

160
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

LA POLIADENILACION CITOPASMICA COMO UN
MECANISMO DE CONTROL TRADUCCIONAL EN
SEMILLAS DE MAIZ (*Zea mays* L.)

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 :
ANDREA SANJUAN BADILLO

DIRECTOR DE TESIS: DRG. ADRIANA ORTIZ LOPEZ



MEXICO, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

ABRIL DE 1997



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: La poliadenilación
citoplásmica como un mecanismo de control traduccional en semillas de
maíz (Zea mays L.).

realizado por Andrea Sanjuan Badillo

con número de cuenta 8733988-0 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario Dra. Adraina Ortiz López

Propietario Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra

Propietario Biol. Miguel Angel Meneses Pérez

Suplente Biol. Ana María Velasco Velasco

Suplente Biol. José Luis Bustos Sánchez

Adraina Ortiz Lopez
F. Plasencia
M. Meneses
Ana María Velasco V.
J. Bustos

FACULTAD DE CIENCIAS

~~UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO~~
M. EN C. VIRGINIA ABRÍN BATULE

COORDINACIÓN GENERAL
DE BIOLOGÍA

Agradezco de antemano y muy especialmente a la Dra. Adriana Ortiz López, mi tutora, por compartir conmigo su conocimiento y maravillosa amistad, por que sin su ayuda no hubiera hecho posible unas de mis metas en la vida.

A mi madre Celia Badillo Hernández por su dura insistencia para que yo me titulara, por su apoyo ante las situaciones más difíciles de mi vida y por su total comprensión, por que se lo debo TODO.

A mi padre Filiberto San Juan Soriano por darme un poco de su vida y ayudarme en el último esfuerzo.

A mis hermanos Verónica, Martha y Pedro por que de una u otra manera me ayudaron, y por supuesto a mi hermano Jesús que me ayudo mucho durante todo este tiempo y trató de comprenderme.

Agradezco a mis compañeros del laboratorio 105 José Luis, Anita, Sergio, Miriam, Carlos y a la señora Mary, y del laboratorio 103 Leonel, Martín y Alfredo por sus consejos y enseñanzas durante el proceso y elaboración de mi tesis, y especialmente a la Maestra Eida por sus comentarios y aportaciones en la elaboración de la misma.

Quiero dar gracias también al Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra por su valiosísima ayuda en la elaboración de este trabajo.

Quiero dar gracias a una persona sumamente especial en mi vida, porque me ayudó cuando se lo pedí y por otras tantas cosas. Gracias Jorge Reyes Vázquez

Por último agradezco a la UNAM por proporcionarme los servicios que en ésta se ofrecen.

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 105 del departamento de Bioquímica en el Conjunto "E" de la Facultad de Química, UNAM, bajo la dirección de la Dra. Adriana Ortiz López.

Parte de este trabajo fue apoyado por DGAPA, en el proyecto IN 200793.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	
ABREVIATURAS	
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
Características generales de la semilla	6
Estructura de la semilla	6
Embrión	7
Endospermo	7
Cubierta de la semilla (testa)	7
Germinación	8
Síntesis de proteínas en embriones durante la germinación	9
Síntesis de proteínas	12
Control traduccional durante el desarrollo temprano	13
Poliadenilación citoplásmica	13
Objetivo	15
3. MATERIAL Y MÉTODOS	16
Ejes embrionarios de maíz	16
Oocitos de <i>Xenopus</i>	16
Desinfestación	16
Incubación	17
Preparación de extractos y ensayo de poliadenilación	17
Aislamiento de polirribosomas	18
Extracción de ARN TOTAL de las fracciones polisómica y no polisómica	19
Precipitación de ácidos nucleicos	19

Aislamiento de ARN TOTAL	21
Gel de agarosa para transferencia de ARN	21
Transferencia	22
Marcaje de la sonda de ciclinas	23
Oligo d(T) ₁₂₋₁₈ marcado en el extremo 5'	24
Prehibridación	24
Hibridación y lavado	25
Autoradiografías	25
Revelado	25
OBTENCIÓN DE LA SONDA S ₁₃₋₆	26
Purificación de la sonda (Geneclean)	26
AMPLIFICACIÓN POR RT-PCR	28
Obtención del ADnc	28
Amplificación del ADnc	29
Gel de poliacrilamida desnaturalizante	30
Preparación de muestras	31
Obtención de ADnc marcado	31
Gel alcalino	32
Cuidados para trabajar con ARN	32
4. RESULTADOS	34
Actividad citoplásmica de la poli(A) polimerasa en extractos de embriones de maíz a diferentes horas de germinación	34
Amplificación de la región 3' terminal del ADnc de ejes embrionarios de maíz	36
Activación traduccional de mensajes almacenados de ejes embrionarios de maíz	39
5 DISCUSIÓN	43
6 CONCLUSIÓN	47
7 BIBLIOGRAFÍA	48

ABREVIATURAS

A 260	absorbancia a 260 nanómetros
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
APS	Persulfato de amonio
ARN	Ácido ribonucleico
BSA	Albúmina sérica de Bovino
°C	Grados centígrados
C. E.	Coefficiente de extinción
cm	Centímetros
DEPC	Diethyl pirocarbonato
dGTP	Desoxinucleótidos fosfatos
dATP	"
dCTP	"
DTT	Ditiotreitol
EGTA	Etilen glicol-bis (2-aminoetil eter) N, N, N', N'-ácido tetraacético
EDTA	Etilen dinitrotetracetato disódico
F. D.	Factor de dilución
g	Gramos
KCl	Cloruro de potasio

MgCl ₂	Cloruro de magnesio
M	Molar
mM	Milimolar
mL	Mililitros
μL	Microlitros
MOPS	3-(N-morfolino) ácido propanesulfónico
nm	nanómetros
NW	New Whash
PTE	Polietileno 10-tridecil éter
SSC	Citrato de sodio salino
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TAE	Amortiguador Tris-acetatos
TBE	Amortiguador Tris-boratos
TEMED	Tetrametilendiamina
U/μL	Unidades por microlitro

RESUMEN

El control traduccional es un mecanismo importante que regula la expresión de genes en eucariotes (Hershey, 1991). Específicamente, en los oocitos de *Xenopus* un gran conjunto de ARNm's son acumulados, los cuales pueden ser activamente traducidos o pueden ser enmascarados y traducidos durante la maduración meiótica, fertilización o en las primeras etapas de la embriogénesis (Richter, 1991). Uno de los mecanismos que controlan la traducción de ARNm's específicos en este sistema es la poliadenilación citoplásmica la cual consiste en un incremento de la cola de poli(A). La poliadenilación citoplásmica es regulada por una secuencia 3' no traducible denominada secuencia de poliadenilación citoplásmica (CPE) y por una señal de poliadenilación nuclear (AAUAAA). El CPE es una secuencia rica en uridinas que esta localizada rio arriba de la secuencia de poliadenilación nuclear y ha sido descrita en varios organismos desde anfibios hasta mamíferos (Sallés et. al., 1992).

En las primeras etapas de la germinación en maíz la síntesis de proteínas es soportada por ARNm's almacenados los cuales son reclutados desde un conjunto no traducible hasta polisomas en diferentes estados del desarrollo. El estudio de los diferentes señales que conducen la movilización de ARNm's almacenados puede ayudar al entendimiento del control traduccional en plantas. El objetivo de este trabajo fue investigar si la poliadenilación citoplásmica controla la traducción de ARNm's específicos durante la germinación del maíz.

En nuestros resultados se observó la presencia de la poli(A) polimerasa citoplásmica en extractos de ejes embrionarios de maíz secos y germinados.

Dicha enzima fue capaz de poliadenilar tanto transcritos de maíz como de *Xenopus*. Por otra parte en uno de los experimentos usamos 3'RACE, amplificación rápida del ADNc del extremo 3' se usó un cebador homólogo al CPE para amplificar el ADNc por el extremo 3' de ejes embrionarios de semillas secas y germinadas. Los resultados mostraron productos amplificados de ADNc aislados de semillas germinadas en un rango de 100 a 300 nucleótidos, sugiriendo que el CPE esta presente en ARNm's de semillas de maíz y puede, probablemente, estar involucrado en la poliadenilación citoplásmica de ARNm's específicos. También se aislo RNA de la fracción polisómica y no polisómica de semillas de maíz germinadas, se transcribieron en forma reversa con oligo d(T) en la presencia de α -³²P]dATP o α -³²P]dCTP. El análisis de autoradiografía con el ADNc marcado de la fracción polisomal produjo una mancha de productos, mientras que la no polisómica da un grupo compacto de productos. Estos resultados demostraron un incremento en el tamaño de los ARNm's durante su .movilización a polisomas.

INTRODUCCIÓN

En los seres vivos, la síntesis de proteínas es una parte integral en la ruta de la expresión del gen, la cual aporta contribuciones importantes en la modulación de la expresión de genes específicos. Dicha modulación es regulada por diferentes mecanismos que controlan la traducción de diferentes clases de ARN mensajeros (ARNm's) o de uno en particular (Hersey, 1991). En el desarrollo temprano de muchos animales, cualquier cambio en el patrón de la síntesis de proteínas se atribuye al cambio de la actividad traduccional o estabilidad de un ARNm en el huevo (Sheets *et. al.*, 1994). Se ha reportado que la adición de poli(A) al extremo 3' de un ARNm, puede influir en la estabilidad de este y en la eficiencia de su traducción (Hersey, 1991). También se ha visto que la inhibición de la traducción de algunos ARNm's esta controlada por secuencias discretas encontradas en las regiones no traducibles 3' y 5' y que la traducción de otros ARNm's es debida a la poliadenilación citoplásmica la cual es regulada por un elemento de poliadenilación citoplásmica (CPE) y por la secuencia AAUAAA (Richter, 1991). En *Xenopus laevis* se ha aislado la enzima poli(A) polimerasa citoplásmica que presenta similitud con la poli(A) polimerasa nuclear de *Xenopus* (Fox *et. al.*, 1992). Además Hake y Richter (1994) encontraron que durante la maduración de oocitos de *Xenopus* hay una proteína de unión al CPE, la cual se fosforila a un tiempo que corresponde con la inducción de la poliadenilación.

En plantas no se ha descrito el mecanismo de poliadenilación citoplásmica. Sin embargo las secuencias de poliadenilación nuclear han sido descritas por Hunt (1994). La expresión de genes puede estar controlada

transcripcionalmente y post-transcripcionalmente (Gallie, 1993). En los ejes embrionarios de maíz se pueden sintetizar, durante la imbibición temprana, proteínas codificadas por ARNm's almacenados. Estos transcritos se sintetizan durante el desarrollo de los embriones (Mohr and Schopfer, 1995) aunque se ha reportado que algunos de ellos se sintetizan en los tejidos maternos (Bewley and Black, 1994) y se encuentran almacenados como partículas ribonucleoproteicas menajeras (moléculas de ARN asociadas con proteínas) (Bewley and Black, 1994; Mohr and Schopfer, 1995). El conocimiento sobre la información genética contenida en estos mensajes almacenados es escaso. Recientemente se ha identificado en ejes embrionarios de maíz algunos mensajes que codifican para algunas proteínas ribosómicas (Beltrán-Peña *et. al.*, 1995). Estos ARNm's tienen una secuencia rica en pirimidinas en la región 5' no traducida (5' UTR) y su reclutamiento a polisomas esta correlacionada con un aumento en la fosforilación de la proteína ribosomal S6 que se encuentra ensamblada a la subunidad pequeña del ribosoma (Sánchez de Jiménez *et. al.*, 1996), como también se ha reportado en animales. Igualmente se ha visto, que los mensajes almacenados se traducen en forma programada durante la etapa temprana de la germinación movilizándose de las partículas ribonucleoproteicas (fracción no polisómica) a los polisomas (fracción polisómica que son moléculas de ARNm unidas a ribosomas)

En el presente trabajo investigamos los mecanismos de poliadenilación citoplásmica como un mecanismo importante para la regulación de la traducción de algunos ARNm's almacenados en maíz durante la germinación.

