



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MÉXICO

00551  
UNAM  
POSGRADO  
19

DIRECCIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO  
FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

CARACTERIZACIÓN Y EXPRESIÓN  
DEL GEN DE LA PROTEÍNA DE  
REPLICACIÓN A-1 DE MAÍZ

295497

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO  
DE:

MAESTRA EN CIENCIAS  
(BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:

FABIOLA JAIMES MIRANDA

MÉXICO, D.F.

2001





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.

JURADO:

PRESIDENTE	Dr. Federico Sánchez Rodríguez
VOCAL	Dr. Ruy Pérez Monfort
SECRETARIO	Dr. Eleazar Martínez Barajas
SUPLENTE	Dra. María Imelda López Villaseñor
SUPLENTE	Dr. Félix Recillas Targa

Este trabajo se realizó en el laboratorio 101 del departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Javier Plasencia de la Parra.

El trabajo fue financiado por el proyecto CONACyT 3407P-N con apoyo parcial del convenio CSIC-CONACyT para el bienio 1999-2000

Fabiola Jaimes Miranda recibió beca para sus estudios de Maestría por parte de CONACyT por el periodo 1999-2001. No de beca 138471

## Índice

	Pág.
Resumen	1
Introducción	
1.1 Biosíntesis de macromoléculas durante la germinación de semillas	2
1.2 Función de las fitohormonas en la germinación de semillas	4
1.3 Replicación del DNA en eucariotes	8
1.4 Reparación del DNA	14
1.4.1 Reparación por escisión de bases	14
1.4.2 Reparación por escisión de nucleótidos	15
1.5 Proteínas de la replicación del DNA en plantas	17
1.5.1 El PCNA en plantas	19
1.5.2 DNA polimerasas alfa y delta	20
1.6 La proteína de replicación A (RPA)	22
1.6.1 Estructura y función de la RPA-1	25
...1.6.2 Estructura y función de la RPA-2	29
...1.6.3 Estructura y función de la RPA-3	30
...1.6.4 La RPA en otras especies	30
...1.6.5 La RPA en plantas	31
Antecedentes	33
Objetivos	36
Hipótesis	36

## Materiales y métodos

2.1 Obtención de la secuencia de cDNA de la RPA-1 de maíz	37
2.1.1 Extracción y purificación de la sonda	37
2.1.1.1 Extracción de la sonda	37
2.1.1.2 Purificación	38
2.1.2 Marcaje de la sonda	39
2.1.3 Sondeo de un banco de cDNA de maíz	39
2.1.3.1 Titulación del banco de cDNA	40
2.1.3.2 Escrutinio del banco de cDNA	40
2.1.3.3 Hibridación	41
2.1.4 Escrutinio por PCR de las colonias positivas	42
2.1.5 Obtención de la clona de cDNA PR413a	43
2.1.5.1 Células competentes	43
2.1.5.2 Transformación	44
2.1.6 Obtención de la clona de cDNA PR413A	44
2.1.6.1 Amplificación por PCR	44
2.1.6.2. Subclonación en el vector pGEM-T Easy	45
2.1.7 Secuenciación de DNA	45
2.1.8 Análisis de secuencia	45
2.2 Determinación del número de genes de RPA-1	48
2.2.1 Extracción de DNA genómico	48
2.2.2 Calidad y cuantificación del DNA	49
2.2.3 Digestión del DNA genómico con enzimas de restricción	49
2.2.4 Southern blot	49

2.2.4.1	Transferencia por capilaridad	50
2.2.4.2	Hibridación	50
2.3	Ensayos de expresión	51
2.3.1	Tratamiento con giberelina	51
2.3.2	Extracción de RNA de ejes embrionarios de maíz.	51
2.3.3	Northern blot	52
2.3.3.1	Transferencia por capilaridad	53
2.3.3.2	Hibridación	53
Resultados		
3.1	Aislamiento de una clona de cDNA de la RPA-1 a partir de un banco de cDNA de maíz	55
3.1.1	Clonación del inserto de DNA en el plásmido pKS Bluescript	59
3.2	Clonación del extremo 5' del cDNA de la RPA-1 de maíz	63
3.3	Determinación el número de genes de la RPA-1 de maíz	71
3.4	Expresión del gen de la RPA-1 de maíz	73
3.4.1	Expresión durante la germinación y efectos de fitohormonas	73
3.4.2	Expresión en distintos tejidos de la planta de maíz	76
Discusión		
4.1	Aislamiento del cDNA de la zmRPA-1	78
4.2	Análisis de los dominios de la zmRPA-1	78
4.3	Número de genes de la zmRPA-1	81
4.4	Expresión de la zmRPA-1	83
4.5	Perspectivas	85

## Índice de Figuras y Tablas

	Pág.
Fig. I1 Estructura química de las fitohormonas	8
Fig. I2 Mecanismos de maduración de los fragmentos de Okazaki	12
Fig. I3 Síntesis semidiscontinua del DNA	14
Fig. I4 Esquema general del sistema de reparación por escisión de nucleótidos	17
Fig. I5 Esquema de la proteína de replicación A	22
Fig. I6 La proteína de replicación A-1	26
Fig. A1A Obtención de una sonda de DNA	34
Fig. A1B Clonación del fragmento de PCR	34
Fig. A1C Secuencia del fragmento de DNA de 301 pb (RPA12)	35
Fig. MM1 Mapa del vector lambda gt11	39
Fig. MM2 Estrategia para la clonación del cDNA de RPA-1 de maíz	46
Fig. R1 Identificación de placas de lisis positivas	55
Fig. R2 Gel de agarosa cargado con los productos de PCR	56
Fig. R3 Southern blot	57
Fig. R4 Producto de PCR con oligonucleótidos rpa1 y rpa2	58
Fig. R5 Amplificación del inserto de cDNA de la clona 4.1.13	59
Fig. R6 Clonación en pKS Bluescript de los fragmentos de DNA	60
Fig. R7 Secuencia del fragmento de 1203 pb	61
Fig. R8 Secuencia de la clona de cDNA EST (683019G07.x1) de maíz	63

Fig. R9 RT-PCR de diferentes tejidos de maíz:	64
Fig. R10 Amplificación de un fragmento de aprox. 1500 pb	64
Fig. R11A. Autorradiografía de Southern blot de las clonas obtenidas	65
Fig. R11B. Análisis de la clona PR25	66
Fig. R12 Secuencia de 2258 pb	67
Fig. R13 Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de RPA-1 de maíz y de arroz traducidas	69
Fig. R14 Alineamiento múltiple entre las secuencias de RPA-1	71
Fig. R15 Electroforesis de DNA genómico digerido	71
Fig. R16 Autorradiografía de Southern blot	73
Fig. R17. Gel de agarosa con RNA de diferentes tiempos de germinación	74
Fig. R18. Expresión del gen RPA-1 de maíz durante la germinación de ejes embrionarios de maíz en presencia y ausencia de ácido giberélico	75
Fig. R19. Gel de agarosa con RNA de diferentes tiempos de germinación.	75
Fig. R20 Autorradiografía de Northern blot	76
Fig. R21. Gel de agarosa con RNA extraído de diferentes tejidos:	76
Fig. R22. Autorradiografía de Northern blot.	77
Fig. D1 Alineamiento de la región 3' UTR los cinco EST y de zmRPA-1	83
Tabla I1 Comparaciones entre las secuencias de aminoácidos de las tres subunidades de ortólogos de la RPA	31
Tabla D1 Posición de los aminoácidos que se han identificado en RPA-1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	81



## Lista de abreviaturas

ABA	Acido abscísico
AG	Acido giberélico
AP	Apurínico o apirimídico
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
BA	Benciladenina
BER	Reparación por escisión de bases.
cDNA	DNA complementario
DMSO	Dimetilsulfóxido
EST	Expresion sequence tags
X Gal	5-bromo 5 -cloro-3 indolil- $\beta$ -D-tiogalactósido
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutámico
Gly	Glicina
IPTG	Isopropil $\beta$ -D-tiogalactósido
Lys	Lisina
MCM	Proteínas de mantenimiento del cromosoma
NER	Reparación por escisión de nucleótidos
pb	Pares de bases
pfus	Unidades formadoras de placa de lisis
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular

Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
RFC	Factor de replicación C
RT	Transcriptasa Reversa
Ser	Serina
ORC	Complejo de reconocimiento de origen
RPA	Proteína de replicación A
RT-PCR	Transcriptasa reversa- reacción en cadena de la polimerasa
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
XPA	Xenoderma pigmentosa A
XPB	Xenoderma pigmentosa B
XPC	Xenoderma pigmentosa C
XPD	Xenoderma pigmentosa D
XPE	Xenoderma pigmentosa E
XPF	Xenoderma pigmentosa F
XPG	Xenoderma pigmentosa G

## Resumen

La proteína de replicación A (RPA) es un complejo estable de tres subunidades de 70, 34 y 14 kDa que tiene una alta afinidad por DNA de cadena sencilla. RPA estimula a la DNA polimerasa  $\alpha$ /primasa durante la replicación del DNA, y es una proteína indispensable para este proceso. Además se ha reportado que está involucrada en los procesos de reparación y recombinación del DNA. En plantas hay poca información sobre el proceso de replicación del DNA y cómo está regulado, por lo que el estudio de los genes y sus proteínas durante el desarrollo vegetal aportaría información sobre su función; para esto nos hemos concentrado en la subunidad de 70 kDa (RPA-1) en maíz. Se obtuvo una secuencia reportada para RPA de maíz de un banco de datos, la cual sirvió para diseñar un par de oligonucleótidos con los cuales, a partir de DNA genómico de maíz, se obtuvo una sonda por PCR que se empleó para el escrutinio de una biblioteca de cDNA proveniente de RNA de raíz y tallo de maíz, con lo cual se obtuvo la secuencia de 2258 pares de bases (pb). El análisis de la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos definió que correspondía a RPA-1 de maíz. En ésta secuencia se identificó la señal de poliadenilación y la región 3' no traducible. La secuencia traducida en marco de lectura (ORF) fue de 630 aminoácidos donde se identificó el dominio de dedo de zinc, el dominio de unión principal a DNA y el inicio de la traducción. Se realizaron experimentos para determinar el número de copias del gen y se observó el patrón de expresión de esta proteína a diferentes tiempos de imbibición en presencia de ácido giberélico y citocininas (benciladenina). Además se observó su expresión en tejidos diferenciados de maíz encontrándose una mayor expresión en tejidos proliferativos.

## Introducción

Antes de que una célula eucariótica se divida, debe duplicar su masa y sus macromoléculas para dividir los componentes entre las dos células resultantes. Mientras que la transcripción y traducción de los genes que codifican para muchas proteínas ocurre en forma continua, la duplicación del genoma ocurre durante un periodo específico de síntesis de DNA. Esta fase S del ciclo celular se caracteriza por la presencia y actividad de distintas enzimas y proteínas que participan en ella y es precedida por la fase G1 en la cual hay un control muy estricto de la síntesis de RNAs y proteínas necesarias para la preparación e inicio de la fase S. A continuación se hará una descripción de los principales eventos moleculares que ocurren durante la germinación de semillas con énfasis particular sobre el metabolismo del DNA. Enseguida, se presentará una revisión de las proteínas involucradas en la replicación y reparación del DNA en eucariotes y su comparación con lo que se conoce en células de plantas. Finalmente se presenta una revisión de la estructura y función de la proteína de replicación A (RPA).

### 1.1. Biosíntesis de Macromoléculas Durante la Germinación de Semillas

La respiración de semillas maduras con un contenido de humedad del 10 al 15% es extremadamente baja en comparación con las semillas en desarrollo. Sin embargo, en el momento que hay penetración de agua se observa un aumento en el consumo de  $O_2$ , el cual se ha atribuido en parte a la hidratación y activación de las enzimas mitocondriales que están involucradas en el ciclo del ácido cítrico y en la cadena transportadora de electrones. Asimismo la concentración de ATP en la semilla seca es muy baja, prácticamente de cero, pero con la entrada de agua se

incrementa rápidamente y en semillas de lechuga a los 15 minutos de imbibición la concentración es de  $5 \times 10^{-2}$  nmol/g de semilla (Bewley, 1985). A continuación hay una etapa en la que el consumo de  $O_2$  aumenta muy poco, la semilla se hidrata completamente y todas las enzimas preexistentes están activadas. Quizá durante esta etapa se activa la ruta glucolítica y hay un incremento en la cantidad de ATP. Al final de esta etapa emerge la radícula y se puede decir que la germinación se ha completado (Bewley, 1985).

En este momento hay un segundo incremento en la cantidad de  $O_2$  atribuido a que la actividad mitocondrial aumenta por la síntesis de proteínas involucradas en la respiración. Este proceso traduccional es esencial para que la germinación se complete y es independiente de la síntesis de los primeros RNAs, ya que en las semillas se encuentran algunos RNAs almacenados. Posteriormente inicia la síntesis de RNA y la síntesis de DNA ocurre hasta las etapas tardías de la germinación (Bewley, 1985).

Durante la formación de la semilla hay una considerable síntesis de proteínas pero esta cesa en el momento de la desecación y maduración. En las semillas secas no se han encontrado polisomas, pero estos se forman rápidamente con la entrada de agua a la semilla para que comience la síntesis de proteínas. En la semilla seca se encuentran ribosomas, RNAs de transferencia, factores de elongación y de iniciación, aminoácidos y aminoacil-tRNA-sintetasas. Además, todos estos componentes se encuentran en cantidad suficiente para comenzar la síntesis de proteínas tan pronto como la semilla se hidrate (Bewley, 1985).

Existe una conservación de RNAs mensajeros (RNAm) que se ensamblan durante el desarrollo de la semilla y que codificarán proteínas necesarias para procesos celulares indispensables y para la germinación como tal. La síntesis de

proteínas que se presenta en etapas posteriores a la germinación es casi totalmente dependiente de la síntesis de nuevos RNA mensajeros (Sánchez de Jiménez y Aguilar, 1984).

La síntesis temprana de DNA que ocurre al imbibir las semillas es de tipo reparativa y organelar. En ejes embrionarios de maíz la síntesis replicativa de DNA comienza entre las 15 y 20 horas de germinación y se encuentra un máximo a las 40 horas (Baiza *et al*, 1989). Se ha caracterizado la actividad de DNA polimerasa en extractos protéicos preparados de ejes embrionarios de semillas secas; estos extractos contienen por lo menos 3 diferentes actividades de DNA polimerasas que fueron llamadas 1, 2 y 3 (Coello *et al*, 1992). Las DNA polimerasas 1 y 2 se han caracterizado como tipo  $\delta$  y  $\alpha$  respectivamente y son del tipo replicativas, mientras que la polimerasa 3 es de tipo reparativa (García *et al*, 1997).

## 1.2 Función de las Fitohormonas en la germinación de semillas

La fitohormona ácido abscísico (ABA) (Fig. I1), tiene un papel fundamental en la maduración del embrión. Esta hormona previene la germinación precoz e induce la transcripción de genes que han sido asociados a la tolerancia de la desecación y a la acumulación de reservas. Su función quedó claramente demostrada en mutantes de maíz que son deficientes en ABA, pues presentan el fenotipo vivíparo, es decir la germinación ocurre en la mazorca (Neill *et al*, 1986). La tolerancia a la desecación y la capacidad que tiene la semilla de ser almacenada por largos periodos de tiempo están asociados al ABA (Bewley, 1997).

Una hormona con actividad antagónica a ABA es el ácido giberelico (AG) (Fig.I1) o giberelina que tiene un papel inductor en la germinación precoz. En trigo y en cebada se ha visto que induce la movilización de reservas del endospermo

(Jacobsen, 1995). Aunque en maíz no se ha demostrado un claro requerimiento de giberelina en la germinación de semillas maduras, se ha observado que cuando la concentración de ABA alcanza un máximo la concentración de AG disminuye (White *et al*, 2000). Mientras que el AG induce la transcripción de genes como la  $\alpha$ -amilasa y otras enzimas hidrolíticas requeridas para la utilización de reservas durante la germinación estos mismos genes son suprimidos por ABA (Jacobsen *et al*, 1995).

El AG induce un aumento en la cantidad y actividad de  $\beta$ -1,4-endoxilanasas,  $\beta$ -xilano piranosidasas y  $\alpha$ -arabinofuranosidasas que son enzimas que hidrolizan la pared del endospermo. También la dextrinasa y la  $\beta$ -1,3 glucosidasa, son sintetizadas *de novo* en respuesta a giberelina (Bradford *et al*, 2000).

En semillas de tomate, se ha encontrado que la actividad de la endo  $\beta$  manasa, la manosidasa y la galactosidasa aumentan en respuesta a AG. En semillas de tomate deficientes en AG, la actividad de la endo  $\beta$  manasa incrementa mayoritariamente justo antes de la emergencia de la radícula al agregar AG exógeno (Groot *et al*, 1988).

Hay un incremento en las celulasas de semillas de tomate antes de la emergencia de la radícula en particular de la  $\beta$ -1,4-endoglucanasa. La actividad de la  $\beta$ -1,4-endoglucanasa se incrementa en presencia de AG (Bradford *et al*, 2000)

También se ha detectado la expresión de poligalacturonasas en el endospermo de semillas de tomate y esta actividad se incrementa después de la entrada de agua a la semilla (Sitrit *et al*, 1999). Las poligalacturonasas se han identificado en el desensamblaje de la pared celular además de estar presentes en la maduración de frutos (Hadfield and Bennet, 1998).

Se aisló el DNA complementario (cDNA) de una putativa arabinosidasa a partir de semillas de tomate tratadas con GA por un ensayo de expresión diferencial

(Dahal *et al*, 1997). El RNA correspondiente se expresa en el endospermo en respuesta a GA pero no en el embrión (Bradford *et al*, 2000).

Los xiloglucanos son quizá el principal componente hemicelulósico en la pared celular de las dicotiledoneas y la xiloglucan endotransglucosilasa probablemente tenga relación con la germinación. Se han asociado al ablandamiento de tejidos y al desensamblaje de la pared por observarse durante la maduración de frutos (Maclachlan and Brady, 1994). Aún no es claro si su función es en la hidrólisis del endospermo o el crecimiento del embrión (Bradford *et al*, 2000).

La  $\beta$ -1,3 glucanasa y la quitinasa son proteínas relacionadas a la patogenésis, ya que sus respectivos genes se expresan en respuesta a infección por patógenos y al daño mecánico de la planta (González-Carranza *et al*, 1998). También se expresan durante el desarrollo y se han encontrado en el endospermo de las semillas de tabaco en germinación (Vögeli-Lange *et al*, 1994) así como en semillas de tomate justo antes de la salida de la radícula (Wu *et al*, 1998). El AG exógeno induce la expresión de estos genes en semillas de tomate deficientes en la biosíntesis de esta hormona (Bradford *et al*, 2000). Se ha postulado que durante la hidrólisis de la pared celular, estas enzimas se requieran como un mecanismo de defensa durante la emergencia de la radícula o su función sea participar en la hidrólisis de pared celular (Bradford *et al*, 2000).

En semillas de *Arabidopsis thaliana* se ha identificado un gen que codifica una expansina que tiene su actividad en el endospermo, lo que sugiere su participación en el proceso de separación de célula involucrado en la penetración de raíces a través de otros tejidos (Bradford *et al*, 2000). En semilla de tomate se encontró que este mismo gen es inducido por AG en el endospermo justo antes de la emergencia de la radícula (Chen and Bradford, 1998).



Un gen que quizá participa en la adaptación a la desecación es el que codifica la galactinol sintasa. Esta enzima cataliza la formación de galactiol de UDP-galactosa y myo-inositol. El galactiol es usado como el donador de galactosa para la formación de rafinosa (Liu *et al*, 1995). En presencia de AG la cantidad de este transcrito disminuye notablemente, pero aun no es claro si la expresión de esta enzima es necesaria para la adaptación al estrés y tolerancia a la desecación (Bradford *et al*, 2000).

En semillas de tomate se han identificado una serie de transcritos llamados GAST1 que son inducidos por AG (Shi *et al*, 1992). Estos RNAm son poco abundantes durante el desarrollo de la semilla pero se incrementan en forma considerable durante la imbibición. De la familia de estos genes GAS se han identificado dos en *Arabidopsis thaliana* que solamente se expresan en semillas (Herzog *et al*, 1995). La función de las proteínas de bajo peso molecular (11kDa) que codifican estos genes se desconoce, pero es muy probable que formen parte de un sistema de señalización durante la germinación inducida por AG y ABA (Bradford *et al*, 2000). Otras hormonas que juegan un papel importante en el control de la germinación son las citocininas (Fig I-1). Estas en presencia de auxinas promueven la división celular, además de aumentar la síntesis de RNAm en semillas durante la germinación.

En experimentos con benciladenina (BA), que es una citocinina sintética, se ha observado un incremento del 50% en la síntesis total de DNA además de ocurrir un incremento en la síntesis reparativa de DNA en ejes embrionarios de maíz (Reyes, 1991). La BA adelanta el inicio de la replicación de tal manera que un evento que ocurre normalmente a las 15 horas después de la entrada de agua, se presenta desde las 6 horas de germinación en presencia de BA a una concentración

de  $10^{-6}$  M (Reyes *et al*, 1991). Se ha observado que la actividad de la DNA polimerasa (DNA polimerasa tipo  $\delta$ ) de maíz en presencia de BA, a una concentración de  $1 \times 10^{-4}$  M, es 2.9 veces mayor a las 6 horas de germinación y 1.5 veces mayor a las 20 horas y para la DNA polimerasa 2 (DNA polimerasa tipo  $\alpha$ ) es 4.8 veces más alta a las 6 horas de germinación y 2.9 veces a las 20 horas en relación a un control (Vázquez-Ramos and Reyes, 1990).

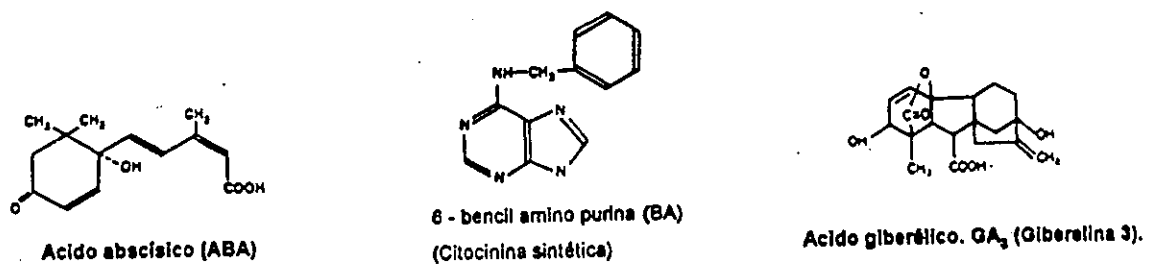


Fig. I1 Estructura química de tres fitohormonas involucradas en el control de la germinación de semillas.

