

Insulina estimula el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* a través de la cinasa MAPK3

Aurelio Juárez Domínguez, Ricardo Santillán Mendoza, María E. Mellado Rojas, Elda M. Beltrán Peña

Laboratorio de Transducción de Señales. Edificio B3. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mich. Ciudad Universitaria, C. P. 58030

Resumen

La insulina es ampliamente conocida por su papel en la regulación de los niveles de glucosa en la sangre de mamíferos, sin embargo esta hormona también activa rutas de transducción de señales involucradas en el crecimiento celular. Una de ellas es la cascada de señalización de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), la cual se encuentra conservada evolutivamente entre los organismos eucariontes. La ruta MAPK consiste de tres tipos de cinasas: cinasa activada por mitógenos (MAPK), cinasa de la MAPK (MAPKK), y cinasa de la MAPKK (MAPKKK). La cascada MAPK es disparada por diversos estímulos externos promoviendo así la expresión de genes comprendidos en el metabolismo, muerte, proliferación y diferenciación celular en mamíferos y levaduras. En plantas, dicha cascada de señalización está involucrada en respuestas a estrés biótico, abiótico y hormonas, desencadenando al ser activada, procesos de defensa, división y desarrollo celular. En esta investigación se estudió la estimulación del crecimiento del sistema radicular de *A. thaliana* a través de la cascada MAPK por efecto de la insulina, para lo cual se ensayaron líneas de sobreexpresión (OvMAPK3-1) y baja expresión (RNAiMAPK3) del gen *AtMAPK3*. Los resultados obtenidos sugieren que la cascada MAPK podría estar involucrada en la respuesta a insulina.

Palabras clave: insulina, *A. thaliana*, raíz, cascada de señalización MAPK.

Abstract

Insulin is widely known for its role in the regulation of glucose levels in the blood of mammals, but this hormone also activates signal transduction pathways involved in cell growth. One of them is mitogen-activated protein kinases (MAPK) signaling cascade, which is evolutionarily conserved among eukaryotic organisms. The MAPK path consists of three types of kinases: mitogen-activated kinase (MAPK), MAPK kinase (MAPKK) and MAPKK kinase (MAPKKK). The MAPK cascade is triggered by several external stimuli, promoting genes expression involved in metabolism, death, proliferation and cell differentiation in mammals and yeast. In plants, this signaling cascade is involved in responses to stress biotic, abiotic and hormones, triggering defense processes, cell division and development when is activated. In this work we studied the root system growth of *A. thaliana* through the MAPK cascade by insulin stimulation, for which over expression (OvMAPK3-1) and low expression (RNAiMAPK3) lines of gene *AtMAPK3* were tested. The results suggest that the MAPK cascade could be involved in the response to insulin.

Key words: insulin, *A. thaliana*, root, MAPK signaling cascade.

Introducción

La insulina es una hormona que en mamíferos es segregada por las células del páncreas en respuesta a altos niveles de glucosa en sangre. La hormona interactúa con el receptor (IR) ocasionando su autofosforilación y la activación del sustrato receptor de insulina (IRS) (Lee *et al.*, 1997; Cheatham y Khan, 1995). La señalización a partir del receptor de insulina involucra dos cascadas principales: la de fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K) conocida también como ruta metabólica y la de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), denominada cascada mitogénica (Bastarrachea *et al.*, 2005). El bloqueo de la vía MAPK con mutantes o inhibidores farmacológicos impide y previene la estimulación del crecimiento y diferenciación celular inducido por la insulina, pero no presenta ningún efecto en las acciones metabólicas de la hormona (Saltiel y Khan, 2001).

A la par del descubrimiento de la insulina pancreática en

animales, se reportó la presencia en plantas de una sustancia parecida a la insulina a la cual denominaron “glucocinina” (Collip, 1923). Setenta años después se encontró que la insulina y factores parecidos a insulina I y II (IGF-I e IGF-II); aceleraban el desarrollo post-germinativo de semillas de girasol, sandía y pepino (Goodman y Davis, 1993). En estudios más recientes se reportó que la adición de 200 µU/ml de insulina en maíz aceleraba la germinación y el crecimiento de las plántulas y, a nivel molecular estimulaba la fosforilación de la proteína S6 aumentando la síntesis de proteínas ribosomales en ejes embrionarios de maíz en germinación (Beltrán-Peña 1997; Sánchez de Jiménez *et al.*, 1999). Nuestro grupo de trabajo observó que 200 µU/ml (1.23 nM) de insulina estimulaba el incremento en la longitud de la raíz principal, inducía la formación de los primordios de raíces laterales y promovía la elongación de los pelos radicales en *A. thaliana*, (Ortega Domínguez, 2007).

Autor de correspondencia: D.C. Elda María Beltrán Peña. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Edificio B3, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Ciudad Universitaria. Francisco J. Múgica s/n. Morelia, Mich. C.P. 58030 eldabelt@umich.mx.

