



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

CAMPUS IZTACALA
FACULTAD DE QUIMICA UNAM

400282  61060 1

“AMPLIFICACION POR PCR DE SECUENCIAS CODIFICANTES DE POLI(ADP-ribosil) POLIMERASAS Y MAP cinasas de maíz (Zea mays L.)”

B01191/96
E^o 2

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
YURI JORGE JESUS PEÑA RAMIREZ



LOS REYES IZTACALA MEXICO ENERO DE 1996



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.

AGRADECIMIENTOS:

A mi asesor y jefe Dr. Jorge Vázquez Ramos por la dirección de este trabajo.

A los sinodales que aceptaron ser asignados para la revisión de este trabajo (Segio Vaca, Jorge Sarquis, Diego Arenas y Ramon Moreno).

A Fundación UNAM, y a la Secretaría General de la UNAM por los apoyos económicos recibidos durante la carrera y para la realización de esta tesis (09496293, 97112691).

A todos los chavos del laboratorio 114 y del departamento de bioquímica (Entiéndase Doctoras, Doctores o aspirantes a ←).

A la ENEPI, a la FQ y al Departamento de Bioquímica de la Facultad.

A quien no caiga en cualquiera de estas categorías y le deba agradecer.

El presente trabajo fue realizado en el departamento de bioquímica vegetal (laboratorio 114) del conjunto E de la Facultad de Química, UNAM y fue auspiciado por CONACyT 3031-N y OEA Plant Biotechnology.



. BASKET CASE .

Do you have the time to listen to me NINE
About NOTHING and EVERYTHING
all at once
I am one of those
Neurotic fools
Neurotic to the bone
No doubt about it

Sometimes I give myself
the CREEPS
Sometimes my mind plays
tricks on me
It all keeps adding up
I think I'm CRACKING UP
Am I just PARANOID?
I'm just STONED

I went to a shrink
to analyze my dreams
She says it's lack of sex
that's bringing me down
I went to a whore
He said my WHORE cause
it's bringing HER down

Grasping to CONTROL
So you BETTER hold on

Espero que
sapan quien
Six

GREEN DAY

NOW HE LIVES IN A HOUSE, A VERY BIG HOUSE IN THE COUNTRY
WATCHING AFTERNOONS REPEATS
AND THE FOOD HE EATS IN THE COUNTRY
HE TAKES ALL MANNER OF PILLS
AND PILES UP ANALYST BILLS IN THE COUNTRY
IT'S LIKE A ANIMAL FARM,
LOTS OF RURAL CHARM IN THE COUNTRY.

INDICE:

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
La semilla angiosperma	4
Germinación	7
Reparación del DNA en las semillas	9
Transducción de señales	12
MAPK y PARP: Establecer su papel fisiológico	15
Amplificación por PCR	16
Variantes del PCR	19
JUSTIFICACIÓN	21
OBJETIVOS	25
MATERIALES Y MÉTODOS	27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
Diseño de oligonucleótidos	38
Síntesis de oligonucleótidos	40
Amplificación por PCR	43
Amplificación por RT-PCR	44
Reamplificación y discriminación de bandas	45
Southern blot e hibridación	49
Clonación de regiones tipo MAPK y PARP	51
Secuenciación de los insertos clonados	53
Expresión de M5 en la germinación del maíz	54
Escrutinio de un banco genómico de maíz	57
Perspectivas y avances adicionales	58
CONCLUSIONES	60
REFERENCIAS	62

Amplificación por PCR de secuencias codificantes de MARL y NAR1 de maíz

ABREVIATURAS

$\alpha^{32}\text{P}$ dCTP	desoxicitidina trifosfato marcada en posición α con fósforo 32
A	adenina
A ₂₆₀	absorbancia a 260 nanómetros
ADP	adenosina difosfato
ATP	adenosina trifosfato
BSA	albúmina de suero bovino
C	citidina
cDNA	DNA complementario
Ci	Curie
cp	control positivo
CPM	cuentas por minuto
dATP	desoxi adenosina trifosfato
dCTP	desoxi citidina trifosfato
DD-PCR	PCR Diferential Display
ddATP	didesoxi adenosina trifosfato
ddCTP	didesoxi citosina trifosfato
ddGTP	didesoxi guanosina trifosfato
ddNTPs	mezcla de didesoxinucleótidos trifosfato
ddTTP	didesoxi timidina trifosfato
DEPC	dietil pirocarbonato
dGTP	desoxiguanosina trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	mezcla de desoxinucleótidos trifosfato
dTTP	desoxitimidina trifosfato
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
ERK	extracellular regulated kinase
FGRB	buffer de corrida para gel de formaldehido
G	guanosina
HAc	ácido acético glacial
IPTG	isopropil β -D-tiogalactopiranosido
KAc	acetato de potasio
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MAPKK	Mitogen Activated Protein Kinase Kinase
MOPS	ácido 4 morfolinpropanosulfónico
MuLV	virus de la leucemia murina
NaAc	acetato de sodio

NAD	nicotin adenin dinucleótido
PARG	poli(ADP ribosil) glicohidrolasa
PARL	poli(ADP ribosil) liasa
PARP	poli(ADP ribosil) polimerasa
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
Primer	cebador
r.p.m.	revoluciones por minuto
RNA	ácido ribonucleico
RT-PCR	reacción de PCR a partir de cDNA
SDS	duodecil sulfato de sodio
SSC	buffer de citratos
T	timina
TBE	buffer de boratos
Tris-Cl	hidrocloruro de 2-Amino-2-(hidroximetil)- 1,3'propanodiol
UV	ultravioleta
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β D-galactopiranosido

RESUMEN

La germinación de una semilla angiosperma inicia cuando ésta toma agua del medio; el proceso involucra una serie de eventos que hacen que el metabolismo, casi detenido en la semilla seca, se convierta en un proceso muy activo capaz de desencadenar la proliferación celular. Uno de los primeros sucesos celulares que ocurren en las etapas tempranas de la germinación es la reparación de macromoléculas, prioritariamente la reparación del DNA, debido a que de la integridad de esta molécula en una célula depende la viabilidad de todas las células hijas a las que se dé origen.

Una de las enzimas que inspeccionan el DNA en busca de errores para su reparación es la Poli(ADP ribosil) polimerasa (PARP). Sin embargo no solo es necesario que las macromoléculas como el DNA se encuentren íntegras para que avance el ciclo celular; también es necesario que todas las células que conforman al embrión se hallen intercomunicadas y sincronizadas. La comunicación intercelular ocurre, la mayoría de las veces a través mensajeros hormonales, factores de crecimiento, etc., mientras que la comunicación intracelular requiere de una red finamente regulada de cinasas y fosfatasas, cuya acción activa o desactiva factores traduccionales, transcripcionales y duplicativos. Una de las enzimas clave de esta red es la MAP cinasa (MAPK), enzima que se ubica en un punto de convergencia de diversas cascadas fosforilativas, aunado a que se encuentra muy cerca de los efectores moleculares de respuesta.

Antecedentes directos del presente trabajo han demostrado que la estimulación de ejes embrionarios de maíz con citocininas trae consigo una activación en una enzima tipo PARP, lo cual ocurre de modo concomitante con una elevación en la actividad de cinasas.

Como parte de un proyecto general que intenta conocer la función de estas actividades enzimáticas durante la germinación del maíz, las metas a cumplir en esta tesis fueron amplificar por PCR segmentos de genes de proteínas tipo MAPK y tipo PARP. Para lo anterior se diseñaron oligonucleótidos degenerados de regiones conservadas de estos genes en otros sistemas biológicos, se amplificaron cDNAs de regiones putativas para los genes de ambas proteínas, se clonaron en un vector bacteriano y fueron secuenciados parcialmente.

Asimismo, para uno de estos cDNAs se midió su expresión en ensayos de Northern blot, y se escrutinó un banco genómico en busca del gene completo.

INTRODUCCIÓN

LA SEMILLA ANGIOSPERMA.

Una nueva planta formada por reproducción sexual comienza como un embrión alojado en una semilla totalmente desarrollada. Así, las semillas juegan un papel crítico en la historia de las plantas superiores. Los sucesos por los cuales un individuo llega a establecerse, se deben en gran medida a las propiedades fisiológicas y bioquímicas de la semilla; el éxito de estos sucesos radica en cómo responda la semilla al ambiente, en sus reservas alimenticias, etc., lo que debe ser suficiente y sostenido hasta que la joven planta se haya convertido en un organismo independiente, autótrofo, capaz de usar la energía luminosa (Raven 1992).

Las semillas angiospermas están compuestas de cuatro estructuras principales: el embrión, que es el resultado de la fertilización de la célula huevo por el núcleo del tubo polínico masculino, el endospermo, el perispermo y la testa (Bewley 1994) (figura 1). El embrión maduro de las angiospermas contiene al eje embrionario localizado entre los cotiledones, los cuales son las primeras hojas del esporofito. Como su nombre lo indica, las semillas *monocotiledóneas* comúnmente solo tienen un cotiledón y las *dicotiledóneas* tienen dos. En los extremos del eje embrionario encontramos los meristemas apical y radicular, compuestos de células meristemáticas que dirigen la proliferación celular (Raven 1992).

En las monocotiledóneas, el cotiledón, además de funcionar como almacén de alimentos u órgano fotosintético, también lleva a cabo una función de absorción. Ubicado dentro del endospermo, el cotiledón absorbe nutrientes digeridos por actividad enzimática, y que son conducidos por él hacia las zonas en proliferación del embrión. En plantas con un cotiledón

masivo y bien diferenciado como el de maíz, esta estructura recibe el nombre de escutelo y se encuentra al lado del eje embrionario. El escutelo se encuentra apresado dentro del endospermo y lleva a cabo todas las funciones del cotiledón. El eje embrionario es la estructura que origina al nuevo individuo; al inicio de la germinación desarrolla la radícula hacia la parte inferior y el tallo primario hacia la parte superior; esta última estructura se origina a partir de la plúmula. Ambas estructuras, radícula y plúmula, se encuentran protegidas por una estructura tipo vaina llamada coleorriza y coleoptilo respectivamente. La coleorriza es la primera estructura de la semilla que se desarrolla y lo hace a partir del pericarpio (que es la pared del ovario maduro) (Bewley 1994).

En el caso del maíz, los integumentos se desintegran durante el desarrollo de la semilla y del fruto, dejándole al pericarpio la función de cubierta seminal. Después de que ha emergido la primera raíz, el coleoptilo es empujado hacia arriba por la elongación del primer entrenudo, llamado mesocotilo. Cuando la base del coleoptilo toca la superficie del suelo, las primeras hojas de la plúmula comienzan a emerger y a desarrollarse dos o más raíces secundarias o adventicias estableciéndose así el joven esporofito (Raven 1992).

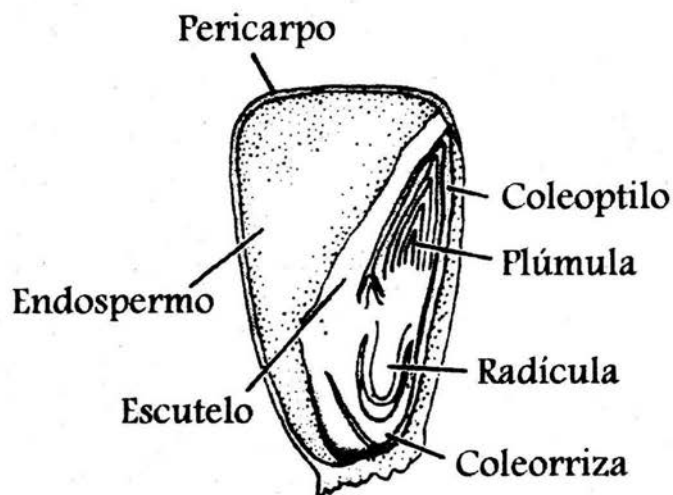


FIGURA 1 Estructura de una semilla de maíz.

Todas las semillas están resguardadas por la cubierta seminal, la cual se desarrolla a partir del integumento ovárico y provee protección al embrión que aloja en su interior. La cubierta seminal es mucho más delgada que el integumento que le da origen; en una semilla seca tiene la textura del papel, pero en muchas semillas es muy dura y altamente impermeable al agua. Justo por debajo de la cubierta seminal se encuentra una capa de células altamente especializadas del endospermo llamada capa de aleurona; las

células que la componen son ricas en proteínas, y su función fisiológica será discutida mas adelante (Raven 1992).

GERMINACIÓN.

En la literatura científica el término *germinación* es utilizado con diversas connotaciones, por lo que es necesario dejar bien claro lo que para nosotros representa y los eventos metabólicos que involucra. Generalmente se dice que la germinación inicia cuando la semilla comienza a tomar agua del medio (imbibición), sin embargo en el presente trabajo, consideramos que la germinación es la serie de sucesos por los cuales tienen que pasar las células de las semillas para cambiar de un estado metabólicamente reducido (casi detenido) hasta un estado muy activo del metabolismo que desencadena la proliferación celular (Vazquez-Ramos 1992). Entre estos eventos están incluidos la hidratación proteica, cambios estructurales subcelulares, respiración, síntesis y reparación de macromoléculas y elongación celular entre otros (Bewley 1994).

Para que comience la germinación de una semilla son necesarios muchos factores abióticos y bióticos; entre los primeros encontramos tres principalmente: el agua, el oxígeno y la temperatura, aunque para semillas de lechuga y algunas malezas es necesario un periodo de irradiación solar. Muchas de las semillas maduras se encuentran extremadamente secas, conteniendo solamente entre 5 y 20% de su peso total en agua, de esta manera la germinación no será posible hasta que la semilla tome toda el agua necesaria para el establecimiento de todas sus actividades metabólicas. Las enzimas presentes en la semilla son activadas, y otras son sintetizadas *de*

de novo gracias a la digestión y utilización de reservas alimenticias, que fueron acumuladas en las células de la semilla durante el periodo de formación del embrión (Raven 1992). Las mismas células que estuvieron encargadas de sintetizar una gran cantidad de reservas, son las encargadas de su degradación por lo que sufren un total revertimiento de sus procesos metabólicos durante las primeras fases de la germinación. Durante el inicio de este periodo el embrión libera giberelinas, las cuales migran hacia la capa de aleurona donde las células que la conforman son inducidas por estas hormonas para la producción de enzimas hidrolíticas. Una de esas enzimas es la α -amilasa, la cual hidroliza las reservas de almidón del cotiledón (Raven 1992). Durante las primeras fases de la germinación, debido probablemente a la hidratación y activación de proteínas mitocondriales, la tasa de consumo de oxígeno y la concentración de ATP dentro de la célula aumentan considerablemente en comparación con lo encontrado en semillas secas (Street 1984). La síntesis de RNA es un evento temprano en la germinación (Datta et al. 1983). Las RNA polimerasas-DNA dependientes no son enzimas limitantes, ya que se han encontrado en trigo, cebada y soya en cantidades suficientes para catalizar la síntesis de RNA tan pronto como se inicia la germinación (Bewley 1985). Durante la fase temprana de la germinación, la síntesis de proteínas puede llevarse a cabo en ausencia de síntesis de RNA (Datta et al. 1983), pero en los tiempos posteriores, la síntesis proteica depende de los mensajes sintetizados *de novo* (Mayer 1989). La síntesis del DNA es un proceso que ocurre poco tiempo después de la entrada de agua a la semilla (Osborne 1980). En los ejes embrionarios de maíz en germinación, la velocidad de síntesis de DNA se mantiene baja en las primeras horas y aumenta en tiempos posteriores al iniciar la síntesis replicativa (Vázquez-Ramos & Osborne 1986).