ANTECEDENTES

El maíz (*Zea mays* L.) es el cultivo más importante de la cultura americana, en México, es uno de los granos de mayor importancia y grandes áreas de cultivo son dedicadas a su producción. Actualmente el maíz se produce en 134 países del mundo (81.7% de los 164 países del mundo). El 68.4% del área mundial (709 millones de hectáreas) es sembrada por trigo, arroz, maíz, sorgo, mijo, cebada, avena y centeno. De este 68.4% el 11.8% del área mundial (122 997 miles de hectáreas) se cultiva con maíz. En el año de 1983 en México fueron cosechadas el 6.8% de hectáreas (8 408 miles de hectáreas) (Reyes, 1990). En consecuencia, la importancia fundamental de la fisiología de la germinación, para la agricultura y la horticultura, es tan obvia que necesita ser consolidada firmemente (Reyes, 1990).

El desarrollo de una pequeña semilla de maíz da lugar a una planta de 2 a 3.5 m durante unas pocas semanas. Todas las plantas de maíz normales se desarrollan y crecen de semejante manera; sin embargo el tamaño de la planta, periodo de crecimiento y producción potencial varían grandemente dependiendo de los factores ambientales y la variedad utilizada.

Las estructuras importantes de la semilla del maíz consisten del pericarpio (cubierta de la semilla), endospermo y el embrión. El pericarpio es una cubierta fina que protege al embrión y al endospermo encapsulados. El endospermo esta constituido en su mayoría por almidón, el cual sirve como la principal fuente de energía cuando germina la semilla así como para la plántula pequeña. Si la semilla es plantada en un suelo húmedo y cálido, ésta

típicamente germina y emerge en una o dos semanas, este tiempo varía dependiendo de las características del suelo (Reyes, 1990).

La primera estructura que rompe a través de la cubierta de la semilla es la radícula, seguida por el coleóptilo y después la raíz seminal. El crecimiento del coleóptilo y la elongación del mesocótilo (primer internodo) causa la emergencia de la planta de la superficie del suelo. Cuando el coleóptilo alcanza la luz, las primeras hojas verdaderas emergen. El establecimiento de una nueva plántula se presenta después de una semana en sinergismo con el desarrollo del sistema de nodos radicular y el emerger de las raíces (Fig. 1). Los nodos de las raíces en semanas posteriores, entonces, comienzan a desarrollarse como un sistema radicular tomando el papel de absorción de nutrientes y agua. Estas raíces y las hojas verdaderas se desarrollarán a partir de su meristemo apical, con lo cual se tendrá una planta adulta (Watson and Ramstad, 1987).

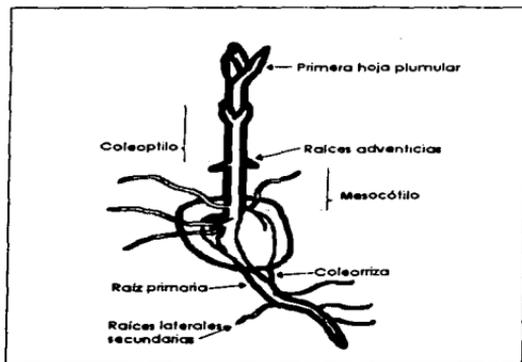


FIGURA 1.- Plántula joven de maíz.

Para tener una exitosa germinación, las semillas deben presentar ciertas características como son una viabilidad alta, capacidad de germinación alta y que esta sea uniforme. Los eventos que ocurren durante el desarrollo y la maduración de la semilla son también de gran importancia ya que durante este período se almacenan reservas (Watson and Ramstad, 1987).

El maíz es un cereal y tiene múltiples clasificaciones pero su clasificación taxonómica es la siguiente (Reyes, 1990):

Reino	Vegetal
División o phylum	Tracheophyta
Sub-división	Pterapsidae
Clase	Angiosperma
Sub-clase	Monocotiledóneas
Orden	Graminales
Familia	Graminae
Tribu	Maydeae
Género	Zea
Especie	mays
Raza	existen más de 300 razas

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA SEMILLA

Estructura de la Semilla

Las semillas de las angiospermas usualmente presentan: (1) el embrión, resultado de la fertilización de la célula huevo en el saco embrionario por uno de los tubos polínicos del polen; (2) el endospermo, el cual surge de la fusión de dos núcleos polares en el casco embrionario con el otro núcleo del tubo del polen; (3) el perispermo, un desarrollo de la nucela y (4) la testa o cubierta de la semilla, formada de uno o ambos integumentos que rodean al óvulo. En el caso de la semilla de maíz, que pertenece a la familia de las Gramineae, incluye un embrión, endospermo, aleurona y pericarpio (Figura 2) (Watson and Ramstad, 1987).

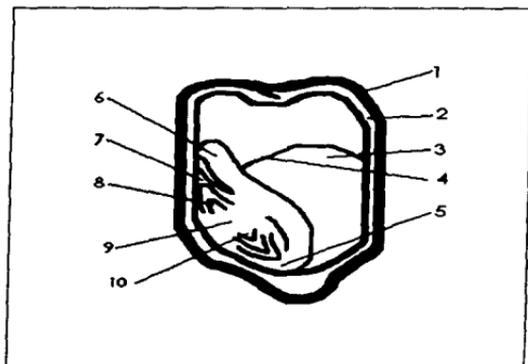


FIGURA 2.- Anatomía de la semilla. 1 testa, 2 capa de células de aleurona, 3 endospermo, 4 capa de células epiteliales, 5 coleormiza, 6 escutelo, 7 coleóptilo, 8 plúmula, 9 nudo cotiledonar, 10 radícula.

Embrión

El embrión está conformado por el eje embrionario y en el caso del maíz por solo un cotiledón. El eje comprende la raíz embrionaria (radícula), el hipocótilo, en el cual los cotiledones están fijos, y el ápice del tallo con las primeras hojas verdaderas (plúmula). En monocotiledóneas el único cotiledón es mucho más reducido y modificado para formar un escutelo, la vaina basal del cotiledón es elongada para formar un coleóptilo convirtiéndose en las primeras hojas y en algunas especies como el maíz, el hipocótilo está modificado para formar un mesocótilo (Watson and Ramstad, 1987).

Endospermo

Las semillas pueden ser endospérmicas o no endospérmicas en donde el maíz es una semilla endospérmica. El endospermo, que tiene una alta capacidad de retención del agua puede tener un papel dual, el de proveer reservas para el embrión germinado y el de regular el balance de agua del embrión durante la germinación (Watson and Ramstad, 1987).

Cubierta de la semilla (testa)

La testa es de considerable importancia para la semilla ya que es una barrera protectora entre el embrión y el medio externo. El carácter protector de la cubierta de la semilla puede ser atribuido a la presencia de una cutícula externa e interna, frecuentemente impregnada con ceras, grasas y una o más capas de cubiertas gruesas. Para el maíz la testa está unida al pericarpio formando una cariopside, la cual cubre al grano y proporciona protección a las partes interiores. El pericarpio y la testa se desarrollan a partir del tejido materno (Watson and Ramstad, 1987).

GERMINACIÓN

La germinación comienza con la toma de agua por la semilla (imbibición) y termina cuando comienza la elongación del eje embrionario, usualmente la radícula. Esto incluye numerosos eventos físicos, químicos, bioquímicos y genéticos finamente regulados, tanto anatómica como temporalmente, y de los cuales ninguno por sí mismo es único para la germinación. Desde el punto de vista bioquímico, se puede decir que la germinación es la reiniciación de la actividad metabólica y el crecimiento por parte de los tejidos que constituyen a la semilla; esto involucra rehidratación, la utilización de reservas y el desarrollo gradual de sistemas sintéticos que transforman al embrión en una planta joven y la capacitan para asumir una existencia autotrófica (Mohr, 1995).

Durante la germinación, la secuencia de eventos fisiológicos y bioquímicos que parecen ser común a un gran número de semillas pueden dividirse en:

- a) **Eventos tempranos:** los cuales incluyen hidratación, síntesis de ATP, síntesis de proteínas, síntesis de ARN y reparación de ADN. (Bewley and Black, 1994; Bidwel, 1990; Doerner, 1994)
- b) **Eventos tardíos o secundarios** que incluyen expansión celular, movilización de reservas y duplicación del ADN. Cada evento representa un estado potencial en el cual un sistema de control puede operar en la germinación (Doerner, 1994).

La síntesis de proteínas es un evento temprano en la germinación. Las ARN polimerasas dependientes de ADN no son enzimas limitantes, ya que se han encontrado en trigo, cebada y soya en cantidades suficientes para catalizar la síntesis de ARNm tan pronto como se inicia la germinación. Sin embargo, el rápido aumento en la síntesis de proteínas que ocurre durante las primeras etapas de la germinación es un evento independiente de la síntesis

de novo de ARN mensajero. En varias semillas de cereales se han descrito la existencia de mensajeros almacenados que se sintetizan durante la embriogénesis, pero no se expresan en ese período. Se ha sugerido que estos mensajes almacenados se requieren en las etapas tempranas de la germinación para una rápida reiniciación de la actividad metabólica (Bewley and Black, 1994).

La transición de las primeras etapas del desarrollo a la germinación necesita cambios fundamentales en el control de la expresión del gen en el interior de la semilla. En algunos estados la expresión de genes que codifican para proteínas de reserva, y para enzimas involucradas en la síntesis de material almacenado y otras actividades, tienen que ser apagados mientras que genes que codifican para enzimas involucradas en la germinación, la iniciación del crecimiento axial y la subsecuente movilización de reservas son activados (Bewley and Black, 1994).

Síntesis de proteínas en embriones durante la germinación

La síntesis de proteínas ocurre durante el desarrollo de la semilla, pero cesa durante la desecación en los estadios finales de la maduración. Evidencia de esto es que no se encuentran polisomas en semillas secas. En consecuencia cabe preguntarse: Si algunos o todos los componentes involucrados en la síntesis durante el desarrollo de la semilla son destruidos como consecuencia de la desecación o si estos son conservados en la semilla seca y entonces son reutilizados en una subsecuente rehidratación (Bewley and Black, 1994).

Ha sido aceptado que los ribosomas activos y los ARN^ts están presentes en las semillas secas. En embriones de trigo y embriones de diferentes semillas tales como cebada, soya y maíz se ha observado la presencia de ARNm's almacenados en el embrión seco que sustentaran la síntesis temprana de proteínas. Estos ARNm's están en forma protegida en la semilla seca, quizá en el núcleo o en el citoplasma asociado con proteínas como partículas

ribonucleoproteicas (RNPM). Los transcritos no protegidos son presumiblemente hidrolizados durante la maduración tardía o la germinación temprana (Bewley and Black, 1994).

En ejes de chícharo, por ejemplo, los cambios del estado del ARNm con el tiempo son reflejados por un cambio cualitativo en los tipos de proteínas que comienzan a sintetizarse. Aquí, los productos de traducción *in vitro* de ARNm's extraídos a partir de ejes secos de chícharo y de ejes embebidos son poco similares cuantitativa y cualitativamente. A tiempos más largos, bajo la completa germinación a 16 horas, los tipos de proteínas determinadas por mensajes extraídos son considerablemente diferentes de aquellas de tiempos tempranos. Muchos de los mensajes presentes en ejes secos son reemplazados a medida que la germinación prosigue. Varios estudios han mostrado ahora que embriones de trigo y de otras especies también exhiben cambios cualitativos en su ARNm a unas pocas horas de iniciar la imbibición (Bewley and Black, 1994).