En plantas, la cascada MAPK está involucrada en la señalización a estrés biótico, abiótico, hormonas y también está comprendida en los procesos de división y desarrollo celulares (Nakagami *et al.*, 2005). La secuenciación completa del genoma de *A. thaliana* ha revelado que la familia de las MAPKs consiste de 80 genes para las MAPKKK, 10 para las MAPKK y 20 para las MAPK (Ichimura *et al.*, 2002). A pesar del gran número de genes para las MAPKs, solamente tres de ellos han sido estudiados en detalle (MAPK3, MAPK4 y MAPK6). Aunque en plantas, la cascada MAPK se ha reportado principalmente en respuestas de defensa, existen estudios de la misma en procesos de desarrollo y división celular. Un ejemplo es el reportado por Suzuki y Machida en 2008, donde en células de tabaco la cinasa de la MAPK designada como NPK1 juega un papel importante en la formación de pared celular. Otro ejemplo, es el reportado por Samaj y colaboradores en el 2002; donde en alfalfa mostraron que la MAPK inducida por estrés (SIMK) estaba involucrada en el crecimiento de los pelos radiculares.

Por otro lado en mamíferos se sabe que las rutas PI3K/mTOR y MAPK pueden converger y tener un mismo blanco de fosforilación (Shahbazian *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2008)). La activación de las dos rutas (PI3K y MAPK) en plantas, por un mismo estímulo fue reportada en *A. thaliana*, donde observaron que los niveles de los transcritos de los genes AtMEKK1 (MAPKKK), *AtMAPK3* (MAPK3) y AtPK19 (proteína relacionada a la cinasa p70 y p90 de S6) incrementaron marcada y simultáneamente cuando las plantas fueron expuestas a temperaturas bajas, daño y estrés salino (Mizoguchi *et al.*, 1996).

Como describimos anteriormente la insulina activa la ruta de las MAPKs en mamíferos, sin embargo, en plantas no existen reportes de su participación en la activación de dicha cascada. Por lo antes mencionado, el objetivo del presente trabajo, consistió en determinar si la ruta de señales MAPK estaba involucrada en el crecimiento radicular de *Arabidopsis* estimulado por insulina.

Materiales y métodos

Se usaron semillas de plantas silvestres -Wt- (Col-0) y de las líneas de sobre y baja expresión del gen *AtMAPK3* (OvMAPK3-1 y RNAiMAPK3 respectivamente) donadas amablemente por el Dr. Ángel A. Guevara García del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Las semillas se desinfectaron con cloro al 5% y SDS 1%, después de varios lavados se incubaron por 48 hrs a 4 °C, posteriormente se sembraron y crecieron en medio Murashige-Skoog (MS) 1X con 1 % de sacarosa, 0.8 % de gelrite, suplementado con insulina a 0, 200 y 2000 μ U/ml. Las cajas fueron incubadas en forma vertical en una cámara con fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad. A los 13 días de sembradas se evaluaron los siguientes parámetros de la arquitectura radicular: longitud de la raíz principal (RP), número de raíces laterales (RL) y densidad de las raíces laterales (DRL) -relación del número de raíces laterales entre la longitud de la raíz principal-. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa statistical 8, realizando un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una comparación de medias (LSD) con diferencia mínima significativa.

Análisis de expresión de genes por RT-PCR

Las secuencias de los oligonucleótidos para la amplificación de

los genes fueron las siguientes: *AtMAPK3* sentido: 5'- AAC TCA CGG AGG ACA GTT CAT AAG -3' y antisentido: 5'- GCA ATT TAG CAA GGT ACT GGT GAT -3'. *AtS6K* sentido: 5' CGG GAT CCC GAT AAR GCW GCY GACT GGT GGA G3'; antisentido: 5' GGA ATT CCG CCT CCA GCT TCY TCC AGT TKA T3'. *UBIQUITINA* sentido: 5' GGA AGA AGA AGA CTT ACA CC-3' y antisentido: 5' AGT CCA CAC TTA CCA CAG TA- 3' (Ping *et al.*, 2006).

Se extrajo RNA de plántulas silvestres -Wt-, OvMAPK3-1 y RNAiMAPK3 de 13 días de edad, crecidas en medio MS 1X, 1% de sacarosa e insulina a 0, 200 y 2000 μ U/ml, con Trizol (Invitrogen). Posteriormente se analizó su integridad en gel y se cuantificó midiendo la Absorbencia a 260 nm. El RT-PCR se llevó a cabo con el kit SuperScript. III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase de Invitrogen, de acuerdo al protocolo descrito por el proveedor. Las condiciones de amplificación para *AtMAPK3* fueron las siguientes: 30 min a 50 °C; 2 min a 94 °C; 40 ciclos de 30 seg a 94 °C; 1 min a 55 °C y 2 min a 68 °C, posteriormente 5 min a 68 °C. La amplificación de ubiquitina y S6K se llevo a cabo de la siguiente manera: 30 min a 50 °C; 5 min a 94 °C; 40 ciclos por 15 seg a 94 °C; 1 min a 67 °C y 45 seg a 68 °C y posteriormente 10 min a 68 °C. La amplificación de los genes se evaluó cargando 5 μ l de la reacción más 2 μ l de buffer de carga, en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio.