### 1.3 Replicación del DNA en Eucariotes.

La replicación *in vitro* del DNA de Simian virus 40 (SV40) ha servido como modelo para estudiar las funciones de las diferentes enzimas y proteínas involucradas en la replicación. SV40 (Simian virus 40) es un papovavirus con un genoma de 5000 pb. El tamaño del genoma ha hecho posible el mapeo de sus genes y conocer la secuencia completa. Para que ocurra la replicación del DNA viral se unen al origen de replicación dos proteínas virales llamadas antígenos T: (Tumor) una de bajo peso molecular t (17 kDa) y la otra, T, de 82 kDa. El antígeno T es requerido para el inicio de la replicación y para la regulación de la transcripción ya que se unen en lugares específicos en el DNA disociando la doble cadena en el origen (Kornberg, 1991). El antígeno T reconoce y se une a una secuencia rica en A

y T en el DNA, la activación de esta proteína depende del factor de replicación C (RFC). Posteriormente se recluta la proteína de replicación A (RPA), después se une la DNA polimerasa  $\alpha$ , esta genera un cebador y se integra el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) y la DNA polimerasa  $\delta$ , la topoisomerasa I o II y la DNA ligasa. La replicación de SV40 es semidiscontinua, bidireccional y es a la misma velocidad la síntesis de ambas cadenas. Se ha demostrado que lleva 8 minutos encontrar y abrir el origen de replicación (Toshiki *et al*, 1990).

La replicación del DNA comienza en sitios específicos de la molécula llamados orígenes de replicación, que permiten que genomas de gran tamaño sean replicados. Como primer paso en este proceso está el reconocimiento de estos orígenes y la apertura de la doble hélice del DNA por proteínas con actividad de DNA helicasas para permitir en primer lugar la síntesis del cebador. El inicio de la replicación en estos orígenes está altamente regulado por proteínas que se aseguran que cada secuencia de DNA se duplique solamente una vez por cada división celular (Melvin, 1999).

Cada sitio de inicio de la replicación es reconocido por un complejo de seis polipéptidos (Beel and Stillman, 1992) llamado complejo de reconocimiento del origen (ORC), posteriormente son reclutadas la proteína Cdc 6, las siete proteínas de mantenimiento del cromosoma (MCM 2-7) de las cuales las MCM 4, 6 y 7 tienen actividad de helicasa 3'-5' (Ishimi, 1997). La presencia de estas proteínas MCM en el origen de replicación es esencial para la unión subsecuente de la proteína de replicación A (RPA) y de cuya asociación dependerá que el complejo MCM sea funcional (Tanaka, 1998). RPA es un heterotrímero de 111 kDa que además de

estabilizar al DNA de cadena sencilla que se generó por la acción de las helicasa, estimula la actividad de la DNA primasa cuyas dos subunidades están unidas a la DNA polimerasa  $\alpha$  (Wobbe *et al*, 1987; Fairman and Stillman, 1988; Wold and Kelly 1988). Se ha demostrado la interacción directa de la DNA polimerasa  $\alpha$  con RPA y que el reclutamiento de esta polimerasa depende de la funcionalidad de RPA, además el tiempo de reclutamiento de la maquinaria de replicación en orígenes tempranos y tardíos está marcado por el tiempo en que RPA se une a estos (Tanaka y Nasmyth, 1998).

La DNA polimerasa  $\alpha$  es una fosfoproteína heterotetramérica conformada por una subunidad A (180 kDa ) que tiene la actividad catalítica de polimerasa, una actividad de primasa que reside en la subunidad D (48 kDa ) que está fuertemente asociada a la subunidad C (58 kDa ). Por último está la subunidad B de 70 kDa a la que no se le ha demostrado ninguna función catalítica, pero que sí es necesaria para el reclutamiento de la polimerasa  $\alpha$  primasa a la horquilla de replicación (Melvin, 1999). La función de la DNA primasa es sintetizar un oligoribonucleótido de 10 bases para que la DNA polimerasa lo elongue hasta 40 bases (Waga y Stillman, 1998) por la acción de la subunidad A. Este cebador de RNA-DNA se elimina posteriormente, pero es fundamental para el inicio de la replicación.

La importancia de la DNA polimerasa  $\alpha$  se ha determinado con diferentes estrategias experimentales en células mutantes de ratón temperatura sensibles en la DNA polimerasa  $\alpha$ . Se observó que no eran capaces de replicar al DNA a la temperatura restrictiva. Cuando se inyectan anticuerpos contra la DNA polimerasa  $\alpha$  a núcleos, inhiben la replicación ya que depletan a la enzima de las células HeLa. En el sistema de replicación *in vitro* de SV40 la precipitación con anticuerpos impide la replicación del DNA SV40 (Lehman y Kaguni, 1989). Por otro lado, por la baja

procesividad de la actividad de polimerasa (la deficiente capacidad de elongación) de esta proteína se sugiere que su función sea exclusivamente en el inicio de la replicación del DNA (Melvin, 1999).

Durante la síntesis del DNA, ambas cadenas se sintetizan de 5' a 3' pero como la cadena de DNA es antiparalela, se requiere un mecanismo diferente para cada una. Una de ellas se sintetiza continuamente en el mismo sentido que avanza la horquilla de replicación pero la otra se sintetiza discontinuamente en dirección opuesta al avance de la horquilla de replicación. Para la síntesis discontinua es necesario una síntesis repetida de cebadores (Fig I-2/2) que se elongan por las DNA polimerasas  $\delta$  y  $\epsilon$  (Fig I-2/4) y que forman segmentos cortos de DNA llamados fragmentos de Okazaki (Melvin 1999). Los cebadores de DNA se eliminan por la RNAsa H1 (Fig I-2/5) y por una exo/endonucleasa 5'-3' de 46 KDa llamada FEN-1 (Fig I-2/5). La RNAsa H1 hidroliza al cebador de RNA desde su extremo 5' dejando un ribonucleotido en el extremo 5' de la cadena de DNA de este mismo cebador, siendo este el sustrato para FEN1. Los huecos producidos por estas nucleasas se llenan probablemente por las DNA polimerasas  $\delta$  y  $\epsilon$  y la DNA ligasa I los une formando al final una sola cadena. (Fig I-2/7).

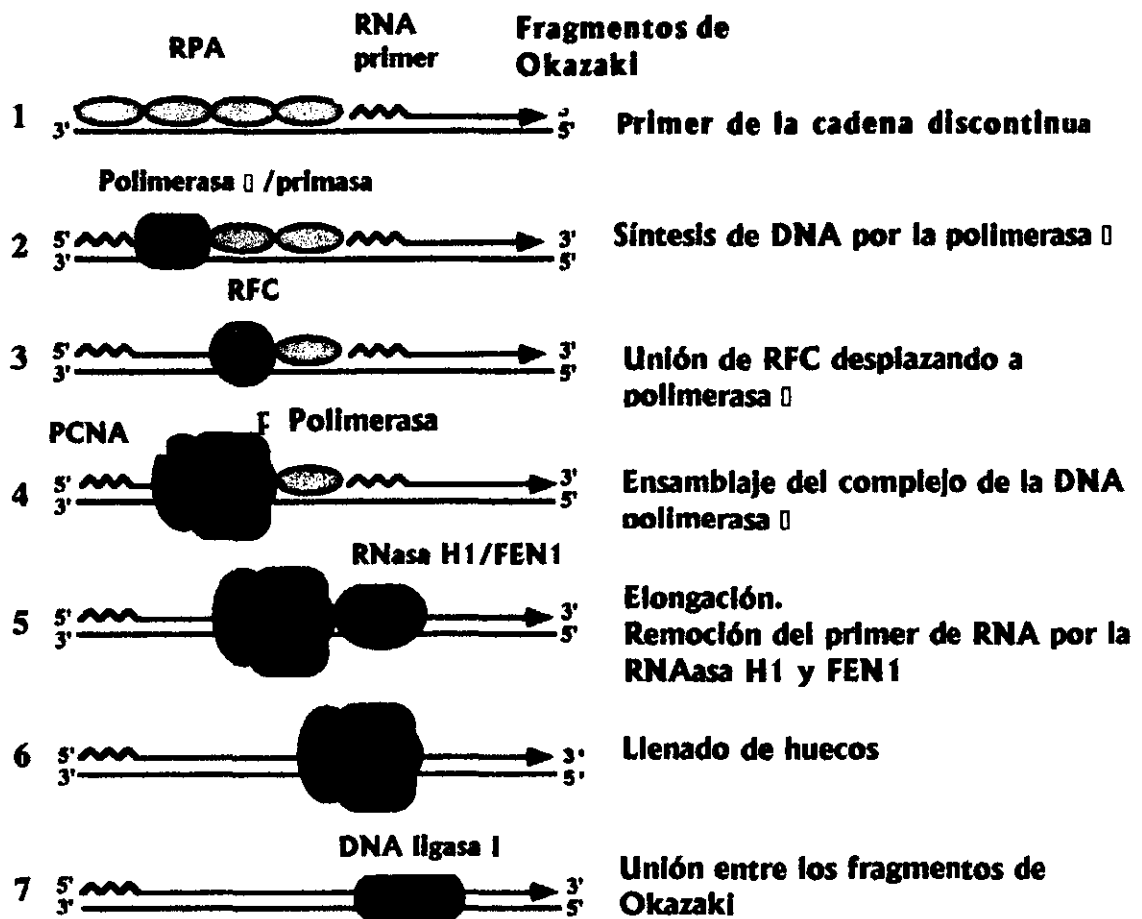


Fig I-2. Mecanismo de maduración de los fragmentos de Okazaki, en el que se muestra la función sucesiva de distintas enzimas y proteínas durante la replicación del DNA en eucariontes (Stillman, 1994).

La DNA polimerasa  $\alpha$  se disocia del complejo de replicación por la acción del factor de replicación C (RFC) (Tsurimoto and Stillman, 1989; Lee *et al*, 1991) que está conformado por cinco subunidades distintas (p140, p40, p38, p37 y p36) y se une al cebador inmediatamente después de que éste se sintetiza por la DNA polimerasa  $\alpha$  primasa. El RFC recluta tanto al antígeno nuclear de proliferación nuclear (PCNA) como a la DNA polimerasa  $\delta$  (heterodímero compuesto por p125 y p50) y la DNA polimerasa  $\epsilon$  (Fig I-3). El PCNA, es un homotrímero de 87 kDa y su función es incrementar la procesividad de las polimerasas  $\delta$  y  $\epsilon$  manteniendo una asociación estable entre las polimerasas y el DNA molde. Estas polimerasas además

tienen una actividad de exonucleasa que asegura la fidelidad del DNA sintetizado. La DNA polimerasa  $\delta$  fue caracterizada por primera vez de timo de ternera y luego en otras especies. Su función esencial en replicación se ha demostrado en levaduras ya que al ser mutada y sobreexpresada se detiene el ciclo celular en la fase S (Kornberg, 1992)

Tanto la DNA polimerasa  $\delta$  como la  $\epsilon$  tienen una función catalítica similar y ambas son esenciales para la viabilidad en levaduras, (Wang, 1991), pero se ha observado que la DNA polimerasa  $\epsilon$  no complementa de manera eficiente a mutantes en DNA polimerasa  $\delta$  durante la replicación del DNA (Lee *et al*, 1991). Una vez que la DNA polimerasa  $\delta$  se recluta en la horquilla de replicación (Fig I-3) es capaz de sintetizar fragmentos de DNA de 5 a 10 kb; en el caso de la cadena discontinua la DNA polimerasa sintetiza segmentos de DNA hasta que se encuentra el extremo de algún otro fragmento (FigI-3).

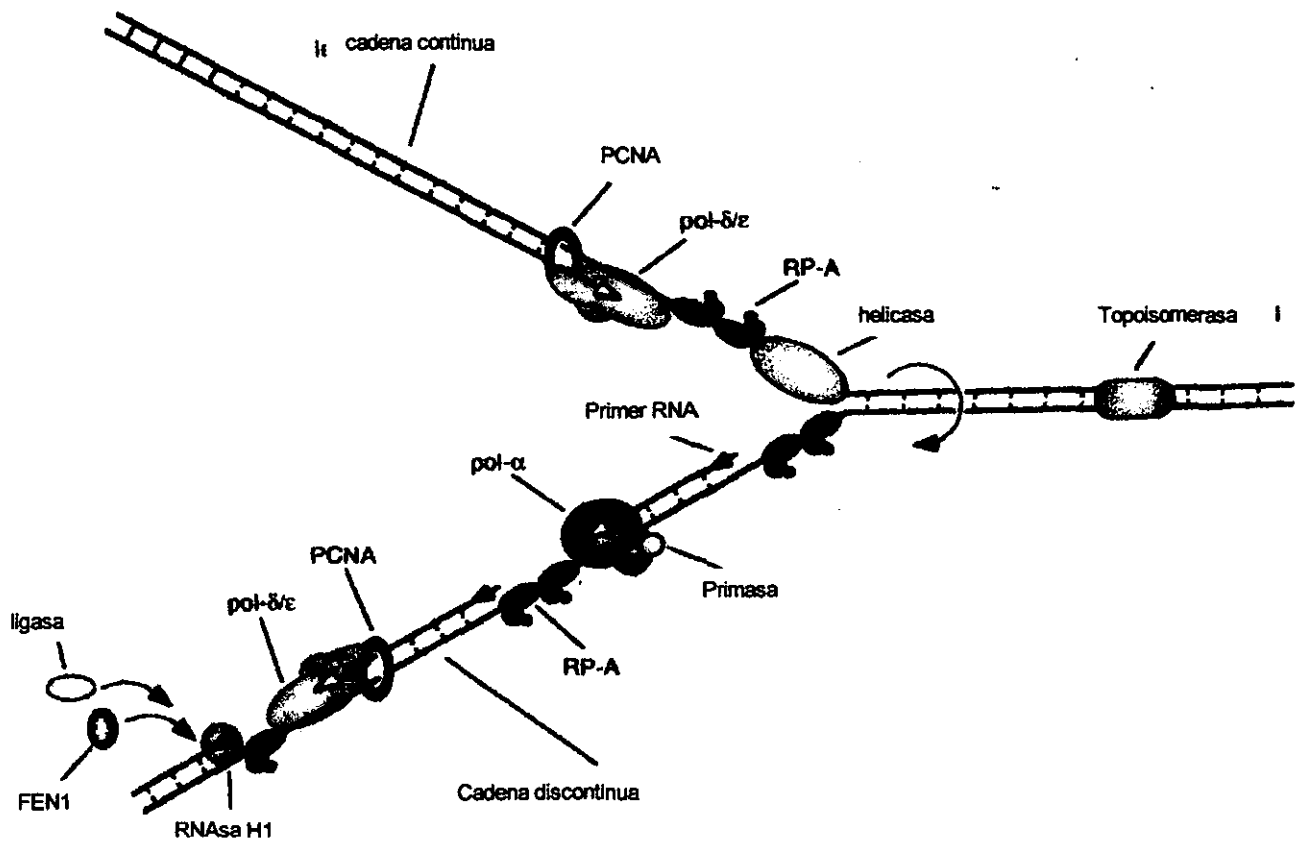


Fig 1-3 Síntesis semidiscontinua del DNA. Este diagrama representa a la organización de la horquilla de replicación. En diagrama no se ha incluido al factor de replicación C, debido a que aun no se tienen evidencias que demuestran que este continua en el aparato de replicación una vez que PCNA a ingresado a la horquilla de replicación (Melvin, 1999).

#### 1.4. Reparación del DNA.

Entre los múltiples mecanismos de reparación del DNA hay dos que han sido estudiados con más detalle: Reparación por escisión de bases (BER) y reparación por escisión de nucleótidos (NER) (Taylor and Lehmann , 1998).

##### 1.4.1.Reparación por escisión de bases

El primer evento de reparación por escisión de bases (BER) es la hidrólisis del enlace N-glucosídico que une la base nitrogenada a la cadena de desoxi-ribosa fosfato. La hidrólisis de este enlace se cataliza por enzimas llamadas glicosilasas



donde cada enzima elimina un tipo de base errónea, por ejemplo, la uracil DNA glucosidasa cataliza la escisión de la base uracilo del DNA. Otro ejemplo, es la timidina DNA glicosidasa que cataliza la escisión de timidina cuando ha sido incorporada erróneamente al DNA por guanina (Melvin, 1999). La escisión de la base genera sitios apurínicos o apirimídicos, que son reparados por las Apirimídico ó apurínico (AP) endonucleasas que catalizan la incisión del enlace fosfodiéster hacia el extremo 5' del sitio AP, generando así residuos con un extremo 3' OH y otro con un extremo 5' desoxi-ribosafosfato (Taylor and Lehmann, 1998). Para completar el proceso de BER se requiere de la enzima desoxi-ribofosfo-diesterasa para eliminar el extremo 5' generado por la AP endonucleasa, seguido por una síntesis reparativa y una ligación del DNA (Taylor and Lehmann, 1998).

La mayoría de los genes que participan en este sistema de reparación han sido clonados por complementación de mutantes de *E. coli* (Van der Kemp et al, 1996).

#### 1.4.2. Reparación por escisión de nucleótidos

Este sistema de reparación es particularmente efectivo en los daños provocados por distorsiones de la hélice debidas a la formación de fotoproductos, principalmente dímeros de timina, inducidos por una exposición a luz UV. La reparación por escisión de nucleótidos (NER), es un proceso relativamente complejo que requiere de la acción de varias proteínas para el reconocimiento de la lesión, la apertura de la doble cadena del DNA alrededor del daño, y la escisión de éste (Wood, 1996).

Como primer paso en la reparación por NER está el reconocimiento del daño por la proteína XPA (xeroderma pigmentosa A) que se une a la cadena de DNA dañada. Al parecer, esta proteína de 38-42 kDa, identifica desviaciones mínimas en la conformación normal del DNA. La XPA forma un complejo con la proteína de

replicación A (RPA), la cual se une a la cadena no dañada que queda desapareada (He, 1995), pero además incrementa la afinidad de la XPA por el DNA dañado, esto sugiere que en su forma funcional la XPA esta unida a la RPA. Se sabe que participan otras dos proteínas de unión a cadena sencilla que son la XPC (xeroderma pigmentosa C) y la XPE (xeroderma pigmentosa E) pero su función aun no ha sido definida con precisión. Se cree que la XPC aumenta la eficiencia en la unión a las lesiones y de la XPE se sabe que *in vitro* puede sustituir la función de la RPA.

El complejo XPA-RPA, recluta al complejo TFIIH el cual colabora con las helicasas, XPB (xeroderma pigmentosa B) y XPD (xeroderma pigmentosa D) , que abren la cadena de DNA. Después, la proteína nucleasa XPG (xeroderma pigmentosa G) se une a RPA. Esta nucleasa corta al DNA dañado en su extremo 3', a continuación, XPA actúa como sitio de unión para la nucleasa 5' que es un complejo multimérico que contiene a la proteína ERCC1 y a XPF (xeroderma pigmentosa F), las cuales cortan en el extremo 5' del sitio donde está el DNA dañado (Cleaver and States, 1997). El fragmento de DNA que es de 30 nucleotidos y que contiene el daño se desplaza, dejando un fragmento desapareado, el cual continua unido a la RPA. El nuevo DNA es sintetizado por la DNA polimerasa  $\delta$  con participación de el RFC y el PCNA, que son necesarios en ensayos *in vitro* e *in vivo*, y finalmente la DNA ligasa, que une al DNA con el resto de cadena (Fig1 -4). Las mutaciones en el gen de la proteína XPA se reflejan en una pérdida de la capacidad de reparación de daño sufrido por UV de fuente solar o artificial (Cleaver *et al*, 1997).

La mayoría de los genes de las proteínas que participan en NER en humanos han sido clonados en levadura por complementación de mutantes sensibles a

radiación y algunos se han clonado basándose en su identidad con genes de levaduras (Sijbers *et al*, 1996).

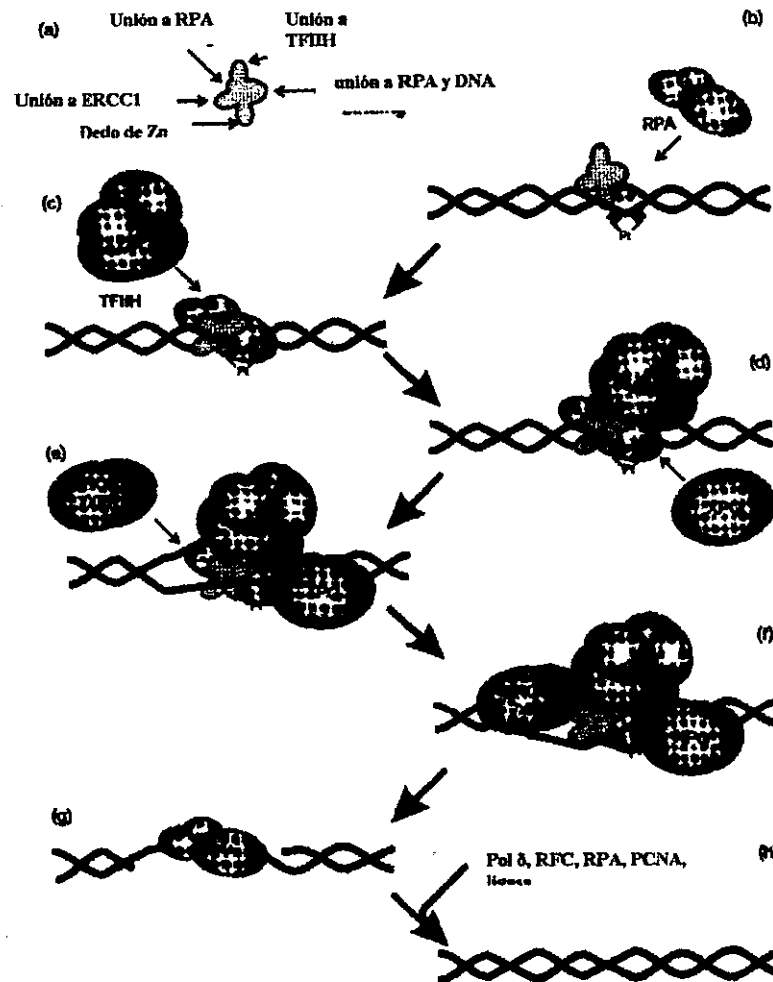


Fig 1-4 Esquema general del sistema de reparación por escisión de nucleótidos (Cleaver and States, 1997).

### 1.5 Proteínas de Replicación en Plantas

Aun cuando los mecanismos básicos que controlan el avance del ciclo celular parecen estar conservados en todos los eucariotes superiores, el control temporal y espacial de la división celular puede diferir en forma importante entre distintos

organismos. Las plantas tienen características únicas de desarrollo, que no se encuentran ni en animales ni en hongos.

1.-Debido a la presencia de la pared celular rígida, las células vegetales no se pueden mover y en consecuencia la organogénesis depende de la división celular y expresión celular en el sitio de la formación del nuevo órgano.

2.-Las divisiones celulares están confinadas a regiones especializadas llamadas meristemos. Estos meristemos producen continuamente células nuevas, que conforme se alejan del meristemo, se diferencian. La identidad del meristemo puede cambiar de una fase vegetativa a una fase reproductiva, resultando en la producción de flores.

3.-El desarrollo de una planta es principalmente post-embriionario. Durante la embriogénesis, el principal evento del desarrollo es el establecimiento del eje raíz-brote. La mayor parte del crecimiento vegetal ocurre después de la germinación, por desarrollo reiterativo en los meristemos.

4.- Como consecuencia de la vida sésil de las plantas, el desarrollo y la división celular está altamente influenciada por los factores ambientales como la luz, gravedad, heridas, disponibilidad de nutrientes y condiciones de estrés (De Veyleder *et al*, 1998)

Una de las estrategias para estudiar el ciclo celular en las plantas ha sido la caracterización molecular de genes, de cDNA y de proteínas homólogas a las animales y levaduras y compararlas tanto estructural como funcionalmente. Asimismo, el estudio de la expresión de estos genes y las interacciones entre las proteínas durante eventos de desarrollo específicos contribuyen a definir la función específica de estos reguladores en células vegetales.

