagga ggtgaacgca tccggctcta ggctcaagga
1621 ctaaggatgt ttagccatt gaagatgtgc ttaaaatctt gatcagatga catgtatgga
1681 aacttaaggg ggtgtttggg aacaaagttt ttctgcagtt ttggaagaat actgcagtat
1741 tctcaaatat tgcagtatta tatacataat ggtgtttggc aagctgggta aaatctctgt
1801 tttcaaaact gaagtattgc aaatactata gttgttttaa ggcaaaaaaa aaaaaaaaaa
1861 a
```

//

Disclaimer | Write to the Help Desk  
NCBI | NLM | NIH

Aug 30 2004 07:13:44

Title:

**Dissecting a Signal Transduction Pathway that Regulates Cell Growth in Maize Seedlings.**

Reyes de la Cruz Homero\*<sup>‡</sup>, Dimitrova Dinkova Tzvetanka\*<sup>‡</sup>, García-Flores Cristina\*, Aguilar Raul\*, Jiménez-García Luis Felipe<sup>†</sup> and Sánchez de Jiménez Estela\*<sup>§</sup>.

\*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Facultad de Química, and <sup>†</sup>Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria 04510, México, D. F.

<sup>‡</sup> Have made similar contribution to this work.

**Corresponding autor:**

<sup>§</sup> Estela Sánchez de Jiménez  
Paseo de la Investigación Científica  
Circuito Institutos, Facultad de Química,  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Ciudad Universitaria 04510, México, D.F.  
Telephone number: 52(55)-5622-5278  
Fax number: 52(55)-5622-5329  
Email: [estelas@servidor.unam.mx](mailto:estelas@servidor.unam.mx)

**Running Title:** Cell growth regulation in maize



## Summary

Insulin and “insulin-like” growth factors (IGFs) regulate cell growth in eukaryotes by stimulating a signal transduction pathway that exerts translational control. No similar pathway has been described in plants. However, insulin or an insulin-related maize peptide (ZmIGF), have shown to accelerate maize seed germination, seedling growth and protein synthesis. The objective of this work was to inquire whether these effects are induced through a pathway similar to the one described for insulin/IGF in animals.

Insulin/ZmIGF dose-response experiments were performed to define optimum concentration for maize seedling growth. ZmIGF was immunolocalized *in situ* in root and coleoptile meristems of germinating maize axes. Significant increment on ribosomal protein synthesis was induced by Insulin/ZmIGF in maize axes and changes in *the novo* synthesized cytoplasmic proteins were also observed. RT-PCR analysis of total and polysomal RNA, isolated from insulin/ZmIGF-stimulated axes, revealed specific mRNA recruitment into polysomes for translation, and activation of the endogenous S6 ribosomal protein kinase (ZmS6K). The above effects were reversed by rapamycin, an inhibitor of the insulin-induced signal transduction pathway in animals. Taken together these data strongly suggest that a signal transduction pathway, similar to that stimulated by insulin in animals, regulates translation and cell growth in maize seedlings.

## Introduction

Gene expression is translationally regulated in eukaryotic cells during a variety of cellular responses (1). Such regulation is exerted mainly at the level of translation initiation. Particularly, ribosomal protein synthesis is known to be under translational control in higher organisms (2, 3) including plants, (4, 5). In mammals, the mechanism for this regulation has been largely investigated, since it is part of an overall insulin/IGF-stimulated pathway that regulates cell growth and/or cell proliferation (6). Indeed, insulin and members of the family of peptidic growth factors, IGFs I and II ("insulin-like" growth factors), stimulate the phosphatidylinositol-3-kinase pathway (7, 8) that targets two main protein kinases, mTOR (target of rapamycin) and p70<sup>S6K</sup> (S6 ribosomal protein kinase). Both kinases have been demonstrated to play a central role on cell growth regulation (9, 10) through activation of target proteins involved in translation rate stimulation.

In animals, the mTOR kinase targets two main downstream effectors, the eIF4E binding protein (4E-BP), and the ribosomal protein S6 kinase (11, 12). On one side, mTOR directly phosphorylates 4E-BP increasing the levels of free eIF4E for overall, as well as, specific translation initiation. On the other, the S6 kinase activated by the insulin/IGF signal pathway induces ribosome hyperphosphorylation of S6 ribosomal protein (S6rp) on the 40S ribosomal subunit (13, 14). Although the precise mechanism involved in these process is not completely understood, selective recruitment into polysomes of mRNAs containing a track of pyrimidines at their 5'UTR (5'TOP) (2) is observed in the activated cells.

These events result in specific increment of ribosomal protein synthesis, since most of the encoding ribosomal protein mRNAs contain the 5' TOP signal (15). By this signal transduction pathway, the insulin/IGF stimulatory effect ultimately results in increased cell growth/proliferation (16).

Although in plants no similar pathway has been described, insulin-related peptides have been reported in several species (17, 18, 19). The physiological role of these peptides has not been elucidated yet. However, it has been demonstrated that insulin stimulates seed germination and seedling growth of several dicot and monocot plants (4, 20). Furthermore, insulin application to germinating maize axes showed induction of ribosomal protein synthesis and S6rp phosphorylation, suggesting that a signal transduction pathway responsive to this stimulus is present in maize. Recently, a maize insulin-related peptide (ZmIGF), sharing specific epitopes with insulin, was found to produce growth acceleration effects similar to those induced by insulin on seed-germinating tissues. Thus, suggesting that ZmIGF might represent the endogenous effector for a signal transduction pathway similar to that stimulated by insulin (21).

Based on the above information the objective of the present work is to search deeper into the biochemical events involved in the signal transduction pathway that regulates cell growth in maize seedlings by insulin-related factors. According to our results we conclude that a signal transduction pathway, similar to the one described to promote cell and organ growth in animals by insulin/IGF, is present in maize tissues and might perform similar function.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Biological Material and Germination Conditions

Maize (*Zea mays* L.) seeds from a Mexican variety (Chalqueño) were used for all experiments. Sets of 100 seeds each, were imbibed between two rolled filter papers, either in water (control), ZmIGF (final concentration: 100, 200, 400, 600  $\mu\text{Uml}^{-1}$ ) or water plus 200  $\mu\text{Uml}^{-1}$  bovine insulin (Sigma, St. Louis, MO), during 72 h at  $24 \pm 2$  °C in darkness. Seedling size (root and coleoptile) was measured in each set at the end of the period.