REPARACIÓN DEL DNA EN LAS SEMILLAS.

Se ha sugerido que la síntesis de DNA en las fases tempranas de la germinación es el resultado de la síntesis reparativa (Osborne et al. 1980/81; Vázquez-Ramos & Osborne 1986), esto es debido a que durante el tiempo que pasa la semilla en estado quiescente, los daños que sufre el DNA no pueden ser reparados, lo que convierte a la reparación del DNA en un evento prioritario, ya que de la integridad que conserve la información genética dependerá la viabilidad de la célula y de sus siguientes generaciones. Los daños sufridos por el DNA pueden ser de muchos tipos, como pérdida, sustitución o daño en las bases, distorsiones o rupturas en la cadena, etc. Se han descrito varios mecanismos de reparación del DNA, entre los que cabe mencionar a los sistemas fotoactivables (fotoliasas), sistemas de reparación por excisión, o por desalquilación directa (Lewin 1994, Le Cam 1994). Los sistemas de reparación por excisión dependen grandemente de nucleasas de tipo endo y exo y están encargados de reparar una gran variedad de daños. Su modo de acción inicia con la remoción de histonas del sitio dañado, identificación del daño e hidrólisis de la región dañada. En células eucariontes la región que es removida oscila alrededor de los 20 nucleótidos, y es de inmediato reparada por polimerasas tipo β y ligasas (Lewin 1994). La variedad de lesiones, la complejidad del DNA y las múltiples vías reparativas dificultan la identificación de estos sistemas; sin embargo, las respuestas de reparación con un fenotipo particular como la respuesta SOS en procariontes y la Polí ADP ribosilación en eucariontes las hacen particularmente apropiadas para el estudio de su regulación, en particular para detectar alguna expresión diferencial de sus genes en sistemas donde el DNA ha sufrido algún deterioro (Le Cam 1994, Murcia 1994).

El sistema de poli ADP-ribosilación fue descubierto en 1966 por Chambón y colaboradores. Desde entonces los componentes enzimáticos que en él participan han sido extensamente caracterizados; se halla localizado en la cromatina de las células eucariontes, excepto en levaduras; procesa ADP-ribosa utilizando NAD⁺ como sustrato y consta principalmente de tres componentes enzimáticos: 1. Poli ADP ribosil polimerasa (PARP), encargada de la síntesis de un polímero de ADP-ribosa y de la unión covalente del polímero consigo misma. 2. Poli ADP ribosil glicohidrolasa (PARG), enzima que hidroliza el polímero y 3. Poli ADP ribosil liasa (PARL), cuya tarea es la de degradar la unión polímero-PARP (Althaus 1992).

Se ha reportado que este sistema multienzimático se activa concomitantemente con el daño al DNA y que su función más relevante es la de secuestrar momentáneamente a las histonas de la zona dañada y así permitir el libre acceso a esta zona a las enzimas encargadas de la reparación del daño por excisión. Experimentalmente se ha evidenciado que al deprimir este sistema, no hay una disociación histona-DNA, reportándose, además una protección a nucleasas en sistemas *in vitro* e *in vivo* deprimidos en el sistema de poli ADP ribosilación. Se ha dejado en claro que el mecanismo de secuestro de las histonas está dado por la preferencia de estas a unirse a polímeros de ADP ribosa sintetizados por PARP y que la vida media de este polímero, que es equivalente al tiempo de secuestro de las histonas, coincide con el tiempo que tarda en ser reparado el daño al DNA (Althaus 1992, Murcia 1994).

El avance del ciclo celular depende del estado en el que se encuentre el DNA al inicio de la fase S. El conjunto de factores transcripcionales y replicativos que han sido activados deben encontrar un DNA íntegro; de aquí la importancia de la reparación del DNA y de las enzimas que regulan

dichos factores para el avance satisfactorio del ciclo celular. Estas y otras proteínas reguladas a su vez, en la mayoría de los casos por cinasas, son las encargadas de desatar los procesos de avance en el ciclo celular, por lo que existe una compleja red de intercomunicación celular que está encargada de transmitir la señal y convertirla en una respuesta fisiológica específica o general que resulta en la decisión de proliferación o no proliferación (figura 2) (Blumer 1994, Georgieva 1994).

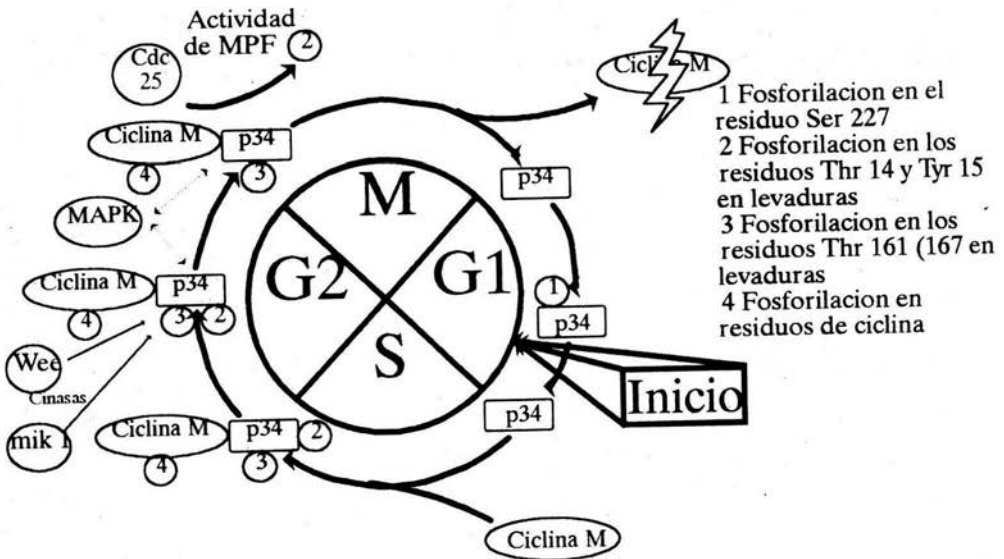


FIGURA 2 Control del ciclo Celular en Eucariotes.

TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES.

La gran mayoría de los procesos celulares propios de la germinación están mediados por transducción de señales, ya que para coordinar las primeras fases del desarrollo, la célula debe responder de forma específica y particular de acuerdo al medio que la rodea y las necesidades particulares que se le presenten. Dichas respuestas obedecen a estímulos, los cuales son percibidos por la célula mediante un acoplamiento de estímulo-respuesta. Así, una señal es generada y transmitida (Transducción de la señal) y un cambio bioquímico es producido (la respuesta). Este proceso requiere además del reconocimiento del estímulo por parte del receptor, del subsecuente uso de mensajeros secundarios y/o proteínas efectoras que transmiten la señal, la cual entonces provocará la respuesta apropiada. Entre las propiedades clave de la transducción de señales se encuentra la velocidad a la cual el estímulo provocado por factores externos es transducido o “comunicado” hasta los blancos celulares de respuesta, la sensibilidad para responder a una cantidad muy baja de efector, la potenciación del mensaje (lograda gracias a una amplificación del mismo), y la especificidad, todas controladas por una red de elementos que actúan como reguladores positivos y negativos, en los cuales los elementos de regulación positiva actúan como intermediarios esenciales que conducen la transducción de la señal. Por su parte los elementos de regulación negativa son los responsables de que se asegure que la respuesta sea la adecuada, que se de en el tiempo necesario, así como que se encuentre coordinada con otros eventos celulares. Específicamente, el control negativo puede: 1) provocar cambios en la sensibilidad a estímulos en particular, lo que permite a su vez regular la intensidad de la respuesta, 2) terminar la respuesta cuando se ha completado, siempre y cuando el estímulo se haya terminado y 3) permitir que la vía de

señalización pueda ser re-usada (Blumer 1994, Georgieva 1994, Lewin 1994, Stasfrom 1993).

En la mayoría de los casos las vías por las cuales son transducidas las señales son las de fosforilación / desfosforilación de proteínas, en las que las proteínas cinasas y las proteínas fosfatasas forman una red de reguladores positivos y negativos. En estas redes encontramos proteínas sobre las que confluyen vías de transducción, por lo que las mutaciones en estas proteínas pueden traer consigo fuertes cambios metabólicos que pueden llevar a una célula a una proliferación desmedida. Algunos Proto-oncogenes son también un grupo de proteínas con actividad de cinasa y representan elementos transduccionales que controlan la proliferación celular por transmisión de estímulos mitogénicos (Georgieva 1994, Hagège 1993).

Se ha reportado que una de las principales funciones de los productos proto-oncogénicos resulta en la inducción de fosforilaciones por medio de proteínas-tirosín cinasas (PTKs) y de proteínas-serín-treonín cinasas. Las PTKs parecen estar íntimamente ligadas a la proliferación celular, ya que algunos cambios celulares como la transición entre la quiescencia, diferenciación y el estado mitótico en las células eucariontes es promovido y acompañado por cambios en la expresión de estos genes (Blummer 1994, Cano 1995, Nishida 1993). Un claro ejemplo de ello lo constituyen las MAPK (de sus siglas en inglés Mitogen Activated Protein Kinases) en la regulación del ciclo celular. Las MAPK son también activadas en células no proliferativas por hormonas, neurotransmisores y otros estímulos extracelulares. Además, la diferenciación celular regulada extracelularmente también involucra la activación de MAPK, lo cual indica que se encuentran también involucradas en otros procesos de señalización intracelular (Avruch 1994, Blumer 1994, Cano 1995, Davis 1994, Nishida 1993).

En la literatura podemos encontrar un número cada vez mayor de blancos de fosforilación de MAPK y también un número considerable de proteínas-quinasas de MAPK, las cuales se han nombrado como MAP cinasa cinasa (MAPKK o también MEK, ERKK, MKK1, MKK2 etc. dependiendo del sistema en el que se han caracterizado). Todas estas proteínas son a su vez reguladas enzimáticamente por fosforilación, lo que convierte al proceso de señalización o transducción intracelular en una cascada fosforilativa que podemos visualizar resumidamente en la figura 3.

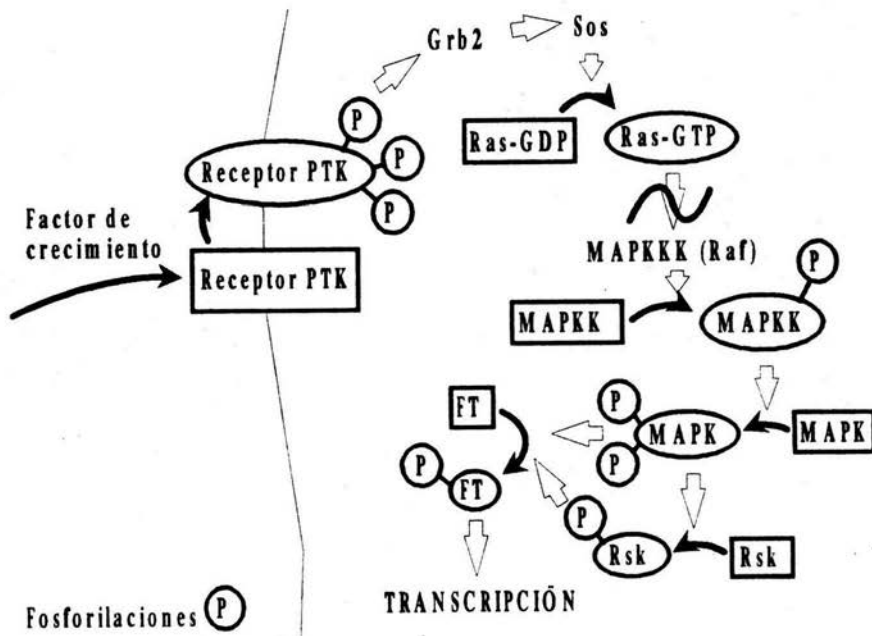


FIGURA 3 Transducción de señales mitogénicas mediada por una cascada de fosforilación/desfosforilación en la que se encuentra involucrada MAPK.

Recientemente se ha reportado que existe más de una cascada fosforilativa en cada célula; cascadas que responden de modo independiente y particular a un estímulo dado, lo que nos hace pensar en la complejidad de la señalización intracelular y del gran número de proteínas que deben estar involucradas en este modelo. En células de mamíferos y levaduras se han reportado al menos tres cascadas diferentes. En el caso de las MAPK se conocen tres subfamilias con al menos dos diferentes isoformas en cada una (Cano 1995); en plantas solamente se ha reportado la existencia de una vía homóloga a la vía ERK (subfamilia TEY) de mamíferos, por lo que en este campo queda por comprobarse la posible existencia de cascadas paralelas, de isoformas en MAPK tipo JNK/SAPK o tipo HOG1 (subfamilias TPY y TGY respectivamente; Cano, 1995).

MAPK Y PARP: ESTABLECER SU PAPEL FISIOLÓGICO.

El conocimiento sobre la existencia y el papel fisiológico de proteínas tipo MAP cinasas y tipo Poli(ADP ribosil) polimerasas en el maíz es de gran importancia, ya que ambas proteínas participan en paralelo en la regulación del ciclo celular (ver justificación); es decir, pese a que sus actividades enzimáticas son completamente independientes una de la otra, sus efectos metabólicos determinan si la célula prolifera o no. El presente trabajo de tesis se abocó al aislamiento de secuencias tipo MAPK y tipo PARP del genoma de maíz, realizando amplificaciones por PCR de regiones que son reconocidas por oligonucleótidos específicos que fueron diseñados para actuar como cebadores de la replicación en secuencias conservadas de los genes de estas proteínas.

AMPLIFICACIÓN POR PCR.

La estrategia experimental que se escogió para el aislamiento de estos genes (amplificación por PCR), es una de las estrategias más usadas hoy en día por biólogos moleculares de todo el mundo; se trata de una estrategia metodológica que permite amplificar una secuencia de DNA en particular que puede estar “diluida” millones de veces en un genoma.