Se han caracterizado algunas de las proteínas que participan en la replicación en plantas superiores y se ha encontrado un alto grado de conservación estructural entre estas proteínas y las caracterizadas para mamíferos. Esto sugiere que el funcionamiento es de manera análoga y por tanto que los mecanismos de replicación entre eucariotes superiores están muy conservados.

#### 1.5.1 PCNA en plantas.

En *Arabidopsis thaliana* se han identificado secuencias genómicas parecidas al PCNA humano dentro de los cromosomas 5 (Lin *et al*, 1999) y 1 (Theologis *et al*, 2000).

En *Brassica napus* se caracterizó un cDNA de 1004 nucleótidos que codifica una proteína de 263 aminoácidos con una similitud de 81.6% al PCNA de humano. Por Southern blot se detectaron al menos dos copias del PCNA (Markley *et al*, 1993). En maíz (*Zea mays*) se clonó el cDNA de PCNA que predice una proteína de 263 aminoácidos, y tiene una identidad del 62 % al PCNA de humano y de 95 % al reportado para el PCNA de arroz (*Oryza sativa*) (López *et al*, 1995). Una segunda clona de cDNA aislada es 94 % idéntica a la primera en la región codificante pero difiere en un 40 % en las regiones 5' y 3' no traducibles. Por Southern blot se confirmó la existencia de dos genes de PCNA y los Northern blots revelaron que ambos genes se expresan igualmente en tejidos en proliferación (López *et al*, 1997).

En arroz se han reportado una clona genómica y una clona de cDNA de PCNA ambas clonas tienen 789 nucleótidos y codifican para una proteína de 263 aminoácidos y un peso molecular de 29 kDa. La comparación entre esta secuencia y la secuencia del PCNA de ratón revela una similitud de 64 % a nivel de nucleótidos y

62 % de similitud a nivel de proteína. El PCNA de arroz tiene una similitud de 88% con la secuencia de aminoácidos traducida de PCNA de soya (Suzuka *et al*, 1991).

En DNA genómico de zanahoria (*Daucus carota*) se detectaron por Southern-blots un gene de PCNA cuyo RNA tiene un tamaño de 1.5kb y una identidad de 88% con el PCNA de humano (Hata *et al*, 1992).

En la planta vincapervinca (*Catharanthus roseus*) se identificó el cDNA del PCNA con un marco de lectura abierto de 804 aminoácidos y una masa relativa de 29 kDa con un 85 % de similitud con la PCNA de humano (Kodama *et al*, 1991)

En chícharo (*Pisium sativum*) (Mukherjee *et al*, 1998) y tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Egelkrout *et al*, 2000) se han identificado los cDNA del PCNA que predicen proteínas de 266 y 264 aminoácidos respectivamente.

#### 1.5.2. DNA Polimerasas $\alpha$ y $\delta$

Se ha identificado en *Arabidopsis thaliana* secuencias genómicas de la subunidad catalítica de DNA polimerasa  $\delta$  en el cromosoma 1 (Lin *et al*, 1999) y en el cromosoma 5 (Sato *et al*, 2000). Esta secuencia predice una proteína de 1081 aminoácidos y que es 54 % idéntica y 70 % similar a la DNA polimerasa  $\delta$  de humano.

En arroz, la secuencia de cDNA de la subunidad catalítica de la DNA polimerasa  $\delta$  se puede predecir una proteína de 110.5 kDa con una identidad de 53 % y una similitud de 70 % a la encontrada en humano (Hatanaka *et al*, 2000).

También en arroz se ha identificado el cDNA de la subunidad catalítica de la DNA polimerasa  $\alpha$  (Yokoi *et al*, 1997) que codifica una proteína de 1245 aminoácidos y que tiene una identidad de 38 % y 55 % de homología a la de humano.

A partir de hoja de espinaca se ha purificado a la DNA polimerasa tipo  $\alpha$  que tiene un peso molecular aproximado de 160 000 Da (Misumi *et al*, 1982).

No se tienen evidencias de proteínas homólogas en plantas de RFC ni de FEN1.

## 1.6. La proteína de replicación A (RPA)

Uno de los factores esenciales en la replicación del DNA eucariótico es la proteína de replicación A (RPA). Esta es un complejo heterotrimerico estable formado por subunidades de 70kDa, de 34 a 32 kDa y de 11 a 14 kDa (Fig I-5). El peso molecular de las subunidades varía en los rangos indicados en distintas especies: en la RPA humana, los pesos moleculares de los polipéptidos son 68, 29 y 13.5 kDa para RPA-1, 2 y 3 respectivamente. El complejo heterotrimerico en humanos tiene un peso predicho por su secuencia del cDNA correspondiente de 111 kDa.

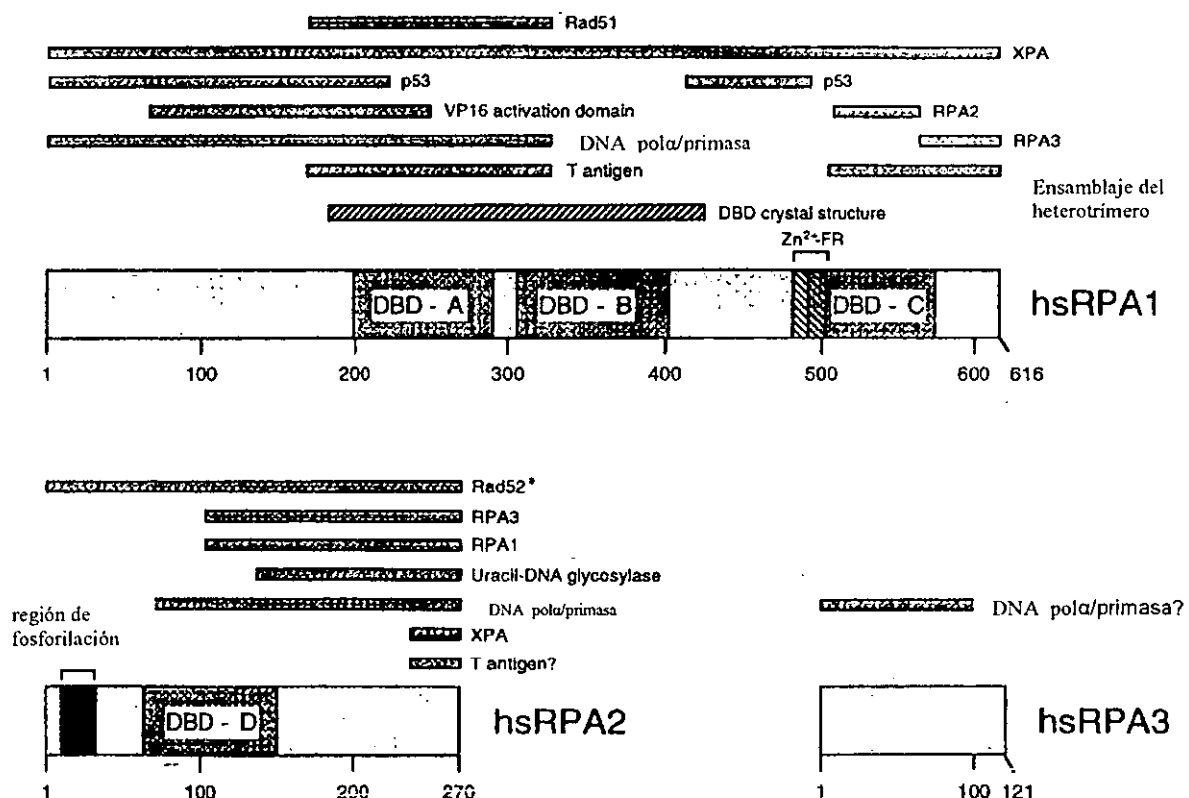


Fig I-5. Esquema de la proteína de replicación A de humano, donde se muestran las tres subunidades y las proteínas con las que interaccionan cada una de ellas. Los dominios de unión a DNA (DBD), el putativo dedo de Zn y la región de fosforilación se muestran en RPA-1 y RPA-2 (Ifode *et al* 1999).



La RPA es la proteína más abundante de las SSB ("single-strand binding") celulares (Wold, 1997). (En timo de ternera se han aislado una SSB de 48 y otra de 61 kDa que estimulan la actividad de la DNA polimerasa  $\alpha$  hasta 100 veces bloqueando sitios de unión no productivos en el DNA dejando libre el lugar donde se une la polimerasa, otras SSB se han identificado en levaduras pero su función aún no se conoce (Kornberg 1992)). En la literatura se le ha nombrado de diferentes maneras, incluyendo proteína de replicación A, factor de replicación A (RFA) y proteína de unión a cadena sencilla de DNA humana o HeLa (HSSB). Sin embargo, RPA es la denominación más común y más apropiada para esta proteína debido a que la inicial R se refiere a replicación pero también se puede referir a recombinación y reparación, eventos en los cuales participa esta proteína. El acrónimo RPA se refiere siempre al heterotrímero, mientras que las subunidades separadas se denominan por su peso molecular aparente, RPA70, RPA32 y RPA14. Sin embargo por las diferencias que se han encontrado en el peso de las subunidades en las diferentes especies se ha optado por denominar a las subunidades como RPA-1, RPA-2, RPA-3 en orden decreciente de peso (Ozawa, 1993 y Umbricht, 1993).

La principal función de RPA y también la más estudiada es estabilizar al DNA de cadena sencilla durante la replicación (Iftode et al, 1999). RPA se une con alta afinidad al DNA de cadena sencilla por lo que forma parte de las proteínas SSB sin embargo cualquiera de las subunidades de RPA tienen una baja similitud con otras SSB conocidas (Erdile et al, 1991).

La proteína de replicación A (RPA) fue originalmente purificada de extractos celulares humanos como un componente esencial para la replicación de DNA en ensayos *in vitro*. Se caracteriza por tener una alta afinidad por cadena sencilla en comparación con su unión al DNA de doble cadena, y no puede ser remplazada exitosamente por otra SSB heteróloga ni en ensayos *in vivo* ni *in vitro*, lo que sugiere la interacción específica de RPA con otras proteínas (Erdile *et al*, 1991). El heterotrímero es soluble una vez ensamblado, pero cada subunidad por separado es poco soluble. Cuando RPA-2 y 3 son coexpresadas forman un complejo soluble que al interaccionar con RPA-1 aumentan su solubilidad, lo que sugiere que la formación del complejo RPA-2-RPA-3 es un paso necesario para la formación de RPA y quizá para el plegamiento correcto de RPA-1 (Henricksen *et al*, 1994).

Por ensayos de inmunolocalización en células humanas se ha demostrado que RPA se encuentra en el núcleo y está presente en el foco de replicación, justo antes del inicio de la fase S y permanece ahí durante la síntesis del DNA (Adachi, 1992 y Tanaka, 1998).

La mayoría de los estudios muestran que una vez que ha concluido la fase S, RPA-1 se disocia de los cromosomas, y durante la fase M, solamente RPA-2 se encuentra asociada a estos. RPA-3 se localiza en el citoplasma durante la mitosis, lo que sugiere que el ensamblaje del heterotrímero es regulado durante el ciclo celular (Cardoso, 1993).

RPA estimula la actividad de helicasa en células humanas y en levaduras y aun cuando muchas helicasas son estimuladas por SSBs solamente algunas helicasas eucarióticas son estimuladas por RPA. El heterotrímero también estimula la actividad de las DNA polimerasas:  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  (Mitsis *et al*, 1993 y Erdile *et al*, 1991). Además, se ha demostrado que la HsRPA estimula la actividad de exonucleasa 3'-5'

de la DNA polimerasa  $\delta$  (Wold, 1997). Mientras que la DNA polimerasa  $\alpha$  es estimulada únicamente por RPA las otras DNA polimerasas son estimuladas por diferentes SSBs (Wold,1997). La estimulación de la actividad de las DNA polimerasas  $\alpha$  y  $\epsilon$  requiere de la presencia de otros factores como PCNA.

La RPA está involucrada también en el proceso de recombinación del DNA. Estudios en células de monos han mostrado que la RPA-2 y la Rad52 (que es una proteína que ayuda a la unión entre las cadenas de DNA) forman un complejo esencial para la recombinación (Hays *et al*, 1998). Estudios *in vitro* con la scRPA muestran que la RPA puede reducir la cantidad de estructura secundaria en el DNA de cadena sencilla sugiriendo que una vez que el DNA es cortado, la RPA se une a la cadena sencilla del DNA reduciendo las estructuras secundarias. Posteriormente, la Rad52 desplaza a la RPA facilitando la unión de la RAD51. Estas tres proteínas interaccionan entre si (Fig I-5) y quizá sean las encargadas de buscar la secuencia homóloga durante la recombinación (New *et al*, 1998).

Como ya se describió anteriormente la RPA es fundamental en algunos mecanismos de reparación de DNA ya que se une a la XPA aumentando la eficiencia de ésta para reparar el dañado DNA por luz UV. La XPA interactúa con las subunidades 1 y 2 de RPA (Li, *et al*, 1995) (Fig. I-5), pero sólo la unión con la RPA-1 es esencial para la función de la XPA, en cambio la interacción con la RPA-2 no indispensable.

### 1.6.1 Estructura y función de la RPA-1

La RPA se une a cadena sencilla del DNA como un complejo heterotrimérico pero la actividad de unión más importante se encuentra en la subunidad de 70 kDa (Wold, 1989), que interactúa con una región de 30 nucleótidos, en el DNA.

La RPA-1 está conformada por cuatro dominios; un dominio hacia el extremo amino terminal (del aminoácido 1 –168 en hsRPA) que participa en la interacción de RPA con otras proteínas, un dominio central de unión al DNA (del aminoácido 169-441), aunque los aminoácidos del 113 al 168 no se unen al DNA son necesarios para una interacción óptima (André, *et al*,1999) un supuesto dedo de Zn ( alrededor de las aminoácidos 481-503) y un dominio hacia el extremo carboxilo terminal (aproximadamente del aminoácido 503-616) el cual es requerido para la interacción con RPA-2 y 3 (Wold, 1997) (Fig. I-6)

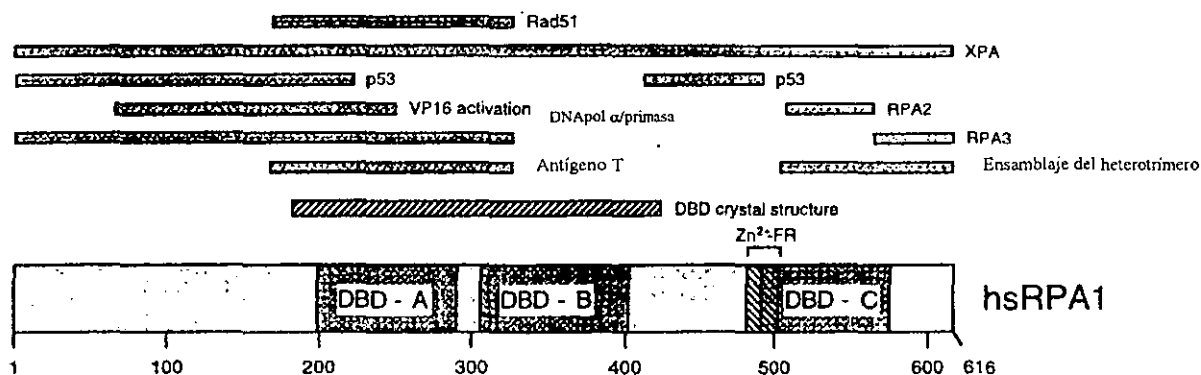


Fig. I-6 La proteína de replicación A-1, dominios de unión (A B, C, putativo dedo de zinc y proteínas con las que interacciona (Ifode, 1999).

Se ha identificado que la región central de la RPA-1 es indispensable para su unión a DNA (del residuo 169 al 441 aproximadamente); este dominio de unión a DNA (DBD) está compuesto por dos subdominios intercambiables denominados A y B (Philipova *et al*, 1996), que interactúan directamente con el DNA y tienen la misma

estructura tridimensional. El subdominio A abarca de los residuos de 198 a 291 y el subdominio B de los residuos 305 a 402 (Gomes *et al*, 1995 y Gomes *et al*, 1996) con una separación de 15 aminoácidos. En estudios recientes se ha observado que hacia la región del C-terminal (residuos 416-621), existen cuatro dominios de unión a DNA de cadena sencilla, aunque la interacción es débil (Brill *et al*, 1998), además, la región central de RPA-2 tiene también actividad de unión a cadena sencilla (residuos 43-171). Los diferentes DBD de la RPA han sido designados de la siguiente manera: el dominio central y de mayor afinidad en RPA-1 son los subdominios A y B, el sitio de baja afinidad en la RPA-1 hacia el C-terminal, dominio C y el sitio central de la RPA-2, dominio D (Brill *et al*, 1998). La presencia de varios sitios de unión a DNA a lo largo de toda la proteína sugiere que la unión de la RPA a cadena sencilla del DNA ocurre en más de un paso. Se ha propuesto que la secuencia de eventos comienza con la unión de la RPA a 8 nucleótidos de manera inestable, a través del dominio de alta afinidad A y B y después de la formación de este complejo, la RPA se alinea con el DNA usando los sitios secundarios del DBD (dominios C y D), formando así un complejo estable, unido a una región que abarca 30 nt (Blackwell *et al*, 1996).

Además de su función de unión a cadena sencilla de DNA, el extremo C-terminal (residuos 503-616), es necesario para el ensamblaje del heterotrímero. El análisis con mutantes sugiere que los 50 aminoácidos hacia el C-terminal son requeridos para la interacción entre la RPA-1 y la RPA-3, mientras que los 60 aminoácidos adyacentes son requeridos para la interacción con la RPA 2 (Kim *et al*, 1996).

Todos los homólogos a la hsRPA-1 tienen un hipotético dedo de zinc (C-X4-C-X13-C-X2-C) muy conservado localizado cerca del residuo 500. El alto nivel de

conservación entre las especies sugiere que este motivo tiene una importancia considerable en la estructura y función de la RPA. Hay evidencias que indican que este dedo de zinc es necesario para la estimulación de la DNA polimerasa  $\delta$ , lo cual no resulta esencial para replicación, pero sí para la reparación y afecta la estabilidad de la interacción RPA-DNA de cadena sencilla (Gomes y Wold, 1996). Otros estudios han demostrado que el dominio de dedo de zinc sí contribuye a la unión al DNA y se ha sugerido que pudiera ser aún más importante la unión que aporta este dominio que la que aporta la RPA-2 (Lao Ye *et al*, 1999). Aun con mutaciones en tres de las cisteínas del dedo de zinc, la proteína recombinante puede mantener la replicación *in vitro*. El requerimiento de este motivo parece estar en la reparación pero no tanto en replicación lo que sugiere un papel diferencial de la RPA en el metabolismo del DNA (Dong *et al*, 1999). Se ha observado que una las cisteínas que conforman este dedo de zinc pueden formar puentes disulfuro, lo cual induce un cambio conformacional que interfiere con la unión al DNA o con la unión a otras proteínas. La unión de Zn(II) de manera coordinada con los cuatro residuos de cisteína impediría la formación de puentes disulfuro y de esta manera el  $Zn^{2+}$  tendría un papel regulador en la unión de la RPA-1 al DNA (Park *et al*, 1999).

Los estudios de Park y colaboradores sugieren que es esencial la participación de un catión divalente como el  $Zn^{2+}$  en la conformación y regulación de la RPA (Park *et al*, 1999).

La RPA además tiene la capacidad de unión a cadena doble de DNA (dsDNA) y ésta aumenta de manera importante cuando encuentra una parte abierta o desapareada donde entra con afinidad a cadena sencilla y desestabiliza aun más a la doble hélice. Se ha demostrado que la presencia del dedo de  $Zn^{2+}$  es importante en la unión de la RPA al DNA de doble cadena, debido a que mutaciones en este

dominio disminuyen su afinidad. Lo anterior sugiere que esta unión podría ser importante en el reconocimiento y reparación de daño (Lao *et al*, 1999).

Por análisis mutacional se han identificado algunos aminoácidos indispensables en la subunidad de 70 kDa para que esta funcione adecuadamente. Cuando la Lys 45 es sustituida por Glu causa una disminución del 90% en la recombinación y cuando las Ser 351 y Ser 373 son remplazadas por Pro, ocurre una elongación defectuosa al igual que una iniciación de la replicación deficiente (Umezu *et al*, 1998).

### 1.6.2 Estructura y función de RPA-2

Al parecer la RPA-2 contiene tres dominios funcionales diferentes, en el extremo amino terminal se encuentra un sitio de fosforilación, en la región central un sitio de unión de unión secundaria al DNA y en el extremo carboxilo terminal un sitio de unión a la XPA (Ifode *et al*, 1999) (Fig I-5).

La subunidad de 32 kDa de RPA se fosforila *in vitro* en los residuos Thr-21 y Ser-33 por la proteína cinasa dependiente de DNA (DNA-PK) (Niu *et al*, 1997) y en Ser-23 y Ser-29 por el complejo cdc2-ciclina (Henrickese *et al*, 1994). Esta fosforilación es observada cuando la RPA esta unida a DNA de cadena sencilla y en respuesta a daño del DNA por luz UV, en presencia de hidroxurea y durante apoptosis (Liu *et al*, 1993; Carty *et al*, 1994; Treuner, *et al* 1999), lo que apoya el papel de RPA en la regulación del metabolismo del DNA.

Por el sistema de doble híbrido utilizando a hsRPA-1 como anzuelo, se ha aislado un homólogo de RPA-2 de células humanas que tiene una identidad del 47% con la RPA-2 reportada para humanos, llamada RPA 4 que se expresa en células de placenta y de colon en humanos. Además, esta proteína es capaz de ensamblarse con la RPA-1 y la RPA-3 y este heterotrímico es capaz de unirse al

DNA de cadena sencilla (Keshav *et al*, 1995). Esto abre la posibilidad de una expresión diferencial entre tejidos o en diferentes etapas del desarrollo.

### 1.6.3 Estructura y función de RPA-3

La función de la RPA-3 aun no es conocida se ha propuesto que interactúa directamente con el DNA, pero esto aún no se ha demostrado (Philipova *et al*, 1996), deleciones en el extremo carboxilo terminal en levaduras hacen a la célula no viable (Ifode *et al*, 1999).

En estudios en células de *Saccharomyces cerevisiae* con la RPA-2 y la RPA-3 mutadas en diferentes regiones y temperatura sensibles se observó solamente las células que tenían a la RPA-3 mutada pero no a la RPA-2 podían llevar a cabo por lo menos una ronda de replicación de DNA, demostrando que es suficiente para el movimiento de la horquilla de replicación que se forme el complejo RPA-1 y RPA-2 (Maniar *et al*, 1997).

### 1.6.4 La RPA en otras especies

Subsecuente a la identificación de la RPA humana, que fue la primera que se caracterizó, se han encontrado heterotrimeros ortólogos de la hsRPA en varios organismos eucariotes: la scRPA en *Sacharomyces cerevisiae* (Heyer *et al*, 1990), la spRPA en *Schizosaccharomyces pombe* (Parquer *et al*, 1997), la xlRPA en *Xenopus laevis* (Adachi y Laemmli,1992) y la dmRPA en *Drosophila melanogaster* (Mitsis *et al*,1993). Todas las RPA encontradas en diferentes organismos son heterotrimeros estables con subunidades aproximadamente de 70, 30 y 14 kDa. Hay un alto nivel de similitud entre las RPA caracterizadas en distintas especies, en particular los genes de las subunidades 1 y 2 están altamente conservados. La comparación de



secuencias de RPA-1 en el extremo N- terminal muestra menor conservación que la región central y la región del C-terminal (Wold, 1997) (Tabla I-1).