### Purification of ZmIGF SDS-gel electrophoresis

ZmIGF was purified from maize axes according to (21) by affinity chromatography column using insulin antibody as trapping agent. SDS-PAGE was performed with 12 % polyacrylamide gels (22). ZmIGF units were approximately calculated based on a dot blot standard curve performed with bovine insulin as previously reported (21).

### Immunofluorescence.

Small pieces of maize embryonic axes were fixed with freshly prepared 4% paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4 for 60 min at room temperature. Samples were then processed for histological techniques. Briefly, the samples were dehydrated in a graded ethanol series at room temperature and embedded in paraplast. Sections of 3  $\mu\text{m}$  in thickness were obtained and mounted

on silanized slides. Samples were then deparafinized and rehydrated and an antigenic recovery procedure with proteinase K (Proteinase K ready to use, Dako) for 5 min at room temperature was performed. The samples were incubated with goat anti-guinea pig IgG secondary antibody coupled to Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) diluted 1:20 in PBS, for one and a half hours at room temperature. The sections were counterstained with 0.1  $\mu\text{l}/\mu\text{l}$  of DAPI for DNA and then mounted with antifading in fluorescence medium (Vector, H-1000, Burlingame, CA). The samples were analyzed with a Nikon E800 epifluorescence microscope equipped with a Plan Fluor 63X objective (N.A. 1.4) and a triple band filter (Chroma). Images were taken with a DAGE-MTI DC-330 CCD camera coupled to a computer using the software Flashpoint 3D FPG.

### **Protein synthesis and electrophoretic analysis**

Maize embryonic axes (500 mg) were manually excised after 22 h of seed germination and incubated for 2 h in MS medium with 200  $\mu\text{U}$  of either ZmIGF or insulin, or water (control), in the presence of 200  $\mu\text{Ci}$  [ $^{35}\text{S}$ ]-methionine (1000 Ci  $\text{mmol}^{-1}$ , Amersham). Axes were homogenized and cytoplasmic and ribosomal proteins were obtained accordingly (5). Samples of both ribosomal and cytoplasmic proteins were counted in a liquid scintillation counter. Protein concentration was determined by the Bradford procedure (23).

Cytoplasmic proteins were analyzed by 2-D electrophoresis. For the isoelectrofocusing (IEF), IPG strips forming a linear 3 to 10 pH gradient (BIORAD)

was used. IPG strips were rehydrated for 12 h at 20°C with the rehydration/sample buffer containing 8 M urea, 2% CHAPS, 50 mM DTT, 0.2% Bio-lyte and 150 µg of protein.

IEF was performed at 20°C and run in a PROTEAN IEF Cell (BIORAD) for 20 min at 250 V, 2h at 4,000 V and 5 h at 10,000 V. Before the second dimension, each IPG strip was incubated at room temperature for 15 min in equilibration solution I (6 M urea, 0.37 M Tris pH 8.8, 2% SDS, 20% glycerol, 2% (W/V) DTT) and for 15 min in equilibration solution II (6 M Urea, 0.375 M Tris PH 8.8, 2% glycerol, 2.5% (W/V) iodo acetamide). Proteins were then resolved by polyacrilamide gels as indicated. The gels were analyzed by fluorography and Coomassie blue staining.

#### **Total and polysomal RNA isolation. RT-PCR analysis**

Maize seeds were germinated on moisturized cotton, in the dark at 25 °C, for 22 h. The embryonic axes were excised and incubated for 2 h in MS medium (1.5 ml g<sup>-1</sup> axes) alone (control) or in the presence of 200 µM ml<sup>-1</sup> of either insulin (insulin-stimulated), or ZmIGF (ZmIGF-stimulated). Rapamycin (0.1 µM), an inhibitor of the insulin-related signal transduction pathway (24, 25), was included in some experiments. After incubation, the axes were either frozen in liquid nitrogen and stored at -70 °C or used immediately.

Total RNA was isolated from 0.4 g of maize embryonic axes by the TRIZOL reagent method (BRL, Life technologies/Invitrogen). Additional RNA purification with LiCl followed according to (26), to further clean the RNA preparation.

Polysomes and polysomal RNA were isolated from 0.75 g of embryonic axes according to (27) and modified by LiCl precipitation (26). RNA concentration was calculated by spectroscopic measurements and samples for reverse-transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) were diluted to  $0.1 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$  with DEPC-treated water. For RT-PCR assays, 200 ng of total or polysomal RNA were reverse-transcribed-amplified with gene specific oligonucleotides designed from maize-coding sequences in a one-step reaction (one step RT-PCR, Platinum Taq, Invitrogen). The primer sequence were as follows: for Glyceraldehyde 3-P-dehydrogenase (GA3PDH) FW: 5'CCTTGACCGCAGCCTTGATCCTACATC3', RV: 5'-ACCCATCCTCGTTTCCTCCGTCTAG-3'; for ribosomal protein "6 (rp S6) FW: 5'-TGATGCTCTGGGTGAGGAGTTAAA-3', RV: 5-TTCCTTCAGCCTCTGGGCAAGAAG-3'; for eukaryotic translation initiation factors (eIF4E) FW: 5-ATGGCCGAGGAGACCGACACCA-3'; RV: 5'-TTCCAGATCAAACC-3'; and (eIFiso4E) FW: 5'-GCGACATGGCGGAGGTCGAGGCT-3', RV: 5'-GGCCTTCTTGACGTCCAGCTTAC-3'.

### **S6rp-phosphorylation**

Maize embryonic axes (500 mg) excised from 22 h germinated seeds were stimulated or not with 200  $\mu\text{M}$  ZmIGF and fed with 400  $\mu\text{Ci}$  [ $^{32}\text{P}$ ]-orthophosphate (Amersham Pharmacia Biotech) and incubated for 2 h in liquid Murashige-Skoog medium (MS) (28). At the end of this period, ribosomes and ribosomal proteins were obtained from the axes as described (5). Ribosomal proteins were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography.