Resultados

Análisis del nivel del transcrito del gen *AtMAPK3* en las líneas de sobre OvMAPK3-1 y baja expresión RNAiMAPK3

Para detectar la expresión del transcrito del gen *AtMAPK3* en las líneas OvMAPK3-1 y RNAiMAPK3 se llevó a cabo un RT-PCR con el RNA extraído de plántulas de 13 días de edad. Como puede observarse en la **Fig. 1**, la expresión del gen *AtMAPK3* se encuentra incrementada en la línea de sobreexpresión OvMAPK3-1, y disminuida en las líneas de baja expresión RNAiMAPK3. Estos resultados permitieron corroborar la sobre y baja expresión en las líneas ensayadas en los experimentos posteriores.

Arquitectura radicular de la línea de sobreexpresión OvMAPK3-1

Para determinar el fenotipo de las líneas de sobreexpresión OvMAPK3-1 comparadas con las silvestres, se sembraron las semillas respectivas en medio MS 1X y 1% de sacarosa. Podemos observar en la **Fig. 2** que las plántulas OvMAPK3-1 presentaron una disminución de la longitud de la raíz principal, ninguna diferencia en el número de raíces laterales y un aumento significativo en la densidad de raíces laterales respecto a las plántulas silvestres.

Efecto de insulina en plántulas que sobreexpresan el gen *AtMAPK3*

Para determinar el efecto de la insulina en plántulas que sobre expresan el gen *AtMAPK3* se analizó el crecimiento de la raíz en plántulas silvestres -Wt- de *A. thaliana* y en la línea OvMAPK3-1.

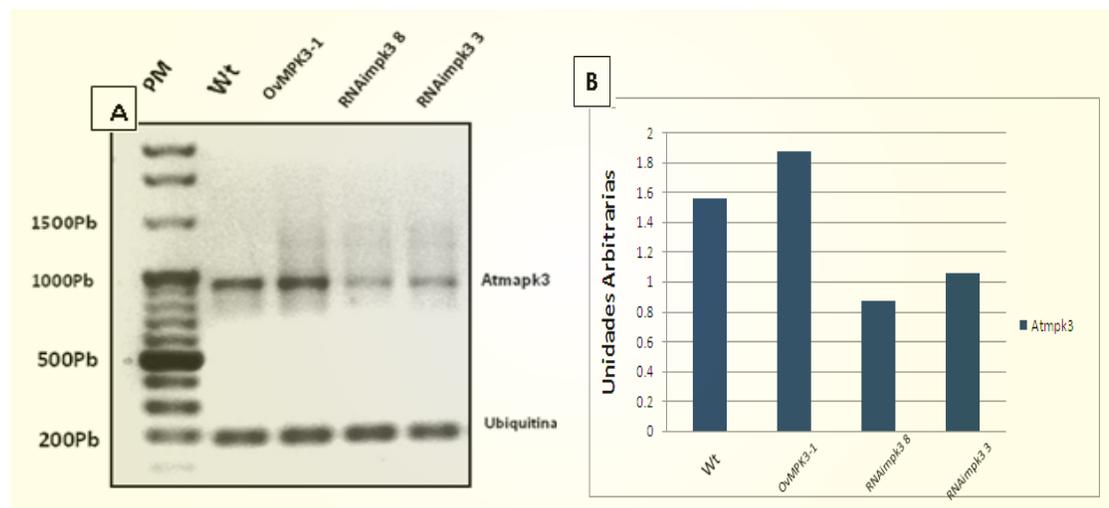


Figura 1. Análisis de la expresión del gen *AtMAPK3* por RT-PCR. Líneas que sobreexpresan y disminuyen la expresión del gen *AtMAPK3* fueron analizadas por RT-PCR a partir del RNA extraído de plántulas de 13 días de crecimiento en medio MS 1X y 1% de sacarosa. La expresión de UBIQUITINA se realizó como control de carga. **(A)** gel de agarosa que muestra la expresión de los diferentes genes. **(B)** Análisis densitométrico del gel mostrado en A.

A los 13 días de crecimiento, la insulina a una concentración de 200 μ U/ml estimuló la longitud de la raíz principal tanto en las plántulas silvestres como en la línea OvMAPK3-1 (Fig. 3A). El número de raíces laterales mostró un aumento en ambas líneas en el medio suplementado con insulina (Fig. 3B). La densidad de las raíces laterales se incrementó tanto en las plántulas silvestres como en la línea MAPK3-1 crecidas en el medio con insulina (Fig. 3C). Resumiendo, observamos que la insulina a una concentración de 200 μ U/ml estimuló el crecimiento tanto en las plántulas silvestres -Wt- como en las plántulas de la línea de sobreexpresión OvMAPK3-1. Posteriormente, analizamos el efecto de 2000 μ U/ml de insulina sobre el crecimiento y encontramos que en la longitud de la raíz principal y el número de raíces laterales (Fig. 4A y 4B) no se presentaron diferencias en la línea de sobreexpresión respecto al control y, por lo tanto

el parámetro de la densidad de las raíces laterales tampoco se vio afectado (Fig. 4C). Podemos concluir que la insulina a 2000 μ U/ml no alteró el crecimiento de la raíz ni en las plántulas Wt, ni en las líneas de sobreexpresión del gen *AtMAPK3*.