Especie	<i>H. sapiens</i> RPA1	<i>X. laevis</i> RPA1	<i>D. melanogaster</i> RPA1	<i>S. pombe</i> RPA1
<i>S. cerevisiae</i> RPA1	44.5 (32.5)	44.4 (33.1)	46.9 (34.5)	50.4 (39.2)
<i>S. pombe</i> RPA1	50.0 (38.7)	51.9 (41.4)	49.4 (36.9)	
<i>D. melanogaster</i> RPA1	54.6 (45.3)	54.3 (44.5)		
<i>X. laevis</i> RPA1	80.7 (74.1)			

Especie	<i>H. sapiens</i> RPA2	<i>H. sapiens</i> RPA4	<i>M. musculus</i> RPA2	<i>S. pombe</i> RPA2
<i>S. cerevisiae</i> RPA2	37.8 (29.9)	35.3 (26.9)	37.4 (29.5)	41.7 (35.7)
<i>S. pombe</i> RPA2	43.5 (34.2)	38.7 (29.2)	44.2 (34.6)	
<i>M. musculus</i> RPA2	88.5 (87.4)	54.1 (45.6)		
<i>H. sapiens</i> RPA4	56.8 (47.5)			

Especie	<i>H. sapiens</i> RPA3	<i>S. pombe</i> RPA3
<i>S. cerevisiae</i> RPA3	35.2 (27.6)	35.3 (27.4)
<i>S. pombe</i> RPA3	37.0 (26.0)	

Tabla I-1 Comparaciones entre las secuencias de aminoácidos de las tres subunidades de ortólogos de RPA El primer valor indica el porcentaje de similitud y el segundo valor entre paréntesis indica el porcentaje de identidad (Ifode *et al.* 1999).

#### 1.6.5. La RPA en plantas

En plantas se conoce poco sobre la caracterización de los genes y proteínas de las diferentes subunidades de esta proteína. En arroz (*Oryza sativa*) se

caracterizó el cDNA de la RPA-1 (OsRPA-1 No. de acceso de Gen Bank AF009179) por ensayos de despliegue diferencial en búsqueda de genes inducidos por giberelina. Este cDNA predice una proteína de 69.6 kDa, con tres dominios funcionales, que corresponden al sitio de interacción con RPA-2 y 3 así como los dos subdominios de alta afinidad por DNA. Cuando estos dominios se insertan entre los extremos amino y carboxilo de la ScRPA-1 se puede complementar mutantes termo sensibles de levadura. El transcrito se expresa preferencialmente en hoja joven, en raíz de plántulas de 3 días y en meristemo apical y los niveles de expresión en tallo son menores pero aumentan en presencia de giberelinas. (Van der Knapp, 1997). Con el reporte de la secuencia completa del genoma de *Arabidopsis thaliana* ( The Arabidopsis Genome Initiative, 2000) se identificaron seis secuencias homólogas a RPA-1 que codificarían para la subunidad completa. Además, se describen otras 76 secuencias parciales como, similares a la RPA, pseudogenes y proteínas tipo RPA ([http://www.tigr.org/docs/tigr-scripts/edb2\\_scripts/neuk\\_name\\_search.spl](http://www.tigr.org/docs/tigr-scripts/edb2_scripts/neuk_name_search.spl)) distribuidas en los cromosomas 1, 2, 3 y 5 .

A nivel bioquímico se ha purificado RPA de núcleos extraídos de protoplastos de hojas de tabaco cuyas subunidades 1, 2 y 3 disociadas tienen masas moleculares relativas de 70, 34 y 14 kDa respectivamente que se observaron en un gel de poliacrilamida teñido con plata. Este heterotrímero muestra actividad de unión a cadena sencilla de DNA *in vitro* y estimula la actividad de la DNA polimerasa  $\alpha$  hasta cuatro veces con cantidades crecientes de RPA. Sin embargo, un exceso de RPA causa una disminución de 1.5 veces en la actividad de la DNA polimerasa  $\alpha$  de tabaco (García-Maya, 1997).

## Antecedentes

En el laboratorio se aisló un fragmento de DNA de maíz de 300 pb, con oligonucleótidos diseñados a partir de una secuencia reportada en un banco de información de secuencias de cDNA (EST, expressed sequence tags 52849 GenBank: T23395). El oligonucleótido sentido fue llamado rpa1 y el oligonucleótido antisentido fue llamado rpa2. La amplificación del fragmento de DNA por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) hizo a partir de DNA genómico de maíz bajo las siguientes condiciones:

1 ciclo:

- Desnaturalización :95°C 3 min

35 ciclos:

- Desnaturalización 95°C 1 min
- Alineamiento 56° C 40 seg
- Elongación: 72° C 40 seg

1 ciclo

- Elongación 72° C 10 min

MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, Buffer 1X (10 mM tris-HCl, pH 8.9 , 50 mM KCl), dNTPs 0.2 mM, oligonucleótidos 1 μM cada uno , Taq polimerasa 0.25 U/μL)

El producto de la reacción se analizó en un gel de agarosa (Fig A1A), en el que se observa una banda de aproximadamente 300 pb (carril 3). También se probaron como moldes cDNA proveniente de RNA aislado de ejes embrionarios de maíz germinados por 24 horas (carril 2) y una alícuota (aproximadamente 10<sup>7</sup> pfu) de un banco de cDNA de maíz (carril 4), pero en ninguno de estos se encontró producto de amplificación.

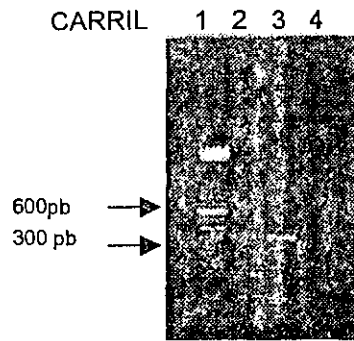


Fig.A1A Obtención de una sonda de DNA por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los oligonucleótidos 1rpa y 2rpa diseñados a partir de la clona dbEST 52849 (GenBank:T23395) del proyecto Maize cDNA sequences in dbEST (Expressed Sequence Tags). Carril 1, marcadores de peso molecular escalera 100 pb; carril 2, molde, cDNA de RNA 24 horas de germinación; carril 3, DNA genómico; carril 4, DNA de banco de cDNA de maíz.

Este fragmento se clonó en el sitio *Eco RV* del vector de clonación pKS-Bluescript, que se usó para transformar *E.coli DH5 $\alpha$*  competentes. A esta clona se le llamó RPA12. En la figura A1B se muestra que el producto de PCR se clonó en el vector pues al digerir el DNA con *Eco RI* y *Hind III* se libera este fragmento (carril 3 y 4).

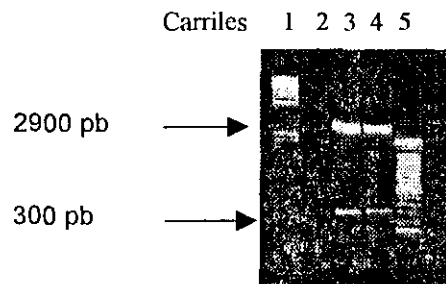


Fig A1B Clonación del fragmento de PCR obtenido con los oligos rpa1 y rpa2 en el vector de clonación pKS Bluescript.carril1 marcadores de peso molecular ( DNA  $\lambda$  digerido con *Hind III*), carril 2 producto de PCR, carril 3 y 4 DNA de laclona rpa12 digerido con *Eco RI* y *Hind III*, carril 5 marcadores de peso molecular (escalera de 100 pb)

En la secuencia (301 pb) de la clona RPA 12 (Fig. A1C) se pueden identificar a los oligonucleótidos rpa1 y rpa2, así como la secuencia reportada en el EST (mayúsculas) que está interrumpida por un intrón de 105 pb.

```

001  GCTGGTGGTTTCAAGTCCATGTATTCTGATAGAGTTTTTCTGTCTCACA
050  TCACAAGTGATCCTGCCATGGGCCAGGAAAAGgtactatcctgaatatt
099  cactgaaatatgacactgttcgtatctttaattgaagaattgcaaatct
147  ggagaagctccaattcgacttcgacttcttggttttcccttgcaagCCTG
194  TTTTCTTCAGTTTGTATGCCACCATAAGCCACATCAAGCCTGACCAGAA
242  CATGTGGTACCGTGCTTGCAAGACCTGCAACAAGAAGGTGACTGAAACT
290  TTTGGATCTGGAT

```

Fig.A1C Secuencia del fragmento de DNA de 301 pb (RPA12) amplificado por PCR usando DNA genómico de maíz como molde. Las secuencias de los oligonucleótidos rpa1 y rpa2 se muestran en rojo en los extremos 5' y 3' respectivamente. La secuencia de un intrón (minúsculas) de 105 pb está interrumpiendo las dos secuencias exónicas, que son idénticas a la clona EST 52849

## Objetivos

### Objetivo general.

- ❖ Caracterizar el cDNA correspondiente a la proteína de replicación A 1 de maíz.

### Objetivos Particulares.

- ❖ Conocer la secuencia de la proteína de replicación A1(RPA) de maíz y comparar con proteínas homólogas de otras especies.
- ❖ Determinar el número de copias del gene correspondiente a la RPA 1 de maíz.
- ❖ Determinar la expresión tisular del mensaje en particular en tejidos donde la proliferación celular es alta.

## Hipótesis

Debido a que se han descrito varias secuencias parciales de cDNAs correspondientes a la RPA-1 en *Zea mays*, es posible aislar algún cDNA completo que permitiría caracterizar la estructura de la proteína predicha, así como el número de genes y su patrón de expresión en distintos tejidos y distintas etapas de desarrollo

### 2.1 Obtención de la Secuencia de cDNA de RPA-1 de Maíz

#### 2.1.1. Extracción y purificación de la sonda.

Como sonda se utilizó un fragmento de 300 pb amplificado por PCR con los oligonucleótidos rpa1 y rpa2 (Apendice B) diseñados a partir de un EST (expressed sequence tags 52849 GenBank: T23395) de maíz, que fue obtenido y clonado anteriormente en el laboratorio.

(FIG.1MM)

#### 2.1.1.1 Extracción de la sonda

Esta extracción se realizó, con algunas modificaciones, utilizando el protocolo indicado en Sambrook *et al* (1989)

Se cultivaron células de *Escherichia coli* cepa DH5 $\alpha$ , durante 12 horas en medio TB (Apéndice A) a 37° C. El cultivo se centrifugó a 4000 rpm. por 10 min, se resuspendió con agitación vigorosa en 200  $\mu$ L de solución de GTE (Apéndice A) fría, para mantener la estabilidad de la membrana. Esto se incubó 5 min a temperatura ambiente y se adicionó 400  $\mu$ L de una solución de alcalina de lisis (Apéndice A) se agitó suavemente para lisar la membrana plasmática. Posteriormente se incubó por 5 min en hielo y se agregó 300  $\mu$ L de una solución de neutralización (Apéndice A) para precipitar proteínas y carbohidratos. El tubo se agitó vigorosamente por 10 segundos y se dejó en reposo en hielo por 3.5 min; una vez transcurrido el tiempo, se centrifugó por 10 min a 12000 rpm, a 4°C. Se tomó el sobrenadante y se hizo una extracción con una solución de fenol-cloroformo alcohol isoamílico (FCI, Apéndice A) y

posteriormente se precipitó el DNA con 0.7 volúmenes de isopropanol. El DNA plasmídico obtenido se disolvió en agua estéril.

La sonda fue liberada del vector de clonación incubándolo con 10 U/ $\mu$ L de las enzimas de restricción *Eco RI* y *Hind III* en: Amortiguador B de boehringer<sup>MR</sup> (Apéndice A) a 37°C por dos horas.

#### 2.1.1.2. Purificación

El producto resultante de la digestión se resolvió en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y se cortó el fragmento del gel que contenía a la banda de 300 pb. El DNA se extrajo de la agarosa utilizando el kit "Gene CLEAN" de Bio 101<sup>MR</sup> en la siguiente manera:

El fragmento de agarosa se pesó y se le agregó 2-3 volúmenes (w/v) de NaI 6 M pH 7. La agarosa se fundió a 45- 55 °C por 5 min y se agitó cada minuto, hasta que la agarosa se fundió completamente. Posteriormente se agregaron 5  $\mu$ L de la suspensión "glassmilk" (previamente agitado en vortex) y se mezcló. Esto se centrifugó a 12000 rpm por 5 seg y se descartó el sobrenadante. El pellet se lavó con 700  $\mu$ L de solución "New Wash" helada y se resuspendió con pipeta, se centrifugó a 12000 rpm y se descartó el sobrenadante. Este lavado se hizo dos veces más y después del último lavado, se eliminó completamente la solución new wash con pipeta. Para eluir el DNA, se resuspendió el pellet en 10  $\mu$ L de agua estéril y se calentó a 50°C durante 3 min., se centrifugó a 12000 rpm durante 30 seg. el sobrenadante se tomó con una pipeta y se pasó a un tubo limpio.



### 2.1.2. Marcaje de la sonda

El marcaje se hizo siguiendo el protocolo de random primers DNA (labeling system de GIBCO):

El DNA (aproximadamente 50 ng), se desnaturalizó a 100°C por 5 min, se enfrió en hielo y se agregó a una solución dATP 10µM, dTTP 10µM, dGTP 10 µM, amortiguador "Random primer" 1X (Apéndice A), 5 U del fragmento Klenow de la DNA polimerasa de *E. coli*, 50 µCi {α-P<sup>32</sup>} dCTP en un volumen final de 50 µL. Esta reacción se incubó durante 30 min a 37°C, se llevó a un volumen final de 200µL con TE (Apéndice A). La marca no incorporada a la sonda se eliminó pasándola por una columna de 1mL de Sephadex G-25 previamente equilibrada con solución TE.

### 2.1.3. Sondeo de un banco de cDNA de maíz.

El banco de cDNA fue proporcionado por el Dr. John Walker, Universidad de Missouri, E.U.A. y fue preparado a partir de RNAm de tallo y raíz de plántulas de maíz B73 etioladas de dos semanas de edad. Está clonado en el vector lambda gt11 (stratagene) (Fig. MM 1).

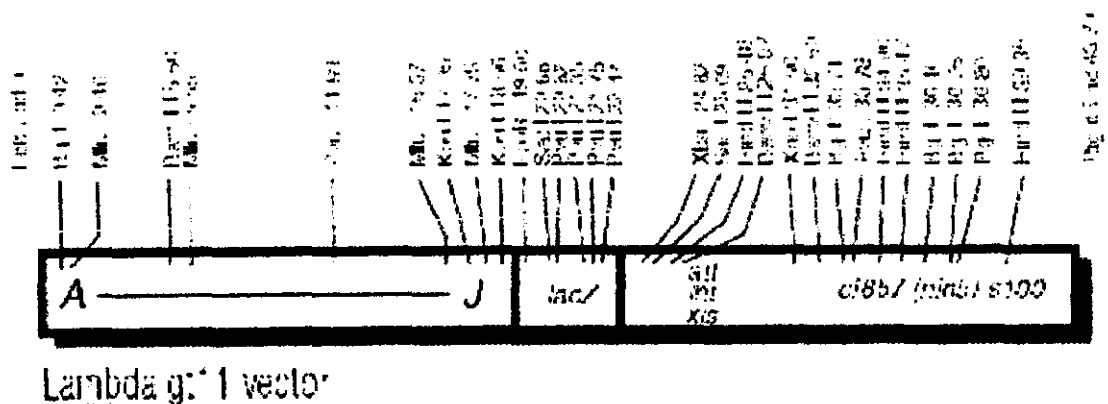


Fig MM 1 . Mapa del vector lambda gt11.

Se hicieron dos escrutinios. Se inoculó 50 mL de medio LB (Apéndice A) suplementado con maltosa 0.2% y  $\text{MgSO}_4$  10 mM sin antibiótico, con una colonia de *E coli* cepa Y1090 (células hospederas). Se incubó con agitación toda la noche a 37°C.

Las células se centrifugaron a 2000 rpm por 10 min, se eliminó el medio que quedó como sobrenadante y el botón se resuspendió cuidadosamente en 15 mL 15 mM  $\text{MgSO}_4$ . La suspensión de células se diluyó con esta misma solución hasta tener una densidad óptica de 0.5 a 600nm

#### 2.1.3.1. Titulación del Banco de cDNA

Se hicieron diluciones seriadas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ) de la suspensión de bacteriófagos en el amortiguador SM (Apéndice A). Se agregó 1  $\mu\text{L}$  de la suspensión de fagos a 200  $\mu\text{L}$  de células hospederas sensibilizadas diluidas en  $\text{MgSO}_4$  15 mM, con la finalidad de permitir la entrada de los fagos a las bacterias. Esta mezcla se incubó con agitación suave durante 20 min a 37°C y el volumen completo se pasó al centro de una caja y petri con agar LB y se distribuyó homogéneamente con 3.5 mL de agar suave (Apéndice A) a 48°C después de 6 horas de incubación a 37 °C se contaron las placas de lisis y se determinó el título del banco que fue de  $5 \times 10^6$  pfu/mL.

#### 2.1.3.2. Escrutinio del banco de cDNA.

Para esto se tomaron aproximadamente  $6 \times 10^5$  pfu del banco de cDNA distribuidos de tal manera que se mezclaran alrededor de 50 000 pfu con 600  $\mu\text{L}$  de suspensión de células ajustadas a una densidad óptica de 0.5. Se incubaron los tubos que contenían los fagos y las células hospederas durante

20 min a 37°C y se plaquearon 600 µL de esta suspensión mezclada con 8 mL de agar suave que estaba a una temperatura de aproximadamente 48°C, en cajas de 140 mm de diámetro con agar LB.

Las cajas petri se incubaron durante 6 horas o hasta que las placas de lisis fueron visibles y confluentes. Se pusieron 2 horas sobre hielo, para evitar que los filtros de nylon se adhieran a la placa de agar. La membrana de nylon, que era del mismo tamaño que la caja petri, se sumergió en agua estéril y después se puso en contacto con el agar en la caja petri durante 2 min marcado la orientación tanto en cajas como en los filtros. En cajas las marcas asimétricas se hacen perforando la membrana con una aguja, y las cajas se marcan con marcador indeleble, después de la transferencia el filtro se sumergió en una solución NaCl (1.5 M) y NaOH (0.5 M) durante 2 min, se neutralizó durante 5 min en una solución NaCl (1.5 M) y Tris-HCl (0.5 M pH 8), se lava por 30 seg. en Tris.HCl 0.2 M (pH 7.5) y SSC 2X (Apéndice A). Los filtros se secaron sobre papel 3MM y el DNA se entrecruzó covalentemente con luz UV (254 nm) con una dosis de 0.12 julios (XL-1000UV Crosslinker SPECTROLINKER<sup>MR</sup>, Spretconics Corp.) durante 90 s.

Las placas de agar con las placas de lisis se guardaron a 4 °C.

#### 2.1.3.3. Hibridación

Los filtros se prehibridaron durante una hora a 68°C en una solución de hibridación (Apéndice A) y en esta misma solución se puso la sonda previamente desnaturalizada a 100°C durante 5 min. La hibridación se realizó durante 18 horas y los lavados se hicieron con una solución con SDS 0.1 % y

con SSC 0.1 X. Los filtros se expusieron por 48 horas frente a una película de rayos X a  $-70^{\circ}\text{C}$

Una vez revelada la placa radiográfica se alinearon con las cajas de agar para identificar las placas positivas, se cortó el agar que contenía las placas positivas con la parte ancha de una punta de micropipeta de  $200\ \mu\text{L}$  y se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se les adicionó 1 mL de amortiguador SM. Para extraer a los bacteriofagos se añadió al tubo  $30\ \mu\text{L}$  de cloroformo se agitó en vortex por 30 seg, se incubó 10 min. a temperatura ambiente posteriormente se centrifugó a 2000 rpm y se tomó el sobrenadante. Con esta nueva suspensión de fagos se hicieron diluciones seriadas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ) en amortiguador SM y se infectaron  $190\ \mu\text{L}$  de células hospederas y cada dilución se distribuyó como se describió anteriormente en cajas petri de 100 mm de diámetro, éste fue el segundo escrutinio ( Fig MM2).

#### 2.1.4. Escrutinio por PCR de las clonas positivas.

Usando como molde las suspensiones de fagos obtenidas en el segundo escrutinio se amplificó por PCR ( $95^{\circ}\text{C}$  3 min 1 ciclo;  $95^{\circ}\text{C}$  1 min,  $60^{\circ}\text{C}$  45 seg,  $72^{\circ}\text{C}$  1:45 seg durante 30 ciclos y  $72^{\circ}\text{C}$  7 min 1 ciclo.,  $\text{MgCl}_2$  2.5 mM, amortiguador para PCR 1X, dNTPs 0.2, oligos  $1\ \mu\text{M}$ , Taq polimerasa  $5\text{U}/\mu\text{L}$ ,  $2\ \mu\text{L}$  de suspensión de fagos) el inserto contenido en estos usando los oligonucléotidos  $\lambda\text{gt}11\text{F}$  y  $\lambda\text{gt}11\text{R}$  (Apéndice B), que flanquean el sitio de clonación en el vector (Fig.MM 2). Los productos de PCR resultantes se corrieron en un gel de agarosa al 1.2%, el DNA se transfirió a una membrana de nylon y se hibridó con las mismas condiciones que los filtros anteriores y con la misma sonda.

### 2.1.5. Obtención de la clona de cDNA PR413a

El producto de PCR amplificado con los oligonucleótidos  $\lambda$ gt11R y  $\lambda$ gt11F (FIG 1MM) se cortó con *EcoR1* al igual que el vector de clonación PKS-Bluescript, éste se desfosforiló en una reacción de 50  $\mu$ L de amortiguador para desfosforilación 1X (Apéndice A), 2 unidades de fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP) y se llevó al volumen con el amortiguador de dilución (Apéndice A), se incubó por 60 min a 37 °C y se purificó con una extracción de FCI. El DNA se precipitó con dos volúmenes de isopropanol durante 20 min a -20 °C y se centrifugó a 12000 rpm por 15 min, el precipitado se recuperó y se lavó con dos y medio volúmenes de etanol al 70 %.

Posteriormente, 1  $\mu$ g del DNA del vector se ligó con 1  $\mu$ g del DNA del inserto en presencia de 2 unidades de la DNA ligasa T4 y amortiguador para ligación 1 X (Apéndice A) en un volumen final de 10 $\mu$ L. El tubo se incubó toda la noche a 14°C (Sambrook *et al* 1989).

#### 2.1.5.1. Células competentes (Inoue,H *et al*, 1990).

La cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  se creció durante toda la noche a 37 °C en medio LB, se tomó una alícuota y se creció en 25 mL de medio SOB (Apéndice A) a 18 °C hasta llegar a una densidad óptica de 0.6 a 600 nm, se incubó en hielo por 10 min, se centrifugó a 5000 rpm por 10 min, se resuspendió cuidadosamente en 8 mL de solución TB (Apéndice A) fría se agregó dimetilsulfoxido (DMSO) a una concentración final de 7%, se mantuvo en hielo por 10 min y se hicieron alícuotas de 200  $\mu$ L en tubos eppendorf de 1.5 mL que se almacenaron a -70°C.