### **ZmS6K immunoprecipitation and activity assay**

ZmS6K was obtained by immunoprecipitation with anti-human p70<sup>S6K</sup> antibody from extracts of maize embryonic axes. The ZmS6K immunoprecipitate was incubated with A-sepharose (Amersham Biosciences) for 2 h at 4 °C according to Reyes de la Cruz, et al. (29). The A-sepharose-antibody-protein kinase complex was collected at the bottom of 1.5 ml Eppendorf tubes by centrifugation in a GS-15R microfuge. The supernatant was discarded and the pellet washed three times with 1 ml each of buffer B and then twice with buffer A. Finally, the pellet was resuspended in dilution buffer.

ZmS6K activity was assayed *in vitro* on 10  $\mu\text{l}$  of this complex according to (29), in a 20  $\mu\text{l}$  reaction mixture containing: reaction buffer, 100  $\mu\text{M}$  ATP, 5  $\mu\text{Ci}$  (3000 Ci  $\text{mmol}^{-1}$ ) [ $^{32}\text{P}$ ]- $\gamma$ -ATP, 5  $\mu\text{g}$  RSK peptide (Calbiochem Co.) as substrate, and PKC and PKA inhibitors (100 and 150 ng respectively). The reaction mixture was incubated 30 min at  $24 \pm 2$  °C, stopped by applying the 20  $\mu\text{l}$  of the reaction mix to p81 phosphocellulose circle papers (Whatman Co.), extensively washed with 0.85



% v/v phosphoric acid during 24 h and finally washed with acetone. The papers were dried at room temperature and placed in vials for liquid scintillation counting.

### **Western blot assays**

ZmIGF was identified by Western blot using guinea-pig polyclonal antibody raised against bovine insulin (Sigma Co.) (dil. 1:3000) as the first antibody. Anti-guinea-pig IgG antibody coupled to peroxidase (Sigma Co.) (dil. 1:2000) was used as second antibody. For ZmS6K, a rabbit antibody raised against human p70<sup>S6K</sup> (Sta. Cruz Biotechnologies) (dil. 1:2000) was used as first antibody and the anti-rabbit IgG antibody coupled to peroxidase (BIO-RAD) (dil. 1:2000) as second antibody. All membranes were developed by a chemoluminescent method (ECL; Amersham Pharmacia Biotech).

## RESULTS

### **ZmIGF content and physiological effect on maize axes during germination**

Maize embryonic axes extracts from different germinating periods, 0 h (quiescent stage) to fully germinated seeds (48 h) were resolved by SDS-PAGE and analyzed by Western blot with anti-bovine insulin as first antibody (Fig. 1 A). Data showed an increased content of a cross-reacting-protein of 20 kDa (ZmIGF). To use as effector, ZmIGF was isolated from (24-48 h) germinating maize axes, according to previous report by affinity chromatography using anti-bovine insulin antibody as the ligand agent. Its concentration was estimated by dot blot versus an insulin-standard curve (21).

Different concentrations of either insulin or ZmIGF were applied to maize seeds to test their physiological effect on seed germination. Groups of 100 maize seeds each were germinated with water or water-plus-effector in a range of concentrations (100 to 600  $\mu\text{U mL}^{-1}$ ). Most seeds germinated within 28 to 36 h; the insulin/ZmIGF-stimulated seeds germinated faster. At 72 h, measurements of root and coleoptile length were performed on the growing seedlings. Average length values were recorded and presented as a dose-response plot (Fig. 1 B). Data show a significant length increment in both, coleoptile (Fig 1 B left) and root (Fig. 1 B right) for the insulin- and ZmIGF-stimulated seeds ( $p < 0.01$ ), compared with the control. Growth stimulation proved to be a function of insulin/ZmIGF concentration with a maximum stimulus at approximately 200  $\mu\text{U mL}^{-1}$ . Higher concentrations

produced an inhibitory effect, more pronounced on coleoptile than on root enlargement (Fig. 1 B).

### **ZmIGF *in situ* immunolocalization in maize axes**

Localization of the ZmIGF peptide by *in situ* immunofluorescence was performed in tissues from embryonic axes using anti-insulin primary antibody and a secondary antibody coupled to rhodamine. Counterstaining was used to localize DNA. Intense red fluorescence labeling was observed in the cytoplasm of cells from the apical (Fig. 2 a-b) and the root (d-e) areas. These cells correspond to actively growing tissues (meristematic zone). No signal was detected in the controls where the primary antibody was omitted (Fig. 2 c, f). The distribution of the signal was not homogeneous but was observed as discrete spots. In addition, the intracellular distribution displays a cytoplasmic pattern resembling that of the endoplasmic reticulum. In spite of observing fluorescence labeling in several cells, not all cells in the area were labeled. A faint fluorescence labeling was also noted in some other cell types.

### **Insulin/ZmIGF effect on protein synthesis**

Insulin/IGF-induced selective translation of ribosomal proteins has been reported in animal tissues (1). To investigate whether ZmIGF might exert a similar regulatory effect on maize tissues, maize embryonic axes isolated after 22 h of germination were incubated with 200  $\mu\text{U mL}^{-1}$  of either ZmIGF, insulin or water and [ $^{35}\text{S}$ ]-methionine (200  $\mu\text{Ci}$ , 1000  $\text{Ci mmol}^{-1}$ ) for 2 h. Cytoplasmic and ribosomal proteins

were obtained from these axes and the incorporated radioactivity was determined by liquid scintillation counting. Total amount of [<sup>35</sup>S] incorporated into ribosomal proteins significantly increased in the insulin/ZmIGF-stimulated axes whereas this was not the case for the cytoplasmic proteins, where similar values of incorporated [<sup>35</sup>S]-methionine were found in the three experimental groups after correction for [<sup>35</sup>S]-methionine uptake (Fig. 3 A).

To test whether the specific increase in ribosomal protein synthesis was due to activation of a signal transduction pathway, similar to that induced by insulin in metazoan, rapamycin (0.1 μM) was added to some of the axes. This macrolide is an inhibitor of the insulin-induced signal transduction pathway in animals (15, 24). Results showed that, indeed, the increment of ribosomal protein synthesis was blocked by rapamycin in the stimulated axes (Fig. 3 A).