Efecto de insulina en la línea RNAiMAPK3

Se analizó el efecto de la insulina sobre las plántulas que reprimen la expresión del gen *AtMAPK3* (RNAiMAPK3), la Fig. 5A muestra que en las plántulas Wt se estimuló el crecimiento de la raíz principal en medio con insulina a 200 μ U/ml en tanto que en la concentración de 2000 μ U/ml no varió respecto al control. Por otra parte en la línea RNAiMAPK3 no se encontró ninguna diferencia en la longitud de la raíz principal a 200 μ U/ml de insulina, mientras que a 2000 μ U/ml se observó una disminución del crecimiento de la raíz principal. Respecto al número de raíces laterales, las plántulas Wt mostraron un aumento en I200 μ U/ml, y ninguna diferencia significativa en I2000 μ U/ml; en la línea RNAiMAPK3 crecida con I200 μ U/ml no se encontró diferencia significativa y en el medio con insulina a 2000 μ U/ml, se presentó una disminución del número de raíces laterales (Fig. 5B). Con relación a la densidad de raíces laterales, las plántulas RNAiMAPK3 crecidas en diferentes concentraciones de insulina no mostraron diferencia (Fig. 5C). En la fig. 6 se puede apreciar claramente el efecto contrastante de la insulina en la densidad radicular entre las líneas OvMAPK3-1 y RNAiMAPK3, donde dicho parámetro es incrementado en las plántulas OvMAPK3-1 y revertido en las líneas RNAiMAPK3.

Análisis de la expresión de los transcritos de los genes *AtMAPK3* y *AtS6K* en plántulas silvestres de *A. thaliana* por efecto de la insulina

Para determinar si en plantas al igual que en mamíferos las proteínas involucradas en las cascadas de transducción de señales disparada por insulina, están reguladas a nivel transcripcional, se analizaron los niveles de expresión de los genes *AtMAPK3* y *AtS6K* mediante una reacción de RT-PCR en plántulas silvestres tratadas con insulina. Los resultados mostraron que el nivel de expresión de ambos transcritos se alteró en respuesta a insulina (Figura 7).

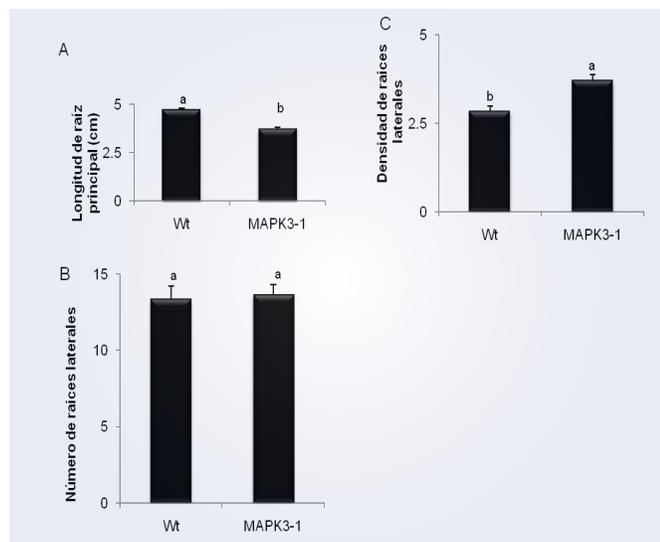


Figura 2. Arquitectura radicular de la línea de sobreexpresión del gen *AtMAPK3* de *A. thaliana*. Las semillas de Arabidopsis se sembraron y crecieron por 13 días en medio MS 1X, 1% de sacarosa. **(A)** Longitud de la raíz principal; **(B)** Número de raíces laterales; **(C)** Densidad de raíces laterales. Los valores son el promedio de al menos 15 plántulas de tres ensayos diferentes (\pm EE) ($P < 0.05$). Las letras indican diferencia significativa obtenida por un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una comparación de medias (LSD) diferencia mínima significativa.