### 2.1.5.2. Transformación

A las células competentes se les agregó 5  $\mu$ L de la reacción de ligación y se agitaron suavemente con la punta de la pipeta, se incubaron en hielo por 30 min exactamente y se les dió un choque térmico durante 30 seg. a 42 °C, las células se colocaron en hielo por 2 min y se les agregó 400  $\mu$ L de medio SOC los tubos se agitaron a 225 rpm a 37 °C durante una hora, se plaquearon 50  $\mu$ L y 200  $\mu$ L en cajas petri con agar LB y 50  $\mu$ g/mL de ampicilina, 100  $\mu$ L de isopropil  $\beta$  -D-tiogalactósido (IPTG) 100mM, 20  $\mu$ L de 5-bromo 5 -cloro-3 indolil- $\beta$ -D-tiogalactósido (X Gal) 50 mg /mL. Se incubaron por 18 horas a 37 °C, después de este tiempo las cajas se mantuvieron a 4°C durante todo el día para permitir el desarrollo del color azul en las colonias no recombinantes. Las colonias positivas se seleccionaron y se inocularon en 3 mL de medio LB suplementado con ampicilina 50  $\mu$ g/mL, se incubaron toda la noche con agitación a 37 °C (Stratagene) y se extrajo el DNA plasmídico, como se describió en la sección 2.1.1.1

### 2.1.6. Obtención de la clona de cDNA PR25

#### 2.1.6.1. Amplificación de cDNA por PCR

Se realizó una reacción de PCR utilizando como molde un cDNA obtenido de una reacción de Transcriptasa Reversa (RT) a partir de RNA de 24 horas de germinación en presencia de giberelina, y los siguientes reactivos y condiciones:  $MgCl_2$  2.0 mM, Buffer 1X, dNTPs 0.2, oligonucleótido rpa5 (Apéndice B), 0.5  $\mu$ M y oligonucleótido rpa2 (Apéndice B), 0.25 mM , Taq

polimerasa 5U/ $\mu$ L. 95°C 3 min un ciclo, 95°C 1min, 58°C 0.45min 72°C 1.45 min 35 ciclos, 72°C 10 min un ciclo 8 (Fig MM2).

#### 2.1.6.2. Subclonación en el vector pGEM-T Easy

El cDNA obtenido (120 ng) de una reacción de PCR se utilizaron para ligarse con 50 ng del vector pGEM-T Easy<sup>MR</sup> de Promega (Fig MM2) , requiriendo para esto 5  $\mu$ L del amortiguador de ligación rápida para la T4 DNA ligasa, 3 unidades de DNA ligasa T4 en un volumen final de 10  $\mu$ L, la reacción se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas y después se hizo la transformación, como se describió en la sección 2.1.5.2.(Fig MM2).

#### 2.1.7. Secuenciación de DNA.

Todas las secuencias reportadas en este trabajo se realizaron en un secuenciador automatico Abi Prism, modelo 3100 con edición manual de los electroforegramas (Fig MM2)

#### 2.1.8. Análisis de la secuencia.

Se analizó la secuencia utilizando los programas:

NPS@ Multalin multiple alignment

([http://pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa-automat.pl?page=npsa\\_multalin.html](http://pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa-automat.pl?page=npsa_multalin.html))

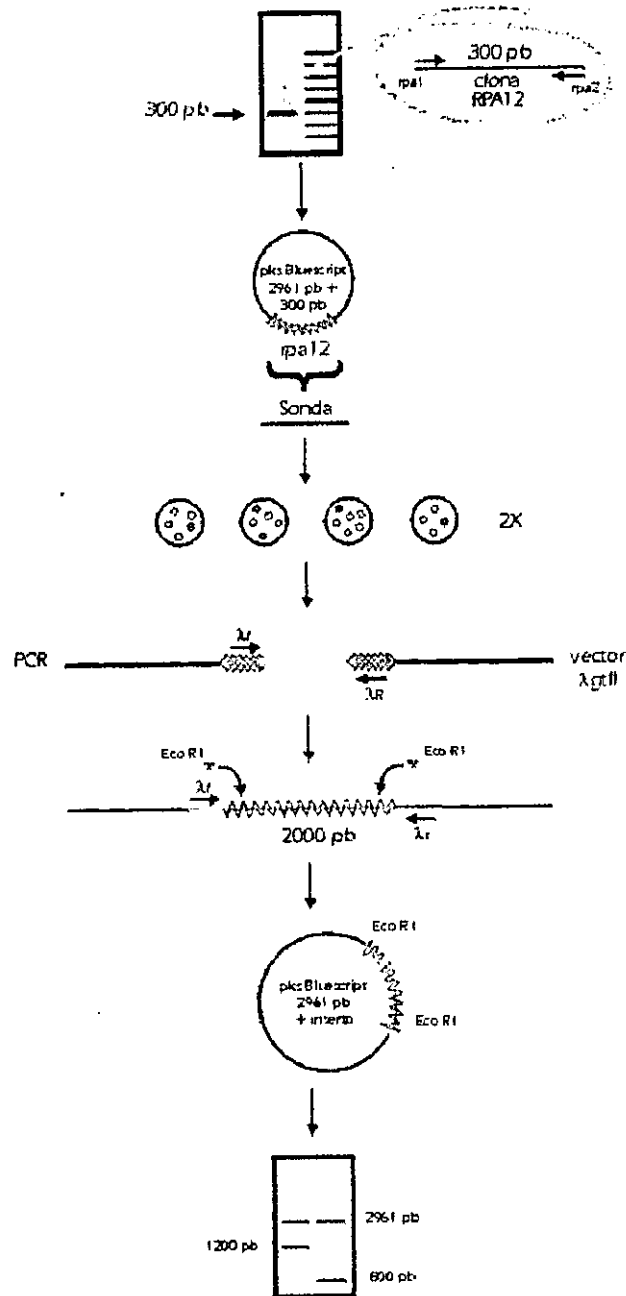
Search Launcher query sequence:

(<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu:9331/multi-align.html>)

General help for ClustalW

(<http://ubik.microbiol.washington.edu/clustalW/help1.html>)

Estrategia para la donación  
del cDNA de RPA1 de *Zea mays*





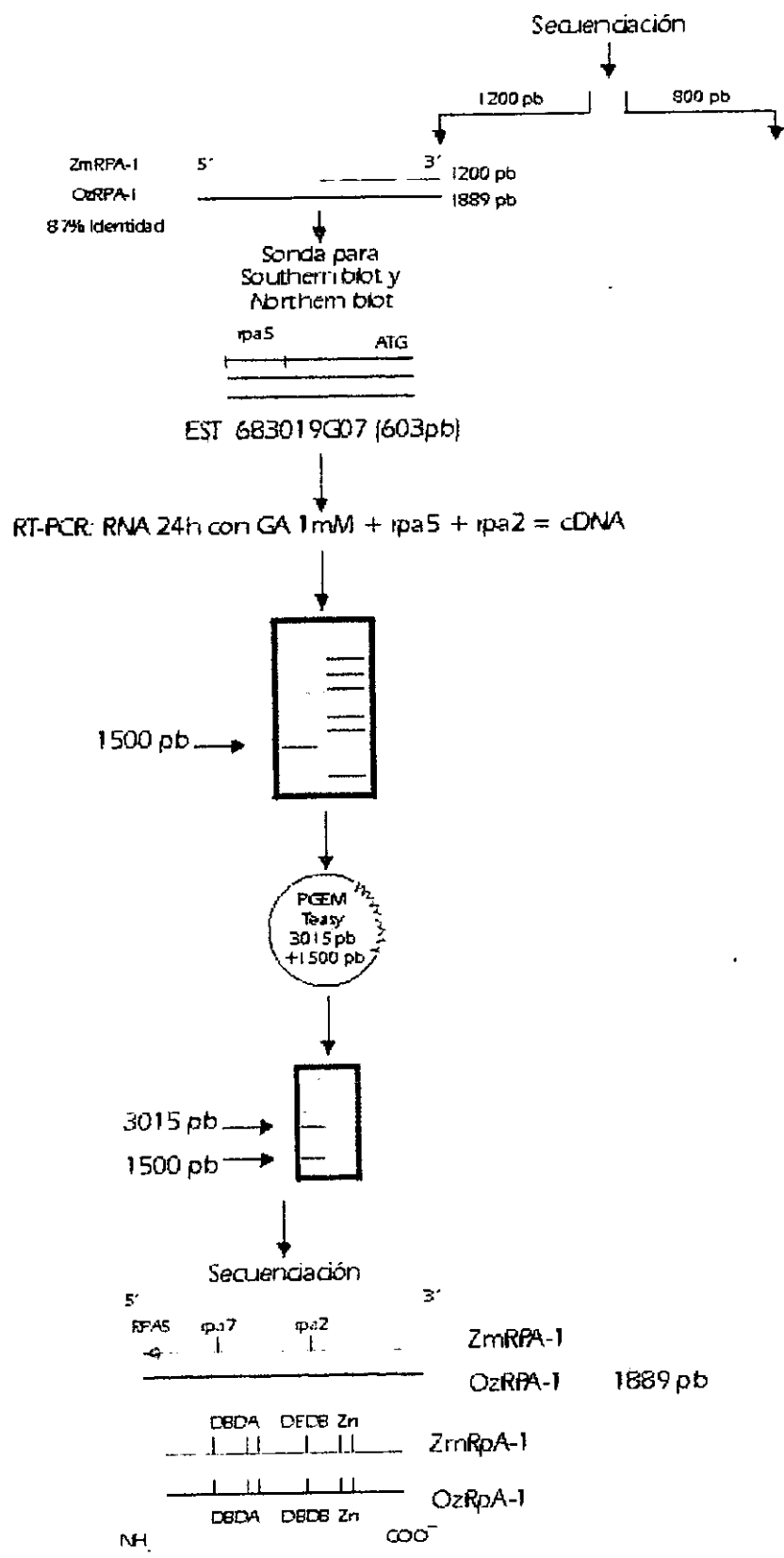


Fig MM2

## 2.2. Determinación del número de genes de RPA-1 de maíz ( De la porta et al 1983)

### 2.2.1. Extracción de DNA genómico

Se trituraron 0.15 g de ejes embrionarios con nitrógeno líquido, hasta obtener un polvo muy fino, se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se le agregó 1.0 mL de amortiguador de extracción (Apéndice A), 1.5  $\mu$ L de  $\beta$ -Mercaptoetanol y 60 $\mu$ L de SDS al 20%. El tubo se agitó hasta tener el polvo bien resuspendido en el amortiguador.

La suspensión se incubó por 10 min. a 65°C se le agregaron 400  $\mu$ L de acetato de potasio 3M (pH5.0) y se incubó en hielo por 30 min. Posteriormente se centrifugó dos veces por 10 min a 14000 g en un rotor de ángulo fijo (centrifuga MR 1812, rotor 100.4 jouan).

El sobrenadante se decantó en un tubo corex y se le agregó un volumen igual de isopropanol frío, se mezcló suavemente por inversión y se incubó a -20°C por lo menos 30 min.

El precipitado blanco formado se colectó con la punta de una pipeta Pasteur doblada en forma de gancho y se lavó varias veces con etanol al 70% sumergiéndolo varias veces

El precipitado se transfirió a un tubo eppendorf que contenía 500 $\mu$ L de agua estéril para disolverlo.

### 2.2.2. Calidad y cuantificación del DNA

Para evaluar la calidad del DNA genómico se corrió una alícuota en un gel de agarosa al 1 % en TAE 1X (Apéndice A) y bromuro de etidio (0.5 µg /mL)

La cantidad de DNA se determinó con un espectrofotometro shimadzu UV160U a una longitud de onda de 260 nm y relacionando la lectura de absorbancia con concentración partiendo de que una unidad de absorbancia equivale a una concentración de DNA de 50µg/mL.

### 2.2.3. Digestión del DNA genómico con enzimas de restricción.

Se digirieron 30 µg de DNA genómico con 50 U de cada una de las siguientes enzimas de restricción *Eco RI*, *HindIII* *XbaI* y *SstI* GIBCO 5 µL de amortiguador 10 X para enzimas de restricción en un volumen total de 50 µL, se incubó a 37°C durante 2 horas.

### 2.2.4. Southern blot

La electroforesis y el montaje de la electroforesis se llevó acabo según Ausubel *et al*, (1992).

A cada una de las reacciones de digestión se les agregó 6.66 µL de amortiguador de carga para DNA (Apéndice A) y se corrieron en un gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio (0.5 µg /mL) a 84 V durante 5 horas. Antes de transferir el gel fue tratado con las siguientes soluciones:

HCl (0.25 M) por 15 min dos veces, NaCl (1.5 M) / NaOH (0.5 M) por 15 min dos veces, NaCl (1.5) / Tris- HCl (1 M pH 8.0) por 20 min y finalmente con SSC

10X por 20 min. Las incubaciones se realizaron siempre con agitación suave y a temperatura ambiente.

#### 2.2.4.1. Transferencia por capilaridad

El gel se colocó sobre papel filtro 3 MM que tenía contacto con una solución 10X de SSC. Este papel está apoyado en una superficie plana sobre el gel de agarosa. Se colocó la membrana de nylon Hybond<sup>MR</sup>-N+ cortada del mismo tamaño que el gel, se eliminaron las burbujas de aire atrapadas entre la membrana y el gel rodando un tubo por encima de ambos. Se colocaron tres papeles filtro 3MM y sobre estos papel absorbente cortado del mismo tamaño que el gel formando una pila de unos 7 cm. Sobre todo esto se colocó un peso de aproximadamente ¼ de Kg y se dejó transferir por 16 horas.

El filtro de nylon se lavó con 1 X SSC con el fin de eliminar los residuos de agarosa. Finalmente el DNA se fijó covalentemente al filtro de la misma manera que se describe en la sección 2.1.3.2.

#### 2.2.4.2. Hibridación

Se utilizó como sonda 700 ng del fragmento clonado de 1203 pb de RPA de maíz (clona PR413A), este DNA se marcó radiactivamente como se indicó en la sección 2.1.2.

Se hibridó con una solución: SSC (6X), SDS (0.5%), DNA de esperma de salmón 1% y solución Denhart (5X) en un volumen total de 5 mL. La hibridación fue durante 18 horas, se lavó con SDS 0.1% y con SSC 0.1X, Se expuso 48 horas a una película de rayos X a -70 °C

## 2.3. Ensayos de Expresión

### 2.3.1. Tratamiento con giberelina.

Se pusieron a imbibir 40 ejes embrionarios en cajas petri de plástico en medio MS (Murashige and Skoog , mezcla de sales) y en presencia y ausencia de 1  $\mu$ M giberelina, durante 12, 24 y 48 horas, el medio MS, se esterilizó y se agregó la giberelina cuando el medio tuvo una temperatura de 48°C

### 2.3.2. Extracción de RNA de ejes embrionarios de maíz, para 100 mg de tejido. (Sanjuan, 2001)

Se utilizó el reactivo TRIzol <sup>MR</sup> (GIBCO-BRL) siguiendo el protocolo del fabricante con ciertas modificaciones.

Se molieron los ejes embrionarios en un mortero con nitrógeno líquido hasta tener un polvo muy fino y se le agregó 1 mL de TRIzol <sup>MR</sup> y se homogeneizó, se agregó 10  $\mu$ L de DEPC <sup>MR</sup> se agitó y se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL.

El homogenado se incubó por 2.5 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 rpm por 10 min a 4 °C, el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio, se adicionó 0.2 mL de cloroformo, las muestras se agitaron vigorosamente por 15 seg, se centrifugó a 8500 rpm por 15 min a 4 °C la fase acuosa se transfirió a un tubo limpio y se añadió 0.5 mL de isopropanol, se incubó por 10 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 8350 rpm por 10 min a 4 °C y se eliminó el sobrenadante .

El RNA se lavó con 1 mL de etanol al 75% y se agitó por inversión por 15 seg, se centrifugó a 6400 rpm por 5 min a 4 °C se eliminó perfectamente el

etanol por decantación y secado del RNA con aire caliente. El RNA se disolvió en 100  $\mu\text{L}$  de agua tratada con DEPC (Dietil pirocarbonato, 90  $\mu\text{L}$  por cada 100 mL de agua) (Sanjuan,2001).

La cantidad de RNA cargada se calibró en un gel de agarosa al 1% y se hizo una reacción de RT PCR ( reverse transcriptase- Polymerase chain reaction) utilizando el kit de Gibco BRL<sup>MR</sup> donde se puso 500 ng de RNA de diferentes tiempos y condiciones, 2.5  $\mu\text{M}$  del oligo rpa2, y agua hasta completar 9  $\mu\text{L}$ , éste se calentó a 70 °C durante 10 min , se enfrió en hielo y se agregaron, 0.01 M de DTT, 1X del “amortiguador para síntesis de cadena sencilla” (Apéndice A ) y 0.5 mM de cada desoxinucleótido, esto se incubó por 2 horas a 42 °C y se le agregó 200 U de de la enzima transcriptasa reversa (Gibco BRL<sup>MR</sup>), se incubó por 60 min a 42 °C y se detuvo la reacción aumentando la temperatura a 70°C durante 15 min.

La reacción de PCR se hizo utilizando como molde 2  $\mu\text{L}$  del cDNA obtenido, amortiguador para PCR 1 X,  $\text{MgCl}_2$  2.5 mM DNTPs 0.2 mM , rpa1 0.5 $\mu\text{M}$ , rpa2 0.25  $\mu\text{M}$  y 1 U/ $\mu\text{L}$  de Taq polimerasa en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$  y 1 ciclo a 95°C por 3 min. , 35 ciclos a 95°C por 1 min. , 56°C por 45 seg, 72°C por 40 seg, 1 ciclo a 72°C por 10 min.

### 2.3.3. Northern blot

A 20  $\mu\text{g}$  del RNA total obtenido como se describió anteriormente, se le agregó DMSO (dimetil sulfóxido) al 50%, glioxal desionizado 1M (el glioxal se pasó por una resina Bio-Rad AG501-X8, hasta que tuvo un pH mayor a 5, se hicieron alícuotas y cada alícuota se usó solo una vez), MOPS 1X y esta mezcla se llevó a 45  $\mu\text{L}$  con agua tratada con DEPC ( dietil pirocarbonato). Esto

se incubó a 50°C por una hora, se enfrió en hielo y se agregó 6 µL de amortiguador de carga para RNA (Apéndice A) las muestras se cargaron en un gel de agarosa (1.2%) de 11 x 14 cm en un volumen total de 110 mL con MOPS 1 X. El gel se corrió a 60 V a 4 °C

#### 2.3.3.1. Transferencia por capilaridad.

Una membrana de nylon cuyas dimensiones eran 0.3 mm mas cortos por cada lado que el gel se sumergió durante 5 min. en una solución SSC 10 X. El gel se colocó sobre papel filtro 3 MM que tenía contacto con una solución 10X de SSC, este papel esta apoyado en una superficie plana. Sobre el gel de agarosa se colocó la membrana de nylon Hybond<sup>MR</sup>-N+ cortada del mismo tamaño que el gel, se eliminaron las burbujas de aire atrapadas entre la membrana y el gel rodando un tubo por encima de ambos, se colocaron tres papeles filtro 3MM y sobre estos papel absorbente cortado del mismo tamaño que el gel formando una pila de unos 7 cm, encima de todo se colocó un peso de aproximadamente ¼ de Kg y se dejó transferir por 16 horas.

Una vez desmontada la transferencia la membrana se sumergió durante 10 min en SSC 1X, se secó con aire caliente y se fijó con UV, de la misma manera que como se describió en la sección 2.2.4.1. El filtro se expuso durante 15 días a una película de rayos X a -70 °C.

#### 2.3.3.2. Hibridación

La membrana se prehibridó durante 2 horas a 68°C con 15 mL de amortiguador de fosfatos (0.5 M), albúmina (1%), EDTA (1mM pH8) y SDS (7%). La hibridación se hizo en la misma solución por 18 horas La sonda se

extrajo y se marcó como se describió en la sección 2.1.2. Se hicieron 2 lavados de 15 min. cada uno a 68°C con una solución SSC 2 X y SDS 0.1% y dos de 5 min. con una solución SSC 0.1 X y SDS 0.1% (Sanjuan, 2001).



## Resultados.

### 3.1 Aislamiento de una clona de cDNA de RPA-1 a partir de un banco de cDNA de maíz

Se realizó el escrutinio de aproximadamente  $6 \times 10^5$  unidades formadoras de placas de lisis (pfus) de un banco de cDNA de maíz utilizando el inserto RPA12 como sonda en el primer escrutinio se encontraron 6 posibles placas de lisis positivas que se llamaron F1.1, F2.1, F4.1, F5.1, F8.1 y F9.1. Estas suspensiones de fagos se reamplificaron, se analizaron individualmente a una dilución mayor en un segundo escrutinio. Todas resultaron positivas y se seleccionaron dos placas de lisis por caja: F1.1, F1.2, F2.1, F2.2, F4.1, F4.2, F5.1, F5.2, F8.1, F8.2, F9.1, F9.2. En la figura R1 se muestra una placa de rayos X con el resultado de este segundo escrutinio.

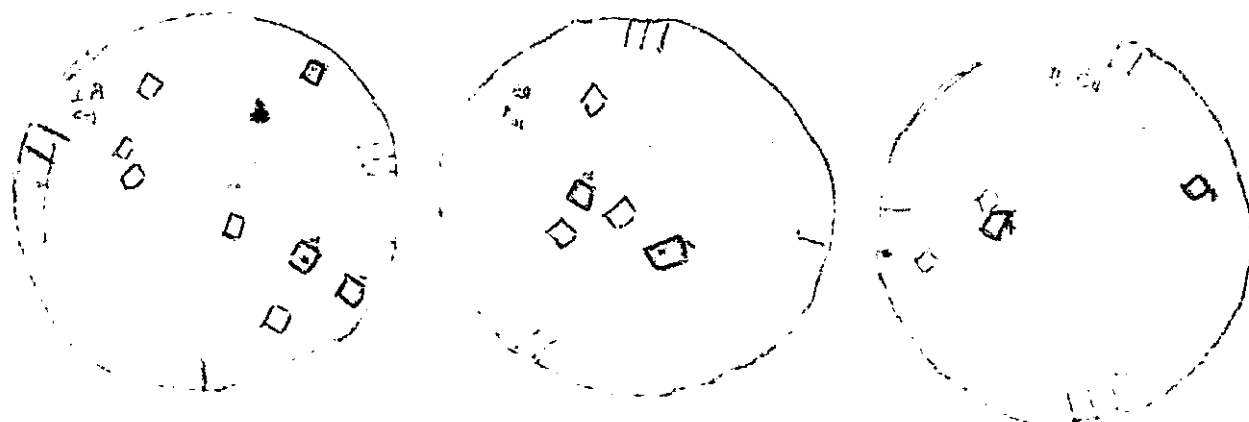


Fig.R1 Identificación de placas de lisis positivas por hibridación con el DNA RPA12 obtenidas en el segundo escrutinio del banco de cDNA de tallo y raíz de plántulas etioladas de maíz de dos semanas.