The Insulin/ZmIGF effect on the translation process was further analyzed. Although the total amount of [<sup>35</sup>S] incorporated was not significantly increased by the effector stimulation, specific changes may occur for some proteins that could be masked by the total amount of [<sup>35</sup>S] incorporated. Thus, cytoplasmic proteins were resolved by 2-D gel electrophoresis and fluorography. Indeed, the patterns of the ZmIGF/insulin-stimulated axes showed clear differences in some labeled spots, compared with the control (Fig. 3 B). Taken together, the above data indicate a ZmIGF/insulin stimulatory effect on translation of specific mRNAs.

### **Selective mRNAs recruitment into polysomes**

It has been demonstrated that insulin-stimulated animal cells selectively recruit mRNAs, encoding ribosomal proteins and translation factors into polysomes for translation (6, 13). These mRNAs are known as 5'TOP mRNAs due to a pyrimidine cluster present at their 5'UTR. To test whether the increment on specific ribosomal protein synthesis observed for the insulin/ZmIGF-stimulated axes is due to a similar mechanism, total as well as polysomal RNAs were isolated from axes under the same conditions as described above. RT-PCR was performed on these RNAs with oligonucleotide probes designed for four genes (see Materials and Methods). These were: glyceraldehyde 3-P dehydrogenase (GA3PDH) as control, and three mRNAs encoding for translational apparatus proteins: S6 ribosomal protein, and translation initiation factors eIF-4E and eIF-iso4E. Similar quantities for these mRNAs were found in the total RNA fraction for ZmIGF, ZmIGF + rapamycin, insulin or control samples (Fig. 4 left), indicating that ZmIGF or insulin do not stimulate transcription of these genes. It is interesting to notice that the S6rp mRNA, in the ZmIGF or insulin-stimulated axes was present even on lower amounts than in the control, but its content was restored in the rapamycin-containing set. On the other hand, the RT-PCR products of the polysomal mRNAs revealed a differential effect (Fig. 4 right). eIFiso4E and S6rp mRNAs showed a significant increment in the samples from stimulated axes, compared with the control. On the other hand, the eIF4E and GA3PDH mRNAs did not increase, but remained unaltered after ZmIGF or insulin-stimulation (Fig. 4 right). These data indicate selective mRNA recruitment (S6rp and eIFiso4E) into the polysomes by the influence of the effectors. Furthermore, rapamycin, the specific inhibitor of the

insulin-stimulated signal transduction pathway, blocked the ZmIGF-induced mRNAs recruitment, since the levels of S6rp and eIFiso4E mRNAs in the corresponding polysomal RNA samples remained similar to those in the control. These data are consistent with the results of the protein synthesis experiments and further confirm the translational control exerted by insulin/ZmIGF in maize, where the synthesis of ribosomal proteins and of other proteins related to translation, as eIFiso4E, are selectively regulated.

### **Insulin/ZmIGF-induced S6rp kinase activity and S6rp phosphorylation**

The following experiments were performed to elucidate whether the signal transduction pathway exerted by ZmIGF involves S6 kinase activation, as the mechanism that has been described for insulin in the mammalian system (6).

Activation of the insulin-stimulated pathway in mammals induces a cascade of phosphorylation reactions (6, 30), among which activation of mTOR kinase and p70<sup>S6K</sup>, have been identified. Both kinases play a central role in cell growth regulation (6, 8, 24). In order to test whether the maize orthologue enzyme (ZmS6K), might also be activated *in vivo* by insulin/ZmIGF, the following experiments were performed. Duplicate sets of maize axes were stimulated with ZmIGF (Z) or insulin (I) or not (C), as above. In one set [<sup>32</sup>P]-orthophosphate was also included for 1 h in the incubation medium. After the incubation period, ZmS6K was immunoprecipitated by human p70<sup>S6K</sup> antibody and its activity *in vitro* assayed as reported (25, 29). Total enzyme content was determined by Western blot in the axes extracts. Results showed that while the amount of ZmS6K protein remained constant in all the experimental samples (Fig. 5A), the ZmS6K activity was higher

in both, the ZmIGF- and the insulin-stimulated axes, compared with the control (Fig. 5 B). On the other hand, the [<sup>32</sup>P] labeled axes set was used to confirm that ZmS6K activation resulted in *in vivo* S6rp phosphorylation in the 40S ribosomal subunit. Indeed, the isolated ribosomal proteins from these axes, resolved by SDS-PAGE and autoradiography, showed higher [<sup>32</sup>P] incorporation into S6rp from the ZmIGF-or the insulin-stimulated axes, compared with the control (Fig. 5 C).

## Discussion

Many reports have demonstrated that cell growth/proliferation is tissue-specific regulated in eukaryotes through an insulin/IGF-stimulated signal transduction pathway (11, 30). In this research, we approached the biochemical basis underlying a mechanism that regulates cell growth proliferation in maize seedlings. To our knowledge, this is the first report on a pathway, similar to that stimulated by insulin in animals, described for plants.