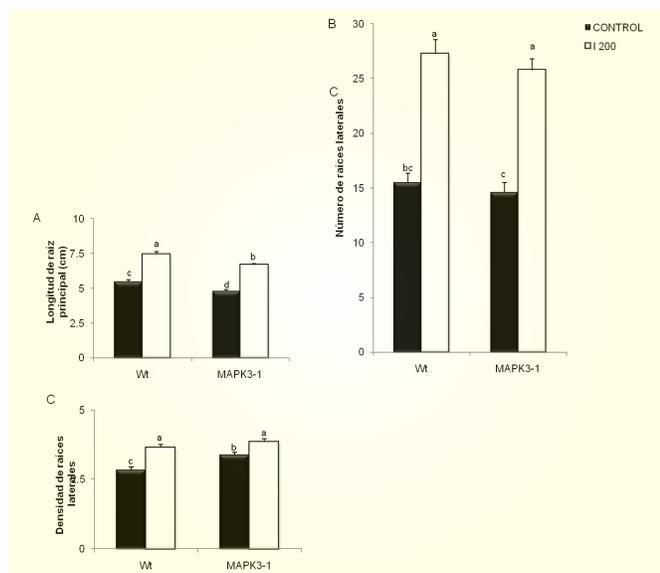


Figura 3. Arquitectura de la raíz de plántulas Wt y líneas que sobreexpresan el gen *AtMAPK3* de *A. thaliana* en medio suplementado con 200 µU/ml de insulina. Las semillas de *Arabidopsis* se sembraron y crecieron por 13 días en medio MS 1X, 1% de sacarosa suplementado con insulina a concentraciones de 0 y 200 µU/ml. (A) Longitud de la raíz principal; (B) Número de raíces laterales; (C) Densidad de raíces laterales. Los valores promedio de al menos 15 plántulas en ensayos por triplicado (± EE) (P<0.05). Las letras indican diferencia significativa obtenidas por un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una comparación de medias (LSD) diferencia mínima significativa.

Discusion

Los resultados mostrados en la **fig. 1**, corroboraron el hecho de que contamos con líneas de sobre y baja expresión del gen *AtMAPK3*. La expresión de un gen específico se ha utilizado extensamente para determinar la participación de dicho gen en una respuesta específica. Por ejemplo, Xing *et al.*, en el 2008, utilizaron líneas mutantes para los genes *AtMKK1* (*mkk1*) y *AtMAPK6* (*mapk6*) y de sobreexpresión para los mismos genes (MKK1OE y MAPK6OE) y mostraron que bajo condiciones normales de

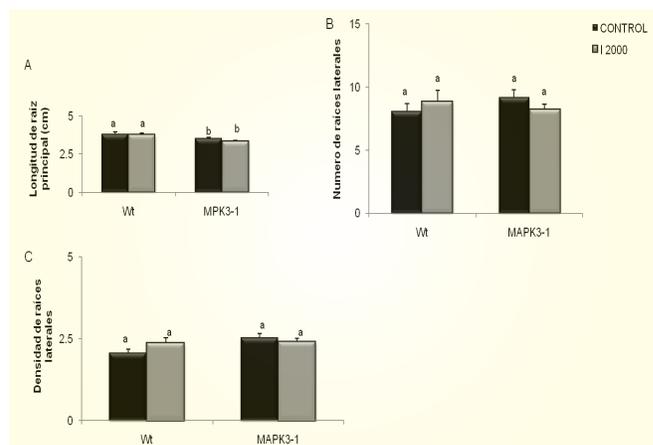


Figura 4. Arquitectura de la raíz de plántulas Wt y líneas de sobreexpresión del gen *AtMAPK3* de *A. thaliana* en medio suplementado con 2000 µU/ml de insulina. Las semillas de *Arabidopsis* se sembraron y crecieron por 13 días en medio MS 1X, 1% de sacarosa suplementado con insulina a concentraciones de 0 y 2000 µU/ml. (A) Longitud de raíz principal; (B) Número de raíces laterales; (C) Densidad de raíces laterales. Los valores promedio de al menos 15 plántulas en tres ensayos diferentes (± EE) (P<0.05). Las letras indican diferencia significativa obtenidas por un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una comparación de medias (LSD) diferencia mínima significativa.

crecimiento las plántulas *mkk1* exhibieron una velocidad de crecimiento similar a las silvestres. Sin embargo, en respuesta a ABA la velocidad de germinación en las líneas silvestres disminuyó considerablemente, mientras que las plantas *mkk1* mostraron una alta velocidad de germinación. En contraste, la línea de sobreexpresión *AtMKK1* (*AtMKK1OE*) presentó una inhibición mayor que la silvestre, comparada con las plantas *mkk1*. Como observamos en el ejemplo anterior el uso de líneas mutantes y de sobreexpresión permitió obtener fenotipos contrastantes. Por otra parte, Lu *et al.*, 2002, analizaron el efecto de ABA sobre la ruta MAPK utilizando líneas de baja expresión (RNAiMAPK3) y de sobreexpresión (MAPK3-1, MAPK3-2 y OvMAPK3) y concluyeron que la señal de ABA podía ser transmitida a través

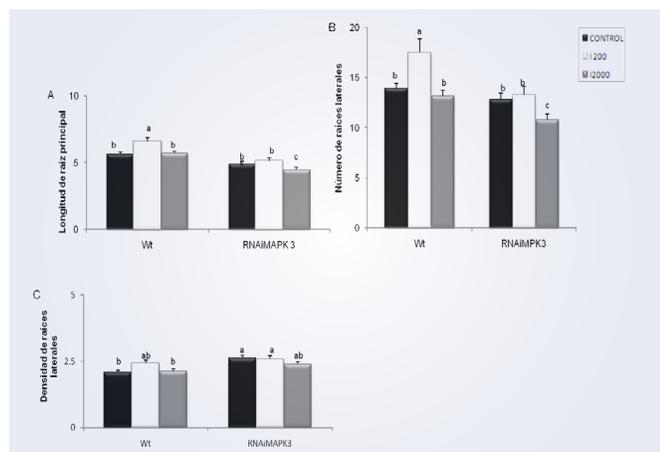


Figura 5. Efecto de la insulina sobre el crecimiento del sistema radicular de plántulas RNAiMAPK3. Las semillas de *Arabidopsis* se sembraron y crecieron por 13 días en medio MS 1 X, 1% sacarosa suplementado con 0, 200 y 2000 µU/ml de insulina. (A) Longitud de la raíz principal; (B) Número de raíces laterales (C) Densidad de raíces laterales. Los valores promedio de al menos 15 plántulas (± EE) (P<0.05). Las letras indican diferencia significativa obtenidas por un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una comparación de medias (LSD) diferencia mínima significativa.