La técnica de amplificación por PCR (de sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction) fue desarrollada a mediados de los años 80s por Mullis. El PCR puede usarse para reproducir o amplificar una secuencia de DNA *in vitro* sin el uso de células durante el proceso. Sin embargo, el procedimiento solamente puede ser usado si las secuencias de nucleótidos flanqueantes de la región de interés es conocida, ya que el PCR involucra el uso de oligonucleótidos sintéticos complementarios a dichas secuencias conocidas donde se alinean (o hibridan) a la región de interés para cebar una amplificación enzimática del segmento de DNA; este alineamiento dependerá de la complementariedad del oligonucleótido con la región blanco, de la concentración de sales y de la temperatura a la cual ocurre la hibridación (cuando se modifica alguno de estos dos últimos factores se dice que estamos cambiando la *stringencia* del experimento).

El PCR involucra tres pasos, cada uno repetido muchas veces para producir los ciclos de amplificación (figura 4). Paso 1: El DNA genómico que contiene la secuencia a ser amplificada es desnaturalizado por calor (94°C). Paso 2: El DNA desnaturalizado, se alinea a un exceso de primers (u oligonucleótidos) a una temperatura que varía de los 37 a los 68°C, lo que permite modificar la *stringencia* del experimento. Paso 3: Una DNA polimerasa es usada para replicar el segmento de DNA hacia los extremos 3'

de los oligonucleótidos, los cuales proveen el extremo 3'OH libre requerido para la extensión covalente; el DNA genómico desnaturalizado sirve como templado. El producto del primer ciclo de replicación es nuevamente desnaturalizado, alineado a los primers y replicado nuevamente por la DNA polimerasa. El ciclo es repetido muchas veces hasta que se alcanza el nivel de amplificación requerido. Nótese que el procedimiento de amplificación tiene otra ventaja más, un rendimiento exponencial, ya que para el fin del primer ciclo el segmento de DNA se ha duplicado, al fin del segundo ciclo al cuadruplicado, etc., de tal modo que para el décimo ciclo tendremos aproximadamente 1024 copias a partir de cada templado original.

Inicialmente la elongación de las cadenas en el PCR se llevaba a cabo con el fragmento Klenow de la DNA pol I de *E. coli*, lo que presentaba la desventaja de que en cada ciclo de desnaturalización del DNA la polimerasa también se desnaturalizaba, lo que obligaba a la adición de nueva enzima al final de cada paso de desnaturalización. El mayor avance en el PCR vino con el descubrimiento de una polimerasa termoestable aislada a partir de una bacteria termófila *Thermus aquaticus*. Esta polimerasa fue llamada *Taq* polimerasa. Esta enzima tiene una temperatura óptima de catálisis de 72°C, temperatura a la cual las cadenas del templado permanecen separadas, por lo que el paso de elongación de las cadenas se lleva a cabo a ésta temperatura. Pero la ventaja más grande que ofrece es que solamente tiene que ser adicionada al inicio de la reacción, ya que no pierde su actividad aún durante el paso de desnaturalización (Gardner 1991).

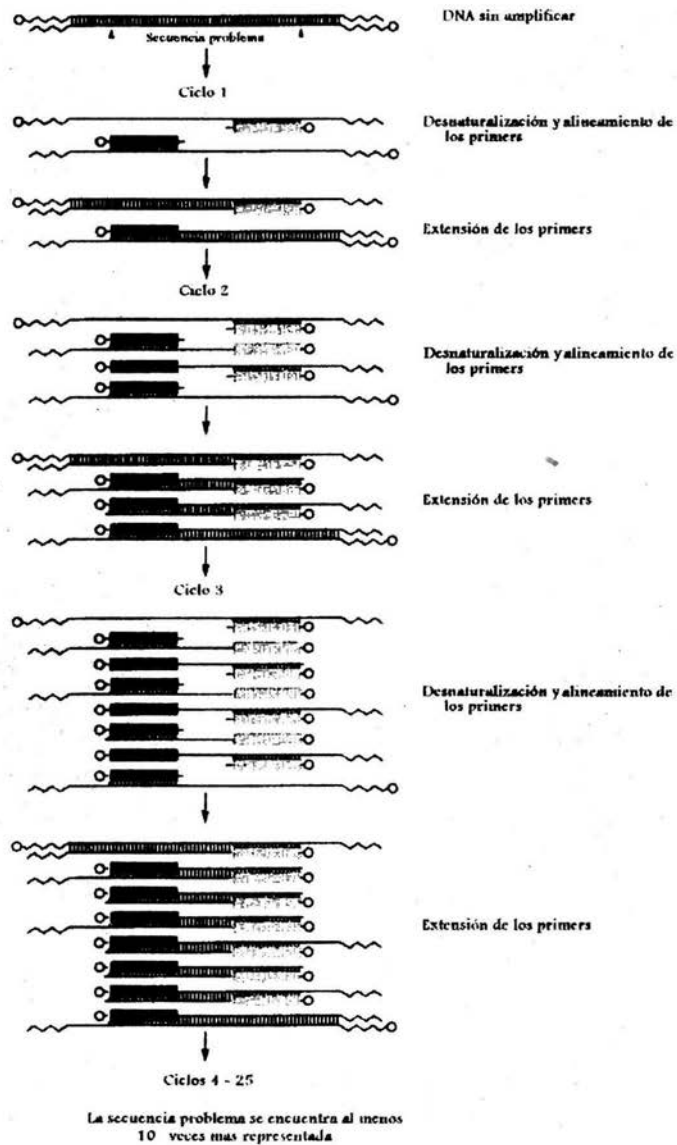


FIGURA 4 Mecanística de la reacción de PCR.

VARIANTES DEL PCR.

Cada vez son más las aplicaciones del principio de amplificación por PCR en la biología molecular, donde se han desarrollado variantes de esta técnica de las cuales a continuación mencionaremos algunas:

RT-PCR: (Reverse Transcription PCR). Esta técnica nos permite obtener una secuencia en particular de cDNA a partir de RNA; para lograr esto, es necesario incubar RNA con transcriptasa reversa en presencia del primer reverse, el cual servirá de cebador a dicha enzima para la síntesis de la primera cadena del cDNA. Posteriormente, el híbrido es desnaturalizado y se añade el segundo primer con la Taq polimerasa para así iniciar con el primer ciclo de amplificación (Life Technologies 1994).

DD-PCR: (Differential Display-PCR) En esta variante de la técnica de PCR se busca encontrar genes que se expresen de una manera diferencial durante algún proceso metabólico; por ejemplo, saber si existen genes que se expresen diferencialmente durante la germinación del maíz. Para lograr esto se obtiene RNA de diferentes tiempos, de diferentes tejidos etc., los cuales se transcriben a cDNA usando como primers oligonucleótidos universales hacia el extremo 5' y oligonucleótidos con la estructura NN(poli T) hacia el extremo 3', donde N es alguna base en particular que sesga la población de mensajes que serán transcritos a cDNA, logrando con esto que mensajes que se encuentren mayormente representados logren una mayor amplificación que mensajes que estén menos representados (Life Technologies 1994).

Secuenciación por PCR: El método está basado en la secuenciación por el método de Sanger, solamente que con el PCR podemos usar varios ciclos de polimerización, lo que vuelve a esta técnica más sensible (Life Technologies 1994).

PCR *in situ*: En esta técnica se realiza una amplificación por RT-PCR directamente sobre un tejido, aunado a que a los oligonucleótidos o a los nucleótidos se les “pega” químicamente un grupo cromóforo, lo que permite detectar en qué parte del tejido ocurrió una amplificación y por tanto en qué región física de un tejido se está expresando determinado mensaje (Life Technologies 1994).

Existen más variantes de ésta técnica como el RACE 5' y RACE 3', mutagénesis dirigida, PCR competitivo, etc., sin embargo por cuestiones de espacio solamente se explicaron brevemente aquellas de mayor importancia para el presente trabajo.

J USTIFICACIÓN

Estamos interesados en saber cuales son los eventos moleculares que desencadenan la proliferación celular durante la germinación de semillas del maíz, cómo están regulados y evaluar el efecto de hormonas vegetales sobre estos eventos. Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio han indicado que al tratar ejes embrionarios de maíz con citocininas, se produce una fuerte estimulación de la actividad de una enzima tipo PARP, a la vez que se produce una estimulación de proteínas calcio-independientes (Zúñiga 1995). Las células de estos ejes entran a la fase S del ciclo celular mucho antes que lo hacen las células de ejes no tratados con la hormona. Consideramos así, la posibilidad de que genes como los de PARP y MAPK se expresen durante el inicio de la germinación, especialmente en ejes estimulados con hormonas, para así colaborar en la promoción del ciclo celular.

Por esta razón, el presente trabajo se planteó estudiar los genes de estas dos enzimas, las cuales deben jugar un papel regulatorio crítico en las primeras fases de la germinación. Las proteínas tipo MAPK, como ya se discutió antes, se encuentran al final de las cascadas de fosforilación, muy cerca de factores traduccionales, transcripcionales y de duplicación, por lo que su activación podría ser una señal del inicio de la proliferación celular. Asimismo, el conjunto de proteínas reparadoras del DNA (entre ellas PARP) regulan también la proliferación ya que de su actividad depende la integridad de esta molécula.

La estrategia experimental que se decidió utilizar para el aislamiento de regiones de DNA con secuencias tipo MAPK y PARP fue la técnica de amplificación por PCR. Dicha técnica, como ya se discutió, es particularmente sensible, específica y de alto rendimiento siempre y cuando sean escogidas correctamente las condiciones para la reacción de

amplificación, lo que ha hecho de esta técnica una de las más usadas hoy en día para el aislamiento de genes de todos los grupos taxonómicos.

El presente trabajo reporta los resultados que hasta ahora se han obtenido, como son la clonación de las regiones que fueron amplificadas, la secuenciación parcial de estas regiones y la expresión de una de ellas durante las primeras fases de la germinación del maíz, así como los resultados obtenidos del primer escrutinio de un banco genómico.

Posteriormente, una vez aisladas estas regiones putativas de estos genes, y habiendo sido secuenciadas, se podría en un futuro buscar el mensaje completo en bancos de cDNA, buscar el gene completo en bancos de DNA genómico, medir su expresión en ensayos de Northern Blot usando RNA de ejes embrionarios sin tratar y tratados con hormonas vegetales para de esta manera evaluar el efecto de hormonas vegetales en la expresión de este gene durante la germinación de semillas de maíz.

A más largo plazo, el conocimiento que se logre construir con los trabajos de todos los que nos dedicamos al estudio de la germinación del maíz será aplicado en la biotecnología de semillas para desarrollar variedades transgénicas de maíz genéticamente estables, cuyas semillas mejoradas germinarían de una manera mas homogénea aún después de largos periodos de almacenaje que propician el deterioro de la semilla; deterioro que es consecuencia de la alteración bioquímica de la estructura celular.

OBJETIVOS

Para el presente trabajo nos propusimos los siguientes objetivos:

1. Diseñar y sintetizar oligonucleótidos de secuencias conservadas de MAPK y PARP.
2. Amplificar por PCR secuencias tipo MAPK y PARP usando dichos oligonucleótidos y analizar electroforéticamente los productos resultantes
3. Clonar dichos productos de PCR.
4. Secuenciar los productos de PCR que hayan sido clonados.
5. Estudiar la expresión de M5 durante la germinación de semillas de maíz, utilizando las sondas obtenidas por análisis de Northern y/o RT-PCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico: Para la realización de este proyecto se utilizó maíz (*Zea mays* L.) variedad chalqueño. El banco genómico de maíz fue adquirido de Stratagene (Lambda FIX II Library), la bacteria hospedera (*E. coli* SRB-P2) fue proporcionada en el mismo paquete. El plásmido pCRII y las células competentes (INVαF⁺) fueron adquiridos de Invitrogen Co.

Los métodos aquí reportados fueron tomados de Sambrook 1992, Weissbach 1988, y manuales de Gibco BRL, Perkin Elmer, Boehringer, Invitrogen, DuPont, Stratagene y Pharmacia, mismos que pudieron haber sido modificados parcialmente.

Obtención del DNA de ejes embrionarios: Se partió de 0.8 - 1.0 gramos de ejes embrionarios de maíz variedad chalqueño, los cuales fueron extraídos de la semilla a mano, auxiliándose con una navaja; fueron congelados en nitrógeno líquido y homogeneizados en un mortero estéril; el polvo resultante se agitó vigorosamente en 15 ml de buffer de extracción: Tris-HCl 100mM pH 8, EDTA 50mM pH 8, NaCl 500mM, β-Mercaptoetanol 10mM y 1ml de SDS al 20% y se incubó a 65 °C 10 minutos; posteriormente fueron adicionados 5ml de acetato de potasio (KAc) 5M, dejándose reposar a 0 °C 20 minutos; después, el extracto fue centrifugado a 25000 g durante 20 minutos, se separó y filtró el sobrenadante, en el cual se hallan los ácidos nucleicos, los cuales, fueron precipitados con 10 ml de propanol-2 a 25000 g 15 minutos, y resuspendidos en 0.7 ml de Tris-HCl 50mM pH 7.4, EDTA 10mM pH 8 (TE). La solución fue transferida a un tubo eppendorf y se volvió a precipitar con 75μl de acetato de sodio (NaAc) 3M pH 5.2 y 500μl de isopropanol, resuspendiendo nuevamente en TE y tratando con RNasa libre de DNasa (Boehringer) a una concentración de 50 μg/ml a 37 °C toda la noche. Las proteínas fueron eliminadas tratando la solución con fenol, 1:1 (v/v), fenol-cloroformo 0.5:0.5:1 (v/v) dos veces y cloroformo 1:1

(v/v); el DNA se precipitó con etanol absoluto 3:1 (v/v) y NaAc 3M pH 5.2 0.1/1, fue resuspendido en 250 μ l de TE y se determinó su cantidad y pureza por un método espectrofotométrico (1U A_{260} = 50 μ g de DNA ó 40 μ g de RNA).

Obtención de RNA de ejes embrionarios: El RNA se extrajo con TriZOL™ (Gibco BRL) a razón de 1.5 ml por cada 100 mg de tejido, éste se homogeneizó en un mortero estéril y se centrifugó para remover fracciones insolubles, posteriormente fueron agregados 0.2 volúmenes de cloroformo-alcohol isoamílico 49 partes a 1 y se centrifugaron en microcentrífuga a 12 mil r.p.m. durante 10 minutos, el sobrenadante se trasladó a un tubo limpio y el RNA fue precipitado con 1 volumen de isopropanol a -20 °C y se incubó de 5 a 30 minutos a -70 °C y centrifugado durante 10 minutos a 12 mil r.p.m.. Finalmente, la pastilla fue resuspendida en agua desionizada tratada con dietil pirocarbonato (1 ml de DEPC/ l. de agua destilada) (dH_2O -DEPC).