Indeed, our results show that seedling growth (Fig. 1 B) and specific translation of ribosomal proteins (Figs. 3 A, and 4) can be induced in maize embryonic axes, similarly as in animal systems after insulin/IGF stimulation (2, 6). In the present case, the stimulation was obtained either by ZmIGF or insulin at concentrations of the same order of magnitude as that used in animal systems (Fig. 1) (21). Antecedents from lower eukaryotic organisms (31), such as flies (32), nematodes (33) and also plants (19, 21, 34) indicate the presence of insulin-related peptides (IGFs) in these organisms. It seems that these peptides share common epitopes with insulin that allow their recognition either by insulin antibody (Figs. 1 and 2) or, by the insulin-receptor (35). Recent reports also indicate that chick embryonic tissues, at very early developmental stages, express a proinsulin protein, not intended to be processed to insulin, but instead, having itself a very important role as apoptotic attenuator during differentiation (36). All this information strongly suggest that proinsulin/IGF-related peptides have a common and early evolutionary origin (32, 33), thus allowing to assume that they also might have similar basic functions in all these organisms. In agreement with this proposal, our



data showed that a basic signal transduction pathway is present in maize tissues, susceptible to be stimulated by insulin/ZmIGF, that responds with physiological and biochemical processes similar to those reported for several other eukaryotes (11, 13, 30) mainly: accelerated growth (Fig. 1B), specific 5'TOP mRNA recruitment for translation into polysomes (Fig. 4), specific phosphorylation of S6 ribosomal protein in the 40S subunit activation by phosphorylation of the ZmS6 kinase (Fig. 5), the ortholog enzyme of the mammalian p70<sup>S6K</sup> (29), and its sensitiveness to rapamycin (Figs. 3, 4) the specific inhibitor of the mTOR (Target of Rapamycin) kinase (24). It is interesting to note that this enzyme lies upstream p70<sup>S6K</sup> in the transduction pathway that regulates cell growth in animals (13, 24), as well as in plants as follows from recent report demonstrating that disruption in Arabidopsis of AtTOR leads to the premature arrest of endosperm and embryo development (37), further supporting the central role of these enzymes in cell growth regulation.

Although the identification of a putative receptor for insulin/ZmIGF has not been described in plants, plant membrane-receptors with similar characteristics of those described for animals have been reported (38). Further, a hetero-dimeric insulin/IGF receptor present in the chick embryonic retina (35) has shown to also bind proinsulin, all this indicating the existence of a wide family of similar receptors type. Since the specific effector-receptor recognition is mainly based on peptide secondary and tertiary structural similarities, it shall be pointed out that the insulin/ZmIGF stimulatory effect on maize axes has proved to be dependent on these grownds. In fact, tertiary structural cues present in these effector peptides are relevant for this recognition, since DTT disruption of insulin structure or trypsin

digestion of ZmIGF completely abolish their stimulatory effect in maize axes (21). This information strongly suggest that a basic structural specific recognition, evolutionary conserved in these effectors, is necessary in order to stimulate the cell growth regulated- signal transduction pathway in maize.

On the other hand, ZmIGF is localized in restricted regions corresponding to meristematic cells of maize embryonic axes where cell growth and proliferation take place (Fig. 2). This strengthens the role of ZmIGF as the putative endogenous effector (or else its precursor). That regulates TOR function within this signal transduction pathway in actively growing maize tissues. Such interpretation is also supported by the fact that expression of a TOR kinase in other plant species was found in primary meristems but not in differentiated cells (39).

All these data drive to the conclusion that in plants, a highly conserved signal transduction pathway regulates cell growth, in a similar fashion as the one described for non-plant eukaryotes (32, 40). Indeed, ZmS6K (ortholog for mammalian p70<sup>S6K</sup>) and TOR kinases seems to be the main players of this pathway whereas induction of ribosomal protein synthesis (Fig. 3A), and selective 5'TOP mRNA recruitment into polysomes (Fig. 4) are the main targets of the pathway that regulates cell growth in maize tissues.

In summary, the data presented here reveal the existence in maize, of a signal transduction pathway that regulates cell growth by stimulating basic mechanisms of translational control. This pathway proved to have similar characteristics as the

insulin/IGF-induced pathway that regulates cell growth in animals. Such findings allow proposing that this cell-growth regulatory pathway has evolved in eukaryotes from a common origin, before separation of the plant and animal kingdoms.

## References

1. Raught, B., Gingras, A. C., and Sonenberg, N. (2000) in *Translational Control of Gene Expression*, eds. Hershey, J. W. B., Mathews, M. B. and Sonenberg, N. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York), pp. 245-293
2. Meyuhas, O. (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**, 6321-6330
3. Caraglia, M., Budillon, A., Vitale, G., Lupoli, G., Tagliaferri, P., and Abbruzzese, A. (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**, 3919-3936
4. Sánchez de Jiménez, E., Beltrán-Peña, E., and Ortiz-López, A. (1999) *Physiol. Plant.* **105**, 148-154
5. Beltrán-Peña, E., Aguilar, R., Ortiz-López, A., Dinkova, T. D., and Sánchez de Jiménez, E. (2002) *Physiol. Plant.* **115**, 291-297
6. Thomas, G. (2002) *Biol. Res.* **35**, 305-313.
7. Vanhaesebroeck, B., and Alessi, D. R. (2000) *Biochem. J.* **346**, 561-576

8. Glass, D. J. (2003) *Trends Mol. Med.* **9**, 344-350
9. Montagne, J., Stewart, M. J., Stocker, H., Hafen, E., Kozma, S. C., and Thomas, G. (1999) *Science* **285**, 2126-2129
10. Lawlor, M. A, Mora, A., Ashby, P. R., Williams, M. R., Murray-Tait, V., Malone, L., Prescott, A. R., Lucocq, J. M., and Alessi, D. R. (2002) *EMBO J.* **21**, 3728-3738
11. Gingras, A.C., Raught B., and Sonenberg, N. (2001) *Genes Dev.* **15**,807-826
12. Miron M., Lasko P., and Sonenberg, N. (2003) *Mol. Cell Biol.* pp. 9117-9126
13. Fumagalli, S., and Thomas, G. (2000) in *Translational Control of Gene Expression*, eds. Hershey, J. W. B., Mathews, M. B. and Sonenberg, N. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York), pp. 695-718
14. Lizcano, J. M., Alrubaie, S., Kieloch, A., Deak, M., Leever, S. J., and Alessi, D. R. (2003) *Biochem. J.* **374**, 297-306
15. Grolleau, A., Bowman, J., Pradet-Balade, B., Puravs, E., Hanash, S., Garcia-Sanz, J. A., and Beretta, L. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 22175-22184