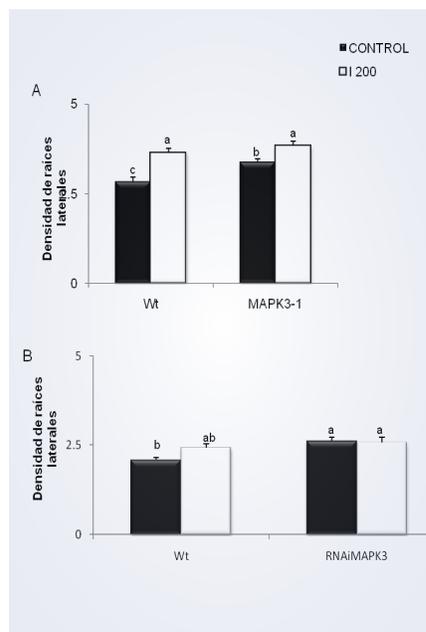
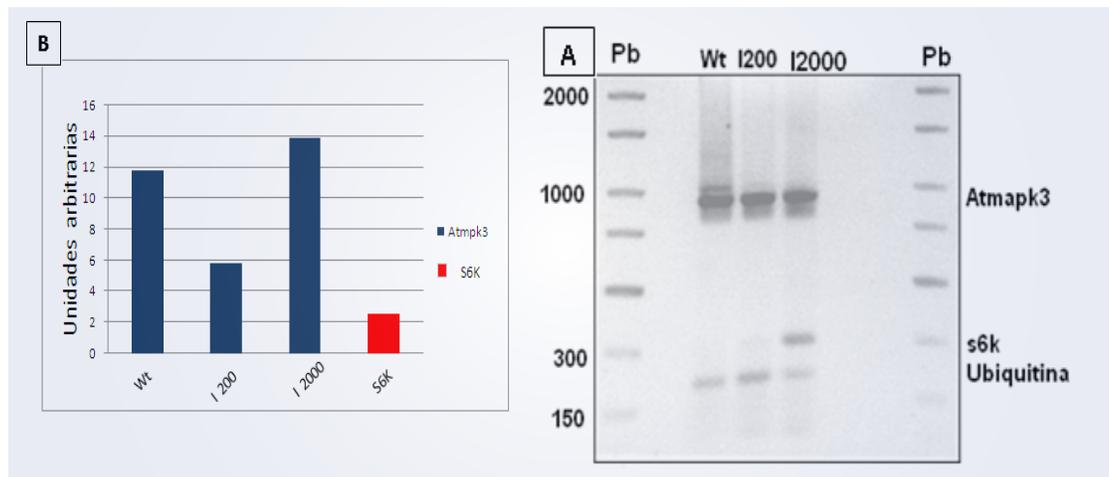


Figura 6. Efecto de la insulina sobre la densidad de raíces laterales en plántulas de las líneas MAPK3-1 y RNAiMAPK3. (A) Las semillas de la línea MAPK3-1 se sembraron y crecieron en medio MS 1X, 1% sacarosa suplementado con 0 y 200 µU/ml de insulina. (B) Las semillas de la línea RNAiMAPK3 se sembraron y crecieron en medio MS 1X, 1% sacarosa suplementado con 0, 200 y 2000 µU/ml de insulina. Los valores promedio de al menos 15 plántulas (± EE) (P<0.05). Las letras indican diferencia significativa obtenidas por un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una comparación de medias (LSD) diferencia mínima significativa.



de la cascada MAPK, activando el arresto post-germinativo de plántulas en desarrollo. En el presente estudio, para determinar la participación de la cascada MAPK en respuesta a insulina en plantas utilizamos las líneas *OvMAPK3-1* y *RNAiMAPK3*. En la primera, insulina a 200 μ U/ml, estimuló el crecimiento de la raíz principal y el número de raíces laterales (Fig. 3), mientras que en la línea *RNAiMAPK3*, insulina inhibió el efecto antes observado, debido a que en estas últimas plántulas la longitud de la raíz principal, número de raíces laterales y densidad de raíces laterales no mostraron diferencia significativa respecto al control (Fig. 5). El efecto contrastante de la insulina en las líneas de sobre y baja expresión del gen *AtMAPK3*, se observa claramente en la Fig. 6 donde comparamos la densidad de las raíces laterales, lo que nos permite sugerir la participación de la cascada MAPK en la modificación de la arquitectura radicular por efecto de insulina.