En el embrión seco existen probablemente dos clases de ARNm almacenados presentes:

- a) ARNm's residuales, que son ARNm's producidos durante el desarrollo de la semilla y no son destruidos durante la desecación y la maduración tardía. Estos no son esenciales para la germinación y pueden ser degradados rápidamente después de la imbibición. Los mensajes de proteínas ribosómicas tempranas en trigo pueden caer dentro de esta categoría. Otro ejemplo es la proteína Em en trigo la cual pertenece al grupo de proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant) que son codificadas por los genes *lea*. Estas proteínas aparecen durante la desecación de las semillas y presentan una importancia funcional con respecto a la protección de los tejidos de la semilla.
- b) Los ARNm almacenados que se acumulan durante el desarrollo, y están disponibles inmediatamente a la hidratación y por lo que pueden ser rápidamente traducidos a proteínas siendo éstos una parte integral de la

germinación. Aunque la identificación de éstos ha sido lenta, recientemente Beltrán-Peña *et. al.* reportaron que entre los transcritos almacenados se encuentran ARNm de proteínas ribosómicas. Bewley y Black (1994) han sugerido que los mensajes almacenados pueden ser subcategorizados en transcritos para (a) enzimas esenciales para metabolismo intermediario y (b) proteínas esenciales para la terminación exitosa del proceso de germinación *per se*, culminando en la elongación de la radícula.

El estudio de los diferentes mecanismos de control traduccional que están implicados en el reclutamiento de ARNm's almacenados a polisomas en la etapa temprana de germinación llevará a entender el control traduccional que ocurre en toda la planta. Se ha descrito en algunos casos que la fosforilación de la proteína ribosomal S6 de la subunidad pequeña esta involucrada en el proceso de iniciación de la traducción de algunos transcritos almacenados (por ejemplo, transcritos de las proteínas ribosómicas) (Beltrán-Peña *et. al.*, 1995). Sin embargo los mecanismos de control traduccional de otros transcritos almacenados no se conocen.

Para entender los mecanismos regulatorios a nivel traduccional es importante mencionar las fases de la síntesis de proteínas.

SÍNTESIS DE PROTEÍNAS

La traducción del ARNm en proteínas es uno de los últimos pasos en la ruta de la expresión del gen. La síntesis de proteínas no solo suple nuevas proteínas funcionales sino también reemplaza aquellas que fueron sujetas a degradación (Voorma *et. al.*, 1994). Para que un ARNm sea traducido, tiene que ser ensamblado el complejo ribosómico, un proceso que requiere un gran número de factores de iniciación eucarióticos (eIF), factores de elongación eucarióticos (FEe), ATP, GTP y aminoacil-ARNt, producidos por una acción concertada de sintetetas, ARNt y ATP (Lenhinger *et. al.*, 1993). Requiere además de la activación de amino ácidos la cual se da en el citosol donde cada uno de los 20 amino ácidos se une covalentemente a un ARNt a expensas de la energía del ATP, en una reacción catalizada por la aminoacil-tRNA sintasa y con Mg^{2+} como cofactor. Por último, la terminación donde la cadena polipeptídica esta completa y el codón de terminación en el ARNm da la señal para liberar la proteína. La síntesis de proteínas es un proceso que es regulado en varios pasos por eventos de fosforilación y defosforilación. La traducción de ARNm entonces puede ser dividida en tres fases separadas: *iniciación*, la cual implica el reconocimiento del codón AUG por el complejo de preiniciación 43S (Voorma, 1994), *elongación*, durante la cual el marco de lectura abierto (secuencia que contiene una serie de tripletes que codifican para aminoácidos sin cualquier tipo de codon de terminación, la secuencia es traducida a proteína) es traducido en proteína por la migración del ribosoma 80S y finalmente la *terminación* donde el reconocimiento del codón de termino por un factor de liberación en el último ribosoma, resulta en la liberación del polipéptido completo (Voorma *et. al.*, 1994).

El paso limitante de la traducción generalmente ocurre durante la fase de iniciación y ha sido esta fase la más estudiada. Para algunos genes se ha propuesto que su expresión está controlada en esta fase. Sin embargo, se ha sugerido que durante la inicio de la germinación pudieran existir mecanismos

de control traduccional semejantes a los que ocurren durante las primeras etapas de la embriogénesis en animales, tales como anfibios y murinos (Gallie, 1993).

Control traduccional durante el desarrollo temprano

La expresión génica en muchas células eucariotes es regulada predominantemente a nivel de la transcripción. Sin embargo, en algunos estados del desarrollo temprano en embriones de animales, no hay transcripción nuclear y la transferencia de la información de un gen a proteína es controlada por los niveles de la traducción de ARNm's maternos (Richter, 1991).

Se ha observado que en el citoplasma de oocitos de *Xenopus* algunos ARNm maternos se acumulan y que ciertos mensajes son traducidos durante la maduración del oocito, fertilización o embriogénesis temprana de varios invertebrados, anfibios (*Xenopus*) y murinos (Wormington, 1993). En estos casos la traducción es controlada predominantemente por la poliadenilación citoplásmica, del extremo 3' de los transcritos. (Bilger et. al., 1994; Li and Hunt, 1995; Jackson and Standart, 1990).

Poliadenilación Citoplásmica

El desarrollo temprano en animales está programado en gran parte por ARNm's maternos que son sintetizados y almacenados en el citoplasma de oocitos en crecimiento. Estos ARNm's no son traducidos inmediatamente después de la transcripción sino que son expresados secuencialmente en estados precisos del desarrollo y, en algunos casos, en lugares precisos durante la maduración del oocito o del embrión en etapas tempranas de la embriogénesis (Wahle and Keller, 1992). Una forma prevalente de la regulación traduccional de ARNm's maternos es la elongación citoplásmica de poli(A), la cual ocurre en varios invertebrados marinos, mamíferos, en

insectos (*Drosophila melanogaster*) (Salles *et. al.*, 1994) y anfibios (*Xenopus laevis*) (Fox *et. al.*, 1989). La poliadenilación citoplásmica activa transcritos con una cola corta de poli(A) (15 a 90 residuos) al aumentarla a 200 residuos y ser subsecuentemente reclutados a polisomas. La adición de la cola de poli(A) en el citoplasma requieren de señales discretas en la región 3' no traducible (3'UTR) (Hake and Richter, 1994). Una de ellas es la secuencia (AAUAAA) consenso por su papel en el corte y poliadenilación nuclear de ARNm heteronucleares, y una secuencia rica en U denominada elemento de poliadenilación citoplásmica (CPE) presentes en transcritos de *Xenopus* (Fox *et. al.*, 1989) y el elemento control de adenilación en ratón (ACE) (Huarte *et. al.*, 1992). Esta secuencia generalmente se encuentra a una distancia de 50-100 nucleótidos río arriba del hexanucleótido AAUAAA (Feng *et. al.*, 1990). Aunque los CPEs tienen la estructura general de UUUUUAAU, estos pueden variar considerablemente de este motivo, y esto puede influir en el tiempo exacto o grado de poliadenilación. La secuencia del CPE/ACE y su posición relativa a AAUAAA tiene control sobre la regulación y la extensión de la poliadenilación (Wormington, 1993). Aunque el descubrimiento de los elementos *cis*, es decir elementos que se encuentran en la secuencia del ADN, que regulan la poliadenilación citoplásmica fue relativamente sencillo, el estudio y análisis de las proteínas que controlan este proceso, ha sido más lento. Generalmente, dos líneas a investigar han sido tomadas. Una ha sido la identificación de factores involucrados en la poliadenilación nuclear que también contribuye a la poliadenilación citoplásmica. Y la segunda línea ha sido el identificar los factores que interactúan con el elemento específico para la poliadenilación citoplásmica (CPE). Hake y Richter (1994) han mostrado que hay al menos una proteína (58-62 KDa) que interactúa con el CPE. La secuencia de esta proteína, tienen dos motivos de reconocimiento al RNA y ha sido denominada proteína de unión al elemento de poliadenilación citoplásmica (CPEB, cytoplasmic polyadenilation element-binding protein). El mensaje de la CEPB y los niveles de proteínas son regulados en el desarrollo, prevalecen en oocitos, declinan precipitadamente en huevo y no son

detectados en la gastrulación. También mostraron que la inmunoeeliminación de esta proteína en extractos de huevos resulta en la pérdida completa de actividad de la poliadenilación citoplásmica. Al suplementar los extractos eliminados con CPEB sintetizado en un lisado parcial de reticulocito se observó que se restableció la actividad, demostrando que esta proteína es un componente esencial del aparato de la poliadenilación citoplásmica (Hake and Richter, 1994).

OBJETIVO

En base a estos estudios nos hemos hecho la pregunta de si en transcritos de maíz existe una secuencia consenso (CPE) que posiblemente en conjunto con el motivo AAUAAA regulen la poliadenilación del ARNm movilizado a la fracción polisómica.

MATERIAL BIOLÓGICO

Ejes Embrionarios de maíz

Los ejes embrionarios se obtuvieron a partir de semillas secas de maíz (*Zea mays L.*) variedad Chalqueño. La obtención de estos ejes se realizó manualmente, cortando con una navaja y sacando el embrión con un poco de endospermo. La mayor parte del endospermo se eliminó, de tal forma que solo se obtuviera el eje embrionario y teniendo el cuidado de no romperlo.

Oocitos de *Xenopus*

Para los ensayos de poliadenilación se utilizaron oocitos de *Xenopus* machajandolos como se describen en Sallés (1992).

Desinfestación

Los ejes embrionarios se lavaron con etanol al 70% durante 5 minutos, agitando suavemente y enjugando dos veces con agua esterilizada. Los ejes fueron lavados con hipoclorito de sodio al 0.1% por 5 minutos agitando y por último fueron enjugados tres veces con agua desionizada estéril para eliminar el exceso de hipoclorito.

Para cada experimento se incluyó un lote (0.5 g peso seco) de los ejes embebidos en α -amanitina (20 μ g por mL) por una hora en obscuridad después de la desinfestación. La α -amanitina es un octapéptido bicíclico derivado de *Amanita sp.*, que inhibe diferencialmente las ARN polimerasas eucarióticas siendo la ARN polimerasa II especialmente sensible. Este tratamiento nos permitió inhibir la transcripción de un 85 a 95 % (Beltrán-Peña et. al. 1995), por lo que la síntesis *de novo* de ARNm es mínima, garantizándonos que los transcritos estudiados son los almacenados durante la embriogénesis.

Incubación

Bajo condiciones de esterilidad se sembraron e incubaron los ejes embrionarios en frascos tipo "Gerber" en medio Murashige-Skoog (Murashige and Sook, 1962) en obscuridad a 30°C. El tiempo de incubación fue de 6, 12, 24 y 30 horas.

Preparación de Extractos y Ensayo de Poliadenilación

500 mg de ejes embrionarios de maíz a diferentes horas de germinación (0, 12 y 24 horas) fueron molidos en un mortero con nitrógeno líquido, el polvo fue homogeneizado con 200 μ L de amortiguador de extracción (HEPES 40 mM pH 7.6, acetato de sodio 100 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 2 mM y DTT 4 mM). El extracto fue clarificado a 23 000 xg a 4°C por 15 minutos y el sobrenadante fue recentrifugado y pasado a través de una columna de Sephadex G-25 equilibrado con HEPES 40 mM a pH de 7.6, acetato de potasio 100 mM, acetato de magnesio 5 mM y DTT 4 mM a 4°C. El afluente fue colectado en un tubo estéril. El volumen colectado fue aproximadamente igual al volumen cargado en la columna.

El ensayo de poliadenilación con extractos de maíz fue hecho en un volumen de reacción de 20 μ L que contenía 10 μ g de ARN_{TOTAL} (ocitos o ejes

embrionarios de maíz a diferentes horas de germinación). 8 μ L de extracto de maíz, KAc 100 mM, acetato de magnesio 0.5 mM, espermina 80 μ M, DTT 2 mM, suplementando con una mezcla de aminoácidos (de cada aminoácido 40 μ M, ATP 1 mM, GTP 60 μ M, fosfato de creatina 10 mM y fosfoquinasa de creatina 100 μ g/mL) y [α - 32 P] ATP 10 μ Ci (3000 Ci/mmol). La mezcla fue incubada a 25°C por 90 minutos. El ARN fue extraído fenolicamente, precipitado con etanol y resuelto por electroforesis como se describe en precipitación y extracción de ARN (Schuler and Zielinski, 1988).