Síntesis de oligonucleótidos: La síntesis de los oligonucleótidos se llevó a cabo en un Gene Assembler Special (Pharmacia) a una escala de 0.2 μ moles cada uno. Los oligonucleótidos son sintetizados en una columna de soporte, de la cual tienen que ser liberados dejándolos toda la noche en un tubo eppendorf con 1.5 ml de NH_4OH a 65°C para posteriormente ser purificados en una columna de Sephadex G-25 (Pharmacia).

PCR: Para las reacciones de PCR se utilizó un termociclador modelo 480 (Perkin Elmer) y un kit de PCR Reagent System: Taq-polimerasa, mezcla de desoxinucleótidos trifosfato, buffer de PCR, y dH_2O (Gibco BRL), mezcla de los oligonucleótidos (Forward & Reverse) así como el templado de interés. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en tubos de pared delgada en un volumen final de 100 μ l (aunque se puede disminuir el volumen hasta 25 μ l)

en el cual las concentraciones de los componentes finales de reacción recomendados son: dH_2O necesaria para el volumen final deseado, buffer de PCR 1X, $MgCl_2$ de 1 a 2 mM, nucleótidos 0.2mM c/u, oligonucleótidos 2 μ M c/u, templado 10 ng/ μ l, *Taq* polimerasa 2.5U/100 μ l. Una vez que fueron añadidos todos los componentes en el orden indicado se dió un pulso de centrifugación y se les añadió a las muestras una o dos gotas de aceite mineral para evitar pérdidas por evaporación. El tubo de reacción se colocó en el termociclador ya pre-calentado a 94°C y fueron incubados a esta temperatura durante 5 minutos previo al primer ciclo de amplificación. Se recomienda también que el número de ciclos sea de 25 ya que más allá de este número la eficacia de la enzima disminuye y los componentes de la reacción comienzan a ser limitantes. Igualmente, se recomienda que al final de estos 25 ciclos se dé un periodo de polimerización final a 72 °C durante 10 minutos. La reacción se detuvo agregando EDTA 5mM o por refrigeración.

RT-PCR: Se utilizó un kit de RNA-PCR: $MgCl_2$, buffer de PCR, *Taq*-polimerasa, mezcla de desoxinucleótidos trifosfato, transcriptasa reversa MuLV, inhibidor de RNAsa, H_2O -DEPC (Perkin Elmer) para la síntesis de cDNA y para la amplificación, utilizando los oligonucleótidos sintetizados como “primers” y RNA como templado. En un tubo se añadieron en orden los siguientes componentes (en concentración final): dH_2O necesaria para un volumen final de 20 μ l, $MgCl_2$ 5mM, 10X PCR buffer II 1X, nucleótidos 1mM c/u, Inhibidor de RNAsa 1 U/ μ l, oligonucleótido “reverse” 0.75 μ M y 1 μ g de RNA total (pueden usarse 5 a 10ng de RNA poli A⁺), las muestras se incubaron a 65°C durante 5 minutos, después se bajó la temperatura a 42°C y se añadió Transcriptasa reversa MuLV 2.5 U/ μ l, para ser incubados a esta temperatura durante 15 a 25 minutos, al cabo de los cuales se agregaron 80 μ l del mix de PCR con concentraciones finales de: $MgCl_2$ 2mM, 10X PCR

buffer II 1X, oligonucleótido “forward” 20 μM , Taq polimerasa 2.5U/ μl y una o dos gotas de aceite mineral. Las muestras se incubaron a 94°C durante cinco minutos antes del primer ciclo de amplificación.

Purificación en columnas de sephadex: Se cubrió el fondo de una jeringa desechable para insulina de 1ml de capacidad con fibra de vidrio (pelo de ángel), y fue llenada con una solución de Sephadex G-25 (Pharmacia) en STE 1X (NaCl 0.1M, Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM), se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 4 minutos a temperatura ambiente, las columnas se lavaron agregando 200 μl de STE y repitiendo la centrifugación. La muestra, que debe tener un volumen máximo de 200 μl , fue cargada en la columna y se repitió la centrifugación, el eluyente resultante es la muestra purificada.

Transferencia Southern: Se cortaron 20-40 μg de DNA de maíz con *EcoRI*, *BamHI* y *HindIII* (Gibco BRL) en Buffer de Restricción Gibco BRL Números 2, 2 y 3 respectivamente a 37 °C toda la noche para correr una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% junto con λ -*HindIII* como marcador de peso molecular y como control negativo, los productos de amplificación o vectores que se usarían como sondas también fueron cargados como controles positivos. Después de la electroforesis, el DNA se transfirió utilizando un filtro de Nylon como soporte receptor y como buffer de transferencia NaOH 0.5M. Al cabo de 16 a 18 horas, se removió el aparato de transferencia (figura 5) y el DNA fue fijado a la membrana de Nylon en un UV-Crosslinker (Hoefer Scientific Instruments) a 1200 KJ/cm² durante cuatro minutos.

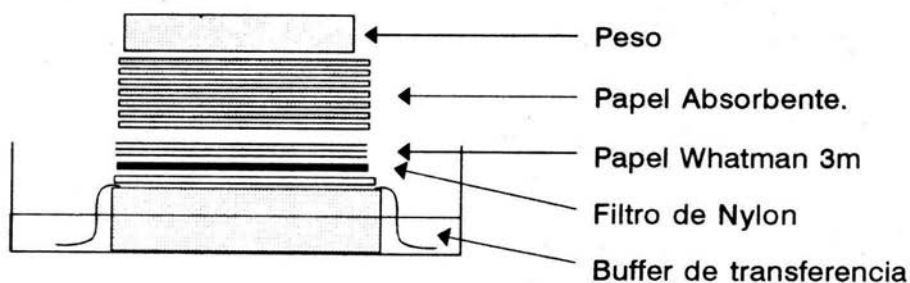


FIGURA 5 Transferencia de ácidos nucleicos a membranas de nylon.

Transferencia Northern: Se prepararon geles desnaturalizantes de agarosa al 1.5%, en los cuales se agregaron 0.178 partes de formaldehído concentrado, 0.625 partes de agarosa disuelta en H₂O-DEPC y 0.196 partes de buffer de corrida para gel de formaldehído (FGRB) (0.1 M MOPS pH 7.0, 40 mM NaAc pH 5.2, 5 mM EDTA pH 8.0). Las muestras de RNA se cuantificaron para tratar 100 µg agregando 0.44 volúmenes de FGRB, (0.77 volúmenes de formaldehído y 2.2 volúmenes de formamida), fueron calentadas a 65 °C 15 minutos, se enfriaron en hielo y fueron cargadas en el gel inmediatamente; las muestras de DNA que se cargaron como controles positivos fueron preparadas de la misma manera. Al terminar la corrida se

montó el aparato de transferencia del mismo modo que en la transferencia Southern, pero usando 20X SSC (NaCl 3M, Citrato de Na 0.3 M pH 7.4) como buffer de transferencia.

Marcaje de sondas: Se marcaron 5 ng de DNA haciéndolo reaccionar con 6µl de 5X Random primer extension buffer, 7 a 12µl de DNA con agua destilada, 6µl de mezcla 5X de desoxinucleótidos trifosfato menos dCTP, 0.25 a 5µl de dCTP marcado en posición α ^{32}P (50 µCi), la muestra se incubó a 94 °C durante cinco minutos y se enfrió en hielo rápidamente, finalmente se agregó 1µl del fragmento grande de la DNA polimerasa I de *E. coli*, también conocido como fragmento Klenow, hasta un volumen final de 30µl (todo de Biotechnology Systems NEN research products). Se dejó la reacción seis horas a temperatura ambiente. Posteriormente, la sonda fue purificada en una columna de Sephadex G-25 (Pharmacia) y se almacenó a -20 °C hasta su utilización. Típicamente se obtenía una incorporación específica de 10^7 C.P.M. /µg DNA.

Hibridación en membranas de Nylon: Primeramente se sumergió el filtro de Nylon en 6X SSC durante dos minutos, se prehibridó durante seis horas a una temperatura 5°C menor que la temperatura de hibridación en una estufa de hibridación (Hybaid), introduciendo el filtro en una botella de hibridación (Hybaid) con 37.5ml de 6X SSC, 5X Denhardt's (100X Denhardt's se prepara con 5g de ficoll, 5g de polivinilpirrolidona, 5g de BSA, y agua destilada estéril hasta 500 ml, agitación toda la noche), 0.5% SDS, 100µg de DNA de cadena sencilla de esperma de pescado (MB Grade Boehringer). Al finalizar la pre-hibridación se hibridó a la temperatura deseada para regular la astringencia del experimento, (37 a 68 °C) 16 horas en 6X SSC, 0.5% SDS, 100µg/ml de DNA de esperma de pescado, y la sonda marcada. Finalmente se lavaron los filtros con baños sucesivos a 6X, 3X, y

1.5X SSC, a temperatura ambiente y a 6X, 3X y 1.5X SSC a 47.5 °C para experimentos poco astringentes y hasta 0.1X SSC y 68°C para experimentos de alta astringencia. Todas las soluciones de lavado incluían 0.5% de SDS y cada lavado duró 20 minutos, al término de cada lavado el filtro se monitoreaba con un contador Geiger de mano, los lavados se suspendían cuando no se detectaba marca inespecífica en la membrana. Finalmente los filtros se secaron y se expusieron en autorradiografía a -70 °C.

Clonación directa de productos de PCR en pCRII™: Esta técnica de clonación desarrollada por Invitrogen Co. aprovecha un “defecto” que tienen la mayoría de las *Taq* polimerasas, las cuales, al terminar la polimerización de los fragmentos amplificados les añaden una adenina en posición 3'; esta compañía ofrece un plásmido capaz de ligarse al producto de PCR con la ayuda de esa adenina, por lo que las clonaciones tuvieron que llevarse a cabo el mismo día que el PCR ya que este “defecto” en los productos se pierde con facilidad. El procedimiento es sencillo; 1µl del producto fresco de PCR se incubó con 1µl de buffer de ligación, 2µl de vector, 1µl de T4 DNA ligasa y agua estéril hasta 9µl. Se incubó la reacción toda la noche a 14°C. La transformación se llevó a cabo añadiéndole a 50µl de células competentes 2µl de βmercaptoetanol, y 2µl de la reacción de ligación. Se incubó la reacción en hielo durante 30 minutos, se dió un pulso de calor de 30-60 segundos a 42°C, se regresó al hielo durante dos minutos y finalmente las células fueron usadas para inocular 500µl de medio LB (Luria Broth), se dejaron crecer 30 minutos a 37°C y se plaquearon en cajas con agar LB, ampicilina 100µg/ml, IPTG 160nM y X-Gal 160nM. Las bacterias transformantes fueron aquellas que al crecer en este medio producían colonias de color blanco.

Escrutinio del banco genómico: Se prepararon aproximadamente 40 cajas con agar YFSMMg (5g de NaCl, 5g de extracto de levadura, 10 g de

peptona, 0.2% de maltosa, 10 mM de $MgSO_4$ y 1.8% de agar) y fueron inoculadas con 3 ml de agar YPSMMg suave (en lugar de agar lleva 0.8% de agarosa), 0.2ml de cultivo bacteriano $A_{595} = 0.5$, y aproximadamente 25,000 unidades formadoras de placa (UFP). Las cajas son incubadas de 5 a 7 horas hasta que se puedan observar las placas, la superficie de agar suave de las cajas fue cubierta con filtros de nylon cargados positivamente (Boehringer) previamente esterilizados para que los fagos difundieran a la membrana, el DNA del filtro fue desnaturalizado, neutralizado, prehibridado, hibridado y expuesto a autorradiografía como se ha explicado anteriormente. Las clonas que hayan resultado positivas se recuperan de la caja original para ser reescrutinadas.

Secuenciación de los insertos clonados: Se utilizó el kit de secuenciación Amplicycle de Perkin-Elmer, el cual consta de buffer de secuenciación, mezcla de reacción para G, A, T, y C, solución stop, DNA control y primers “forward” y “reverse” para plásmidos con sitios M-13, los cuales son regiones del fago M-13 cuyo material hereditario es DNA de cadena sencilla, el cual es muy usado como vector para propagar las regiones a secuenciar.

Debido a que el plásmido en el que se clonaron los productos de PCR (pCRII) posee sitios M-13 en las zonas flanqueantes al “polilinker” (Sitio del plásmido con múltiples zonas de restricción y donde se ubica el inserto), se decidió secuenciar usando los primers de M-13 como cebador a alta astringencia (68°C como temperatura de alineamiento).

Se tomó una colonia de una caja petri con una asa de siembra y se disolvió en 50 μ l de DNA Extraction Reagent (Perkin Elmer), se calentó a 99°C durante 10 minutos y se centrifugó a 12K r.p.m. durante un minuto a

temperatura ambiente, a 20 μ l del sobrenadante se le añadieron 10 pmoles de primer y se calentó a 95°C cinco minutos para posteriormente ser enfriadas en hielo. Posteriormente y en frío se añaden 4 μ l del buffer de secuenciación, 1 ó 2 unidades de *Taq* polimerasa, 25 μ Ci de α^{32} P dCTP y dH₂O hasta 15 μ l; se dividen en cuatro tubos y a cada uno se le agregan 2 μ l de cada mezcla de reacción diferente (G, A, T, C), se agrega una gota de aceite mineral a cada tubo y se dan 25 ciclos de PCR bajo las siguientes condiciones: 95°C 1 minuto, 72°C un minuto y 68°C un minuto. Al final se agregan 4 μ l de solución stop a cada tubo, se calientan a 94°C durante 5 minutos y después de ser enfriadas en hielo se cargan en un gel de secuenciación de acrilamida al 8%. El gel se seca y se expone a autorradiografía a -70°C.

RESULTADOS Y DISCUSION

DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS.

En base a las secuencias reportadas en la literatura, se eligieron ciertas regiones de los genes de MAPK y PARP basándose en los siguientes criterios:

1) Alineando las secuencias aminoacídicas de MAPK y PARP de distintos grupos taxonómicos y eligiendo aquellas regiones que se hallasen mas conservadas filogenéticamente, lo cual es un indicio de que deben ser regiones estructuralmente importantes o imprescindibles para el buen funcionamiento de la enzima, y que codifican para regiones que le brinden a la proteína su capacidad catalítica o su especificidad.