A diferencia de los resultados obtenidos en este estudio, se ha reportado que el efecto de insulina en plantas involucra la cascada PI3K, al encontrar que la adición de la hormona en maíz aceleraba la germinación, el crecimiento de las plántulas y estimulaba la fosforilación de la proteína ribosomal S6 aumentando con ello la síntesis de proteínas ribosomales en ejes embrionarios de maíz en germinación y que dichos efectos eran revertidos por inhibidores de las cinasas involucradas en la cascada PI3K (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1999). En *A. thaliana*, hemos observado que la insulina, estimuló el incremento en la longitud de la raíz principal, indujo la formación de nuevos primordios de raíces laterales, y promovió el alargamiento de los pelos radiculares de *A. thaliana* (Ortega Domínguez, 2007). También hemos encontrado que en células de tabaco NT-1 en suspensión, la insulina incrementó el crecimiento a través de la ruta de señalización PI3K, induciendo un aumento en tamaño y proliferación celular (Fierros Romero, 2010). De los estudios antes mencionados (excepto en plantas de *Arabidopsis*) observamos que la cascada involucrada en el efecto de insulina en plantas es la PI3K.

Respecto a la señalización de insulina y factores de crecimiento parecidos a insulina a través de la ruta MAPK se ha reportado que regula el crecimiento en sistemas animales (Ingram y Waites, 2006). En plantas, la cascada de señalización MAPK se ha estudiado principalmente en las respuesta a estreses bióticos y

abióticos (Nakagami *et al.*, 2005). Recientemente se ha reportado que dicha ruta, también interviene en procesos de desarrollo y división celular. Estudios genéticos de homólogos de NPK1 (MAPKKK de tabaco) en *Arabidopsis* (ANP1, ANP2 y ANP3), han mostrado evidencias directas del papel que juega la MAPKKK en la citocinesis (Suzuki y Machida, 2008). La participación de dicha ruta en el crecimiento radicular fue reportada por Samaj y colaboradores en el 2002., donde los autores analizaron la función de la MAPK (SIMK) de alfalfa, encontrando que durante el desarrollo de los pelos radiculares, SIMK fue activada y transportada al núcleo en las extremidades en crecimiento de los pelos radiculares. Los resultados del presente trabajo también sugieren que la insulina estimula el crecimiento radicular de *A. thaliana* por medio de la ruta de señalización de las MAPK (de la cual MAPK3 es miembro).

Por otra parte, en plántulas silvestres de *Arabidopsis*, determinamos el nivel de los transcritos de los genes *AtS6K* y *AtMAPK3*, dos proteínas en mamíferos involucradas en las cascadas de señalización disparadas por insulina: PI3K y MAPK respectivamente. En *A. thaliana* observamos que ambas concentraciones de insulina ensayadas alteraron el nivel de expresión del gen *AtMAPK3*, 200 μ U/ml lo disminuyó en tanto que 2000 μ U/ml lo incrementó considerablemente (Fig. 7). Por otra parte, 2000 μ U/ml de insulina también indujo un incremento significativo del transcrito del gen *AtS6K*, comparado con el tratamiento de 200 μ U/ml y el control (Fig. 7). Existe un reporte de hace ya varios años realizado por Mizoguchi *et al.*, 1996 donde en *A. thaliana* trataron de determinar si las dos rutas disparadas en mamíferos por insulina (PI3K y MAPK), se activaban transcripcionalmente por un mismo estímulo (estrés por frío, daño y sal). Los autores analizaron el nivel de los transcritos de los genes involucrados en ambas rutas, encontrando que *AtMEKK1* (MAPKKK), *AtMAPK3* (MAPK) y *AtPK19* (relacionado con la cinasa de la proteína ribosomal S6, p70 y p90) se incrementaron marcada y simultáneamente cuando las plantas fueron expuestas a bajas temperaturas, daño y estrés salino. Estos resultados sugirieron que las proteínas involucradas en ambas rutas de transducción de señales, podían ser reguladas tanto a nivel transcripcional como post-traduccional en plantas superiores. Otro ejemplo reciente del análisis de expresión

de las proteínas MAPK es el reportado por Rudd *et al.*, 2008 en el cual encontraron que las proteínas de trigo TaMAPK3 y TaMAPK6 (homólogas de MAPK3 y MAPK6 de *Arabidopsis*) fueron diferencialmente reguladas durante la interacción de la planta con *Mycosphaerella graminicola*. Los autores reportaron altos niveles de expresión de TaMAPK3 en la interacción con el patógeno y ensayos de actividad de las cinasas mostraron que las proteínas TaMAPK3 se acumularon y fueron posteriormente activadas. En contraste no encontraron incremento en la expresión génica, cantidad de proteína ni activación post-traducciona de la TaMAPK6.

Respecto al incremento en los transcritos de los genes AtS6K y *AtMAPK3* por efecto de 2000 μ U/ml de insulina, sugeriría que ambas rutas podrían estar actuando en forma conjunta en *A. thaliana*. Sin embargo, el hecho de que 2000 μ U/ml de insulina no estimule el crecimiento de la raíz de las plántulas Wt podría deberse a que como sucede en mamíferos cuando existe una alta cantidad o activación de S6K, se inhibe la señalización de insulina/IGF, a nivel del sustrato receptor de insulina (Jastrzebski *et al.*, 2007). Los resultados del presente estudio mostraron que la insulina a una concentración de 2000 μ U/ml estimuló la expresión simultánea de los genes de ambas rutas, como lo reportado Mizoguchi *et al.*, 1996.