Con el propósito de conocer cual de estas clonas contenía el inserto de mayor tamaño, se utilizó la suspensión de fagos de cada clona para amplificar por PCR el inserto contenido usando los oligonucleótidos  $\lambda$ gt11 F y  $\lambda$ gt11R que se alinean con los extremos que flanquean el sitio de clonación del vector (Apéndice B). A partir de todas

las suspensiones de fagos se obtuvieron fragmentos de DNA desde 300 pb hasta 2000 pb indicando que las clonas no estaban puras es decir en cada suspensión de fagos se encontraban más de una clona (Fig.R2).

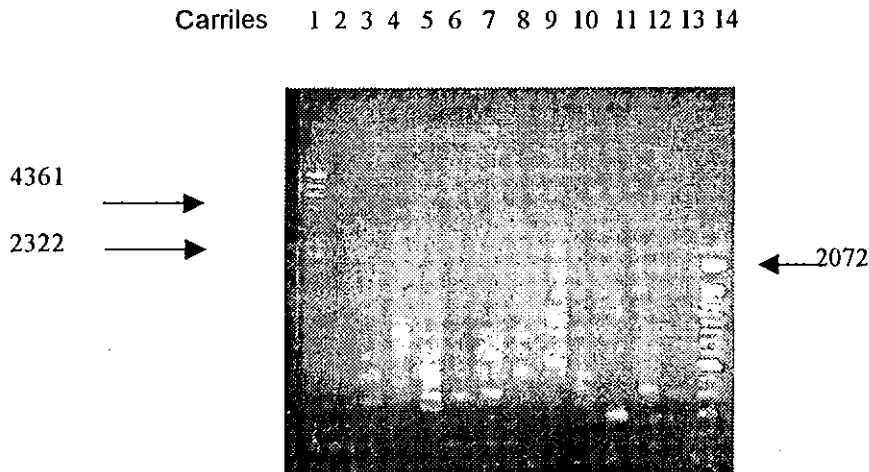


Fig.R2 Gel de agarosa cargado con los productos de PCR obtenidos con los oligonucleótidos  $\lambda$ gt11F y  $\lambda$ gt11R a partir de las diferentes suspensiones de fagos obtenidas: carril 1, marcadores de tamaño, DNA de  $\lambda$  digerido con Hind III. , carril 2 clona 1.1 carril 3 clona 1.2, carril 4 clona 2.1, carril 5 clona 2.2, carril 6 clona 4.1, carril 7 clona 4.2, carril 8 clona 5.1 carril 9 5.2, carril 10 clona 8.1, carril 11 clona 8.2 carril 12 clona 9.1, carril 13 clona 9.2 y carril 14 marcadores de peso molecular (escalera de 100 pb)

El DNA se transfirió a una membrana de nylon que se hibridó con la sonda RPA12 para identificar las clonas con el inserto de mayor tamaño. La autoradiografía (Fig. R3) muestra que las clonas F4.1, F5.2, F8.1, y F8.2 contenían un fragmento de aproximadamente 2000 pb.

Carriles 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

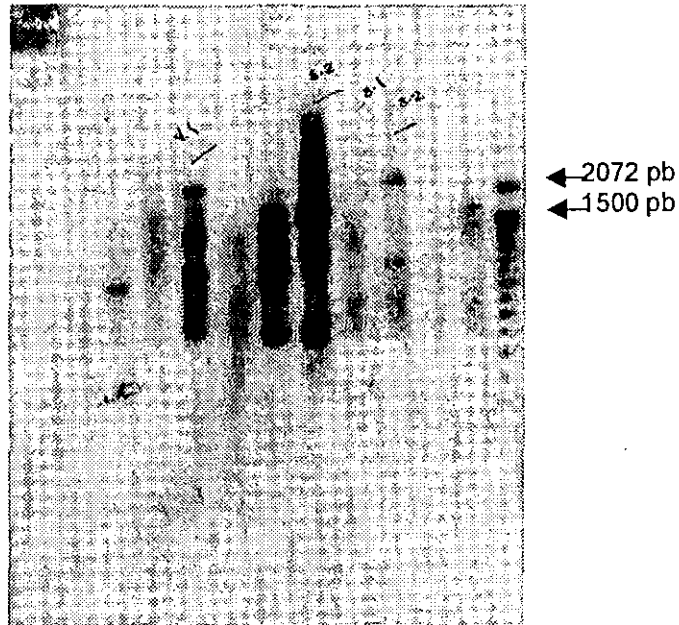


Fig.R3 Southern blot de las diferentes suspensiones de fagos obtenidas. El orden de cargado se indica en la figura 3.

Las suspensiones de fagos correspondientes a las clonas F4.1, F5.1 F8.1 y F8.2 se amplificaron y se plaquearon a distintas diluciones con el fin de obtener de placas de lisis aisladas. La selección de las placas positivas se realizó por PCR usando los oligonucleótidos rpa1 y rpa2, en busca de un fragmento de DNA de 195 pb (Fig. R4).

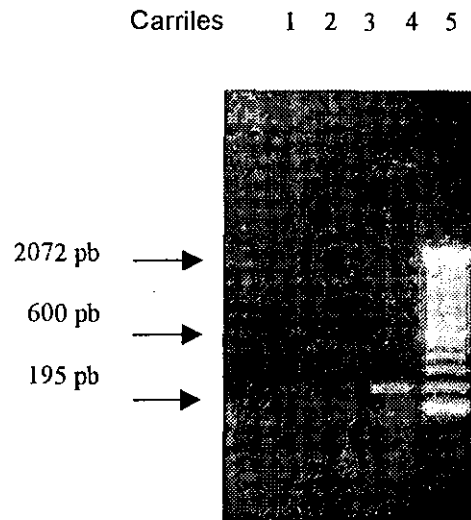


Fig.R4 carril 2 y 4 producto de PCR con oligonucleótidos rpa1 y rpa2, usando como molde suspensión de fagos de las placas de lisis seleccionadas como positivas. Carril 1 y 3 amplificación a partir de suspensión de fagos negativas, carril 5 marcadores de pesos moleculares (escalera de 100 pb).

La suspensión de fagos obtenida de la amplificación de F4.1, era una placa aislada que contenía a RPA-1 de maíz, esta suspensión se reamplificó y las suspensiones resultantes, se utilizaron como molde para amplificar por PCR utilizando los oligonucleótidos  $\lambda$ gt11F y  $\lambda$ GT11R. Así se amplificó una sola banda de aproximadamente 2000 pb (Fig.R5.).

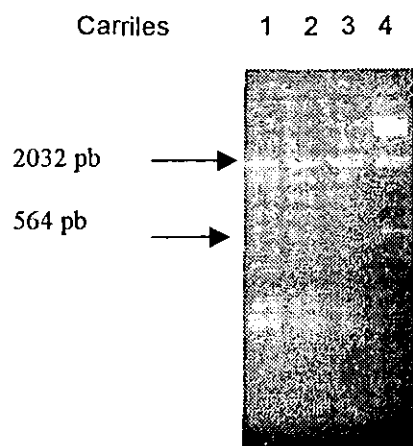


Fig R5 Amplificación del inserto de cDNA de la clona 4.1.13 con los oligonucleótidos flanqueantes del vector  $\lambda$ gt11. Se obtuvo un fragmento de DNA de 2000 pb. Carriles 1, 2, 3, fragmento amplificado; carril 4, marcador de peso molecular  $\lambda$  Hind III.

Para confirmar la identidad de la clona se amplificó por PCR un fragmento de 195 pb utilizando los oligos específicos, rpa1 y rpa2 (datos no mostrados)

### 3.1.1 Clonación del inserto de DNA en el plásmido pKS Bluescript

El fragmento de DNA amplificado se purificó de gel y se digirió con la enzima de restricción *Eco RI* con la finalidad de generar extremos cohesivos para subclonar en un vector plasmídico, ya que el banco de cDNA se construyó en este sitio de clonación.

El producto de la digestión se corrió en un gel de agarosa al 1% y se observó que se obtuvieron dos fragmentos de DNA, uno de 1200 y la otra de aproximadamente 800 pb, lo que indicó que había un sitio interno de *Eco RI* en el cDNA aislado.

Ambos fragmentos se clonaron en pKS Bluescript y se obtuvieron las clonas PR4113A y PR4113B (Fig.R6). Estas clonas fueron purificadas para su posterior secuenciación.

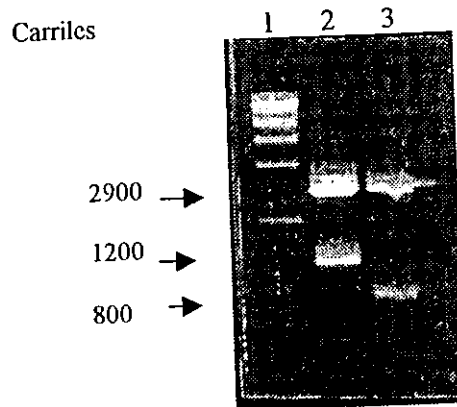


Fig R6 Clonación en pKS Bluescript de los fragmentos de DNA Se purificó DNA y se digirió con *Eco RI*. Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 DNA de la clona PR4113A digerido con *Eco RI*, carril 3 DNA de la clona PR4113B digerida con *Eco RI*.

Al analizar la secuencia (1203 pb) del inserto de la clona PR4113A se encontró una identidad del 84% (511 de 611 pb) con la secuencia correspondiente a la región 3' del cDNA de la RPA1 para arroz, se localizaron las secuencias de los oligonucleótidos rpa1 y rpa2 así como la secuencia EST de donde se diseñaron éstos. En el extremo 3' del cDNA se identificó una región rica en adeninas, probablemente la región de poliadenilación y unas señales hipotéticas: CAYTG (donde Y puede ser C o T) y AATTAAG de poliadenilación (Joshi, 1987). Se identificó un codón de término, TGA y a partir de éste una región 3' no traducida de 219 pb (Fig.R7).

0001. TACAACCTTGTC AAGATTGATCAGCTAGGATCGTATGTCGGTGGCAG  
 0048. GGAGCTTGTAGATATTGTTGGTGTGGTTCAGAGCGTATCTCCCACAC  
 0095. TCAGTGTTAGGAGAAAGATTGACAACGAGACAATACCGAAGCGTGAC  
 0142. ATTGTTGTGGCGGATGACTCTGGCAAACCTGTTAGCATCTCTCTTTG  
 0189. GAATGATCTTGCTACTACGACCGGCCAAGAGCTTTTGAACATGGCTG  
 0236. ACAGTTCGCCTGTTGTTGCGATAAAGAGCCTAAAAGTGTCTGACTTC  
 0283. CAAGGCGTGTCTCTTTCTACTGTAGGCAAAGTACTCTTGCGATTAA  
 0330. TCCTGATCTACACGAGGCTCAGAATCTCAAATCATGGTATGACTCT  
 0337. GAAGGCAAAGATACTTCGCTGGCACCAATTGGTGCAGAAATGGGTGC  
 0424. CGCACGGGCTGGTGGTTTCAAGTCCATCTATTCTGATAGATTTTCTC  
 0471. TGTCTCAGATCAGAACTGATCTCTCCATCTGCGCAGGATTTCTCTTT  
 0518. TTCTTCACTTTCTATCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT  
 0565. CATCTCGTACCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTGAAA  
 0612. CTTTTGGATCTGGATACTGGTGTGAGGGATGCCAAAAGAATGACTCG  
 0659. GAATGCTCACTGAGATACATCATGGTCATCAAGGTCTCCGATCCTAC  
 0706. TGGCGAGGCATGGTTCTCTGTGTTCAACGAGCATGCAGAGAAGATCA  
 0753. TTGGCTGCAGCGCCGACGAGCTTGATCGGATCAGGAAAGAGGAGGGG  
 0800. GACGACAGTTATGTTCTGAAGCTCAAGGAAGCCACCTGGGTTCTCA  
 0847. CCTGTTCCGCGTCAGCGTCACACAGCATGAATACAATAACGAGAAAA  
 0894. GGCAGAGAATCACTGTGAGGAGTGAAGCGCCGGTTCGAGCACGCAGCT  
 0941. GAATCCAAGTACCTGCTTGAACAGATAGCGAAGCTTACTGCTTGATA  
 0988. GTAGAAGATGCAACCTTACTGCAAATAGCGAGGATTATTAGGACTAA  
 1035. TTGATGGTGTCAAGGT**CATTG**CGGCCCTAAGCTTTAGCTATGTATCAG  
 1082. CAGTCAGATGTATTAACCATTCCTGCTCTAATAGTCATCTATCAGC  
 1129. AGTCAGATGTATTTAACCATTCCTGCTT**AATAG**CTCTCTACCAGGA  
 1176. GTCGGAAGTTTTTAAAC**AAAAAAAAAAAAA**.

**Fig.R7** Secuencia del fragmento de 1203 pb contenido en la clona PR4113A y su análisis: 84% de identidad con la secuencia reportada para RPA1 de arroz, codón de término, 219 bases que conforman la región 3' UTR, hipotéticas secuencias de poliadenilación, región de poli A, secuencia de 12 rpa y oligos 1rpa y 2rpa.

Al traducir esta secuencia de cDNA en un marco de lectura que no genera múltiples señales de terminación, se obtuvo una secuencia de 300 aminoácidos con una alta identidad (83%) al extremo carboxilo de RPA1 de arroz.

El inserto de la clona PR4113B de 800 pb, se secuenció y su análisis mostró que correspondía al gen de RNA ribosomal 18 S de maíz. Esto significa que la clona de 2000 pb aislada estaba construida por una secuencia RNAr y una secuencia RNAm

de RPA. Para corroborar esto se secuenció directamente la clona en lambda 4.1.13 con el oligonucleótido  $\lambda$ gt11R y se obtuvo la secuencia del RNA ribosomal.

Para identificar el extremo 5' del cDNA de RPA-1 de maíz se consultó el banco de datos del proyecto de secuencias expresadas de maíz (<http://gremlin3.zool.iastate.edu/zmdb/EST/>) donde se encontró una secuencia de un EST( 683019G07.x1) de 603 pb que correspondía a la región 5' de RPA de maíz y que en comparación con la secuencia de RPA-1 de arroz que contenía un codón de inicio hipotético y a partir de esta secuencia se diseñó el oligonucleótido rpa5 (Fig.R8).





y como oligonucleótido sentido a rpa5. Los productos de amplificación se analizaron en un gel de agarosa (Fig R9).

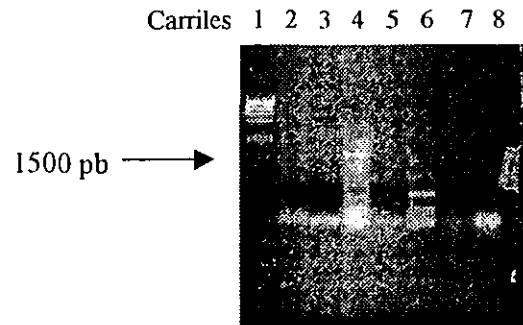


Fig.R9 RT-PCR de diferentes tejidos de maíz: carril 2 12 horas germinación, carril 3, 4 y 5 12, 24 y 48 horas germinación, respectivamente, en presencia de  $1\mu\text{M}$  de giberelina, carril 6 hoja, carril 7 tallo carril 8 raíz, carril 1 marcadores de tamaño (DNA  $\lambda$ -Hind III)

Cuando se empleó RNA de ejes embrionarios germinados por 24 horas en presencia de giberelina se amplificó un fragmento de DNA de aproximadamente 1500 pb (carril 4, Fig 10), cuyo tamaño es consistente con la región acotada por los oligonucleótidos tomando como referencia el cDNA de RPA-1 de arroz. La especificidad de esta amplificación se corroboró haciendo la reacción de PCR en ausencia de alguno de los oligonucleótidos y sabiendo que a partir de DNA genómico se genera una banda de 2000 pb Fig R10.

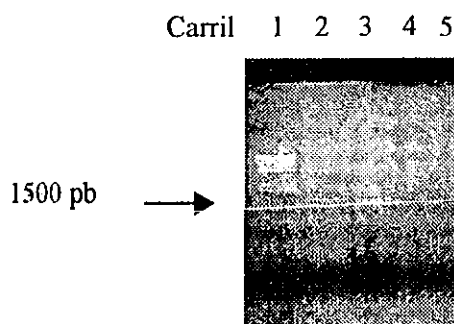


Fig R10 Amplificación de un fragmento de aprox. 1500 pb con los oligonucleótidos rpa2 y rpa5 a partir de RNA de ejes embrionarios germinados durante 24 horas en presencia de giberelina  $1\mu\text{M}$ . Control negativo en el que se incluyeron todos los componentes de la reacción menos el oligonucleótido rpa2 (carril 4 ) o el oligonucleótido rpa5 (carril 5)

El DNA (120 ng aprox.) se purificó del gel y se ligó con 50 ng de DNA del vector pGEM-T-easy de Promega y el producto de la reacción de ligación se utilizó para transformar en la cepa *E. coli DH5 $\alpha$* . Se eligieron 6 colonias transformantes y una colonia negativa y se cultivaron en medio LB en presencia de ampicilina. Se extrajo el DNA plasmídico que se digirió con *Eco RI* y posteriormente se analizó en un gel de agarosa. Resultando que tres de las seis colonias analizadas contenían un fragmento de DNA clonado y se corroboró que este contuviera la secuencia de RPA-1 al hibridar utilizando como sonda el fragmento de la clona PR4113A (Fig R11 A).

carriles 1 2 3 4



Fig. R11A. Autoradiografía de Southern blot de las clonas obtenidas. El fragmento liberado con *EcoRI* carriles 2,3,4. Producto de PCR sin clonar como control positivo, carril 1 .

Se eligió una de las colonias positivas (PR25) y se purificó DNA para secuenciar (Fig.R11B).

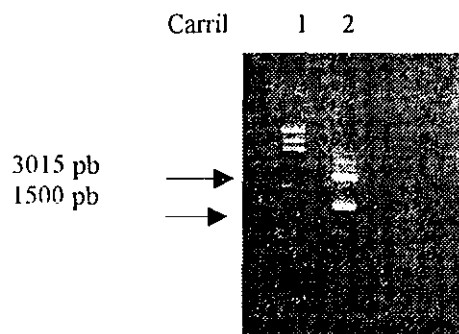


Fig R11B. Análisis de la clona PR25. Carril 1 marcadores de peso molecular (DNA  $\lambda$ - *Hind III*, carril 2 DNA de PR25 digerido con *Eco RI*)

La secuencia de 1362 pb se obtuvo utilizando los oligonucleótidos T7 y SP6 anclados en el vector y con un oligonucleótido interno (RPA-7.apéndice).

El análisis de la secuencia demostró que el extremo 5' de la clona era idéntico a la secuencia EST 683019G07.x1 de donde se diseñó el oligonucleótido RPA5 por lo que se pudieron obtener la secuencia de 667 pb hasta entonces desconocida. El resto de la secuencia resultó idéntica a la secuencia que ya se tenía de la región central del cDNA de RPA-1 de maíz. (Fig.R12) y mostró un 85% de identidad con la secuencia de cDNA de arroz. Además de identificarse el sitio de inicio de traducción, se encontró la secuencia consenso CCGCC que se ha encontrado justo antes del codón de inicio en eucariotes (Kozak, 1984).

0001. AGAAACCTTCTCGCCTCCGCGGGACGATTCGCCAGGGAGAGCAAAGGTAGCAGAGCCGCCATGGAC  
 0067. GCTGCCAAGTTGGTGACGCCGGGCGCCGTGTCCTACATCCTGGCGCACCCGTCTACGGGCTCCGAT  
 0133. GGCGCCGTGTCGGATCTCGTCGTTCCAGGTCCTCGATCTCAAGTCCATCGGCATGGGCAGCCGGTTC  
 0200. AGTTTCACGGCAACCGATGGGAACGACAAAATCAAGGCGATGCTCCCCACTTACTTTGCGTCCGAG  
 0267. GTCCACTCCGGCAATCTGAAGAATTTCCGGTCTCATCCGCATCCTCGACTACACTTGCAACTCCGTC  
 0334. AAAGGCAACGCTGACAAAGTCTGATTGTCGTCAAATGCGAGACTGTGTGCGAAGCGCTCGACGCC  
 0401. GAGATCAACGGCGAGGCCAAGAAAGAGGATCCTCCAATTGTGCTGAAGCCTAAAGACGAAGGCTCA  
 0468. GTCGTGGCTGAGGAAACAAATTCCTCCCCACTCGTGATGAAGCCTAAGCAAGAGGTGAAGTCCGCG  
 0535. TCCCAGATCGTGACTGAGCAGCGTGGAAATGCTGCTCCTGCCACGCGCCTTTCCATGACAAGGAGG  
 0602. GTCCATCCCTTGATCACTCTGAACCCCTACCAGGGTAACTGGGTCAATTAAGGTGCGGGTACAGGAC  
 0669. AAAGGCAATCTGAGAACATACAGGAATGCTCGTGGAGAAGGCTGCGTCTTCAACGTAGAGCTTACT  
 0736. GATGAGGATGGCACCCAGATCCAGGCCACCATGTTAACGAGGCTGCAAAGAAGTTCATCCGATT  
 0803. TTTGAGCTGGGAAAGGTCTATTATGTCTCAAAGGATCTCTTAGAATTGCCAACAAGCAGTTCAAG  
 0870. ACAGTCAAAAATGACTATGAGTTGTCACTAAACGAGATGCTATGTGAAGAAGCAGAGGGGAGACTT  
 0937. TCCTTCCCACAGTGAATAACAACCTTGTCAGATTGATCAGCTAGGATCGTATGTCGGTGGCAGG  
 1004. GAGCTTGATAGATATTGTTGGTGTGGTTCCAGAGCGTATCTCCACACTCAGTGTAGGAGAAAGATT  
 1071. GACAACGAGACAATACCGAAGCGTGACATTTGTTGTGGCGGATGACTCTGGCAAAACTGTTAGCATC  
 1138. TCTCTTTGGAATGATCTTGCTACTACGACCGGCCAAGAGCTTTTGAACATGGCTGACAGTTCCGCT  
 1205. GTTGTGCGATAAAGAGCCTAAAAGTGTCTGACTTCCAAGGCGTGTCTCTTTCTACTGTAGGCAAA  
 1272. AGTACTCTTGGGATTAATCCTGATCTACACGAGGCTCAGAATCTCAAATCATGGTATGACTCTGAA  
 1339. GGCAAAGATACTTCGCTGGCACCAATTGGTGCAGAAATGGGTGCCGCACGGCTGGTGGTTTCAAT  
 1406. CCATGATCTGATAGAGTTTTTCTCTCTCAACTCACAATGATCCGCCAAGGCGAGGAAAAGC  
 1473. CTGTTTTCTCTAGTTTGTATGCCACCATACCTCATCAAGCCTGACCAGAACATGTTGGTACCGTG  
 1540. CTTGCCAAGACCTGCAACAAAGAGTGAATGAAACTTTTGGATCTGGATACTGGTGTGAGGGATGCC  
 1607. AAAAGAATGACTCGGAATGCTCACTGAGATACATCATGGTCATCAAGGTCTCCGATCCTACTGGCG  
 1674. AGGCATGGTTCTCTGTGTTCAACGAGCATGCAGAGAAGATCATTGGCTGCAGCGCCGACGAGCTTG  
 1741. ATCGGATCAGGAAAGAGGAGGGGGACGACAGTTATGTTCTGAAGCTCAAGGAAGCCACCTGGGTTC  
 1808. CTCACCTGTTCCGCGTCAGCGTCACACAGCATGAATACAATAACGAGAAAAGGCAGAGAATCACTG  
 1875. TGAGGAGTGAAGCGCCGGTCCGAGCACGCAGCTGAATCCAAGTACCTGCTTGAACAGATAGCGAAGC  
 1942. TTACTGCTTGAATAGTAGAAGATGCAACCTTACTGCAAATAGCGAGGATATTAGGACTAATTGATG  
 2009. GTGTCAGGTCATTCGCGCCCTAAGCTTTAGCTATGTATCAGCAGTCAGATGTATTAACCATTCCCT  
 2076. GCTCTAATAGTCATCTATCAGCAGTCAGATGTATTTAACCATTCCCTGCTTCTGCTCTCTACCA  
 2143. GGAGTCGGAAGTTTTTAAACCAAAAAAAAAAAAA

Fig.R12 Secuencia de 2258 pb resultante de la secuenciación con los oligos T7 , SP6 y rpa7 y la secuencia obtenida anteriormente de banco de cDNA de maíz. Oligo rpa3, secuencia señal de inicio de la traducción, codón de inicio hipotético según comparación con arroz, oligo rpa7, oligonucleótido rpa7, secuencia de 12rpa, oligonucleótido rpa2, codón de término, región 3' UTR, secuencias hipotéticas de iniciación, región de

Al traducir esta secuencia de cDNA se identificaron los dominios de unión a DNA A y B que van en comparación con RPA-1 de arroz, del aminoácido 180 al 426 así como el dedo de zinc putativo que se encuentra muy conservado en las proteínas

de otras especies. El porcentaje de identidad de aminoácidos entre RPA-1 de maíz y RPA-1 de arroz es del 75%(Fig.14).