2) Eligiendo las regiones de la secuencia primaria de la proteína que le dan a la enzima especificidad, para así evitar regiones comunes con otras proteínas; por ejemplo, si elegimos para el oligonucleótido "forward", la región que codifica para un dominio catalítico de la enzima problema, la región que seleccionemos para el oligonucleótido "reverse" debe estar ubicada dentro de una región que codifique para un dominio de reconocimiento de sustrato, un dominio de regulación, etc. De esta manera, solamente serán amplificadas aquellas secuencias que sean flanqueadas por secuencias que codifican para ambas actividades enzimáticas.

3) Buscando las regiones del DNA que codifican dichas secuencias, se alinean las secuencias de nucleótidos; de esta manera, se eligieron las regiones que constan de 21 nucleótidos para MAPK y 24 para PARP.

4) Se crearon degeneraciones en los oligonucleótidos con el fin de tener una mayor posibilidad de hibridación previniendo de esta manera las posibles sustituciones de nucleótidos (o mutaciones) que sufrieran los genes de MAPK y PARP del maíz en su historia evolutiva. Para esto se utilizó la tabla reportada por Wada *et al*, (1990) donde cita las frecuencias de codón por aminoácido en proteínas de maíz. Por ejemplo, los porcentajes de leucina son los siguientes: CTA 9.6%, CTC 26.4%, CTG 28.2%, CTT 15.8%, TTA 4.4%, TTG 15.4%; de esta manera, al crear un oligonucleótido con secuencias para leucina, un CT^(G/C) reúne más de un 50% de posibilidades de codificar leucina en esa posición, aunque no quiere decir que un oligonucleótido tenga ambas bases; lo que sucede realmente es que el sintetizador incorpora una mezcla de estas bases en la misma posición teniendo como resultado dos poblaciones de oligonucleótidos, los que tienen CTC y los que tienen CTG.

La manera de seleccionar la direccionalidad de los oligonucleótidos está dada por la secuencia original reportada, que es siempre la cadena con sentido en la dirección 5'→3', por lo que el oligonucleótido forward será aquel que se encuentre ubicado hacia el extremo 5' y en la misma dirección que la cadena reportada, es decir será idéntica; el oligonucleótido reverse será aquel que se ubique hacia el extremo 3' de la cadena reportada y en sentido antiparalelo a ésta, con el fin de dejar siempre un extremo 3'OH libre a la polimerasa en el momento del apareo con la secuencia problema.

SÍNTESIS DE OLIGONUCLEÓTIDOS.

Para MAPK se sintetizaron los siguientes oligonucleótidos:

Oligo "Forward":

5'-GGCGC^(C/T)TACGG^(C/T)ATTGT^(C/G)TGC -3'

Oligo "Reverse":

5'-(A/G)AGCTCTGG^(G/T)GC^(T/G)CGGTACCA -3'

En la figura 6 podemos localizar estos oligonucleótidos en el mensaje completo de una MAPK de chícharo; el oligonucleótido "forward" se encuentra ubicado en el dominio número tres de las proteínas tipo MAPK, el cual está encargado de la unión a nucleótido y fosforilación. El oligonucleótido "reverse" se halla en el dominio número ocho en el cual se encuentra ubicada la región de reconocimiento de enzimas tipo MEK, MAPKK etc. para la fosforilación de esta enzima.

Para PARP se sintetizaron los siguientes oligonucleótidos:

Oligo "Forward":

5'-CT^(C/G)CAGAAGATGCCCT^(C/G)GG^(C/G)AAG -3'

Oligo "Reverse":

5'-(C/G)GCGAAGTAGAT^(G/T)CCCTT^(A/G)CCGAA -3'

En la figura 7 podemos observar el lugar donde se encuentran los oligonucleótidos que se sintetizaron en el gene completo de una PARP de pollo; en este caso, el oligonucleótido "forward" se encuentra ubicado en el dominio número 5 de las proteínas tipo PARP, el cual está ubicado en el

dominio catalítico de la enzima, el oligonucleótido “reverse” se halla aproximadamente 300 pb “rio abajo” en el dominio número 7, en el cual se encuentra ubicada la región de reconocimiento de unión a NADH.

sacl

```

AAATCACTGAGAG GGAAGLATAATGAA GGAGGGAGGAGACT CCGGACGCTGACCG GTGATGGAAGATGA CCCTCCGACAGCAA GAGCCACAGCAGG GCGCGATGCGGATC 120
      M E C G G G A P A A D A V H E D A A F Q Q Q E F Q Q Q A A R G I
GAGAATATCCGGG ACACCTAACCAGGT GGGAGTTTCATGAA TACAATATTCGGT AATATATTGAAGT ACTGGAAATACAGA CCTCTATCATGCA ATCGTAAAGGCGCT 240
      E H I P A T L S H G R F I Q Y H I F G H I F E V T A K Y R P P I M P I G R G A
TAGCGATATCTTCC TCTGCTCATATTCG GAGAGGATGAGAT GTTCTGTCAAGAG ATTCGAAATGCATT GATAACAGATGAT GCAAGAGAGGACCTT CPTGAAATCAAGCTC 360
      T G I V C E A R H S E T H E R V A V K F I A M A F D N K I D A R K T L R E I R L
GTTCGACATGGAT CATGAAAACGTCGTC GCATCCGGGATATA GTGCCACGACTGAG CCGGAGATTTCGAT GATTTTATGATGCA TATGACTAATGCG ACTGACTTCACCAA 480
      V R E H D E E N H V V A I R D I V P P P Q R E V F W D V T I A Y E L R D T D L R Q
ATCAATCGATCAAA T CAAGCATGTCGAG GAGACTGTCAATAT TTTCTATCAAAAT CTTCGTGGTTGAG TACATTCATCCGCG AATGTTTGCATAG GACTTAAACCTCAC 600
      I I R S H Q A L B E E R C Q Y F L T Q I L R G L R Y I R S A H V L E R D L K P S
AACTTCTCCTGAAC CCAACTGTGACTG AAGATTGTGATTT GGACTGCTCCTGTA ACCTCGAAACCGAC TTTATGACTGAATAT GTTTTACAAAGTGG TAGCTTCGACAGAG 720
      N L L L H A N C D L E R I C D F G L A B V T S E T D F M T E Y V V F E N T R A P E
CTTCTCTAACTCT TGTGATTACACAGA GCAATGATCTCTG TCTGTGTTGTATT TTGATGAGCTGATG GATCGAAACCCCTG TTTCTGCGCAGAT CATGTGCATCAGTTG 840
      L L L H S E D Y T A A I D V M S V G C I F N E L N D R E P L F P G R D H V R Q L
CCTTACTCATGGAG CTGATTGGTACCGA TCGAAGCTGATTG GGTTCCTGAATGAA AATCCGAAAGATAC ATTAGGCACTGCTT CTTTACCCTCCGAA TCTTTCCAGAAAG 960
      R L L H E L I G T P S E A D L G F L H E H A E R T I R Q L P L Y R Q S P Q E E
TTTCCGATGTCAT CCGAAGCTATAGT CTGTTGAAAGATG TTAATTTGATCCT AGACAAAGATTACT GTTGAATGCACTG GCACACCTTACTTG ACATCCTGCTGATG 1080
      F P R V H P E A I D L V E K N L T F D P R Q R I T V E H A L A R P Y L T S L E D
ATCAGGATGAACT GTATGCAAGCTCC TTAGCTTTGATTG GAACAGATGCTTG ACCGAGGACAGATG AAGGACTGATATC AGAGGACTCTRCA TTTAACCCTGACTAC 1200
      I S D E P V C T T F F S F D F E Q A L T E E Q H R E L I Y R E A L A H P E Y
CAGCAAGTGTACT GGTGATAATATGCG GCGGCTTATCTGG GTTTGGAAATATTTT GTCTCCGCTCCAT AGGTGAGAGATTC TGTGATATATATCA TCTATCTCATATCT 1320
      Q Q
GAAACCGATGACT TGGAAATTAATFAT TGAATGATTTTGA TTGTAGACTGCTG GAACAGATCATAG GTATTTGTGTTGCT FTATTTGTTGAAAT TATCTCCAAATAT 1440
      TGTTTAAGCAACT TATGATAACTTTGT CAGGACATATGCA TTAATGGTATTTT AAAAAAAMAAAAAA AAAAAA 1522

```

FIGURA 6 Secuencia completa del cDNA de una MAPK de *Arabidopsis thaliana* y la secuencia aminoacídica deducida.