Aislamiento de Polirribosomas

Toda la metodología se hizo a 4°C. 500 mg de ejes embrionarios de maíz se molieron en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo muy fino, casi como talco. Este polvo se resuspendió en 3 mL de amortiguador de extracción (PTE 2%, Heparina [182.1 unidades/mg] 0.005 mg/mL, Mercaptoetanol 100 mM, Tris-HCl 200 mM pH 9, KCl 200 mM, MgCl₂ 35 mM, EGTA 25 mM y Sacarosa 20 mM). El tejido grueso del homogeneizado fue desechado cuando se hizo pasar éste por una jeringa empacada con fibra de vidrio. El extracto se incubó por 15 minutos en hielo y se centrifugó posteriormente por 15 minutos a 12 000 xg. El sobrenadante se colocó sobre un colchón de sacarosa (sacarosa 1.5 M, Tris-Cl 40 mM, KCl 20 mM, MgCl₂ 10 mM, Heparina [182.1 unidades/mg] 0.005 mg/mL) y se centrifugó a 20 000 xg por 3½ horas. La pastilla obtenida (fracción polisómica) se separó del sobrenadante que es la fracción no polisómica (Schuler and Zielinski, 1988).

Extracción de ARN_{TOTAL} de las Fracciones Polisómica y no Polisómica.

Las fracciones polisómica y la no polisómica se trataron por separado.

La fracción polisómica se resuspendió en 500 μ L de agua tratada con Dietil pirocarbonato (DEPC) (Ausbel, 1992) y los tubos con los que se trabajó fueron tratados con SDS (dodecil sulfato de sodio) 1% y EDTA (Etilen dinitrioltetracetato disódico) 20 mM. Para la extracción del ARN_{TOTAL} se adicionó un volumen igual de fenol:cloroformo-alcohol isoamílico 24:24:1 (vol/vol/vol), se agitó vigorosamente con vortex y se centrifugó a 16 000 xg a 4°C durante 10 minutos para separar la fase acuosa de la orgánica. La fase acuosa se transfirió a un tubo, al cual se le adicionó un volumen igual de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 para eliminar trazas de fenol volviéndose a centrifugar a la misma velocidad. La fase acuosa obtenida se transfirió a otro tubo limpio y el ARN se precipitó como se menciona en el siguiente apartado. De la fracción no polisómica (\approx 3 mL), se eliminaron proteínas y lípidos de la misma forma como se describió anteriormente.

Precipitación de Ácidos Nucleicos

A la fase acuosa de las fracciones polisómica y no polisómica se le adicionó 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y dos volúmenes de etanol frío al 100% mezclándolo bien con vortex e incubándolo toda la noche a -20°C. Posteriormente, se centrifugó a 12 000 xg por 15 minutos a 4°C. La pastilla obtenida se lavó con etanol al 70% para eliminar las sales. El etanol se decantó y el restante se evaporó poniendo el tubo ependorff cerca de la flama del mechero por 45 segundos. La pastilla se disolvió en 25 μ L de agua tratada con DEPC.

La concentración de ARN_{TOTAL} de ambas fracciones se determinó midiendo su absorbancia en un espectrofotómetro Beckman DU 650 a 260nm, utilizando la siguiente fórmula: Para calcular la concentración en μ g/mL se

multiplica el factor de dilución $\times A_{260} \times 44.19$. Un valor de A_{260} de 1.0 equivale aproximadamente a $44 \mu\text{g/mL}$ de ARN (Sambrook *et. al.*, 1989). Sin embargo para determinar que las muestras estuviesen libres de proteínas se midió la absorbancia a 280 nm. la razón de 260/280 debe ser mayor o igual a 1.8 para asegurar que del ARN_{total} se han eliminado la mayoría de las proteínas. Nuestras muestras nos daban consistentemente valores de 1.8 o mayores.

Las muestras de ambas fracciones se corrieron en un gel de agarosa al 1% para asegurarse de que el ARN_{total} no estuviera degradado, montado en una cámara de electroforesis horizontal HE 33 Minnie the Gel-Cycle with HE 47-10 Gel Casting Kit de Hoefer Scientific Instruments. Las muestras se cargaron con $5 \mu\text{L}$ de amortiguador de carga 10 X (0.25 % de Azul de bromofenol, 0.25 % de Xileno Cianol y Glicerol al 30%), más bromuro de etidio ($0.5 \mu\text{g/ mL}$). El gel se corrió en frío con amortiguador TAE al 1X (Tris-acetatos 40 mM y EDTA 1 mM) a 100 V por una hora, Figura 3.

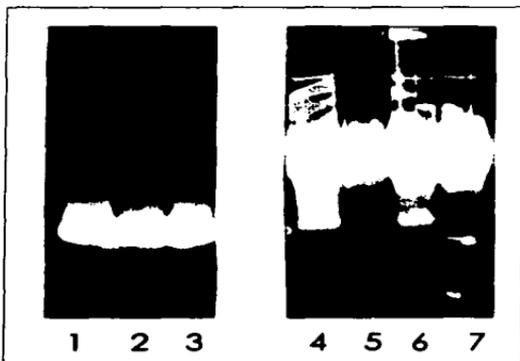


FIGURA 3. Ácidos ribonucleicos. Fracción no polisómica de ejes embrionarios de maíz germinados 50 horas (carriles 1 y 2) y 24 horas (carri 3) así como sus fracciones polisómicas (50 horas, carriles 5 y 7; 24 horas, carriles 4 y 6).

Aislamiento de ARN_{TOTAL}

Aislamiento por el método de TRIzol (para 500 mg de tejido). Se siguieron las especificaciones del fabricante GIBCO (BRL), que se describen a continuación:

Toda la metodología se hizo con material y soluciones libres de ARNasas. Se molió 500 mg de ejes embrionarios de maíz con nitrógeno líquido, después se homogeneizó con 5 mL del reactivo de TRIzol. El homogenizado se incubó en tubos eppendorf durante 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se le adicionó 1 mL de cloroformo-alcohol isoamílico 49:1. Los tubos se taparon, se agitaron vigorosamente con la mano durante 15 segundos y se incubaron por 3 minutos a temperatura ambiente. La separación de fases se obtuvo centrifugando a 12 000 xg por 15 minutos a 4°C. La fase acuosa se pasó a un tubo limpio para precipitar el ARN_{TOTAL}. Se mezcló la fase acuosa con 2.5 mL de isopropanol incubándola a temperatura ambiente 10 minutos para después centrifugarlo a 12 000 xg 10 minutos a 4°C. De este paso se obtuvo una pastilla la cual se lavó con etanol al 75% (1 mL de etanol por mL de reactivo TRIzol usado en un principio) centrifugando a 12 000 xg por 5 minutos a 4°C. La pastilla que se obtuvo fue resuspendida en 300 µL de agua DEPC. Para asegurar que estas muestras no estuvieran degradadas se corrió un minigel como se describe en la sección de precipitación de ácidos nucleicos.

Gel de Agarosa para Transferencia de ARN

La cantidad de muestra que fueron cargadas en este gel varió de 10 a 30 µg de ARN_{TOTAL}. La solución del gel de agarosa fue preparada disolviendo 1.5 gramos de agarosa en 84.6 mL de agua tratada con DEPC, después se calentó a 55°C, 10 mL de amortiguador MOPS 1X y 5.4 mL de formaldehído (12.3 M) fueron adicionados y mezclados perfectamente. La concentración final de agarosa fue de 1.5% y la del formaldehído de 0,66 M.

El gel se monto en un aparato de electroforesis horizontal modelo Horizon 20.25, y se corrió durante 18 horas a 17 V en amortiguador MOPS 1X (amortiguador MOPS 10X: MOPS 200 mM pH 7.0, acetato de Sodio 100 mM, Na:EDTA 20 mM). Se transfirió y se hibridizó, como se describe a continuación.

Transferencia

La transferencia es un método para inmovilizar ácidos nucleicos a una membrana de nylon. Esta transferencia se muestra en la figura 4.

La transferencia se llevo a cabo por 18 horas.

PRECAUCIONES. Para la elaboración de esta transferencia se tomaron las siguientes precauciones con la finalidad de evitar una mala transferencia:

1. Evitar que los componentes 7, 8 y 9 de la figura tengan contacto alguno con la solución citrato de sodio salino (SSC) 20X (NaCl 3 M, citrato de sodio 0.3 M y ajustar el pH a 7.0).
2. No dejar burbuja alguna entre los componentes 7 y 8.
3. La cantidad de la solución utilizada debe ser la suficiente para la transferencia.

Posteriormente se sacó la membrana de nylon (Hybond N*) y se colocó en un papel filtro. El ARN_{TOTAL} transferido a la membrana fue fijado con luz UV en un aparato UVC 500 Ultraviolet Crosslinker HSI durante dos minutos. La membrana se guardó húmeda entre dos papeles filtro y envuelta en papel aluminio a 4°C para su uso posterior.

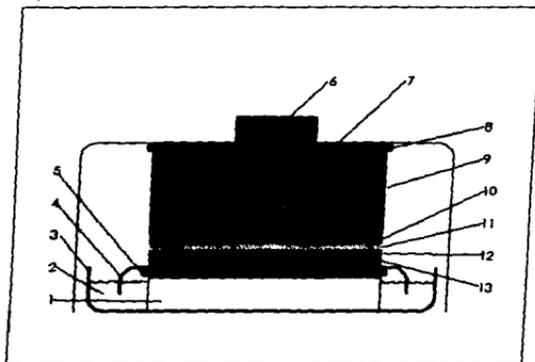


FIGURA 4. Dispositivo de transferencia. 1. Caja petri boca abajo. 2. Solución de SSC 20X, 200 mL. 3. Recipiente. 4. Banda de papel Whatman 3MM con el ancho del gel y un largo de tal manera que toque el fondo del recipiente. 5. vidrio de 20 cm por 20 cm. 6. Objeto que le da peso al dispositivo (500 g). 7. Recubrimiento para evitar que se evapore la solución. 8. Vidrio de 20 cm por 20 cm. 9. Papel periódico con las dimensiones del gel. La altura que debe alcanzar el papel periódico debe ser \approx 15 cm. 10. Tres papeles Whatman 3MM con las dimensiones del gel. 11. Membrana Hybond N+ con las dimensiones del gel. 12. Gel. 13. Tres papeles Whatman del número 3 MM con las dimensiones del gel.

Marcaje de la sonda de Ciclinas

Se llevó a cabo de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Random Primer Extension Labeling System, NEP-103, Biotechnology Systems NEN® Research Products, DUPONT). Aproximadamente 50 ng del ADNc de ciclinas tipo B1 (Sheets *et. al.*, 1994) se puso en baño de agua a ebullición durante 5 minutos para desnaturalizarlo, y después se pasó a hielo. Se le

adicionó 6 μ L de Amortiguador Random Primer Extension 5x, 6 μ L de la mezcla de desoxinucleótidos Trifosfatos, 1 μ L del fragmento Klenow (Large Fragment DNA Polymerase I) y 2 μ L de dCTP marcado α - 32 P con una actividad específica de 6000 Ci/mmol), se mezcló bien y se llevó a un volumen de 30 μ L con agua. Posteriormente se incubó durante una hora a 37°C y la sonda se lavó pasándola a través de una jeringa con fibra de vidrio (empacadas con Sephadex G 40-50) para eliminar el dCTP no incorporado (Feinberg and Vogelstein, 1984). Del líquido obtenido se tomó un microlitro y se determinó la actividad incorporada en cuentas por minuto en un contador de centelleo. Si el valor en cpm resultaban mayores a 80 000 se procedía a lavar la sonda, nuevamente pasándola por una nueva columna empacada con Sephadex.

La sonda fue desnaturalizada por tres minutos en agua hirviendo la cual fue vertida en los tubos que contenían las membranas con amortiguador (ver más adelante) de hibridación evitando tocar las paredes del tubo.