16. Fingar, D.C., Salama, S., Tsou, C., Harlow, E., and Blenis, J. (2002) *Genes Dev.* **16**, 1472-1487.
17. Collier, E., Watkinson, A., Cleland, C. F., and Roth, J. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 6238-6247
18. Hirano, H., Kagawa, H., and Okubo, K. (1992) *Phytochemistry* **31**, 731-735
19. Oliveira, A. E. A., Machado, O. L. T., Gomes, V. M., Xavier-Neto, J., Pereira, A. C., Vieira, J. G. H., Fernandes, K. V. S., and Javier-Filho, J. (1999) *Protein Peptide Lett.*, **6**, 15-21
20. Goodman, D. B., and Davis, W. L. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **190**, 440-446
21. García-Flores, C., Aguilar, R., Reyes de la Cruz, H., Albores, M., and Sánchez de Jiménez, E. (2001) *Biochem. J.* **358**, 95-100
22. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685
23. Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
24. Schmelzle, T., and Hall, M. N. (2000) *Cell* **103**, 253-262

25. Law, B. K., Waltner-Law, M. E., Entingh, A. J., Chytil, A., Aakre, M. E., Norgaard, P., and Moses, H. L. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 38261-38267
26. Cheng, S. H., and Seemann, J. R. (1998) in *RNA isolation and characterization protocols*, eds. Rapley, R. & Manning, D. L. (Humana Press Inc, Totowa, New Jersey, USA), pp. 27-32
27. Beltrán-Peña, E., Ortiz-López, A., and Sánchez de Jiménez, E. (1995) *Plant Mol. Biol.* **28**, 327-336
28. Murashige, T., and Skoog, F. (1962) *Physiol. Plant.* **15**, 473-497
29. Reyes de la Cruz, H., Aguilar, R., and Sánchez de Jiménez, E. (2004) *Biochemistry* **43**, 533-539
30. Martin, K. A., and Blenis, J. (2002) *Adv. Cance. Res.* **86**, 1-39
31. Le Roith, D., Shiloach, J., Roth, J., and Lesniak, M. A. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**, 6184-6188
32. Brogiolo, W., Stocker, H., Ikeya, T., Ritelen, F., Fernández, R., and Hafen, E. (2001) *Curr. Biol.* **20**, 213-221

33. Pierce, S. B., Costa, M., Wisotzkey, R., Devadhar, S., Homburger, S. A., Buchman, A. R., Ferguson, K. C., Heller, J., Platt, D. M., Pasquinelli, A. A., Liu, L. X., Doberstein, S. K., and Ruvkun, G. (2001) *Genes Dev.* **15**, 672-686
34. Watanabe, Y., Barbashov, S. F., Komatsu, S., Hemmings, A. M., Miyagi, M., Tsunasawa, S., and Hirano, H. (1994) *Eur. J. Biochem.* **224**, 167-172
35. García de Lacoba, M., Alarcón, C., de la Rosa, E.J., and De Pablo, F. (1999) *Endocrinology* **140**, 233-243
36. Hernández-Sánchez, C., Mansilla, A., De la Rosa, E. J., Pollerberg, G. E., Martínez-Salas, E., and De Pablo, F. (2003) *EMBO J.* **22**, 5582-5592
37. Menand, B., Desnos, T., Nussaume, L., Berger, F., Bouchez, D., Meyer, C., and Robaglia, C. (2002). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 6422-6427
38. Tichtinsky G., Vanoosthuysse V., Cock J.M., and Gaude, T. (2003) *Trends in Plant Science* **8**,231-237
39. Menand B, Meyer C., and Robaglia, C. (2004) *Curr. Top Microbiol. Immunol.* **279**, 47-113
40. Jacinto, E., and Hall, M.N. (2003) *Moll Cell Biol.* **4**, 117-126

**Abbreviations**

IGFs, insulin-like growth factors; mTOR, mammalian target of rapamicin; p70<sup>S6K</sup>, S6 protein kinase; S6rp, S6 ribosomal protein; TOP, 5' track of oligopyrimidine; ZmIGF, *Zea mays* insulin-related peptide; ZmS6K, *Zea mays* S6K.

**Acknowledgements**

This work was supported by DGAPA (Dirección de Apoyo al Personal Académico, UNAM) Grants IN 202900 and 207903.



## Figure legends

Figure 1. **ZmIGF identification in maize axes during germination by Western blot.** **A)** Maize axes dissected from seeds at different periods of germination (0 to 48 h) were used to prepare protein extracts. Proteins were resolved by SDS-PAGE and either stained by Coomassie blue (left) or transferred to PVDF membranes and analyzed by Western blot, using an antibody against bovine insulin (dil 1:5000) as first antibody (right). The detection of positive bands was made by anti-Guinea Pig IgG conjugated to peroxidase and chemoluminescence using the ECL system (Amersham). Positive control: bovine insulin  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ . The arrow indicates the positive reacting maize peptide. MM standards are at left channel. **B)** Sets of 100 maize seeds disinfected with 5% sodium hypochlorite were germinated either in water alone (control) or in water plus different concentrations (0 to  $600 \mu\text{U mL}^{-1}$ ) of Insulin ( $\square$ ) or ZmIGF ( $\blacksquare$ ). After 72 h of incubation under darkness at  $24^\circ\text{C}$  the seedlings were collected and root and coleoptile measurements were performed. Average values of three independent sets are expressed as length (cm)  $\pm$  SD. Asterisk (\*) stands for significant differences ( $P < 0.01$ ).

Figure 2. **Immunolocalization of ZmIGF in *Zea mays* axis.** Transversal sections of maize embryonic axes meristems obtained from 48 h germinated seeds. Red fluorescence color shows localization of the protein ZmIGF and blue stands for the DNA in the nucleus. Figs. 2 a-c show apical cells at low (a, 20X) and high (b, 60X). Figures 2 d-f show root meristem tissue also at low (d, 20X) and high (e and f, 60X) magnification. As a control, the first antibody was omitted but not the DNA staining

procedure (c, f). Red fluorescence labeling is observed mainly in the cytoplasm of cells in meristematic zones.