	10	20	30	40	50	60
ZmRPA-1	--MDAAKI	VTPGAVSYIL	--AHPSTGSDGAVS	DLVVOVLDLKS	TGMGSRFS	FTATDGNDK
OsRPA-1	MDSDAAPSVI	PGAVAFVLENAS	PDAAATGVPVPEI	VLQVVDLKP	IG--TRFTFLAS	DGKDK
	70	80	90	100	110	120
ZmRPA-1	IKAMLPTYF	ASEVHSGNLK	NFGLIRILDYTC	NSVKG	NADKVLIVVK	ETVCEALDAEING
OsRPA-1	IKTMLLTQL	APEVRS	GNIGNLGVIR	VLDYTCNTI	GEKQEKVLI	IITKLEVVFKALDSEIKC
	130	140	150	160	170	180
ZmRPA-1	EAKKED--	PPIVLKPKDE	SSVVAEETNS	PPL---VMKPKQ	EVKSASQIV	TEQQRGNAAPAT
OsRPA-1	EAEKQEEKPA	IILSPKEE	SVVLSKPTMAP	PLPPVVLKPKQ	EVKSASQIV	NEQQRGNAAPAA
	190	200	210	220	230	240
ZmRPA-1	RLSMTRRVH	PLITLNPYQGN	WVIKVRVT	SKGNLRTYR	MARGE	GCVFVVELTDEDG
OsRPA-1	RLAMTRRVH	PLIFLNPYQGN	WVIKVRVT	SKGNLRTYK	NARGE	GCVFVVELTDDVDG
	250	260	270	280	290	300
ZmRPA-1	TMFNEAAK	KFYPIFELG	KVYYVSKG	SLRIANKQ	FKTVKNDYEL	LLNE-MCEEAEGRI
OsRPA-1	TMFNEAAK	KFYPMFELG	IVYYISKG	SLRVANKQ	FKTVHNDYEM	TLNENAVVEEAEGETFI
	310	320	330	340	350	360
ZmRPA-1	PPVQYIL	VKIDQLG	SYVGGREL	VDIVGVVQ	SVSPTLSV	RRIKIDNETIPKRD
OsRPA-1	PQIQYNE	VKIDQLG	PYVGGREL	VDIVGVVQ	SVSPTLSV	RRIKIDNETIPKRD
	370	380	390	400	410	420
ZmRPA-1	TVSISLW	NDLATTTG	QELLNMD	SSPVVAIK	SLKVSDFQ	GVSLSTV
OsRPA-1	TVTISLW	NDLATTTG	QELLNMD	SAPVVAIAIK	SLKVSDFQ	GVSLSTVGRSTLVVTPDLPEA
	430	440	450	460	470	480
ZmRPA-1	QNLKSWY	DSEGKDT	SLAPIGA	EMGAARAG	GFKSMYS	DRVFLSHITSDP
OsRPA-1	QQLPAMY	DSEGKGT	SMASIG	SDNGASR	VGGAFSMYS	DRVFLSHITSDPNL
	490	500	510	520	530	540
ZmRPA-1	YATISHIK	PDQMMYR	ACKTCN	KKVTE	TEFGSGY	WTEGCGKNDSE
OsRPA-1	LAYISLIK	PDQTMYR	ACKTCN	KKVTE	AMGSGY	WTEGCGKNDSE
	550	560	570	580	590	600
ZmRPA-1	EAMF	SVFNEHA	FKIIGCSA	DELDR	IRKEEG	DDSYVLK
OsRPA-1	EAMLSL	FNEHA	FKIIGCSA	DELDR	IRKEEG	DDSYLLK

```

                610      620      630
                |        |        |
ZmRPA-1      KRORITVRSEAPVEHAAESKYLLEQIAKLT--
OsRPA-1      KRQPIITVRSEAPVDHAAEAQYMLEEIAKLTGC

```

Fig.R13 Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de RPA-1 de maíz y de arroz traducidas a partir de las secuencias de cDNAs. Los dominios de unión a DNA van del aminoácido 180 al 432 y la secuencia conservada de dedo de Zn del aminoácido 498 a 518. Identidad del 75%

La secuencia de aminoácidos de RPA-1 de maíz también se comparó con las secuencias de RPA-1 humana (HsRPA-1), de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (ScRPA-1), y *Drosophila melanogaster* (DmRPA-1) con los que se encontró un porcentaje de identidad de 31%, 32% y 30% respectivamente (Fig. R14)

```

                10      20      30      40      50      60
                |        |        |        |        |        |
ZmRPA-1      --MDAAKLVTGAVSYIL--AHPSTGSDGAVSDLVVQVLDLKSIGMGS--FSFTATDGN DK
OsRPA-1      MDSDAAPSVTPGVVVFVLENASPDAAATGVPVPEIVLQVVDLKPIG--TFFTFVASDGKDK
HsRPA-1      ----MVGQIIEGALIAAIMQKGD TNIKP---ILQ-VINIRPITTGNSPPRYRLMSDGLNT
DmRPA-1      ---MVLASLNTGVIARIMH-GEVVDAP---VLQ-ILAIKKINSAADSEHYRILLSDGKYF
ScRPA-1      ---MSSVQLNRGDFHSIFTNKQRYDNTGGVYQ-VYNTRKSDGANSNRKNLIMICDGIYH

                70      80      90      100     110     120
                |        |        |        |        |        |
ZmRPA-1      IK--AMLPYFASENHSONLKNFGLIPILDYTCNSVKGNA--DKVLLVVKCFVCEALVAE
OsRPA-1      IK-TMLLQVLAPEVRSSENIQNLGVAVLDYTCNTIGERKQ--EKVLLITKIEFVFKALISE
HsRPA-1      LSSEMLAQQINPLVEEEQISSNCVCQIHRFIVWTL-KDG--RRVWILMEIEVFLKSAEAVG
DmRPA-1      NSYAMLASQINVMQHNGEIEEFTIVQLDKYVTSLVGKDGAGKRVVISEITVWNPGAEVK
ScRPA-1      MK-ALLRNLAASKEQ-MEIQRGDIIEVIAEPAIVRERK--KYVLLVDDFFLWQSRADMV

                130     140     150     160     170     180
                |        |        |        |        |        |
ZmRPA-1      INGEAKKED--PPIVLKPKDEGSVVAEETNSPPL---VMKPKQEVKFSASQIVTEQRNNA
OsRPA-1      IKCEAEKQEEKPAILLSPKEESVWLSKPTNAPPLFPVVLKPKQEVKFSASQIVTEQRNNA
HsRPA-1      VVIGNPVPYNEGLGQPQVAPPAPAPASPAASSRFQPNQSSGMGSTVAKAYGASKTEPKAA
DmRPA-1      SKIGEPVPTYENAAKQDLAPKPAVTSNSKPIAKKESPHNNNN-----PIVMNSSI
ScRPA-1      NQTSTFLDNYFSEHPNETLKDEDITDSGNVFN-QTNASNAGVPDMLHSNSNLVNERKFE

                190     200     210     220     230     240
                |        |        |        |        |        |
ZmRPA-1      PATRLSM----TFRVHPLITLNPYQGNFVVKVRVLSKSNLRTYRNARGEGCVFVWEITDV
OsRPA-1      PAARLAM----TFRVHPLISLNPYQGNLIIKVRVLSKENLRTYKNARGEGCVFVWEITDV
HsRPA-1      GPSLSHTSGGTQSKVVPVIA-LTPYOSKNTICARVFNKSSQLPTVSNSPGEGHLSFLEAVDE
DmRPA-1      NSGMTH-----PTSSLSYPYONKQVVKRVVTKSGITTSNARGEGHLSFMDIMDE
ScRPA-1      NENPNSQK---TPPIFAIEQLSPYQNVWTIIEARVSYKGEIKTTHNQRGDGHLEFNFLDIT

```

	250	260	270	280	290	300
ZmRPA-1	DGTQIQATMFNEAAKKFYPI	FELGKVYYVSKGSLRIANKQFKTVKNDYELSLNE-MLCEE				
OsRPA-1	DGTQIQATMFNEAAKKFYPMFELGKVYYISKGSLRVANKQFKTVHNDYEMTLNENAVVEE					
HsRPA-1	SG-EIRATAFNEQVDKFFPLIEVNKVYYFSKGTCLKIANKQFTAVKNDYEMTFNNETSVMP					
DmRPA-1	SG-EIRATAFKEQCCKFYDLIQVDSVYYISKCQLKPANKQYSSLNHAYEMTFSGEIVVQL					
ScRPA-1	SG-EIRATAFNDFATKFNEILQEGKVYYVSKAKLQPAKQFTNLTHPYELNLDRDVTVEE					

	310	320	330	340	350	360
ZmRPA-1	AEG--RLSFPVQYNLVKIDQLGSGYVGGRELVDIVGVVQSVSPTLSVRRKIDNETIPKRD					
OsRPA-1	AEG--ETFI PQIQYNFVKIDQLGSPYVGGRELVDVI GVVQSVSPTLSVRRKIDNETIPKRD					
HsRPA-1	CED--DHHLPTVQFDFTGIDDLLEN-KSKDSLVDIIGICKSYEDATKITVRSNHREVAKRN					
DmRPA-1	CEDTDDDP IPEIKYNLVPI SDVSG-MENKAAVDTIGICKEVGELQSFVARTNKEFKARD					
ScRPA-1	CFD--ESNVPKTHFNFIKLDAIQN-QEVNSNVDVLGIIQTINPHFELTSFA-GKKFDRRD					

	370	380	390	400	410	420
ZmRPA-1	IVVADDSGKTVSISLWNDLATTGQELLNADSSPVVAIKSLKVSDF-QGVSLSTVVGKST					
OsRPA-1	IVVADDSKKTVTISLW:DLATTGQELLDVDSAPIIAIKSLKVSDF-QGLSLSTVGRST					
HsRPA-1	IYLMDTSGKVVTTATLWGEDADKFD-----GSRQPVLAIK GARVSDF-GGRSLSVLSSST					
DmRPA-1	ITLVDMNSAISLTLWGDDAVNFD-----GHVQPVILVKGTRINEFNGGKSLSLGGGSI					
ScRPA-1	ITIVDDSGFSISVGLWNQALDFN-----LPEGSVAAIKGVVPTDF-GGKSLSMGFSST					

	430	440	450	460	470	480
ZmRPA-1	LAINPDLHEAQNLSWYDSEGKDTSLAPIGAEMGAARAGGFKSMY--SDRVFLSHITSDP					
OsRPA-1	IVVNPDLPEAEQLRAWYDSEGKGTSMASIGSDMGASRVGGARSMY--SDRVFLSHITSDP					
HsRPA-1	IIANPDIPEAYKLRGWFDAEGQALDGVSI SDLKSGGVGGSNNTNWK-----TLYEVKSEN					
DmRPA-1	MKINPDIPEAHKLRGWFDFNGGG--DSVANMVSARTGGGSFSTEW-----TLKDARARW					
ScRPA-1	LI PNPEIPEAYALKGMYDSKGRNANFITLKQEPGMGGQSAASLTKFIAQRIT IARAQ AEN					

	490	500	510	520	530	540
ZmRPA-1	AMGQEKPVFFSLYATISHIKPDQIMWYRACKT-- <u>CNKKVTE</u> TFGSGYWCEGCQKNDSECS					
OsRPA-1	NLGQDKPVFFSLNAYISLIKPDQIMWYPACKT-- <u>CNKKVTE</u> AMGSGYWCEGCQKNDAECS					
HsRPA-1	LGQGDKPDYFSSVATVVYLRKE-NCMYQAC <u>PTQDCNKKVIDQ</u> ONGLYRCEKCDTEFPNFK					
DmRPA-1	LGSGDKPDYFQCKAVVHIVKQE-NAFYRAC <u>PQSDCNKKVVDE</u> GNDFRCEKCNALFPNFK					
ScRPA-1	LGRSEKGDFFSVKAAISFLKVD-NAFYPAC <u>SNENCNKKVLEQ</u> PDGTWRCEKCDTINARPN					

	550	560	570	580	590	600
ZmRPA-1	LRYIMVIKVS DPTGEAWFSVFNEHAEKIIGCSADELDRIRKEEGDDSYVLKKEATWVPH					
OsRPA-1	LRYIMVIKVS DPTGEAWLSLFNDQAERIVGCSADELDRIRKEEGDDSYLLKKEATWVPH					
HsRPA-1	YRMLSVN IADFQENQ:VTCFQESAEALIGQNAAYLGEL-KDKNEQAFEEVFQANFRSE					
DmRPA-1	YRLLINMSIGDWT SNRWVSSFNEVGEQLLGHTSQEVGEA-LENDPAKAEQIF SALNFTSH					
ScRPA-1	WRYILTISI I DETNQLWLTFLDQAKQLLGV DANTIMSL-KEEDPNEFTKITQSIQ MNEY					



	610	620	630	640	650
ZmRPA-1	LFPVSVTQHEYMNEKRQRITVRSEAPVEHAAESKYLLEQIAKLTA-----				
OsRPA-1	LFRVSVTQNEYMNEKRQRITVRSEAPVDHAAEAKYMLEELAKLTGC----				
HsRPA-1	IFRVKVKVETYNDESRIKATVMDVKPVDYREYGRRLVMSIRRSLM----				
DmRPA-1	IFKLRCKNEVYGDMTRNKLTVQSVAPINHKEYNIHLLKELQELTGIGSSN				
ScRPA-1	DFPIPAREDTYNDQSRIRYTVANLHSLNYRAEADYLADELSKALLA----				

Fig R14 Alineamiento múltiple entre las secuencias de RPA-1 de *Zea mays* (Zm), *Oryza sativa* (Os), *Homo sapiens* (Hs), *Drosophila melanogaster* (Dm) y *Saccharomyces cerevisiae* (Sc). Se observa la secuencia del dominio de unión a DNA del aminoácido 180 al aminoácido 432 y la secuencia conservada de dedo de Zn del aminoácido 511 a 533

### 3.3 Determinación del número de genes de RPA-1 de maíz

Para determinar el número de genes se extrajo DNA genómico de ejes embrionarios de maíz variedad Chalqueño y 30 µg de éste se digirió por separado con las siguientes enzimas de restricción: *Eco RI*, *Hind III*, *Xba I* y *Xho I* y se separó en un gel de agarosa al 1.2% (Fig 16).



Fig.R15 Electroforesis de DNA genómico digerido con *Eco RI* carril 1, *Hind III* carril 2 *Xba I* carril 3 y *Xho I* carril 4.

El DNA se transfirió del gel de agarosa a una membrana de nylon la cual se hibridó con la sonda PR4113A de 1203 pb en condiciones de alta astringencia (68°C y lavados con 1 X SSC y 0.1 % de SDS) y en condiciones de baja astringencia (60°C y lavados con 2 X SSC y 0.1% de SDS). La autoradiografía del Southern blot realizado en condiciones de baja astringencia se muestra en la figura 17 donde se observa que en el DNA digerido con las distintas enzimas de restricción hay más de una señal de hibridación. En la digestión con la enzima *EcoR1* (carril 1) se observan tres bandas bien definidas, una muy intensa entre 9416 y 6557 pb y dos entre 6557 y 4361 una intensa y la otra muy tenue; en el carril dos la digestión fue con *Hind III* y se observan seis bandas claras una muy intensa entre 9416 y 6557 pb, otra muy cercana a 6557 pb, dos bandas poco intensas una cercana a 4361 pb y la otra entre 4361 y 2322 pb y dos bandas de bajo peso molecular, muy por debajo de 2027 pb, en la digestión realizada con *Xba I* son dos las bandas que se observan con claridad una muy intensa arriba de 6557 pb y otra con una intensidad débil por debajo de 6557 pb; por ultimo en el carril 4 en la digestión con la enzima de restricción *Xho I* se observa una banda muy tenue de bajo peso molecular.

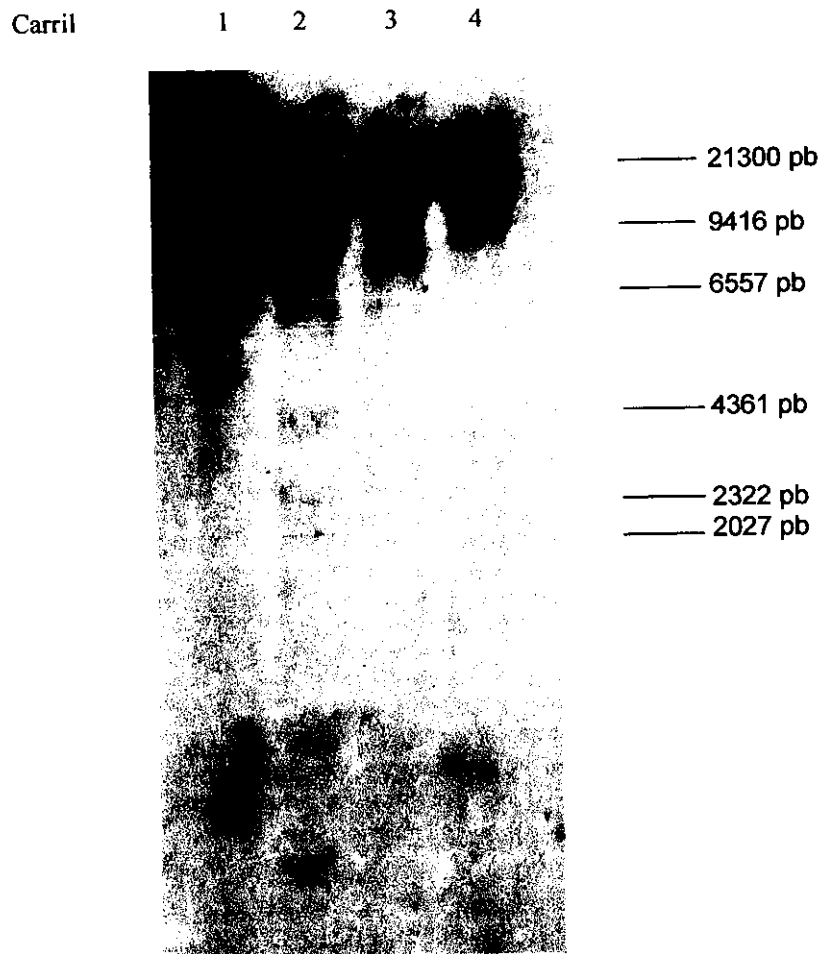


Fig. R16 Autoradiografía de Southern blot (en condiciones de alta astringencia) del DNA genómico digerido con enzimas de restricción. Carril 1 *Eco RI*, carril 2 *Hind III*, carril 3 *Xba I* y carril 4 *Xho I*.

### 3.4 Expresión del gen de la RPA-1 de maíz

#### 3.4.1. Expresión durante la germinación y efectos de fitohormonas

Se estudió la expresión de la RPA-1 durante la germinación de ejes embrionarios de maíz tomando muestras de RNA a las 12, 24 y 48 horas de germinación así como en semilla seca. Se analizó también la germinación en estos mismos tiempos pero en presencia de ácido giberélico ya que se había reportado que en arroz estimulaba la expresión de RPA-1 (Van der Knaap, 1997).

La primera aproximación para estudiar la expresión de RPA durante la germinación fue por RT-PCR donde en el primer caso se utilizó la misma cantidad de RNA para todos los casos (Fig. R17).

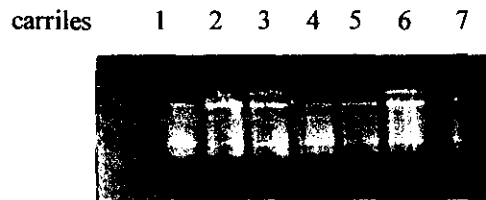


Fig R17. Gel de agarosa con RNA extraídos de diferentes tiempos de germinación. carril 1, 2 y 3: 12, 24, y 48 horas, carril 4, 5 y 6: 12, 24 y 48 horas en presencia de giberelina, carril 7 RNA de semilla seca.

Una vez obtenido el cDNA, la amplificación de este se hizo utilizando los oligonucleótidos rpa1 y rpa2 con los cuales se amplificaba un fragmento de 195 pb (Fig.R18). Se detectó el producto de amplificación de RPA-1 en semilla seca (carril 8) y se observó una cantidad mayor de éste a las 12 horas (carril 2) para luego decaer pero sin llegar a desaparecer. En presencia de ácido giberélico, como se esperaba se encontró un estímulo de la expresión de RPA-1 a las 24 horas como un máximo, observándose un estímulo en la transcripción (Carril 6).

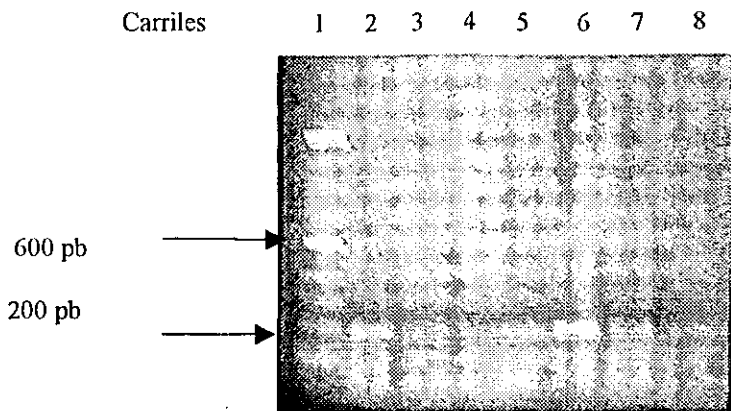


Fig. R18. Expresión del gen RPA-1 de maíz durante la germinación de ejes embrionarios de maíz en presencia y ausencia de ácido giberélico. El análisis se realizó por RT-PCR a partir de 1  $\mu$ g de RNA total extraído a cada tiempo indicado y amplificado con los oligonucleótidos 1rpa y 2rpa. Carril 1 marcadores de peso molecular escalera de 100 pb; carril 2, 12 horas de germinación; carril 3, 24 horas; carril 4, 48 horas; carril 5, 12 horas en presencia de giberelina; carril 6, 24 horas con giberelina; carril 7, 48 horas con giberelina; carril 8 semilla seca

Adicionalmente se estudió la expresión de la RPA-1 de maíz en presencia (1  $\mu$ M y 50  $\mu$ M) y ausencia de otra fitohormona, la benciladenina que es una citocinina. se obtuvieron muestras de RNA a las 12, 24 y 48 horas de germinación de ejes embrionarios de maíz y se calibraron y resolvieron en un gel de agarosa (Fig.R19).