Amplificación por PCR de secuencias codificantes de MAPK y PARP de maíz

1 ATG GCG GAG GCG GCG GAG CCG TAC CCG GCG GAG TAC GCG AAC GCG GCG GCG TCG TCG AAG AAG TCG GAG GCG GCG AAC
2 Met Ala Gln Thr Gly Asp Lys Pro Tyr Arg Ala Ile Lys Lys Ser Gly Arg Ala Ser Cys Lys Lys Cys Gly Ser Ile Ala Lys Ser
31 GAG TCG CCG GCG CCG GCG CCG ATG GTC CAG TCG CCG ATG TTC GAT GCG AAA CCG CCG CAG TCG CAG CAC TAC ACC TCG TTC TCG AAG CCG
32 Asp Ser Ser Thr Cys Lys Ala Lys Met Val Gln Ser Pro Met Phe Asp Gly Lys Val Pro His Trp His Lys Tyr Ser Cys Phe Trp Lys Arg
161 GCG CCG ATC TTC CCG CAC ACA GAG ATC GAT GCG TTC CCG GAG CCG CCG TCG GAG CAG CAG AAA ATA AAG AAC CCG ATT GAA ACC GCG
162 Ala Arg Ile Val Ser His Thr Asp Ile Asp Gly Phe Pro Glu Lys Arg Trp Glu Asp Gln Glu Lys Ile Lys Lys Ala Ile Gln Thr Gly
271 GCG CCG CAG GAG AAA GCG GCG ACC ACC GAG GAG GTC GCG AAC GCG ACC CTA ACT GAC TTC TTT TTT GAG CAG TAT GCG ACC TCG
272 Ala Lys Gln Glu Lys Gly Tyr Arg Lys Gln Val Gly Tyr Ala Gln Lys Ser Leu Thr Asp Phe Ala Ile Gln Tyr Ala Lys Ser
361 AAC ACC AAT ACT TCG AAA GCG TTY GAG CAG AAA ATA GAA ACC GCG CAG ATT CCG ATT TCG AAC AAG ATG ATG GAT CCG GAG AAA CCA CAG
362 Asn Arg Ser Thr Cys Lys Gly Tyr Gln Lys Ile Gln Lys Gly Ile Arg Lys Ser Lys Lys Met Val His Pro Asp AAA CCA CAG
451 CCG GCG ATC GAT AAC TCG CAG CCG GAG TCG TTC CCG ACC CCG GCA GAG CCG GCG TTC CCG CCA ACA ATA TAT GCG GCG ACA CAG
452 Lys Gly Met Ile Asp Asn Trp Tyr His Pro Asp Cys Phe Val Ser Arg Arg Ala Glu Lys Phe Leu Pro Ala Tyr Gly Ala Thr Gln
541 CCG CCG TTC ACC ATG TTC AAA GAT AAA GAA ACT CCG AAC AAA CAG CTA CCA GCT ACT AAG ACT GAA GAA ACC AAG AAA GCG
542 Leu Lys Gly Thr Ser Ile Lys Lys Ala Glu Asp Lys Glu Thr Leu Lys Lys Gln Leu Pro Ala Thr Lys Thr Glu Gly Arg Arg Lys Gly
631 GAG GAG GTA GAT GGA AAT GTG TTC GCA AAA AAG AAA TCA GAA AAA GAA AAA GAA TCA AAG CAG GAA AAA CAG CCG TCG AAG GCG CAG
632 Ala Gln Val Asp Gly Asn Val Val Ala Lys Lys Ser Arg Lys Glu Lys Glu Tyr Ala Lys Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
721 ACA GAG CCG ATC TCG GCG ATC AAG GAT GAG CCG AAG AAG TTC TCG ACC AAT GAG CCG AAA GAG TCG CCG ATC ACC AAC CAG CAG
722 Thr Gln Leu Lys Trp Gly Lys Asp Gln Lys Arg Gln Lys Arg Lys Val Cys Ser Thr Asn Asp Leu Lys Glu Leu Leu Ala Ala Ser Lys Gln Glu
811 GTT CCG TCA GCG GAG AAT GGA ATC TCG AAC AGA TTC GCA GAG GCG ATG GCG TTT GCA GCG CCG CTT CCG TTT GAG GAG TTT AAA GCG CAG
812 Val Pro Ser Phe Lys Ser Asp Ala Thr Tyr Tyr Cys Ser Gly Ser Ile Thr Ala Trp Thr Lys Cys Val Ala Lys Thr Gln Thr Act CCG AAT AGG AAA
901 TTT CCG TTC AAC ACC GAT GCA TAC TAC TCG TCA GCG GAG ATT ACT GCG TCG ACT AAG TGT TCG GCT AAA ACA GAG GAT CCG AAT AGG AAA
902 Phe Tyr Thr Tyr Asn Arg Ala Tyr Tyr Cys Ser Gly Ser Ile Thr Ala Trp Thr Lys Cys Val Ala Lys Thr Gln Thr Act CCG AAT AGG AAA
991 GAG TCG GTA ACC CCG AAC GAA TTT CCG AAT CCG TAT CCG AAA AAA TTT AAG TGT AAG AAG CAG GAT AGG ATA TTC CCG CCG GCG GCG
992 Asp Trp Val Ile Pro Lys Glu Phe Arg Glu Ile Pro Tyr Leu Lys Lys Phe Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
1081 GCA ACT STG AAC TTY GCA CCA CCG CCG GCG TCG CCG ACC CTA TCG ACA GAG ACT GTC ACT GCA CCG CCA GAG AAA GCA CCA CCG ACC AAC
1082 Ala Thr Val Asn Ser Ala Pro Pro Pro Cys Ser Ala Pro Leu Thr Gln Thr Val Thr Ala Pro Gln Asp Lys Pro Leu Thr Asn Met
1171 AAA ATG CCG ACT CTT GGA AAG CCG TCG AAC AAC CAG CAA CCG AAT ATT CCG CAG GAG CCG GCA GGA AAG ATA GCA ACA CCA GCT
1172 Lys Ile Leu Thr Leu Gly Lys Leu Ser Lys Asn Lys Glu Glu Val Lys Asn Ala Val Glu Glu Lys Gly Lys Ala Tyr Met Thr Thr Thr Ala
1261 AAC AAG ACC TTC TCG ATC ABC ACA CAA AAG GAG GTC GAG AAA ATG ACC AAG AAG ATG GAA GAA CCG GAG GAT CCG AAA GCT CCG
1262 Asn Lys Ala Thr Leu Cys Lys Ile Ser Thr Gln Lys Glu Val Glu Lys Met Ser Lys Lys Met Glu Glu Val Lys Asp Ala Lys Val Arg Val
1351 GCG TCA CAG GAG TTT CTT AAG GAT GTC AAA TTT TCG AAC AAG GCG TTC CAG CAG CTT CCG TCT CCG CAG AAT TCA CCG TCG GCG GCG
1352 Val Ser Ser Lys Gln Phe Leu Lys Asp Val Lys Ser Ser Asn Lys Gly Phe Gln Glu Leu Ser Leu His Ala Ile Ser Pro Trp Gly Ile
1441 GAG GTC AAA GCG CAG CAG GAG GTC GCG STG GAT GCG AAC TCG ACC ACC CCG AAT ATC AAC AAT GCT GCG AAG GTC AAC GAG GAA
1442 Ala Val Lys Thr Gln His Gln Glu Val Ala Val Asp Gly Lys Tyr Ser Lys Pro Ala Asn Met Lys Met Ala Gln Asp Lys Lys Val Lys Thr Glu
1531 CAA GGA CCG ACC AAG TTT GAG AAG AAA ATA AAG CTA ACA GTA AAT GCT GCA GCG GCG GTA GAT CCG TAT TCG GCG TCG GAG GAT TCG CCG
1532 Ala Val Phe Gly Lys Ser Lys Glu Lys Lys Met Lys Leu Thr Val Lys Gly Gly Ala Ala Val Asp Pro Asp Ser Gly Leu Asp Ser Ala
1621 GAT CCG TTT GAA AAA GGT GCG AAG ATT TTC ACT GCA ACT CCG GCG CTA GTC GAT ATT GTC AAA GCA ACA AAT TCC TAT TAC AAA GTC CAG
1622 His Val Phe Gly Lys Tyr Gly Lys Ala Phe Ser Ala Thr Leu Gly Leu Val Asp Ile Val Lys Gly Thr Asn Ser Tyr Tyr Lys Lys Gln
1711 CCG TCG GAG GAT GAG AAG ACC ACC TCG TCG TCG TCG TCG GCG GCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG
1712 Lys Leu Glu Asp Asp Arg Glu Ser Arg Trp Trp Val Phe Arg Ser Thr Cys Arg Val Gly Thr Val Ile Gly Ser Ser Lys Lys Thr Val Lys
1801 ATG TCA TGA AAA GAA GAT GCT GTC GAA CAG TTC CTA AAT TCG TAC GAA GAG AAA ACT GCG AAT TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG
1802 Met Pro Ser Lys Gln Asp Ala Val Gln His Phe Leu Asn Leu Tyr Gln Glu Tyr Thr Gly Asn Ser Trp His Ser Lys Asn Phe Thr Ala
1891 TAT CCG AAA AAA TTC TCA CCA CCG GAA ATA GAT TAT GAA CAG GAT GAA GAA GAT CCG ACC AAA CTA GCA CCG ATC TCG AAT AAA TCG
1892 Cys Tyr Phe Lys Phe Tyr Pro Leu Glu Ile Asp Tyr Gly Gln Asp Glu Ala Val Arg Lys Leu Thr Val Ser Ala Lys Thr Lys Ser
1981 AAG CTT ACC GCA ACT CAA GAG CTT ATT AAG ATG ATT TTT GAT CCG GAG ACC ATG AAG AAA ACC ATG CCG GAA TTT GAG ATT CAG CCG
1982 Lys Leu Ala Lys Pro Ile Gln Asp Leu Ile Lys Met Ile Phe Asp Val Glu Ser Met Lys Lys Ala Met Val Glu Ser Glu Ile Asp Leu
2071 GAG AAG ATG CCA CCG GCG AAA CCG ACC AAG CCA CAG ATC CAA ACT GCA TAC TCG CTT AAC GCG GTT CAG CAG GCG GTT TCT GAG CCG
2072 Ala Lys Met Pro Leu Gly Lys Asn Ser Lys Arg Gln Ile Gln Ser Ala Tyr Ser Ile Lys Asn Gln Val Gln Gln Ala Val Ser Asp Gly
2161 GGT TCG GAA TCG CAG ATC TCG GAC TTC TCA AAC CCG TTC TAT ACT CCG ATC CCG GAT GAG TCG GCG ATG AAG AAA CCA CCG CCG CCG CCG
2162 Gly Ser Gln Asn Gln Ile Leu Asp Leu Ser Asn Arg Phe Tyr Ser Leu Lys Pro His Asp Phe Gly Met Lys Lys Pro Leu Leu Ser Ser
2251 AAC TCG GAA TAC ATT CAG GCT AAA CCG CAG ATG TTC GAG AAC TCG CCG TAT ATT GAG GTT GCT TCG ACT CTT CCG ACA GGT GAA AAT GCG
2252 Asn Thr Gln Tyr Ile Gln Ala Lys Val Gln Met Leu Asp Asn Leu Asp Ile Gln Val Ala Tyr Ser Leu Asp Ser Gly Leu Asp Ser Ala Thr Thr
2341 GAT GAG CAG AAA GAG CCA ATT GAT AAT TAT GAA AAG CCG CCA ACT GAT ATT AAG GTT CCG GAG AAA GAT TCA GAA ACC GCG AAG ATT
2342 Asp Gly Asp Lys Asp Pro Ile Asp Ile Asn Tyr Glu Lys Leu Arg Thr Asp Ile Lys Val Val Asp Lys Asp Ser Glu Glu Ala Lys Ile
2431 ATT AAA CAA TAC GTC AAA AAT ACT GAT GCT GCT ACC CAC AAT GCA TAT GAC TTC AAA STG TCG GAA TTT GAG ACC AAT GAA CCG
2432 Ile Lys Gln Tyr Val Lys Asn Thr His Ala Ala Thr His Asn Ala Tyr Asp Leu Lys Val Val Gln Ile Phe Arg Ile Gln Arg Gly Gly
2521 GAG AAT CAG GCT TAC AAG CCA TTT AAG CAG CTT AAT CCG CAG CCG CCG TCG TCG GAG GCG TCG CCG ACC ACC ACC ACC ACC ACC ACC
2522 Gln Ser Ser Gln Ser Tyr Lys Pro Phe Lys Gln Leu His Asn Arg Gln Leu Lys Trp His Gly Ser Arg Thr Thr Asn Phe Ala Gly Ile Leu
2611 TGA CAG GCT CCG CCG ATA GCT CCG CCG GAA GCT CCG STG ACC GCG TCG AAT ATG TTT GCG AAG GCG ATC TAC TTT GCA GAT ACC TTT CCG
2612 Ser Gln Gly Leu Arg Ile Ala Pro Pro Gln Ala Pro Val Thr Gly Tyr Met Phe Gly Lys Ile Lys Tyr Arg Arg Met Val Ser Lys
2701 AAT CCG AAC TAC TCG ACA TCT CAA GCT GAT CCA ATG GCG TTA ATA CTA TTC GGA GAA GTC CCG CCG GAA ATT GAT GAG CAG AAT
2702 Asn Ala Ser His Ile Thr Lys Leu Pro Lys Gly Lys His Ser Val Lys Gly Lys Lys Thr Ala Pro Asp Phe Ile Ala Thr Thr Thr
2791 AAT GCT TCT CAC ATA AAA TCG CCG AAG GCA AAA CAT AAT GTC AAA GCG TTC GCG AAA ACT GCA CCG ACC TCA CCG ACC ACT ACA ACC
2792 Asn Ala Ser His Ile Thr Lys Leu Pro Lys Gly Lys His Ser Val Lys Gly Lys Lys Thr Ala Pro Asp Phe Ile Ala Thr Thr Thr
2881 CTT GAT GCT STG GAA CTT CCG TTA GCG AAT GCG ATC TCA ACA GGA ATT AAT GAT ACT TGT CCG TCG TAC AAT GAA TAT ATT CCG TAT GAT
2882 Leu Asp Gly Val Gln Val Pro Leu Gly Asn Gly Ile Ser Thr Gly Ile Asn Asp Thr Cys Leu Leu Tyr Asn Gln Tyr Ile Val Tyr Asp
2971 CTT GCT CAG TTA AAT CCG AAC TCG CCG AAA CCG AAA CAG TAT AAG NCA TCA CTT TCG TCA
2972 Val Cys Gln Val Asn Leu Lys Tyr Leu Lys Lys Lys Phe Asn Tyr Lys Thr Ser Leu Trp

FIGURA 7 Secuencia completa del cDNA de una PARP de pollo y la secuencia aminoacídica deducida.

Para los cuatro oligonucleótidos la eficiencia de acoplamiento de cada una de las fosforamiditas (nucleótidos modificados para la síntesis química) siempre fue superior a 98%, de tal modo que la cantidad de cada uno superó los 100 nM, cantidad suficiente para >1000 amplificaciones.

AMPLIFICACIÓN POR PCR.

Se realizaron varios ensayos de amplificación usando como templado o molde DNA obtenido a partir de ejes embrionarios de maíz sin germinar y los oligonucleótidos sintetizados como primers. Se usaron como controles negativos todas las posibles mezclas de reacción faltando algún ingrediente y como control positivo la secuencia control y los oligonucleótidos control provistos en el kit. Inicialmente se comenzó con una primera amplificación a 52 °C (basándose en la T_m del oligonucleótido, que es la temperatura a la cual la mitad de los oligonucleótidos permanecen unidos a su cadena complementaria, lo cual se calcula matemáticamente en base a la proporción de GC/AT en el oligonucleótido) como temperatura de alineamiento por 1 minuto y condiciones estándar de elongación y desnaturalización (72 °C por 1 minuto y 94 °C por 45 segundos respectivamente) por 25 ciclos. Ni para MAPK ni para PARP fue posible detectar ninguna banda bajo estas condiciones de amplificación. Posteriormente se usó DNA digerido con tres enzimas de restricción diferentes, pensando que se podría tratar de regiones en las que el templado pudiera presentar problemas de estructura secundaria que no permitiera el paso a los componentes de la reacción de amplificación; sin embargo, con ninguno de los tres templados utilizados fue posible amplificar ninguna región de MAPK o de PARP. Otro camino que se siguió fue utilizar

temperaturas más bajas de alineamiento, con lo que se bajó hasta 42°C sin obtenerse amplificación alguna, mientras que el control positivo (provisto en el kit de PCR), amplificó a altos rendimientos bajo todas las condiciones probadas.

Para verificar que no hubiese problema por contaminación proteica del templado, o que los oligonucleótidos no se hubiesen degradado, se procedió a repetir los experimentos utilizando diferentes muestras de DNA obtenidas por distintos métodos; se verificó la integridad de los oligonucleótidos en un gel de agarosa al 3.5%, etc.; sin embargo, aún así no fue posible lograr la amplificación de ninguna región de los genes de cualesquiera de las proteínas.

Se pensó entonces en probar una amplificación de las regiones de MAPK y PARP por RT-PCR, dada la posible existencia de intrones en el DNA genómico, lo cual condiciona la amplificación de la región a la procesividad de la polimerasa, ya que una región más allá de 10-15 Kb es muy difícil de amplificar, de hecho ya se torna problemático amplificar regiones mayores de 6kb.

AMPLIFICACIÓN POR RT-PCR.

Se extrajo RNA total de callos de maíz como se explica en Materiales y Métodos, debido a que es un tejido altamente proliferativo en el cual los mensajes de ambas enzimas deben estar bien representados.

El RNA fue transcrito a cDNA como se describe en Materiales y Métodos, y fue amplificado por 25 ciclos a 42°C como temperatura de alineamiento y condiciones estándar de elongación y desnaturalización, lo que resultó en la amplificación de al menos seis bandas para MAPK con pesos moleculares entre 100 y 800 pb y al menos cuatro bandas para PARP con pesos de 125 a 600 pb (Figura 8). Las regiones amplificadas serán referidas como M1 a M6 en el caso de MAPK y P1 a P4 en el caso de PARP comenzando en ambos casos la numeración con las de más alto peso molecular.

REAMPLIFICACIÓN Y DISCRIMINACIÓN DE BANDAS.

Debido a la gran cantidad de bandas obtenidas, el siguiente PCR se realizó bajo condiciones mas restrictivas; para ambos genes se realizó una amplificación a una temperatura de alineamiento de 45°C utilizando como templado un microlitro de la amplificación anterior. Los resultados de este experimento (Figura 9) como podemos ver, son la desaparición de bandas en ambos experimentales; sin embargo, para PARP aparece una nueva banda (P5) lo que puede explicarse de la siguiente manera: a bajas temperaturas, el primer se diluye al unirse de modo inespecífico a otras regiones del templado, pero se concentra en regiones más específicas a temperaturas mayores.

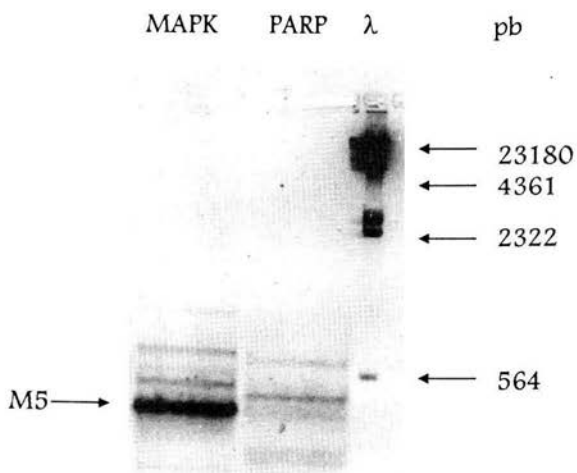


FIGURA 8 Electroforesis de los productos de RT-PCR usando RNA de callo de maíz como templado y 42°C como temperatura de alineamiento en la reacción de PCR, λ= Marcador de peso molecular (DNA del fago lambda cortado con *Hind* III) . Al margen se indican los tamaños de los ácidos nucleicos en pares de bases.

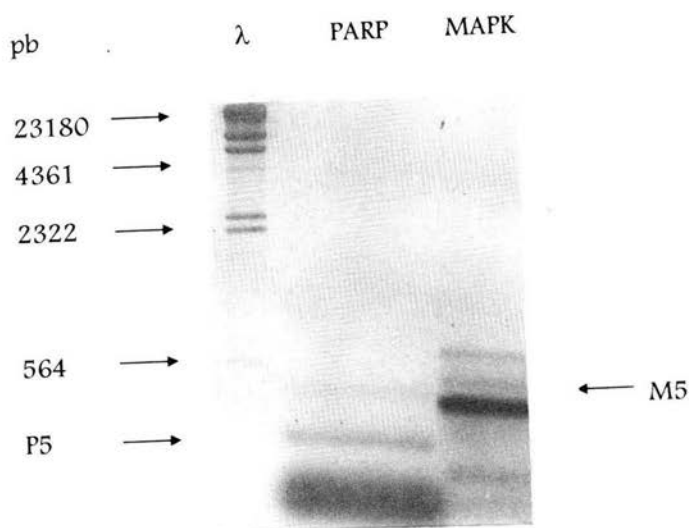


FIGURA 9 Electroforesis de los productos de la reamplificación por PCR, de MAPK y PARP, usando 45°C como temperatura de alineamiento y una mezcla de los cDNAs de la figura 8 como templado. λ =igual que en la figura 8. Al margen se indican los tamaños de los ácidos nucleicos en pares de bases.