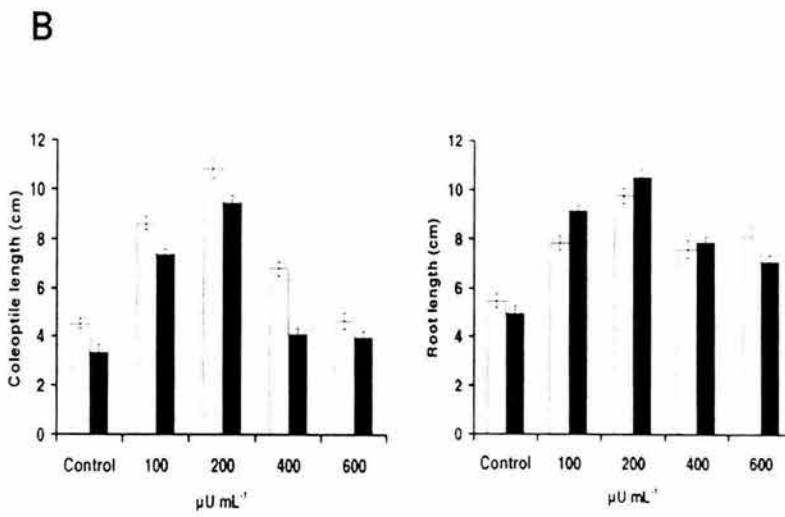
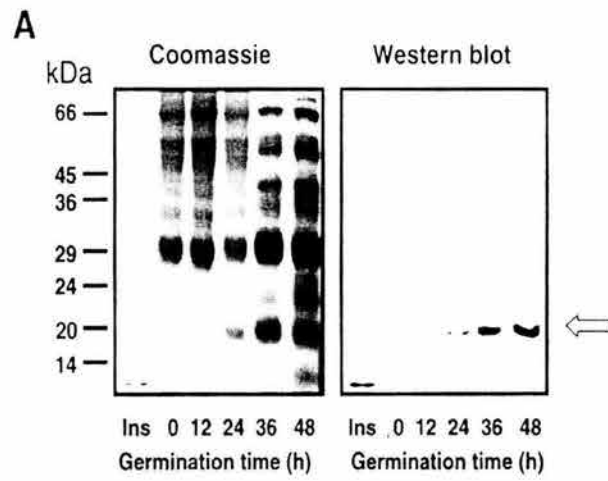
Figure 3. **Effect of Insulin/ZmIGF on protein synthesis.** **A)** Embryonic axes (0.5 g each) extracted from seeds imbibed in water for 22 h were incubated with [<sup>35</sup>S]-methionine in presence of either water (C); 200  $\mu\text{U mL}^{-1}$  insulin (I), 200  $\mu\text{U mL}^{-1}$  ZmIGF (Z), 200  $\mu\text{U mL}^{-1}$  plus 0.1  $\mu\text{M}$  rapamycin (Z+R) or 0.1  $\mu\text{M}$  rapamycin alone (R). Then, the axes were homogenized and the cytoplasmic ( $\square$ ) and ribosomal proteins ( $\blacksquare$ ) were obtained according to Materials and Methods. Aliquots of each sample were used to measure [<sup>35</sup>S]-methionine incorporation by a scintillation counter. **C** Sample values were taken as 100 %. Values are the average of 3 independent experiments. **B)** The cytoplasmic proteins were further analyzed by 2-D electrophoresis and fluorography. The migration of molecular mass markers is indicated on the left. The direction and polarity of electrophoresis is indicated above. Circles in the fluorographies indicate specific changes on labeled spots induced by insulin/ZmIGF.

Figure 4. **Recruitment of mRNAs into polysomes.** Total and polysomal RNA were obtained from sets of maize embryonic axes excised from seeds imbibed in water for 22 h. The axes were incubated for 2 h in the presence of either water (C $\square$ ), 200  $\mu\text{U mL}^{-1}$  insulin (I  $\blacksquare$ ), 200  $\mu\text{U mL}^{-1}$  ZmIGF (Z  $\blacksquare$ ), or 200  $\mu\text{U mL}^{-1}$  ZmIGF plus 0.1  $\mu\text{M}$  rapamycin (Z+R  $\square$ ). Semi-quantitative RT-PCR analysis was carried out with specific oligonucleotides for cDNAs encoding S6rp, eIF4E and eIFiso4E

translation initiation factors and glyceraldehyd phosphate dehydrogenase (GA3PDH) (upper panel). Densitometric analysis of RT-PCR products corrected with GA3PDH product as reference (lower panel). These data have been reproduced twice with similar results.

Figure 5. **Insulin/ZmIGF induces activation of ZmS6K.** Sets of 30 maize embryonic axes (200 mg) from 22 h germinated seeds were dissected and incubated in MS either with  $200\mu\text{U mL}^{-1}$  insulin (I),  $200\mu\text{U mL}^{-1}$  ZmIGF (Z) or water (C) and fed with  $[^{32}\text{P}]$ -orthophosphate during 2 h. The ZmS6K protein was immunoprecipitated and its content in the extracts from each set of axes was determined by SDS-PAGE and Western blot using an anti-human  $\text{p70}^{\text{S6K}}$  antibody (A). The ZmS6K activity was measured using the RSK peptide and  $[^{32}\text{P}]\text{-}\gamma$  ATP as substrates (B). These results are the average of three independent experiments. The ribosomal proteins were obtained from the same extracts and resolved by SDS-PAGE and analyzed by autorradiography (C). The amount of S6rp was determined by SDS-PAGE and Western blot using anti-S6rp antibody (C lower panel).