Oligo d(T)₁₂₋₁₈ Marcado en el extremo 5'

50 ng del oligonucleótido fueron incubados en la presencia de γ - 32 P]ATP 30 μ Ci (3000 Ci/mmol), 10 unidades de polinucleótido cinasa de T4 en amortiguador de intercambio 1x (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, MgCl 10 mM, DTT 5 mM y spermina 0.1 mM) por 40 minutos a 37°C.

Prehibridación

Las membranas se metieron a tubos de hibridación, a los cuales se les adicionó 3 mL de amortiguador de hibridación (albúmina 1%, SDS 7 % y amortiguador de fosfatos 0.5 M pH 7.4, EDTA 1 mM, BSA 1% p/v). Los tubos se dejaron durante dos horas como mínimo en un horno de hibridación Robbins Scientific modelo 400 a una temperatura entre 60 y 62°C.

Hibridación y Lavado

Para la hibridación se le agregó la sonda desnaturalizada a los tubos dejándolos en el horno por 18 horas entre 60-62°C. Posteriormente las membranas se lavaron dos veces en una mezcla de SDS 0.1% y SSC 2X, en agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente. Si la radiactividad de la membrana no bajaba a 300 y 400 cpm. detectados en un contador Geiger, los lavados se continuaban a una mayor astringencia (SSC 0.1X, SDS 0.1%).

Autorradiografías

Las membranas se colocaron en un soporte sólido cubiertos con egapack para que se mantuvieran húmedas y se expusieron en un cassette con una película kodak X-OMAT XO a -70°C durante 3-4 días. Si la marca de la sonda o de las membranas era baja se exponían por un mayor tiempo.

Revelado

Las películas se revelaron de la siguiente manera. Como el cassette estaba en refrigeración se procedía a quitar el hielo y secar perfectamente todo residuo de agua, después en el cuarto oscuro se procedió a abrir el cassette sacar la película y meterla en una charola con el líquido de revelado durante aproximadamente 3 minutos dependiendo de la intensidad de marca; después, se transfirió la película a otra charola con ácido acético al 15% solo por unos segundos y por último se sumergió perfectamente en el fijador durante 4 minutos, para posteriormente lavarla al chorro de agua de la llave y colgarla para que toda el agua se escurriera de la película.

OBTENCIÓN DE LA SONDA S₁₃₋₆

Se utilizó una sonda de ciclina de soya S₁₃₋₆ clonada en el plásmido Bluescript SK(-) (la designación SK indica que el polilinker esta orientado, tal que la transcripción de lac Z procede en dirección de SacI a Kpn I y el signo (-) indica la hebra que es la inferior). Este inserto fue cortado de la región de clonado múltiple con la enzima *NotI* y se siguió la siguiente técnica para la digestión del plásmido: Para 3 µg de plásmido se utilizó 1 µL de enzima de restricción (5 U/µL), 2.5 µL de amortiguador de reacción 10X y lo restante de agua DEPC para obtener un total de 25 µL. La reacción fue incubada en un heat block a 37°C por una hora.

Una alícuota de la digestión fue analizada en un gel de agarosa al 1% como se describe en la sección de Precipitación de Ácidos Nucleicos con la diferencia de que en esta parte se usó amortiguador de carga para AND (Ausbel et. al., 1992) y un marcador que fue ADN del fago λ cortado con la enzima *Hind III*.

El inserto de ADNc fue cortado del gel (1.596 Kb) para posteriormente limpiarlo como se describe a continuación.

Purificación de la sonda (GeneClean)

Se realizó bajo las instrucciones del fabricante Bio 101 Inc. Los pedazos de agarosa fueron pesados y se les añadió 4.5 volúmenes de yoduro de sodio con respecto a su peso, poniéndolos en un heat block a 50°C durante 5 minutos mezclando a intervalos de 2 minutos. Una vez pasado el tiempo se le adicionó 5 µL de una suspensión de matriz de sílice, incubándolos en hielo por 10 minutos y centrifugándolos por 5 segundos a 672 xg. La matriz de sílice se une al ADN por lo que este se encuentra en la pastilla que se lavó tres veces con solución New Wash (del fabricante Bio 101 Inc.); la pastilla se resuspendió

en 250 μ L de solución NW y se centrifugó 5 segundos a 8000 xg. En el último lavado se eliminó toda la solución NW y se resuspendió la pastilla en 15 μ L de agua DEPC para separar el ADN de la matriz. El tubo se incubó a 50°C durante dos minutos para después centrifugarlo a 8000 xg durante 30 segundos. El sobrenadante obtenido se pasó a un tubo limpio ya que contenía al inserto. Se repitió el lavado de la matriz de sílice pero ahora con 10 μ L de agua DEPC. Para calcular la concentración del inserto una alícuota éste se carga en un gel de agarosa al 1%, se corrió la electroforesis y se observaron las bandas teñidas con bromuro de etidio bajo el transiluminador de luz UV.

AMPLIFICACIÓN POR RT-PCR

Mediante la reacción catalizada por la enzima transcriptasa reversa se puede obtener ADNc a partir de ARN_{TOTAL} de la fracción polisómica y no polisómica de ejes embrionarios secos utilizando oligo d(T)₁₈ como cebador.

Obtención del ADNc

1 µg de ARN_{TOTAL} en DEPC (cantidad calculada para completar 20 µl de la reacción total) se incubaron a una temperatura de 50°C por una hora para romper estructuras secundarias. Posteriormente se agregó 2.5 µM de Oligo d(T)₁₈ y la siguiente mezcla

Mezcla Base:

Componente	Volumen	Concentración Final
solución de MgCl ₂ 25 mM	4 µL	5 mM
amortiguador PCR II 10 X	2 µL	1.0 X
dGTP	2 µL	1 mM
dATP	2 µL	1 mM
dTTP	2 µL	1 mM
dCTP	2 µL	1 mM
Inhibidor de ARNasa	1 µL	1 U/µL
Reverse Transcriptasa del virus de leucemia Murina (MuLV)	1 µL	2.5 U/µL

Se adicionó agua tratada con DEPC para obtener un volumen total de 20 µL.

La mezcla total se incubó a 42°C por una hora y se guardó a -20°C para su uso posterior.

Amplificación del ADNc

Una vez obtenido el ADNc, se amplificó la secuencia buscada utilizando un cebador que define al Elemento de Poliadenilación Citoplásmica (CPE: 5'-TA TGGTA CCACTCGAG ATTATG ATT TTAAT-3') 1.25 μM , y oligo d(T)₁₆ (2.5 μM), mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR).

Para cada una de las muestras se adicionó lo siguiente:

Componente	Concentración	Volumen
ADNc de la reacción anterior		10 μL
amortiguador PCR 10X	1X	5 μL
AmpliIaq ADN polimerasa	2.5 U/100 μL	1.5 U/ μL
MgCl ₂ 0.025 M	2 mM	2 μL

agua la cantidad necesaria para obtener una cantidad total de 40 μL . A cada tubo se le adicionó una pequeña gota de aceite mineral para evitar evaporación.

Se usó un termociclador (DNA Thermal Cycler 480, Perkin Elmer) con las siguientes instrucciones para la reacción:

- Desnaturalización a 94°C por 5 minutos, un ciclo.
- Alineamiento a 48°C por 5 minutos, un ciclo.
- Extensión a 72°C por 40 minutos, un ciclo.
- Posteriormente 35 ciclos que consistieron en: 94°C por un minuto, 52°C por un minuto, 72°C por un minuto treinta segundos, y finalmente un ciclo de extensión 72°C por 10 minutos.

En la figura 5 se muestra esquemáticamente esta metodología.

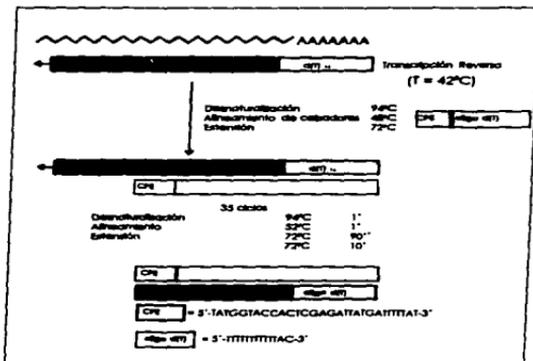


FIGURA 5. Obtención de ADNc y amplificación

Los productos amplificados fueron separados en un gel de agarosa 2.5% NuSieve GTG con amortiguador TBE 1X (TBE 1x = Tris-HCl 89mM, EDTA 89 mM) en una cámara de electroforesis horizontal. Esta agarosa permite una mejor resolución y al 2.5 % se resuelven tamaños de 0.2 a 1 Kb.

Gel de Poliacrilamida Desnaturalizante

Para preparar 80 mL al 4% de poliacrilamida-urea 6 M, se combinaron 38.4 g de urea, 34.2 mL de agua desionizada y 8.0 mL de amortiguador TBE 10x. La urea se disolvió calentando en un horno de microondas. Una vez que se enfrió esta solución a temperatura ambiente se adicionó 8 mL de solución de acrilamida al 40% (acrilamida:bisacrilamida 19:1) mezclándose bien. Para la polimerización se adicionó 480 μ L de Persulfato de amonio (APS) 10%

peso/vol. y 80 μL de TEMED [Stoeckle and Guan, 1993]. Se montó el gel en una cámara de electroforesis vertical Hoefer Scientific Instruments.

Preparación de las muestras.

A 5 μg de muestra de ARN se le adicionó 10 μL de amortiguador de carga (formamida 80%, EDTA 10 mM, Xileno Cianol 0.5 mg/mL, azul de bromofenol 0.5 mg/mL). Se calentaron las muestras a 80°C por 3 minutos. Estas muestras se cargaron en el gel corriéndose a 300 V durante una hora en amortiguador TBE [Stoeckle and Guan, 1993]. Después de la comida se montó el gel como se menciona en la sección de autoradiografía para ponerle una película, y se expuso durante 12 horas.

Obtención de Ácido desoxirribonucleico Complementario (ADNc) Marcado.

Para este procedimiento se mezclan en un tubo:

- 1 μL de cebador oligo d(T)₁₂₋₁₈ (0.005 g/mL)
- 1 μg de ARN_{TOTAL}
- 12 μL de agua DEPC esterilizada (varía dependiendo la cantidad de volumen en que se encuentre 1 μg de ARN_{TOTAL})
- Se calentó el ARN en solución a 50°C por 1 hora se enfrió en hielo y después se adicionó el oligo d(T)₁₂₋₁₈ Y:
- 2 μL de amortiguador 5X (Tris-HCl 250 mM pH 8.3, KCl 375 mM, MgCl 15 mM)
- 2 μL de 0.1 M DTT
- 0.5 μL de dNTPs (de cada dNTP 0.010 M a excepción del dCTP debido a que sería adicionado pero marcado con α [³²P] dCTP)
- 0.5 μL de α [³²P] dCTP 6000 Ci/mmol
- 1 μL de Super Script 200 Unidades

Para obtener un volumen total de 20 μL . Cada muestra se incubó a 37°C durante una hora.

Gel Alcalino

Las muestras fueron resueltas en un gel de agarosa alcalino al 1% siguiendo las instrucciones siguientes: Se pesó la cantidad correspondiente de agarosa para obtener una solución al 1% en agua; esta mezcla se calentó para disolver la agarosa, se adicionó hidróxido de sodio 50 mM y EDTA (pH 8.0) 1 mM. El gel fue montado en una cámara de electroforesis horizontal. Para esta electroforesis se utilizó amortiguador de corrida alcalino 1X (hidróxido de sodio 50 mM, EDTA 1 mM para 1x) hasta cubrir totalmente el gel. Las muestras se precipitaron con hidróxido de sodio 50 mM y 2 volúmenes de etanol 100% a -20°C durante toda la noche. Las muestras fueron resuspendidas en amortiguador de carga alcalino 6X (hidróxido de sodio 300 mM, EDTA 6 mM, ficol 18% tipo Pharmacia 400 en agua, verde de bromocresol 0.15 % y de xileno cianol FF 0.25%). Este gel se corrió durante 17 horas con un voltaje de 20. El gel fue neutralizado con Tris-HCl 1 M pH 7.6 y cloruro de sodio 1.5 M (Ausbel, *et. al.* 1992) y se transfirió a una membrana de nylon Hybond-NT⁺ como se explicó en la sección de transferencia y se expuso en una película X-OMAT por 12 horas.