Con el objeto de hacer más específica la amplificación, se decidió darle una mayor astringencia al experimento por lo que se realizó una amplificación a 50°C como temperatura de alineamiento y un microlitro del RT-PCR original como templado; la Figura 10 nos muestra que las bandas M5 y P5 son las más específicas ya que aparecen como bandas muy bien definidas y concentradas.

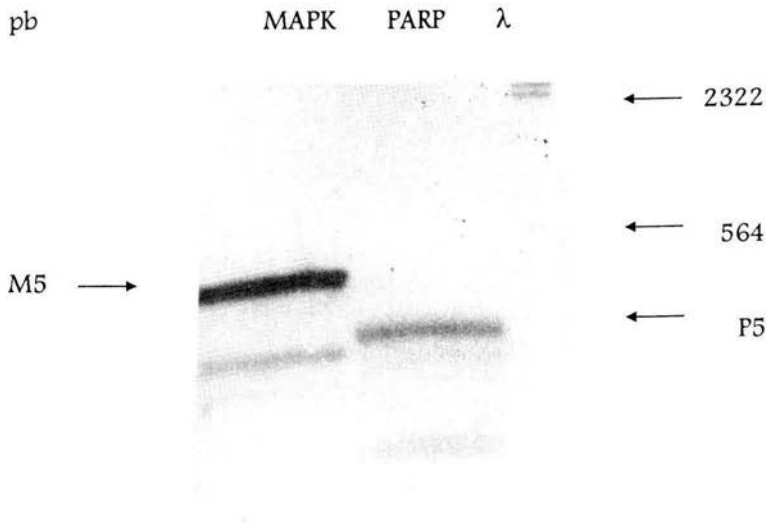


FIGURA 10 Electroforesis de los productos de la reamplificación por PCR, de MAPK y PARP , usando 50°C como temperatura de alineamiento y una mezcla de los cDNAs de la figura 8 como templado. λ =igual que en la figura 8. Al margen se indican los tamaños de los ácidos nucleicos en pares de bases.

SOUTHERN BLOT E HIBRIDACIÓN.

Los experimentos que siguieron fueron enfocados a verificar la presencia de estas bandas en el genoma de maíz utilizando a M5 (375 pb aprox.) y P5 (290 pb aprox.) como sondas; las condiciones de hibridación fueron: 56°C cinco horas con lavados de 25, 37, y 48°C a 225 r.p.m. 0.1X SSC y 0.5% SDS. Utilizando como blanco DNA de maíz cortado con tres enzimas de restricción diferentes (*EcoRI*, *HindIII* y *BamHI*), se obtuvieron hibridaciones específicas, tanto para MAPK como para PARP (Figura 11). La gran cantidad de bandas que observamos, sugiere la existencia de familias génicas de estas proteínas (lo cual no sería nada raro para MAPK (ver Cano 1995)).

Cabe hacer notar dos cosas en esta figura: a) En el carril de DNA cortado con *BamHI*, se encuentra una banda de muy alto peso molecular tanto para MAPK como para PARP, lo cual es debido a que esta enzima no digirió la muestra por completo, ya sea por falta de tiempo de incubación o por una pérdida parcial de la actividad enzimática. b) La intensidad de la mayoría de las bandas iguala a la de los controles positivos (se cargó la sonda fría como control positivo), lo cual es signo de que las regiones que buscamos se encuentran bien representadas en el genoma de maíz.

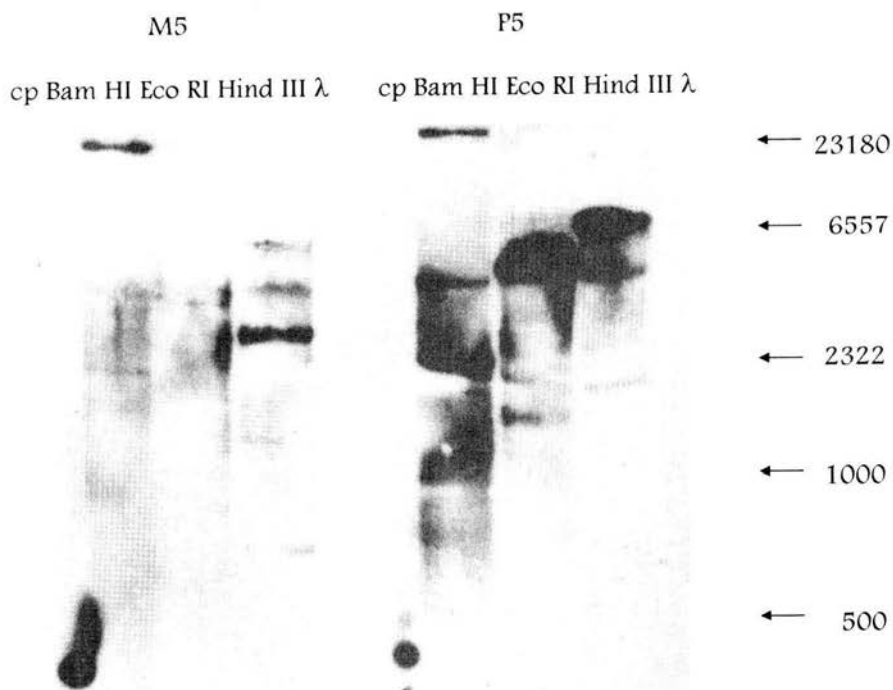


FIGURA 11 Autorradiograma de una hibridación de las bandas M5 (Panel izquierdo) y P5 (Panel derecho) contra DNA genómico de maíz cortado con distintas enzimas de restricción (*Bam* I, *Eco*RI, y *Hind* III) cp=control positivo λ=igual que en la figura 8. Al margen se indican los tamaños de los ácidos nucleicos en pares de bases.

CLONACIÓN DE REGIONES TIPO MAPK Y PARP.

Inicialmente, el enfoque fue clonar las bandas M5 y P5 debido a que eran las mejor representadas, y las que coincidían con los tamaños esperados (370 pb para MAPK y 290 para PARP); dichos productos de PCR fueron clonados en *E. coli* en el vector pCRII de Invitrogen Co. como se describe en Materiales y Métodos; las colonias blancas se propagaron y se realizaron minipreparaciones de plásmido, el cual se digirió con *EcoRI* comprobándose la liberación de los insertos, cuyos tamaños fueron los esperados para M5 y P5 (Dato no mostrado).

Para verificar la identidad de los insertos clonados, para M5 se corrió una electroforesis incluyendo el plásmido cortado con *EcoRI*, el producto de PCR obtenido al realizar una amplificación usando el plásmido con el inserto M5 como templado, y cargando también el marcador de peso molecular como control negativo. Para P5 se corrió un gel con el plásmido cortado y sin cortar con *EcoRI*, y el marcador de peso molecular como control negativo. Los filtros se hibridaron a alta astringencia contra las bandas M5 y P5 respectivamente (68°C 3 h. y lavado a 68°C 0.1X SSC, 0.5% SDS 2 h). Como podemos observar en la figura 12, hay una muy fuerte y homogénea hibridación en el producto de PCR, en los carriles con plásmido y en el inserto liberado; lo que comprueba la clonación de las bandas M5 y P5.

Cabe mencionar que en el filtro con P5 se observan bandas de un peso molecular alto y que hibridan tanto en el carril con el plásmido digerido y sin digerir con enzima de restricción, esto se debe a la presencia de formas multiméricas del plásmido, las cuales no siempre son fáciles de cortar.

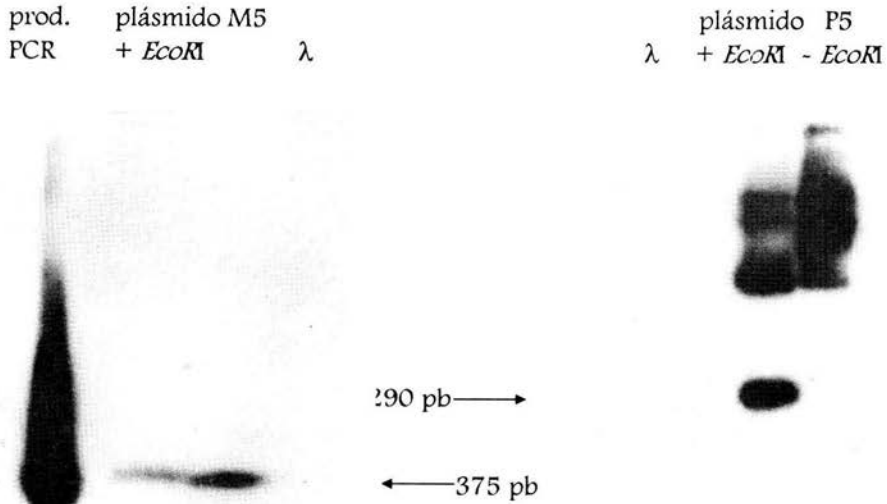


FIGURA 12 Autorradiograma de una hibridación de las bandas M5 (Panel izquierdo) contra un producto de PCR usando DNA plasmídico de la cepa pYJM5 y contra DNA plasmídico cortado con *EcoRI*, enzima que libera el inserto. En el panel derecho se muestra otro Autorradiograma de una hibridación de P5 contra DNA plasmídico de la cepa pYJP5 nativo y cortado con *EcoRI* (Ver texto). λ =igual que en la figura 8. Al margen se indican los tamaños de los ácidos nucleicos en pares de bases.

SECUENCIACIÓN DE LOS INSERTOS CLONADOS.

Como prueba definitiva de la identidad de los insertos que fueron clonados se procedió a secuenciar las regiones de los vectores en los que se clonaron las bandas M5 y P5. Se usaron los primers de M-13 como cebadores de la secuenciación y condiciones altamente astringentes (68°C, 25 ciclos).

Para el caso de la clona M5, en su extremo 5' se lograron leer 125 bases y en su extremo 3' se lograron leer 73 bases:

5'*TGACACTATAGATACTAGCTATGCATAGCTGTACGAGCTCGATCATAGTA
ACGGCGCAGTGTGCTGAATTCGGCTTAATCTCTTTCTCTACACGTCAGCAT
TCTCGACTCTGATAGTCAGCTTG*• (Aproximadamente 200 pares de bases)
•ANCTGCTATGTCTGACTGTAGTTCGGTGTGTAGAGAAGAGATTAAGCCGAA
GTCTGCAGATATCCATCACACT3'

En lo que respecta a P5, aunque se usaron las mismas condiciones de secuenciación que para M5, se tuvieron problemas para la secuenciación en el extremo 5' debido probablemente a impurezas en el templado, sin embargo para el extremo 3' se lograron leer 169 bases:

5'*CGAGCTATGACGCATCGATGTACGCGAAGCTGATTGAGGTGACGACTAT
AGATACTCAGTGTATGCAGTCAGCTGTACGACTCNNGAGTACTAGCGCGAT
CTCGTGAATTCGGTCAATTCGACGCGATGCCGTTATATGCGTTGTCAGCATG
TGTCATCANCACACTATA*3'

Las bases en letras cursivas corresponden al vector.

Las regiones que han sido secuenciadas fueron consultadas vía internet a la base de datos FASTA de la universidad de Oxford; sin embargo, y debido al reducido número de bases que han sido secuenciadas, hasta la fecha no es confiable determinar a qué se parecen las secuencias que han sido clonadas, ya que consultar en una base de datos una secuencia corta aumenta el número de posibles secuencias parecidas en comparación a una de mayor tamaño; pese a ello para M5, resultados preliminares nos dan un cierto parecido a una Adenilato cinasa, lo que resulta alentador ya que, como se mencionó anteriormente, el oligonucleótido que se diseñó hacia el extremo 3' se encuentra ubicado en la región de cinasa de la enzima, región que puede estar compartida con otras cinasas como la Adenilato cinasa.

EXPRESIÓN DE M5 EN LA GERMINACIÓN DEL MAÍZ.

Se estudió de la expresión durante la germinación del maíz del gene que codifica para la región M5 que hemos clonado. Para esto se extrajo RNA total de ejes embrionarios de maíz de distintos tiempos de germinación, 10µg de RNA de cada tiempo y aprox 1.5µg de RNA de callo se corrieron en electroforesis desnaturizante y se transfirieron a una membrana de nylon para ser analizados por hibridación, lo que resultó en un patrón en el cual la expresión de la putativa MAPK (M5) aumenta hacia las 60 horas de germinación, lo cual indica que para este tiempo las células han alcanzado un nivel metabólico mucho más activo que en los otros tiempos probados (figura 13). Cabe mencionar que en este caso la aparición tan tardía del mensaje en la germinación solamente es un reflejo de la cantidad de transcritos del gene, la actividad real de proteínas tipo MAPK en

la germinación podría no depender de la activación del gene que las codifica, debido a que muchas de las proteínas clave en la reactivación metabólica de las semillas son guardadas desde la maduración de las semillas, las cuales al germinar activan a estas proteínas, y solamente son sintetizadas de *ново* aquellas que no alcanzan los niveles metabólicos necesarios. Esto nos lleva a concluir que posiblemente el mensaje con la región M5 no es necesario hasta tiempos tardíos de la germinación, debido probablemente a que la proteína que codifica fue almacenada desde la maduración de la semilla.

Por otra parte era de esperarse que el mensaje fuera detectable en el carril con RNA de callo, sin embargo no fue posible observar ninguna hibridación, lo que pudiera ser causa de que la cantidad que se cargó fue mucho menor que en los otros tiempos, o bien una posible degradación no detectada.