Agradecimientos

A la CIC de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, al COECYT y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT Proyecto 48712) por el apoyo al desarrollo del presente proyecto.

Referencias

- Bastarrachea RA, Laviada-Molina H, Machado-Domínguez I, Kent J, López-Alvarenga JC, Comuzzie AG. 2005. El receptor de insulina como objetivo farmacogenómico: potenciando su señalización intracelular. *Revista de endocrinología y nutrición*, 13:180-189.
- Beltrán-Peña E. 1997. *Expresión genética de las proteínas ribosomales durante la germinación del maíz*. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas (Bioquímica). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Cheatham B, Kahn CR. 1995. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr. Rev.*, 16: 117-142.
- Collip JB. 1923. Glucokinin: A new hormone present in plant tissue. *Preliminary paper. J. Biol. Chem.*, 56: 513-543.
- Fierros Romero G. 2010. *Efecto de la insulina sobre el crecimiento de las células de tabaco NT-1 en suspensión*. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
- Goodman DBP, Davis WL. 1993. Insulin accelerates the postgerminative development of several fat-storing seeds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 190: 440-446.
- Ichimura K, Shinozaki K, Tena G, Sheen J, Henry Y, Champion A, Kreis M, Zhang S, Hirt H, Wilson C, Heberle-Bors E, Ellis BE, Morris PC, Innes RW, Ecker JR, Scheel D, Klessig DE, Machida Y, Mundy J, Ohashi Y, Walker JC. 2002. Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: A new nomenclature. *Trends Plant Sci.*, 7: 301-308.
- Ingram G, Waites R. 2006. Keeping it together: co-ordinating plant growth. *Plant Biol.*, 9: 12-20.
- Jastrzebski K, Hannan KM, Tchoubrieva EB, Hannan RD, Pearson RB. 2007. Coordinate regulation of ribosome biogenesis and function by the ribosomal protein S6 kinase, a key mediator of mTOR function. *Growth Factors*, 25: 209-226
- Lee J, Pilch PF, Shoelson SE, Scarlata SF. 1997. Conformational changes of the IR upon insulin binding and activation as monitored by fluorescence spectroscopy. *Biochem*, 36: 2701-2708.
- Lu C, Han M-H, Guevara-García A, Fedoroff NV. 2002. Mitogen-activated protein kinase signaling in postgermination arrest of development by abscisic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99: 15812-15817.
- Mizoguchi T, Irie K, Hirayama T, Hayashida N, Yamaguchi K, Matsumoto K, Shinozaki K. 1996. A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for mitogen-activated protein kinase and S6 ribosomal protein kinase by touch, cold and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol*, 93: 765-769.
- Nakagami H, Pitzschke A, Hirt H. 2005. Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. *Trends Plant Sci.*, 10: 339-346.
- Ortega Domínguez B. 2007. *Efecto de la insulina sobre la arquitectura de la raíz de A. thaliana*. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Ping C, Lall S, Nettleton D, Howell SH. 2006. Gene Expression Programs during Shoot, Root, and Callus Development in *Arabidopsis* Tissue Culture. *Plant Physiol.*, 141: 620-637
- Rudd JJ, Keon J, Hammond-Kosack KE. 2008. The Wheat Mitogen-Activated Protein Kinases TaMPK3 and TaMPK6 Are Differentially Regulated at Multiple Levels during Compatible Disease Interactions with *Mycosphaerella graminicola*. *Plant Physiol.*, 147: 802-815.
- Saltiel RA, Khan R. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414: 799-806.
- Samaj J, Ovecka M, Hlavacka A, Lecourieux F, Meskiene I, Lichtscheidl I, Lenart P, Salaj J, Volkmann D, Brögge L, Baluska F, Hirt H. 2002. Involvement of the mitogen-activated protein kinase SIMK in regulation of root hair tip growth. *EMBO J.*, 21: 3296-3306.
- Sánchez de Jiménez E, Beltrán-Peña E, Ortiz-López A. 1999. Insulin stimulated ribosomal protein synthesis in maize embryonic axes during germination. *Physiol. Plant.*, 105: 148-154.
- Shahbazian D, Roux PP, Mieulet V, Cohen MS, Raught B, Taunton J, Hershey JWB, Blenis J, Pende M, Sonenberg N. 2006. The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. *EMBO J.*, 25: 2781-2791.
- Suzuki T, Machida Y. 2008. MAP Kinase Cascades Controlling Cell Division, Plant Growth and Development. In L. Bögre y G. Beemster (Eds.), *Plant Growth Signaling*, Vol. 10, pp. 261-275. Springer Berlin / Heidelberg.
- Xing Y, Jia W, Zhang J. 2008. AtMCKK1 mediates ABA-induced CAT1 expression and H₂O₂ production via AtMPK6-coupled signaling in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 54: 440-451.
- Zhu J, Blenis J, Yuan J. 2008. Activation of PI3K and MAPK pathways regulates Myc-mediated transcription by phosphorylation and promoting the degradation of Mad 1. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 105: 6584-6589