Cuidados para Trabajar con ARN

Las dificultades asociadas a lo largo de la purificación, hace al ARN intrínsecamente lábil, debido a la actividad ubicua de la ribonucleasa. Las ARNasas son una familia de enzimas que hidrolizan moléculas de ARN presentando actividad endonucleolítica y hexonucleolítica. Estas son enzimas pequeñas (RNasa A = 14 000 Da.) y muy estables, que mantienen su configuración terciaria gracias a 4 puentes disulfuro que permiten su renaturalización rápidamente, aun después de un tratamiento con muchos desnaturalizantes, y después de hervir en una solución por 20 minutos o más. Las ARNasas tienen cofactores con requerimientos mínimos y son activas en un rango amplio de pH. Es por lo tanto obligatorio que el material y los reactivos estén libres de nucleasas para el comienzo del experimento (Farrel, 1993).

Para las metodologías usadas en los experimentos trabajando con ARN se tuvieron las precauciones que a continuación se mencionan:

- a) Todos los aparatos de plástico se dejaron por una hora en una solución detergente Dodecil sulfato de sodio al 1% y se enjuagaron con agua tratada con DEPC. El DEPC es un inhibidor de ribonucleasas que reacciona con la histidina del sitio activo de las ARNasas (Sambrook *et. al.*, 1989).
- b) El material de cristalería se esterilizó en una autoclave por 15 min. a una presión de 1.5 Kg./cm² o metiéndolo en el horno a 150°C durante 6 horas como mínimo.
- c) El material de plástico, que incluía puntas, tapas y tubos eppendorf nuevos se esterilizaron en una autoclave por 20 minutos.
- d) Para la preparación de las soluciones se utilizó agua desionizada estéril o agua DEPC. Éstos fueron nuevamente esterilizados en autoclave por 15 minutos a la presión indicada anteriormente.

RESULTADOS

Actividad citoplásmica de poli(A) polimerasa en extractos de embriones de maíz a diferentes horas de germinación.

Para determinar si la poliadenilación citoplásmica ocurre durante la germinación extractos citoplásmicos de ejes embrionarios de maíz de diferentes horas de germinación (0, 12 y 24 horas) fueron utilizados como fuente citoplásmica de poli(A) polimerasa. A cada extracto se le adicionó ARN_{TOTAL} extraído de ejes embrionarios secos, o de ejes embebidos por 12 horas o el ARN_{TOTAL} de oocitos de *Xenopus laevis* y se incubó en presencia de α -[³²P] ATP a 25°C por una hora. Como control positivo se utilizaron extractos de oocitos maduros de *Xenopus laevis* pues contiene la enzima citoplásmica poli(A) polimerasa (PAP) (Ballantyne et. al., 1995). El ARN de cada ensayo fué extraído, precipitado y separado por electroforesis. El ARN marcado por la incorporación de AMR₃-[³²P] en los transcritos fue cuantificado densitométricamente. La densitometría muestra que algunos transcritos exógenos fueron poliadenilados por los extractos citoplásmicos usados. Esto sugiere la presencia de actividad tipo PAP en los extractos de maíz y que esta actividad aumentó durante la germinación, (Figura 6).

A los extractos de oocitos de *Xenopus laevis* (control positivo) se les adicionó el ARN_{TOTAL} de ejes embrionarios de maíz seco y de 12 horas de imbibición, también en presencia de α -[³²P] ATP. De igual manera se aisló el ARN y se observó que los ARNm's de los ejes embrionarios de maíz, fueron poliadenilados, lo que muestra que la polimerasa poli(A) de *Xenopus laevis*

fue capaz de reconocer a los transcritos de maíz (datos no mostrados, artículo sometido).

De estos resultados se puede inferir que hay una actividad de poli(A) polimerasa citoplásmica que podría ser responsable de la activación de mensajes en maíz durante la germinación. Esto sugiere la posible presencia de un elemento de poliadenilación citoplásmico (CPE) en transcritos de ejes embrionarios de maíz con un secuencia similar al encontrado en *Xenopus laevis*.

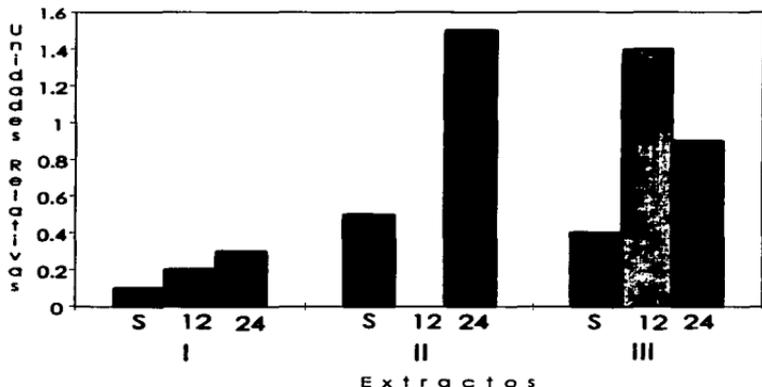


FIGURA 6.- Gráfica de la polimerasa poli(A) en extractos. En esta gráfica se muestra la incorporación de AMP α - ^{32}P cuantificada por densitometría. Los extractos que se representan son de ejes secos (S), de ejes embebidos por 12 horas (12) y 24 horas (24). A cada uno de éstos se les adicionó ARN TOTAL de diferentes fuentes: ARN TOTAL de ejes embrionarios secos de maíz (I), ARN TOTAL de embriones germinados durante 12 horas (II) y ARN TOTAL de oocitos de *Xenopus laevis* (III).

Amplificación de la región 3' terminal del ADNc de ejes embrionarios de maíz

Para investigar si un consenso similar al CPE en *Xenopus laevis* se encuentra en los transcritos de maíz usamos la metodología Amplificación Rápida de ADNc's de la región 3' terminal (RACE o RT PCR en la región 3' terminal). Esta fue realizada a partir de un microgramo de ARN_{TOTAL} extraído de las fracciones polisómica y no polisómica de ejes embrionarios de maíz de 12 horas incubados con o sin α -amanitina. Los ARN_{TOTAL} fueron transformados a ADNc por la enzima transcriptasa reversa MuLV y amplificados con oligo d(T)₁₆ y oligo CPE en las condiciones descritas en material y métodos. En esta técnica de RACE siempre se incluyeron varios controles negativos:

- I. ADN genómico de maíz, que se utiliza como control para descartar la posibilidad de que el producto amplificado provenga de ADN genómico, y no de ARN
- II. ARN_{TOTAL} sin la adición de la enzima MuLV. Si se observaba amplificación se podría concluir que nuestro ensayo está contaminado con ADN genómico.
- III. Otro control incluye los cebadores sin molde: ya que pueden amplificarse productos por el alineamiento del cebador oligo d(T)₁₆ con el oligoCPE si estos presentasen bases complementarias.

Se utilizaron tres controles, y no se observaron productos amplificados en ningún caso.

En la figura 7 se muestra claramente una amplificación de productos en la fracción polisómica de ejes de 12 horas con (carril 6) y sin α -amanitina (carril 1), mas no así en las fracciones no polisómicas respectivas (carriles 7 y 2). El ADNc de oocitos de *Xenopus laevis* fueron usados como control positivo y dió productos de tamaño similar de 100 a 300 pares de bases (carril 3). En los controles negativos no hay un barrido, indicándonos que: a. no hubo contaminación de ADN genómico (carril 4, 5), y b. los cebadores no se alinearon (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que por lo menos

algunos ARNm's almacenados contienen la secuencia cis-CPE que posiblemente medie la elongación de la cola de poli(A) en ejes embrionarios de maíz.

Debido a que productos amplificados de 12 horas de ADNc de maíz en presencia de α -amanitina fueron obtenidos, se puede inferir que transcritos almacenados de ejes embrionarios secos presentan dicho consenso.

Con el fin de confirmar la presencia de la secuencia consenso CPE en los transcritos de maíz se utilizó el oligo CPE y los productos se clonaron en el vector PCR11 (Stratagene) para secuenciarlos. Esto es parte de un proyecto más amplio, cuyos resultados, ya no se reporta en esta tesis.

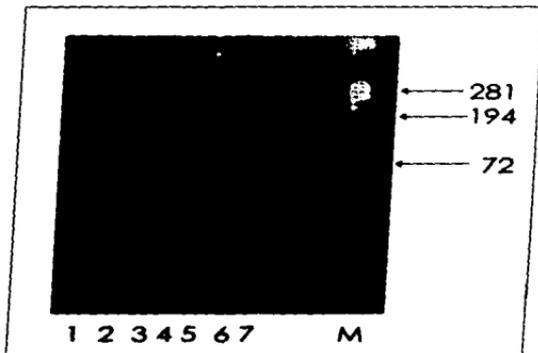


FIGURA 7. Amplificación de la región 3' terminal. Amplificación del ADNc en la región 3' terminal por medio de RT PCR a partir de un microgramo de ARN TOTAL de diferentes muestras utilizando como cebadores oligo-CPE y oligo d(T)₁₂₋₁₈. Se muestra la fracción polisómica de 12 horas sin (caril 2) y con (caril 6) α -amanitina, ADNc de oocitos de *Xenopus laevis* (caril 3), la fracción no polisómica de ejes embrionarios de 12 horas sin (7) y con α -amanitina (1), control negativo de ADN genómico (4), control negativo ARN sin transcriptasa reversa, (5) y marcador ϕ X-174 digerido con la enzima *Hae* III (M).

Cuando se usó el oligo CPE marcado en la región 5' se observó un barrido generado por los ADNc's amplificados. Este experimento se realizó utilizando ARN total de ejes embrionarios secos y de ejes de 12 horas, como molde (Fig. 8) y confirma lo observado en la figura 7.

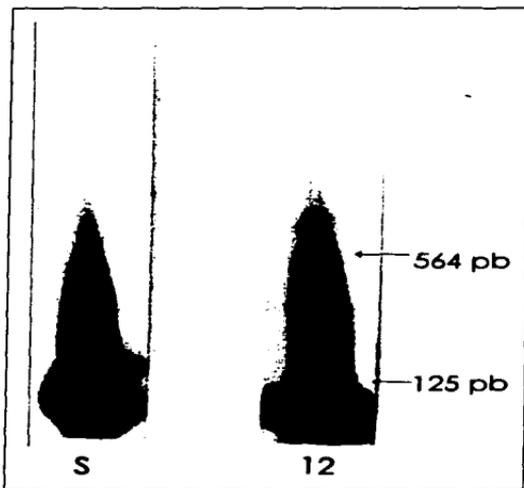


FIGURA 8. Elemento de poliadenilación citoplásmica marcado en la región 5'.

El elemento de poliadenilación citoplásmica se marcó con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ en la región 5', se obtuvo el ADNc y se amplificó por PCR cargándose en un gel de poliacrilamida. Este se expuso con una película X-OMAT durante 12 horas. Las muestras amplificadas son de ARN de ejes de maíz seco (S) y ARN de ejes de maíz con 12 horas de germinación (12).

Activación Traduccional de mensajes almacenados de ejes embrionarios de maíz.