Figure 1



**Figure 2**

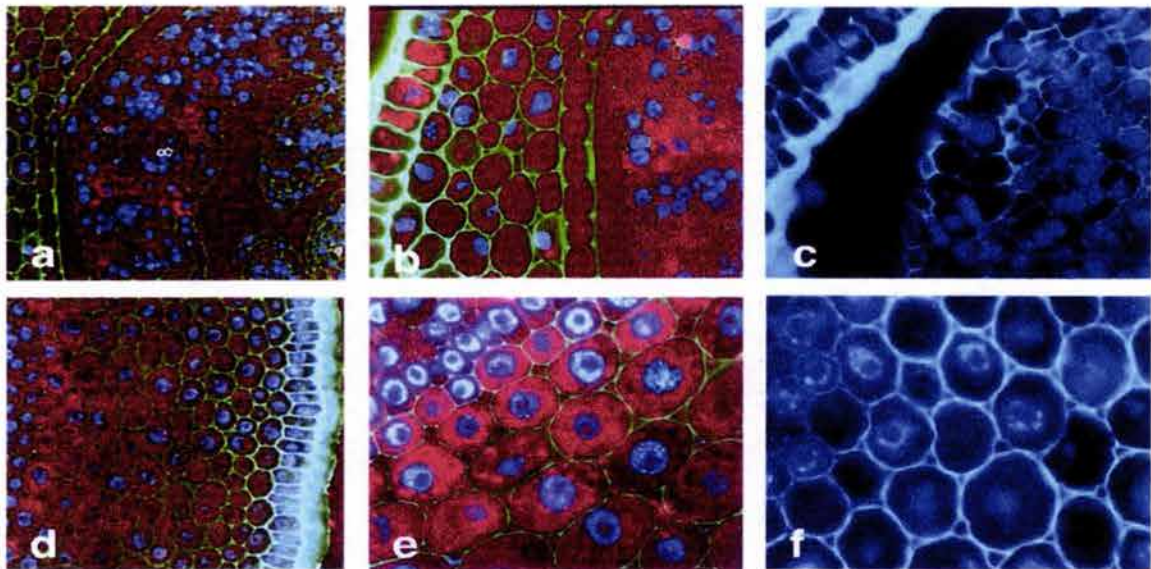


Figure 3

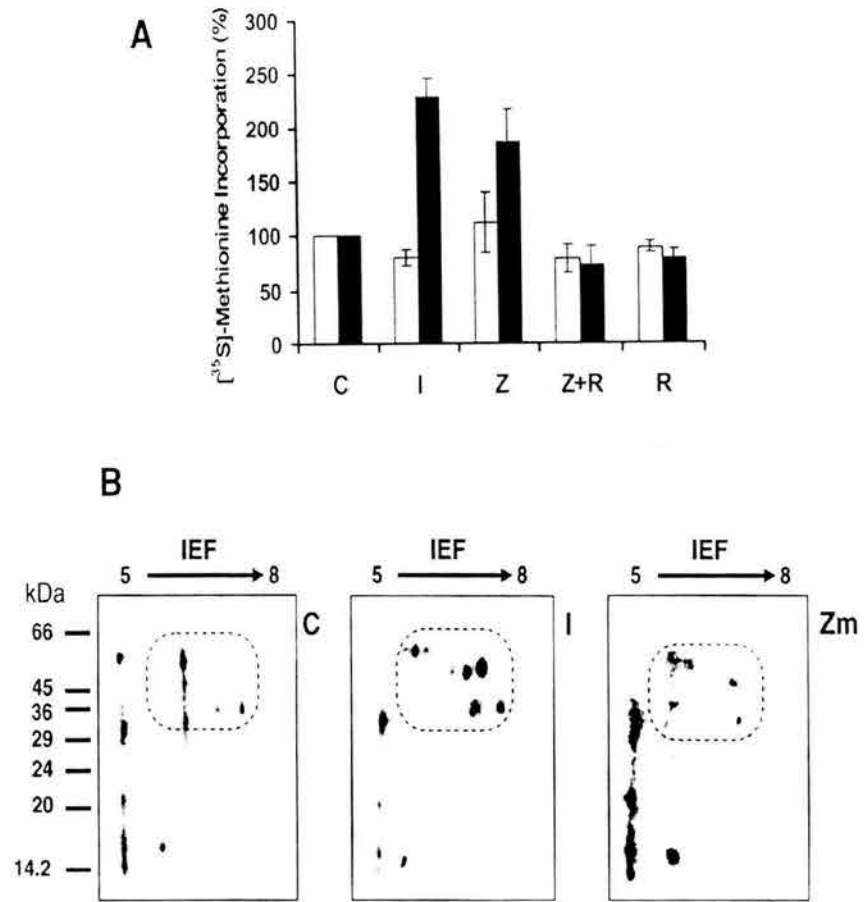


Figure 4

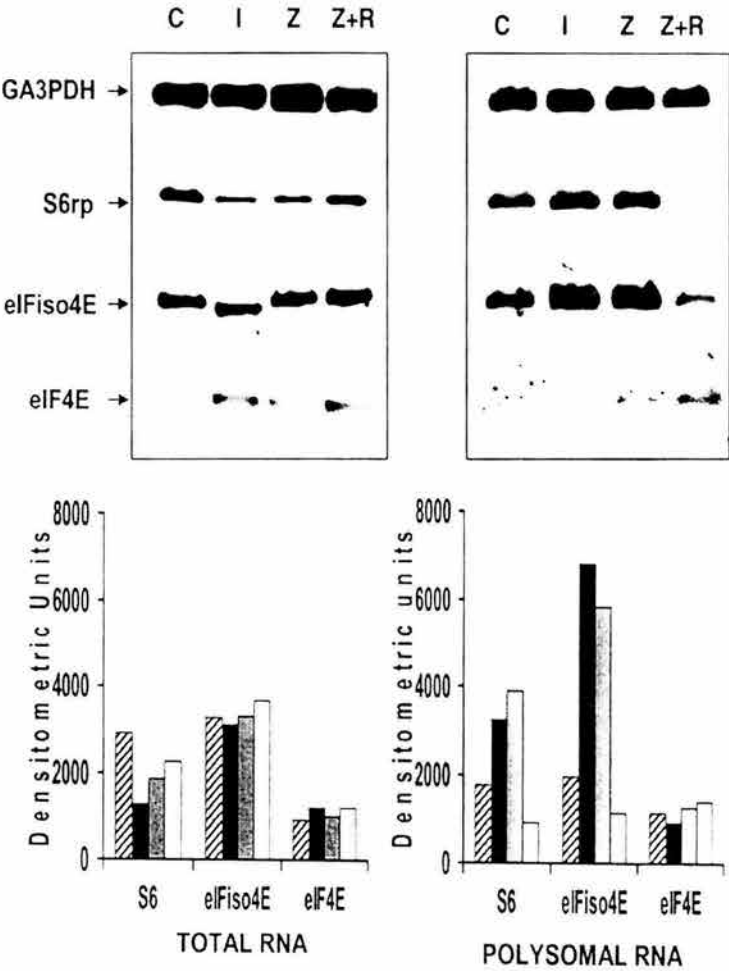


Figure 5