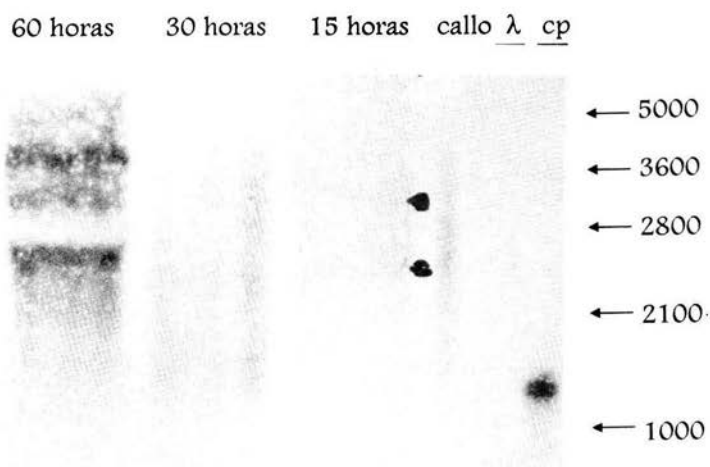


FIGURA 13 Autorradiograma de una hibridación de la banda M5 contra RNA total de maíz a diferentes horas de germinación. λ =igual que en la figura 8. Al margen se indican los tamaños de los ácidos nucleicos en de bases.

ESCRUTINIO DEL BANCO GENÓMICO DE MAÍZ.

Con el fin de buscar una región más amplia de estos genes se procedió a escrutar un banco genómico de maíz, inicialmente contra M5. Se escrutaron aproximadamente 750,000 clonas del banco genómico de maíz (Stratagene)(ver Material Biológico en Materiales y Métodos), hibridando a mediana astringencia (60°C 5 horas y lavados a 57°C a 1X SSC y 0.5% SDS), obteniéndose al menos 20 clonas positivas, las cuales fueron recuperadas y propagadas en líquido. Debido a que se escrutinó a alta densidad, se recuperó también un número muy alto de clonas contaminantes, por lo cual se realizaron lisis múltiples en líquido, se extrajo DNA fágico de cada lisis y se corrió en electroforesis para ser hibridado nuevamente a mayor astringencia, esto nos permitió reducir el número de posibles positivos a cuatro, o por lo menos de esta manera podemos saber en cuales de las lisis las clonas positivas están mejor representadas, debido a que en aquellos carriles donde se incorpora mas marca existe una proporción mayor de DNA homólogo con respecto a la cantidad total cargada (20 µg por carril).

Otro objetivo de este experimento era saber si las clonas positivas que habían sido recuperadas liberaban el inserto en segmentos de igual o distinto peso molecular, para así descartar clonas con patrones de restricción que se repitieran. En la figura 14 podemos observar que el patrón de restricción del inserto de los carriles 1-3 es prácticamente el mismo, mientras que aparece una nueva banda para el carril cuatro; esto podría señalar que las clonas positivas de los carriles 1-3 empaquetaron una región muy parecida, pero la clona del carril cuatro incorporó una región que produce un patrón de restricción diferente, de tal modo que solamente basta reescrutar las clonas de los carriles 1, 2 ó 3 y las clonas del carril.4 a baja densidad en placa para recuperar clonas individuales.

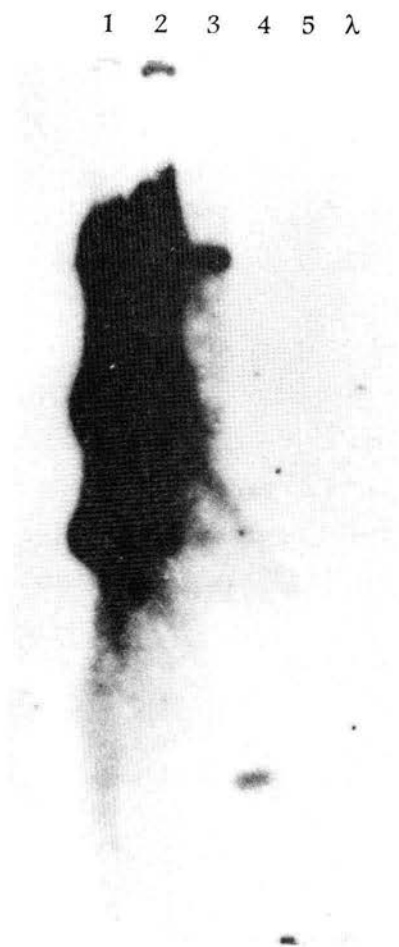


FIGURA 14 Autorradiograma de una hibridación de la banda M5 contra DNA fágico de las distintas clonas positivas cortado con *EcoRI* (carriles 1 a 5) λ =igual que en la figura 8.

PERSPECTIVAS Y AVANCES ADICIONALES.

Los resultados hasta aquí presentados cumplen con los objetivos que se plantearon en esta tesis; sin embargo, abren un abanico de posibles caminos a seguir, entre los cuales están buscar el(los) gene(s) completo(s) de ambas proteínas; para lograrlo, se pretende escrutar un banco genómico usando a M5 y P5 como sondas, recuperar clonas individuales y secuenciarlas.

Un gran avance en el desarrollo futuro del proyecto estará dado por la construcción de un banco de cDNA de callos de maíz, dado que es un tejido en proliferación en el cual la actividad de los genes de estas proteínas deben encontrarse a un buen nivel de expresión; esto nos permitirá recuperar clonas que posiblemente hayan empaquetado el mensaje completo, lo que a su vez nos permitiría expresar estas proteínas en sistemas bacterianos.

C ON CLUSIONES

1. En experimentos de Southern se ha corroborado la presencia en el genoma de maíz de dos de éstos cDNAs en posibles familias génicas: un cDNA de una putativa MAPK y otro de una putativa PARP.
2. La secuenciación parcial de estas dos clonas aún no permite confirmar definitivamente la identidad de dichos cDNAs.
3. Usando la secuencia putativa de MAPK se ha escrutinado un banco genómico de maíz encontrando al menos 3 tipos diferentes de clonas genómicas.
4. Usando la secuencia putativa de MAPK se ha establecido mediante Northern que su expresión aumenta hacia las 60 horas de germinación.

REFERENCIAS

1. Althaus, F. (1992) *Poly ADP-ribosylation: a histone shuttle mechanism in DNA excision repair*. J. Cell Science. Vol. 102, 663-670.
2. Avruch, J., Zhang, X. *et al.* (1994). *Raf meets Ras: Completing the framework of a signal transduction pathway*. TIBS 19, (7) 279-283.
3. Bewley, J. D. , Black, M. (1994). *Seeds*. 2nd Edition. Plenum, USA. 445 pp.
4. Blumer, K. and Johnson, G. (1994). *Diversity in function and regulation of MAP kinase pathways*. TiBS. Vol 19, (6) 236-240.
5. Cano, E., Mahadevan, L. (1995). *Parallel signal processing among mammalian MAPKs*. TiBS. Vol. 20 (4) 117-122.
6. Cathal, W. , *et al.* (1993). *Isolation and characterization of a tobacco cDNA clone encoding a putative MAP kinase*. Plant Mol. Biol. Vol. 23, 543-551.
7. Chen, R. , Sarnecki, C. , Blenis, J. (1992). *Nuclear localisation and regulation of erk- and rsk- encoded protein kinases*. Mol. Cell . Biol. Vol. 12, 915-927.
8. Coello, P. (1994). *Purificación y caracterización de una DNA polimerasa replicativa en maíz. Estudios sobre su regulación durante la germinación*. Tesis Doctoral. Facultad de Química. UNAM. México.

9. Datta, K., Marsh, L., and Marcus, A. (1993) *Early growth of wheat embryonic axes and the synthesis of RNA and DNA*. Plant Physiol. Vol 72, 394-397.
10. Davis, R. (1994). *MAPKs: new JNK expands the group*. TiBS. Vol 19, (11)470-473.
11. Dérijard, B. *et al.* (1995). Independent Human MAP Kinase Signal Transduction Pathways Defined by MEK and MKK Isoforms. Science, Vol. 267, 682-684.
12. Duerr, B. , Jacobs, T. *et al.* (1993). *MsERK1: A Mitogen-Activated Protein Kinase from a Flowering Plant*. The Plant Cell, Vol. 5, 87-96.
13. FASTA database. <http://www.ebi.ac.uk/searches/fasta.html> Oxford University.
14. Gardner, E. , Simmons, M. , and Snustad, P. (1991). *Principles of Genetics*. 8th. Edition. John Wiley & Sons Inc. USA 649 pag.
15. Georgieva, E. , *et al.* (1994) *Maize embryo germination*. Planta, Vol. 192, 118-124.
16. Georgieva, E. , López-Rodas, G., Loidl, P. (1994) *Maize embryo germination*. Planta, Vol. 192, 125-129
17. Goddard, R., Wick, S. *et al.* (1994) *Microtubule Components of the Plant Cell Cytoskeleton*. Plant Physiol. Vol 104, 1-6.

18. Gotoh, Y. , Nishida, E. *et.al.* (1991). *Xenopus M phase MAP kinase: isolation of its cDNA and activation by MPF.* The EMBO Journal, Vol. 10, (9): 2661-2668.
19. Hagège, D. (1993) *Proto-oncogenes in plants: Widespread conserved genes for which roles?* Plant Physiol. Biochem. Vol. 31, (4): 621-629.
20. Hanks, S. , Quinn, A. , Hunter, T. (1988). *The Protein Kinase Family: Conserved Features and Deduced Phylogeny of the Catalytic Domains.* Science, Vol. 241, (1): 42-52.
21. Hunter, T. (1993). *Oncogenes and cell proliferation.* Current Opinion in Genetics and Development. Vol. 3, 3-18
22. Ittel, M-E., Garnier, J-M., *et al.* (1991). *Chicken poly(ADP-ribose) synthetase: complete deduced aminoacid sequence and comparison with mammalian enzyme sequences.* Gene. Vol. 102, 157-164.
23. Jonak, C. , Heberle-Bors, E. ,Hirt, H. (1994). *MAP kinases: universal multi-purpose signaling tools.* Plant Molecular Biology. Vol 24, 407-416.
24. Kameshita, I. Matzuda, Z. *et al.* (1984) *Poly(ADP-Ribose) Synthetase.* J. Biol. Chem. Vol 259, (8) 4770-4776.
25. Kelly, K. Leder, P. *et.al.* (1983). *Cell especific regulation of the c-myc gene by limphocyte mytogens and plateled derived growth factor.* Cell. Vol. 35, 603-610.
26. Kornberg, A. , Baker, T. (1992). *DNA replication.* Freeman, USA. 931 pp.

27. Le Cam, E., Fack, F. *et al.* (1994). *Conformational analysis of a 139 base pair DNA fragment containing a single stranded break and its interaction with human Poly(ADP-ribose) polymerase*. J. Mol. Biol. Vol 235, 1062-1071.
28. Lewin, B. (1994). *Genes* V Oxford University Press. UK 943 pp.
29. Life Technologies (1994) *PCR Techniques Workshop*. Instituto Mexicano del Seguro Social.
30. Mayer, A.M., and Poljakoff-Mayber, A. (1989) *The germination of seeds*. fourth Edition Pergamon Press Oxford U.K. 1-22 pp
31. Mizoguchi, T., Hayashida, N. *et al.* (1993). *ATMPKs: a gene family of plant MAP kinases in Arabidopsis thaliana*. FEBS. Vol. 336, (3) 440-444.
32. Mizoguchi, T., Gotoh Y. *et al.* (1994). *Characterization of two cDNAs that encode MAP kinase homologues in Arabidopsis thaliana and analysis of the possible role of auxin in activating such kinase activities in cultured cells*. Plant J. Vol. 5, (1) 111-122.
33. Mullis, KB. , Faloona, FA. (1987). *Specific Synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. Met. Enzymol. Vol 155, 335-350.
34. Murcia, G. and Ménissier, J. (1994). *Poly(ADP ribose) polymerase: a molecular nick sensor*. TiBS. Vol. 19, 172-176.
35. Nishida, E. and Gotoh, Y. (1993). *The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways*. TiBS 18, (4) 128-131.

36. Osborne, D.J., Sharon, R., and Ben-Ishai, R. (1980/81) *Studies on DNA integrity and DNA repair in germinating embryos of rye (*Secale cereale*)*. Israel J. Bot. Vol 29, 259-272.
37. Oppenheimer, D. , Marks, M., *et al.* (1991). *A myb gene required for leaf trichome differentiation in Arabidopsis is expressed in stipules*. Cell. Vol. 67. 483-493.
38. Pelech, S. , Sanghere, J. , Daya-Makin, M. (1990). *Protein kinase cascades in meiotic and mitotic cell cycle control*. Biochem. Cell Biology. Vol. 68, 1297-1330.
39. Pierce, J. (1989). *Oncogenes: Growth factors and hematopoietic transformation*. Biochim. Biophys. Acta. Vol. 989, 179-208.
40. Raven, P., Evert, R., Eichhorn, S. *et al.* (1992). *Biology of Plants*. Worth Publishers USA 5th edition. 791pp.
41. Saito, I. Hatakeyama, K. *et al.* (1990). *Cloning of a full-length cDNA encoding bovine thymus poly(ADP-ribose) synthetase: evolutionarily conserved segments and their potential functions*. Gene. Vol 90, 249-254.
42. Simonin, F., Poch, O., *et al.* (1993) *Identification of Potential Active-site Residues in the Human Poly(ADP-ribose) Polymerase*. J. Biol. Chem. Vol. 268, (12) 8529-8535.
43. Stafstrom, J. , Altschuler, M., Anderson, D. (1993) *Molecular cloning and expression of a MAP kinase homologue from pea*. Plant Molecular Biology. Vol. 22, 83-90.

44. Street, H. E., and Opik, H. (1984) *The physiology of flowering plants. Their growth and development*. 3rd Edition. Contemporary Biology. U.K. 4-25 pp.
45. Uchida, K., Morita, T. *et al.* (1987). *Nucleotide Sequence of a full-length cDNA for Human Fibroblast Poly(ADP-ribose) polymerase*. Bioch. Bioph. comm. Vol. 148, (2) 617-622.
46. Vázquez-Ramos, J.M., and Osborne, D. (1986). *Analisis of DNA synthesized during early germination of rye embryos using BND-cellulose chromatography*. Mut Res. Vol. 166,39-47.
47. Vázquez-Ramos, J.M. (1992) *Maize Germination, DNA metabolism and cytokinins*. Proceedings of the Fourth International Workshop on Seeds. Vol 2,317-322.
48. Wada, K.-N. *et al.* (1990). *Codon usage tabulated from the GeneBank genetic sequence data*. Nucleic Acids Res. Vol. 18, 2367-2411.
49. Wilson, C. , Heberle-Bors, E. *et al.* (1993). *Isolation and characterization of a tobacco cDNA clone encoding a putative MAP kinase*. Plant Molecular Biology Vol. 23,543-551.
50. Zlatanova, S. *et al.* (1987). *DNA repair precedes replicative synthesis during early germination in maize*. Plant Mol. Biol. Vol. 10,139-144.
51. Zúñiga, J. and Vázquez-Ramos J. (1995). *Does BA stimulate DNA metabolism by modifying gene expression during maize germination?* Sedds Science Res. In press.