Para investigar si la poliadenilación citoplásmica puede ser responsable de la activación traduccional de algunos ARNm almacenados durante la germinación en etapas tempranas se hicieron los siguientes experimentos: El ARN_{TOTAL} de ejes secos y de 12 horas incubados con α -amanitina fue convertido a ADNc por la enzima transcriptasa reversa de MuLV en presencia de [α -³²P]dCTP y oligo d(T)₁₂₋₁₈. La base de este experimento es la siguiente: Cuando se sintetiza el ADNc marcado, el oligo d(T)₁₂₋₁₈ puede alinearse en cualquier parte de la cola de poli(A) y de cada transcrito se obtendrán diferentes tamaños de ADNc. Si los ARNm's son poliadenilados se obtendrá una mayor heterogeneidad en los tamaños de ADNc pues habrá más sitios de alineación del cebador de oligo d(T)₁₂₋₁₈. El ADNc marcado fue separado en un gel de agarosa al 1% en condiciones alcalinas (ver gel alcalino en la metodología). Este se transfirió por capilaridad a una membrana de nylon que fue expuesta a una película X-OMAT.

La autoradiografía muestra que el ADNc de la fracción polisómica es de mayor tamaño que el ADNc del seco (Figura 9), lo que implica que algunos ARNm almacenados se poliadenilaron y se reclutaron hacia polisomas.

Se utilizó una técnica diferente para confirmar lo anterior, y esto fue el determinar si mensajes almacenados de ejes secos son activados por poliadenilación citoplásmica. Para esto se realizó un ensayo de northern blot en el cuál se utilizó como sonda oligo d(T)₁₂₋₁₈ marcado en la región 5' con muestras de ARN_{TOTAL} (30 μ g) de ejes embrionarios secos y de las fracciones polisómica y no polisómica de 6 y 12 horas de germinación (solo los ejes embrionarios de 12 horas fueron incubados previamente con α -amanitina antes de obtener el ARN_{TOTAL}).

Lo que podemos observar en la figura 10 es que la poliadenilación del ARNm de la fracción polisómica aumentó en su tamaño al compararse con el ARN almacenado de ejes embrionarios secos y con el ARN de las fracciones no polisómicas.

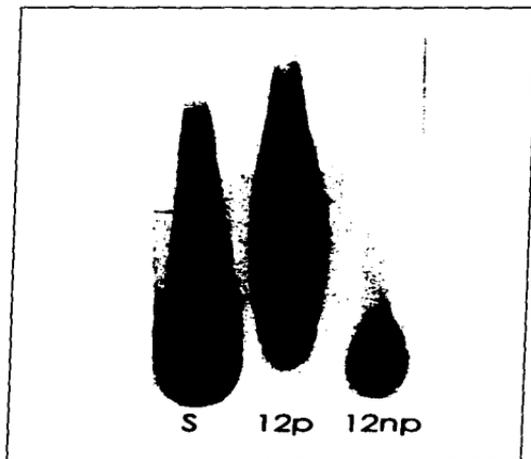


FIGURA 9. Poliadenilación del ADNc en un Gel Alcalino. El ADNc marcado con α -[32 P]dCTP obtenido a partir de ARN_{TOTAL} de ejes embrionarios de maíz se separaron en un gel de agarosa al 1% en condiciones alcalinas transfiriéndose a una membrana de nylon Hybond N* la cual fue expuesta a una película para obtener su autoradiografía. El primer carril muestra ADNc marcado de ejes embrionarios de maíz seco (S), carril central ADNc marcado de la fracción polisómica (12 p) de ejes embrionarios de 12 horas de germinación incubados en presencia de α -amanitina y el tercer carril su respectiva fracción no polisómica (12 np).

Podemos decir en base a estos resultados, que una vez más se pudo determinar que hay mensajes cuya cola de poli(A) se extiende durante el reclutamiento a polisomas y que la poliadenilación citoplásmica es un mecanismo de control traduccional presente en maíz.

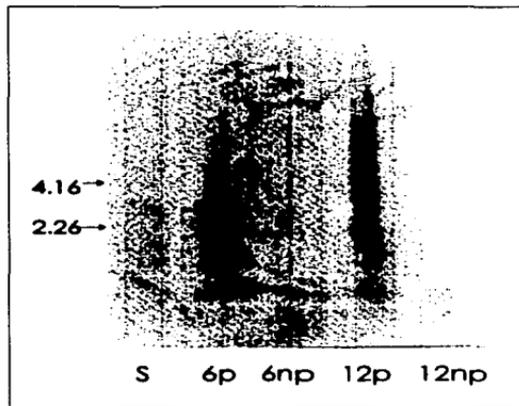


FIGURA 10. Poliadenilación del ARNm con oligo d(T)₁₂₋₁₈ marcado en la región 5'.

El ARN TOTAL (30 µg) de ejes embrionarios de maíz a diferentes horas de germinación fueron resueltos en un gel de agarosa al 1.5 % en condiciones desnaturalizantes, transferido a una membrana y esta hibridada con oligo d(T)₁₂₋₁₈ marcado en la región 5' terminal con [γ-³²P]ATP. En la figura se muestra el ARN TOTAL de ejes embrionarios de maíz de seco (D), de las fracciones polisómica de 6 (6p) y 12 horas (12p) y no polisómica (6 np y 12 np). Los ejes embrionarios de 12 horas fueron incubados previamente con α-amanitina.

En animales se ha observado (Sheets, *et. al.*, 1994) que durante el desarrollo temprano los transcritos de ciclinas se activan por la polidensificación citoplásmica. A partir de estos datos investigamos si las ciclinas en maíz son activadas por un aumento en la cola de poli(A), en específico durante el período en el que se observan las primeras divisiones celulares (Bewley and Black, 1994). Esta investigación se hizo monitoreando el reclutamiento de ARNm de ciclinas hacia polisomas durante el período de inicio de la división celular, 24 y 30 horas. Para responder a esto se hizo un análisis tipo northern blot utilizando como sonda el ADNc de ciclina S₁₃₄ de soya.

Los resultados obtenidos muestran un aumento de la longitud de cola de poli(A) de aproximadamente 0.2 Kb para los transcritos de 24 horas y 30 horas en las fracciones polisómicas. (Figura 11):

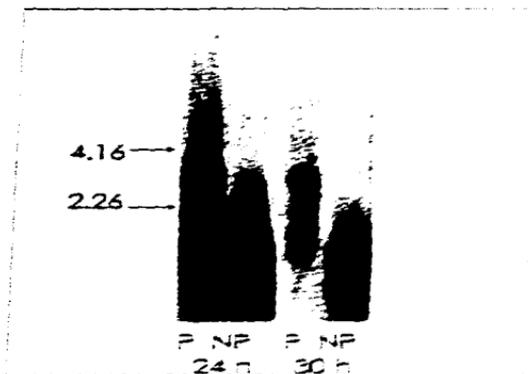


FIGURA 11. Polidensificación citoplásmica de ARNm de ciclinas. Análisis de Northern Blot de 0 a 30 ug de ARN total de tres fracciones de maíz: extractos de las fracciones celulares y no celulares de tres embriones de maíz germinados a 24 horas (24 h) y de 30 horas (30 h) utilizando como sonda el ADNc de ciclina S₁₃₄ de soya.

DISCUSIÓN

Durante las primeras horas de la germinación de maíz la síntesis de proteínas esta controlada por ARN mensajeros que son acumulados durante el desarrollo de la semilla (Bewley and Black, 1994). La traducción de estos ARN mensajeros se da a un tiempo preciso durante las primeras horas de germinación. En este trabajo tratamos de dilucidar si la poliadenilación citoplásmica es un mecanismo del control traduccional que activa algunos mensajes durante la germinación, similar a la que se presenta en células animales (Richter, 1991; Hershey, 1991; Warrington, 1993; Sheets *et. al.*, 1994).

Los estudios reportados en este trabajo muestran la presencia de una actividad de la poli(A) polimerasa en extractos de ejes embrionarios de maíz a diferentes horas de germinación (0, 12 y 24 horas). Los ejes secos mostraron la actividad mas baja de poli(A) polimerasa. Sin embargo fue suficiente para poliadenilar algunos mensajes almacenados. Además, la PAP (poli(A) polimerasa), la cual se ha reportado que es necesaria para la poliadenilación citoplásmica, fue capaz de poliadenilar transcritos de oocitos de *Xenopus*. Esto sugiere que en ejes embrionarios de maíz existe la presencia de una secuencia similar a la de animales. Esta posibilidad fue apoyada por los experimentos de 3', RACE donde se utilizo un oligonucleótido rico en uridinas como cebador. Productos amplificados fueron observados en ejes secos y de doce horas. El ARN de *Xenopus* fue utilizado como un molde control de donde obtuvimos productos de tamaño similar al reportado en *Xenopus*.

El análisis de la activación de algunos mensajes almacenados por poliadenilación citoplásmica, al estar inhibida la transcripción por la acción de la α -amanitina, muestra un aumento en la longitud de la cola de poli(A).

Este aumento está correlacionado con su movilización a los polisomas, lo que sugiere que este mecanismo (poliadenilación citoplásmica) puede ser responsable de la regulación de expresión de algunos genes durante la germinación.

Por otra parte, en animales la poliadenilación citoplásmica está controlada por dos secuencias que actúan en *cis* presentes en la región 3' no traducible del ARN mensajero, la CPE y el hexanucleótido AAUAAA (Fox *et. al.*, 1989; McGrew *et. al.*, 1989; Vassalli *et. al.*, 1989; Paris and Richter, 1990; Simon *et. al.*, 1992; Sheets *et. al.*, 1994; Stebbins-Boaz and Richter, 1994). En plantas, varios estudios indican que las señales de poli(A) involucradas en la poliadenilación nuclear son complejas y compuestas de muchos elementos *cis* distintos. Estos elementos pueden ser agrupados en tres clases: Elementos corriente arriba lejanos (Far upstream elements, FUEs), elementos corriente arriba cercanos (near upstream elements, NUEs) y sitios de corte (CS) y poliadenilación (Hunt, 1994).

Todo lo anterior lleva a pensar que la poliadenilación citoplásmica en plantas es regulada en forma compleja e involucra, en algunos casos, uno o varios elementos ricos en U y uno o mas NUEs con su respectivo CS, así como también proteínas de unión.

Sheets y colaboradores (1994) han observado que la activación tradicional de ARN mensajeros maternos de ciclinas A1, B1 y B2 en *Xenopus* ocurre por la elongación citoplásmica de su cola de poli(A). Recientemente Renaudin *et. al.* (1994) reportaron las secuencias del ADNc de cuatro ciclinas mitóticas de maíz con tamaños en el rango de 1.6 a 1.65 Kb para los dos ADNc que tenían secuencias completas codificadas. Estos tamaños concuerdan con la longitud de los transcritos identificados por nosotros cuando usamos un ADNc de ciclinas tipo B de soya (Hata *et. al.*, 1991). Estas ciclinas median la

transición G2-M en levaduras y células animales (Jacobs, 1995) aunque su papel exacto en plantas no ha sido demostrado.

En ejes embrionarios de maíz, la fase S ocurre alrededor de las 14-16 horas de la imbibición y la primera figura mitótica es observada después de las 28 horas en meristemos del mesocótilo. Sin embargo, un máximo del transcrito esta enriquecido después de las 36 horas (Baiza *et al.*, 1989). Nosotros detectamos este transcrito después de las 30 horas de imbibición en tejido meristemático con un cambio en su movilidad en la fracción polisómica (fig. 9), presumiblemente debido a la poliadenilación.

Entre los elementos que regulan post-transcripcionalmente al ARNm se encuentran la presencia de 5' metilguanósina (*cap*) en el extremo 5' de este y los factores de iniciación, las secuencias guía, el contexto del codón de iniciación, la reiniciación, uso del codón, elongación y terminación y por último la cola de poli(A) y sus equivalentes funcionales (Lenhinger, 1993). Todos estos elementos son de suma importancia tanto individual como conjuntamente, y en este trabajo solo nos enfocamos a la poliadenilación.

Gallie (1993) reporta que las secuencias 3' contenidas en las señales de poliadenilación para genes de plantas pueden ejercer una influencia considerable en la expresión. Si esto es resultado del procesamiento del pre-ARNm, o del impacto de la 3'-UTR en la estabilidad de ARNm nuclear o citoplásmico esto puede ser determinado. Sin embargo, en contraste con los genes animales en los cuales un solo sitio de poliadenilación es frecuentemente usado, múltiples sitios de poliadenilación son una característica común en los genes de plantas. La función de múltiples sitios de poliadenilación no es clara, pero la diferencia resultante en secuencias presentes en la UTR-3' puede afectar la eficiencia traduccional o la estabilidad traduccional del ARNm.

Virtualmente todos los ARNm de plantas son poliadenilados. En algunos casos, la cola de poli(A) incrementa la estabilidad del mensaje, así en otros ejemplos, esto funciona como un regulador en la eficiencia traduccional

(Roothnie, 1996). Para al menos algunos organismos, incluyendo varias especies de plantas, ambas funciones son observadas. La longitud de la cola de poli(A) determina el grado de estabilidad para la expresión del mensaje. Esta capacidad de la cola de poli(A) como un regulador de la estabilidad del mensaje, funciona independientemente de cap. Sin embargo, como un regulador de la eficiencia traduccional, la cola de poli(A) funciona solo cuando el transcrito presenta cap. Por otra parte, la actividad de cap durante la iniciación depende de la cola de poli(A). Aunque cap puede incrementar la eficiencia traduccional de ARNm con poli(A)⁻, su función es incrementada por arriba en una orden de magnitud cuando la cola de poli(A) está presente. Este sinergismo sugiere que cap y la cola de poli(A) en conjunción con sus proteínas asociadas están en comunicación durante la iniciación de la traducción. La comunicación entre la terminación puede ser directa, aunque el contacto de proteína-proteína entre eIF-4F y la proteína de unión a poli(A) (PAB) o todo en conjunto puede involucrar algún otro factor como mediador (Gallie, 1991).

En conjunto este trabajo podría puntualizar que nuestro sistema puede presentar más de un elemento de poliadenilación que podría estar trabajando en conjunto con cap ya que los genes estudiados para plantas presentan más de un elemento de poliadenilación nuclear, aunque esto no es necesariamente real, pero por lo menos un elemento de poliadenilación esta presente en semillas de maíz. Por otra parte en nuestro trabajo pudimos esclarecer que existe una proteína que está involucrada en la poliadenilación citoplásmica de algunos transcritos responsable de la poliadenilación, aunque no sabemos con exactitud que transcritos son y eso se esta investigando, así como si los mensajes que se poliadenilaron tienen cierta estabilidad ya que no fueron degradados.

Queda claro lo complejo de los mecanismos regulatorios posttranscripcionales en plantas y es importante entenderlos para aquellos genes en los cuales la regulación posttranscripcional es componente importante en el control total de la expresión de genes.

CONCLUSIÓN

De lo reportado en este trabajo podemos concluir tres puntos mencionados a continuación, aclarando que falta por seguir y terminar con los enfoques que surgieron en base a esta investigación, los cuales no están reportados en el presente trabajo.

1. Podemos decir que existe una actividad de poli(A) polimerasa citoplasmica con ciertas características similares a la de núcleo, presente en ejes embrionarios de maíz en las primeras etapas de la germinación.
2. Que que puede existir una región consenso (CPE) en el ARNm de ejes embrionarios de maíz, la cual puede regular la elongación de la cola de poli(A) en los mismos.
3. Existen ciertos mensajes en el ciclo celular de maíz, ciclinas, durante la germinación temprana, los cuales aumentan su cola de poli(A) para ser reclutados a polisomas, sugiriendonos que la poliadenilación citoplasmica puede ser un mecanismo de control traduccional presente en la germinación de maíz.

Por último, cabe mencionar que el proyecto en general no termina con el presente trabajo, por el contrario, se puede continuar con el mismo para confirmar la presencia de una secuencia consenso (CPE) en transcritos de maíz, pero esta parte del proyecto es a futuro.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ausbel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. (1992). *Short Protocols in molecular biology*. Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons. N. Y.
2. Balza, A., Vázquez-Ramos, J. M. and Sánchez de Jiménez, E. (1989). DNA Synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *J. Plant Physiol.* 135: 416-421.
3. Ballantyne, S., Bilger, A., Astrom, J., Virtanen, A. and Wickens, M. (1995). Poly(A) polymerases in the nucleus and cytoplasm of frog oocytes: dynamic changes during oocyte maturation and early development. *RNA*. 1: 64-78.
4. Beltrán-Peña, E., Ortiz-López, A. and Sánchez de Jiménez, E. (1995). Synthesis of ribosomal proteins from stored mRNAs early in seed germination. *Plant Mol. Biol.* 28: 327-336.
5. Bewley, J. D. and Black, M. (1994). *Seeds Physiology of development and germination*. Plenum Press. N. Y. 376 pp.
6. Bidwel, R. G. S. (1990). *Fisiología Vegetal*. AGT Editor. México. 784 pp.
7. Bilger, A., Fox, C. A., Wahle, E. and Wickens, M. (1994). Nuclear polyadenylation factors recognize cytoplasmic polyadenylation elements. *Genes & Devel.* 8: 1106-1116.
8. Doerner, P. W. (1994). Cell cycle regulation in plants. *Plant Physiol.* 106: 823-827.

9. Farel, R. E. Jr. (1993). *RNA methodologies: a laboratory guide for isolation and characterization*. Academic Press. San Diego. 317 pp.
10. Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1984). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Addendum Anal. Biochem.* 137: 266-267.
11. Feng, P., Ohlsson, M. and Ny, T. (1990). The structure of the TATA less rat tissue-type plasminogen activator gene. Species-specific sequence divergence in the promoter predict differences in regulation of gene expression. *J. Biol. Chem.* 265: 2022-2027.
12. Fox, C. A., Sheets, M. D. and Wickens, M. P. (1989). Poly(A) addition during maturation of frog oocytes: distinct nuclear and cytoplasmic activities and regulation by the sequence UUUUUU. *Genes & Devel.* 3: 2151-2162.
13. Fox, A. C., Sheets, M. D., Wahle, E. and Wickens, M. (1992). Polyadenylation of maternal mRNA during oocyte maturation: poly(A) addition *in vitro* requires a regulated RNA binding activity and a poly(A) polymerase. *EMBO J.* 11 (13): 5021-5032.
14. Gallie, D. R. (1991). The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes & Devel.* 5: 2108-2116.
15. Gallie, D. R. (1993). Posttranscriptional regulation of gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 77-104
16. Hake, E. and Richter, J. D. (1994). CPEB is a specific factor that mediates cytoplasmic polyadenylation during *Xenopus* oocyte maturation. *Cell.* 79: 617-627.
17. Hata, S., Kouchi, H., Suzuka, I. and Ishii, T. (1991). Isolation and characterization of cDNA clones for plant cyclins. *EMBO J.* 10 (9): 2681-2688.
18. Hershey, J. W. B. (1991). Translational control in mammalian cells. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 717-755.

19. Huarte, J., Stutz, A., O'Connell, M. L., Gubler, P., Belin, D., Darrow, A. L., Strickland, S. and Vassalli, J-D. (1992). Transient translational silencing by reversible mRNA deadenylation. *Cell*. 69: 1021-1030.
20. Hunt, A. G. (1994). Messenger RNA 3' end formation in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 47-60.
21. Jackson, R. J. and Standart, N. (1990). Do the poly(A) tail and 3' untranslated region control mRNA translation?. *Cell*. 62: 15-24.
22. Jacobs, T. W. (1995). Cell cycle control. *Ann Rev Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46: 317-339.
23. Lehninger, A. L., Nelson, L. D. and Cox, M. M. (1993). *Principles of Biochemistry*. Second edition. Worth Publishers. 1013 pp.
24. Li, Q. and Hunt, A. R. (1995). A near-upstream element in a plant polyadenylation signal consists of more than six nucleotides. *Plant Mol. Biol.* 28: 927-934.
25. McGrew, L. L., Dworkin-Rastl, E., Dworkin, M. B. and Richter, J. D. (1989). Poly(A) elongation during *Xenopus* oocyte maturation is required for translational recruitment and is mediated by a short sequence element. *Genes & Devel.* 3: 803-815.
26. Mohr, H. and Schopfer, P. (1995). *Plant Physiology*. Ed. Springer, Alemania. 629 pp.
27. Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*. 15: 473-479.
28. Paris, J. and Richter, J. D. (1990). Maturation-specific polyadenylation and translational control: diversity of cytoplasmic polyadenylation elements, influence of poly(A) tail size, and formation of stable polyadenylation complexes. *Mol. Cell Biol.* 10: 5634-5645.

-
29. Renaudin, J.-P., Colasanti, J., Rime, H., Yuan, Z. and Sundaresan, V. (1994). Cloning of four cyclins from maize indicates that higher plants have three structurally distinct groups of mitotic cyclins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7375-7379.
30. Reyes, C. P. (1990). *El maíz y su cultivo*. AGT editor. México. 460 pp.
31. Richter, J. D. (1991). Translational control during early development. *BioEssays* 13 (4): 179-183.
32. Rothnie, H. M., (1996). Plant mRNA 3'-end formation. *Plant Mol. Biol.* 32: 43-61.
33. Sallés, F. J., Darrow, A. L., O'Connell, M. L., Strickland, S. (1992). Isolation of novel murine maternal mRNAs regulated by cytoplasmic polyadenylation. *Genes & Dev.* 6: 1202-1212.
34. Sallés, F. J., Lieberfarb, M. E., Wreden, C., Gergen, J. P. and Strickland, S. (1994). Coordinate initiation of *Drosophila* Development by regulated polyadenylation of maternal messenger RNAs. *Science*. 266: 1996-1999.
35. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. N. Y. 456 pp.
36. Sánchez de Jiménez, E., Beltrán-Peña, E. and Ortiz-López, A. (1996). Translation of ribosomal protein mRNAs in maize axes. *Seed Science*. En prensa.
37. Schuler, M. and Zielinski, R. E. (1988). *Methods in plant Molecular biology*. Academic Press. San Diego. E. U. 171 pp.
38. Sheets, M.D., Fox, C.A., Hunt, T., Woude, G. V. and Wickens, M. (1994). The 3'-untranslated regions of c-mos and cyclin mRNAs stimulate translation by regulating cytoplasmic polyadenylation. *Genes & Devel.* 8: 926-938.
-

-
39. Simon, R., Tassan, J. P. and Richter, J. D. (1992). Translational control by poly(A) elongation during *Xenopus* development: differential repression and enhancement by a novel cytoplasmic polyadenylation element. *Genes & Devel.* 6: 2580-2591.
 40. Stebbins-Boaz B. and Richter, J. D. (1994). Multiple sequence elements and a maternal mRNA product control cdk2 RNA polyadenylation and translation during early *Xenopus* development. *Mol. Cell Biol.* 14: 5870-5880.
 41. Staëckle, M. Y. and Guan, L. (1993). Improved resolution and sensitivity of northern blots using polyacrylamide-urea gels. *Biotechniques* 15 (2): 227-231 .
 42. Vassalli, J. D., Huarte, J., Belin, D., Gubler, P., Vassalli, A., O'Connell, M. L., Parton, L. A., Rickles, R. J. and Strickland, S. (1989). Regulated polyadenylation controls mRNA translation during meiotic maturation of mouse oocytes. *Genes & Devel.* 3: 2163-2171.
 43. Voorma, H. O., Thomas, A. A. M. and Van Heugten, H. A. A. (1994). Initiation of protein synthesis in eukaryotes. *Mol. Biol. Rep.* 19:139-145.
 44. Wahle, E. and Keller, W. (1992). The biochemistry of 3'-end cleavage and polyadenylation of messenger RNA precursors. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 419-440.
 45. Watson S. A. and Ramstad P. E. (1987). *Comm. Chemistry and Technology*. AACC Monograph series. Minnesota, E. U. 605 pp.
 46. Warrington, M. (1993). Poly(A) and translation: development control. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5: 950-954.
-