Carriles 1 2 3 4 5 6 7 8

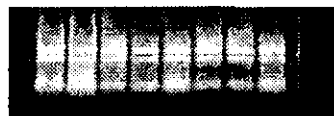


Fig.R19. Gel de agarosa con RNA extraído de diferentes tiempos de germinación: carril 1 semilla seca, carriles 2,3 y 4: 12, 24 y 48 horas respectivamente, carriles 5,6 y 7: 12, 24 y 48 horas de germinación en presencia de 1  $\mu$ M de benciladenina carriles 8, 9 y 10: 12,24 y 48 horas de germinación en presencia de 50  $\mu$ M de benciladenina

El RNA se transfirió a una membrana de nylon y se hibridó con la sonda PR4113A a 68°C. Se observó un máximo de expresión (Fig. R19) a las 12 horas de germinación en ausencia de la hormona (carril2), que decae observándose un mínimo a las 48 horas de germinación normal (carril 4), el transcrito no se observa en semilla

seca (carril1). En presencia de benciladenina ( $1\mu\text{M}$ ) se observa un estímulo en la transcripción a las 24 horas, sin embargo a una concentración de  $50\mu\text{M}$  la cantidad de mensaje disminuye en los tres tiempos de germinación (Fig. 21).

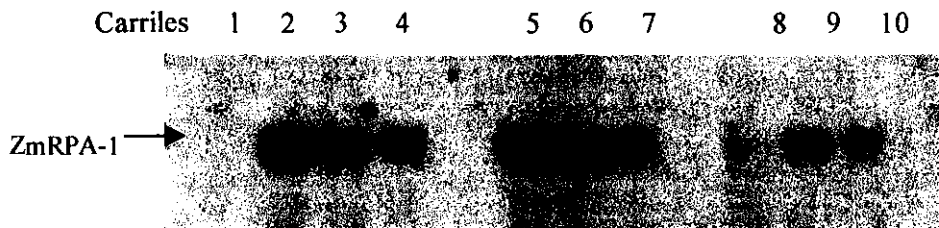


Fig. R20 Autoradiografía de Northern blot, carril 1 semilla seca, carriles 2,3 y 4: 12, 24 y 48 horas respectivamente, carriles 5, 6 y 7: 12, 24 y 48 horas de germinación en presencia de  $1\mu\text{M}$  de benciladenina carriles 8, 9 y 10: 12,24 y 48 horas de germinación en presencia de  $50\mu\text{M}$  de benciladenina

### 3.4.2. Expresión en distintos tejidos de la planta de maíz.

Se estudió también la expresión del gen en diferentes tejidos de la planta de maíz, : hoja, tallo, raíz, pistilo, embrión inmaduro y embrión a las 72 horas ( de una plantas de 15 semanas de edad y 3 días de polinización), se cargó la misma cantidad de RNA en un gel de agarosa (Fig. R21).

Carriles 1 2 3 4 5 6 7 8

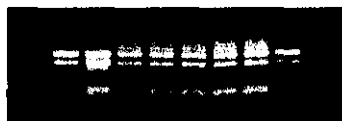


Fig R21. Gel de agarosa con RNA extraído de diferentes tejidos: carril1 12 horas de germinación, carril 2 raíz, carril 3 tallo, carril 4 hoja, carril 5 espiga, carril 6 pistilo, carril 7 embrión inmaduro y carril 8 embrión a las 72 h.

Se incluyó RNA a las 12 horas de germinación normal como control positivo ya que se había observado una máxima expresión en germinación. En la autorradiografía (Fig. R22) se observó el transcrito correspondiente a las 12 horas de germinación (carril 1), pero no se observa ninguna señal del mensaje ni raíz, ni tallo ni hoja. El transcrito está presente en baja cantidad en pistilo (carril 6) y en embrión de 72 horas de germinación (carril 7) y en mayor proporción en embrión inmaduro, lo que indica que el mensaje se encuentra en mayor cantidad en tejidos que están proliferando que en tejidos ya diferenciados.

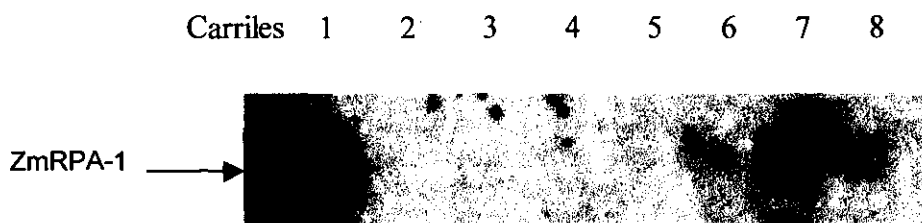


Fig R22. Autorradiografía de Northern blot. de RNA extraído de diferentes tejidos carril1 12 horas de germinación, carril 2 raíz, carril 3 tallo, carril 4 hoja, carril 5 espiga, carril 6 pistilo, carril 7 embrión inmaduro y carril 8 embrión a las 72 h.

#### 4.1 Aislamiento del cDNA de zmRPA-1

Para el aislamiento de la clona de cDNA de zmRPA-1 se utilizó una sonda (RPA12) amplificada de DNA genómico de maíz a partir de oligonucleótidos (rpa1 y rpa2) que fueron diseñados de una secuencia de una clona EST de maíz (GenBank T23395). Con la sonda RPA12 se realizó un escrutinio de un banco de cDNA de maíz clonado en el sitio *Eco RI* de vector  $\lambda$ gt11. De este banco se aisló una clona con un inserto de casi 2000 pb que contenía un sitio interno de corte para *Eco RI*, lo que era posible debido a que el sitio de clonación proviene de adaptadores que posteriormente son ligados al vector. Sin embargo, esta clona resultó una quimera ya que solamente 1200 pb codificaron para una proteína con alta identidad a RPA-1 y el extremo 5' era de RNA ribosomal. El extremo hacia 5' faltante del cDNA se pudo obtener con un oligonucleótido diseñado a partir de una clona EST de maíz (GenBank AW067251) que contenía secuencia codificante y no codificante con una alta similitud a RPA-1. Se empleó este cebador (rpa5) y el cebador rpa2 para amplificar por RT-PCR la secuencia de cDNA usando como molde RNAm de semillas de maíz de 24 horas de germinación en presencia de AG. En estas condiciones se había encontrado un máximo de expresión para zmRPA-1. Así se pudo obtener la secuencia completa de una cDNA de RPA-1 de maíz

#### 4.2 Análisis de las secuencias de cDNA y de los dominios de la proteína.

La secuencia de cDNA de zmRPA-1 tiene 1854 pb en marco de lectura y una identidad de 85% con la secuencia reportada para RPA-1 de arroz (Van der Knaap *et al*, 1997). El análisis de esta secuencia identifica una señal de poliadenilación



característica de los RNAs mensajeros en eucariotes, un codón de término y una región 3' UTR de 219 pb en la que se encontraron secuencias características como AATA que se encuentra de 10 a 30 bases arriba de la señal de poliadenilación y la secuencia CAGATG que se encuentra cercano al sitio de poliadenilación dentro de la región 3'UTR, estas secuencias marcan un sitio de poliadenilación (Joshi, 1987; Fig.12). El codón de inicio se identificó en la posición 61 del cDNA, inmediatamente después del pentanucleótido CCGCC, que se ha observado se encuentra en la mayoría de los transcritos de organismos eucariotes precediendo el sitio de inicio de la traducción (Kosak, 1984).

La secuencia de aminoácidos que predice este cDNA tiene una identidad del 75% con la reportada para RPA-1 de arroz. Además, se identificaron los dominios de unión a DNA A y B por comparación con la RPA-1 de arroz resultando un 83% de identidad y un 92% de similitud. Se identificó además la secuencia conservada de dedo de zinc que está presente también en RPA-1 de humanos, *Drosophila melanogaster* y levaduras. Una diferencia en el arreglo de este dominio es que, en RPA-1 de plantas, la secuencia es CX<sub>2</sub>CX<sub>13</sub>CX<sub>2</sub>C mientras que en el resto de las proteínas ortólogas se encuentra como CX<sub>4</sub>CX<sub>13</sub>CX<sub>2</sub>C. Este acortamiento en el espaciamiento de dos aminoácidos entre las dos primeras cisteínas del dedo de zinc, parece estar conservado en plantas pero su efecto es difícil de predecir ya que, aún en las RPA-1 mejor caracterizadas que son las de humano y levadura, la función de este dominio no es totalmente clara.

Cuando se han hecho mutaciones puntuales en estas cisteínas en levaduras, la afinidad por el DNA se ve ligeramente afectada y la replicación se puede llevar a

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

cabo pero no la recombinación, en la que la estimulación de la DNA polimerasa disminuye (Dong *et al*, 1999).

En zmRPA-1 se identificaron todos los aminoácidos indispensables que están conservados para los diferentes ortólogos de RPA. Cuando Lys 45 es mutada por Glu en levaduras disminuye la eficiencia en la recombinación. Este residuo se encuentra en RPA-1 de humano, arroz y *Drosophila melanogaster* en la posición 47. En levaduras las mutaciones de Phe 238, que tanto en arroz como en maíz esta en la posición 218, Trp ocupa la posición 356 en zmRPA-1 y 364 en osRPA-1 causan una reducción en la afinidad por DNA de cadena sencilla, debido a una perturbación en la estructura, ya que se ha visto que estos aminoácidos interactúan directamente con la cadena de DNA pero estas mutaciones no afectan la reparación por escisión de nucleótidos. Además, cuando la Ser-351 de scRPA-1 (ubicada en la posición 348 para maíz y 356 para arroz) es mutada, disminuye la eficiencia en el inicio de la replicación y la elongación del DNA (Umezu *et al*, 1998).

Los aminoácidos que tienen contacto con el DNA se han identificado por experimentos con mutantes en levaduras (Umezu *et al*, 1998) y se muestran en la tabla D1. La mayoría de estos aminoácidos están conservados entre las diferentes especies, pero la conservación es más alta entre maíz y arroz. Estos a su vez son más parecidos a hsRPA-1 que a scRPA-1 lo que sugiere un mecanismo de unión a DNA para zmRPA y osRPA similar al de hsRPA-1.

HsRPA-1	ScRPA-1	OsRPA-1	ZmRPA-1
Arg 211	Lys 211	Lys 212	Arg 206
Trp 213	Trp 213	Tyr 214	Tyr 208
Arg 217	Arg 217	Arg 218	Arg 212
<b>Arg 235</b>	Gln 235	Gln 237	Gln 231
Phe 239	Phe 239	Phe 240	Phe 235
Lys 263	<b>Gln 267</b>	Arg 265	Arg 260
Phe 269	Phe 269	Phe 270	Phe 265
Glu 277	Glu 277	Glu 278	Glu 273
Asn 337	<b>Gly 337</b>	Asn 342	Asn 334
Arg 341	Lys 340	Arg 342	Arg 339
Tyr 357	<b>Gly 356</b>	Ser 358	Ser 355
Trp 360	Trp 359	Trp 360	Trp 357
Arg 382	Arg 381	Lys 387	Lys 384
Phe 387	Phe 386	Phe 391	Phe 388
Ser 397	Ser 396	Ser 402	Ser 395
Ser 398	Ser 399	Ser 407	Ser 400

Tabla D1. Posición de los aminoácidos que se han identificado en RPA-1 de *Saccharomyces cerevisiae* (Umezú *et al*, 1998) que tienen contacto con el DNA y su ubicación equivalente en hsRPA1, osRPA-1 y zmRPA-1. En negritas se señala los aminoácidos que son diferentes entre las diferentes RPAs-1.

#### 4.3 Número de copias del gen de zmRPA-1

En los genomas de plantas parece haber varias copias del gen de la RPA-1. En arroz se han reportado dos secuencias diferentes de cDNA para osRPA-1 (Van der Knaap *et al*, 1997 e Ishibashi *et al*, 2000) aunque solo una de ellas tiene una

identidad significativa con zmRPA-1 (75%) mientras que el otro cDNA sólo tiene una identidad del 28%. En el genoma de *Arabidopsis thaliana* de la búsqueda de RPA-1 resultan 82 secuencias, de las cuales 6 codifican para la proteína completa. El resto son secuencias parciales reportadas como hipotéticas RPA, pseudogenes y proteínas tipo RPA distribuidas en los cromosomas 1, 2, 3 y 5 ("The Arabidopsis genome sequencing project"). La identidad más alta que se encontró entre estos genes con zmRPA-1 fue del 60% y corresponde a la clona genómica AB008269 que está en el cromosoma 5.

Los resultados obtenidos por Southern blot de DNA genómico de maíz usando la sonda de cDNA es consistente con una familia pequeña de genes y no con un patrón de familia multigénica como en *Arabidopsis thaliana*.

Para conocer si hubiese otras secuencias distintas de cDNA de RPA-1 de maíz se hizo una búsqueda en la colección de secuencias EST, tratando de identificar aquellas que tuvieran un extremo 3'-UTR secuenciado que permitiese distinguirlas. En junio del 2001 la base de datos del genoma de maíz reportó 26 EST, pero solamente algunos, AI691908, TUC 09-07-3431.1, AI7144910, TUC04-05-3757.1, TUC09-07-6470.1, BE186148 tienen una región 3' UTR (Fig. D1).

```

1          1          15 16          30 31          45 46          60 61          75 76          90
1 EST1 ---TAGTAGAAGATG CAACCTTTCTGGTGG TT-CGTTAAGGGCT- GCCCTCCGAGATGTT CCCTCTGGGTTT TAG CACTTCTGTAAGATA 85
2 EST26 ---TAGTAGAAGATG CAACCTTTCTGGTGG TT-CGTTAAGGGCT- GCCCTCCGAGATGTT CCCTCTGGGTTT TAG CACTTCTGTAAGATA 85
3 BE ---TAGTAGAAGATG CAACCTTTCTGGTGG TT-CGTTAAGGGCT- GCCCTCCGAGATGTT CCCTCTGGGTTT TAG CACTTCTGTAAGATA 85
4 zmRPA TGATAGTAGAAGATG CAACCTTACTGCAAA TAGCGACGATTATTA GGACTAATTGATGGT GTCA---GGTCATTG CG--GCCCTAAGCTT 85

          91          105 106          120 121          135 136          150 151          165 166          180
1 EST1 TATGTAGAGGTTGG TTACCTTGATGTC-- AAGCAACAGATGCTA GGACAGT--TCAAGC ATGATGCATGAAGCG TTTGCCGAATTGCAG 171
2 EST26 TATGTAGAGGTTGG TTACCTTGATGTC-- AAGCAACAGATGCTA GGACAGT--TCAAGC ATGATGCATGAAGCG TTTGCCGAATTGCAG 171
3 BE TATGTASAGGTTGG TTACCTTGATGTC-- AAGCAACAGATGCTA GGACAGT--TCAAGC ATGATGCATGAAGCG TTTGCCGAATTGCAG 171
4 zmRPA TAGCTAT--GTATCA GCAGTCAGATGTATT AACCATTCCTGCTC TAATAGTCATCTATC AGCAGTCA-GATGTA TTTAACCATTCCTG 172

          181          195 196          210 211          225 226          240 241          255 256          270
1 EST1 TTTTCAGTTCCCTCGT TCCGTATTCCGTGC CAATGCAACTTTGTT GAGCAAAAAAAAAA AAAAAA----- 238
2 EST26 TTTTCAGTTCCCTCGT TCCGTATTCCGTGC CAATGCAACTTTGTT GAGCAAAAAAAAAA AAAAAA----- 238
3 BE TTTTCAGTTCCCTCGT TCCGTATTCCGTGC CAATGCAACTTTGTT GAGCAAAATAGTGAGG ATTATTAGGACTAAT TGATGGTGTGAGGTC 261
4 zmRPA CTTAATAGTCTCTA CAGGAGT----- ---CGGAAGTTT-TT AACCAAAAAAAAAA A----- 222

          271          285 286          300 301          315 316          330 331          345 346          360
1 EST1 ----- 238
2 EST26 ----- 238
3 BE GCGGCCCTAAGCTTT AGCTCTGTATCAGCA GTCAGAA 298
4 zmRPA ----- 222

```

Fig. D1 Alineamiento de la región 3' UTR. EST1 (AI691908), EST26 (TUC0907-6470.1) y BE (BE186148).

La clona BE186146 tiene una identidad del 91 % con la región 3' UTR de la secuencia de la zmRPA-1 que se analizó en este trabajo.

El análisis de la región 3' UTR de las clonas EST reportó 5 cDNAs cuyas regiones codificantes tienen distintos grados de similitud a la RPA-1 y con regiones 3'-UTR diferentes, por lo que podrían corresponder a los otros genes cuya presencia sugiere el Southern blot.

#### 4.4 Expresión del gen de zmRPA-1

El transcrito de la RPA-1 se pudo detectar solamente en semilla seca utilizando la técnica de RT-PCR, lo que implica que se encuentra en niveles muy bajos y que probablemente este sea residual de la embriogénesis, una etapa altamente proliferativa. Durante la germinación, el transcrito de la RPA-1 ya es detectable por Northern blot y se observó en cantidades considerables a las 12 horas, que es el tiempo en el cual ocurre la síntesis de DNA tanto reparativa como replicativa (Baiza *et al*, 1989). El comportamiento de la RPA en principio es muy

similar al que siguen otras proteínas importantes durante la fase S del ciclo celular y que se han estudiado en maíz, como es el caso del PCNA, donde se determinó por densitometría que la proteína fluctúa durante el ciclo celular, presentando un máximo a las 24 horas de germinación y hacia las 40 horas casi no es detectable (Georgieva *et al*, 1994).

Se ha determinado con aminoácidos marcados radiactivamente que la síntesis de histonas, proteínas que son sintetizadas en la fase S, comienza a las 12 horas y es máxima a las 24 horas de germinación. En el caso de la proteína timidina cinasa, que está muy relacionada con la fase S, la actividad es muy baja al inicio de la germinación pero va aumentando hasta llegar a un máximo entre las 12 y 30 horas y después de este tiempo decrece. Como esta proteína es importante en la reparación del DNA, quizá durante la maduración de la semilla se acumula una cantidad de timidina cinasa y así en la germinación las células pueden reparar el DNA sin depender de la síntesis de proteínas (Georgieva *et al*, 1994).

La cantidad de la RPA aumenta como una respuesta a AG en un punto donde se ha observado que la cantidad de DNA nuclear es máxima (Baíza *et al*, 1989). La RPA es una proteína indispensable desde tiempos muy tempranos para llevar a cabo la germinación, lo que hace de su síntesis una prioridad, como lo es también el movimiento de reservas que responde a AG.

Se ha observado que la fitohormona BA estimula a la DNA polimerasa delta en maíz (Reyes *et al*, 1991). Esta fitohormona también estimula a RPA-1 a las 24 horas de germinación lo que concuerda muy bien con el tiempo donde la cantidad de DNA es máxima (Baíza *et al*, 1989).

La RPA -1 se encontró en arroz en tejidos proliferativos por Northern blot y en maíz también se encontró en mayor cantidad en este tipo de tejidos, donde el DNA se está replicando constantemente y por lo tanto RPA se requiere en una mayor cantidad. Es altamente probable que en el caso de hojas donde la proliferación no es importante, la RPA funcione principalmente en la reparación de daño al DNA, debido a que estos tejidos están sometidos constantemente a daño por luz UV y por lo tanto se requiere de una reparación intensa.

#### 4.5 Perspectivas

En plantas no se han caracterizado las otras subunidades del heterotrímero de RPA. En contraste con lo que sucede para RPA-1 en el genoma de *Arabidopsis thaliana* no se reporta ninguna secuencia con similitud significativa a RPA-2 ([http://www.tigr.org/docs/tigr-scripts/edb2\\_scripts/neuk\\_name\\_search.spl](http://www.tigr.org/docs/tigr-scripts/edb2_scripts/neuk_name_search.spl)) y la base de datos del genoma de maíz reporta 13 secuencias EST con distintos grados de similitud a RPA-2 que se podrían emplear en una estrategia similar a la utilizada en este trabajo para aislar el o los cDNA(s) correspondientes. Tampoco en el genoma *Arabidopsis thaliana* hay una secuencia con parecido evidente a RPA. Llama la atención el contrastante número de secuencias genómicas y de cDNA que se han encontrado de RPA-1 en *Arabidopsis thaliana* y *Zea mays* con las respectivas de las otras subunidades, cuando la proteína funcional debe formar un heterotrímero por lo que se esperaría una relación equimolar entre las distintas subunidades. Esto se podría conocer aislando sondas para las subunidades RPA-2 y 3 que se empleasen para estudiar su expresión y compararlas con RPA-1.

Otra aproximación para el estudio de estas subunidades sería a través de sobreexpresar zmRPA-1 o el dominio de interacción con la RPA2, fijándolo en una

columna de afinidad por el cual se pase un extracto nuclear para intentar purificar RPA-2. Asimismo, la proteína sobreexpresada se puede emplear para inmunización y obtener anticuerpos. Estos se emplearían para estudiar la expresión de la proteína y para inmunoprecipitar complejos nucleares en los que probablemente se encontrarían la RPA-2 y 3. La actividad del heterotrímero se podría estudiar en ensayos de replicación *in vitro* con otras proteínas de replicación de maíz, como es una DNA polimerasa alfa que se ha purificado y caracterizado (Coello *et al*, 1992).

El hecho de encontrar varios cDNAs de la RPA-1, probablemente provenientes de varios genes sugiere que puede ocurrir expresión específica de tejido o de estado de desarrollo de los distintos genes. Esto se podría probar mediante el diseño de sondas o cebadores específicos de las regiones 3' UTR de los cDNAs hipotéticos de la RPA-1.



## Conclusiones

- A partir de un banco de cDNA y con el diseño de oligonucleótidos se obtuvo una clona de cDNA (zmRPA-1) cuya secuencia predice una proteína de 621 aminoácidos que tiene una identidad de 75 % a nivel de aminoácidos con osRPA-1, 32 % con hsRPA-1 y 31% con scRPA-1.
- El patrón de hibridación obtenido por ensayos de Southern blot, utilizando como sonda el cDNA de la clona PR413A, sugiere la existencia de más de un gen para RPA-1 en maíz.
- En ensayos de RT-PCR se observó un incremento importante del mensaje a las 12 horas de germinación y una respuesta a ácido giberélico. Por Northern blot se observó que la expresión de zmRPA-1 es mayor en tejidos proliferativos y responde a las fitohormonas benciladenina.

## Bibliografía

- Adachi Y, Laemmli, UK. 1992. Identification of nuclear pre-replication center poised for DNA synthesis in *Xenopus* eggs extracts immunolocalization study of replication protein A. *J Cell Biol.* 119:1-15.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DM, Seidman JG, Smith JA and Struhl K eds. 1992. *Short Protocols in Molecular Biology*, 2nd ed, Greene Publishing Assoc and Wiley and Sons, New York.
- Bell SP, and Stillman, B. 1992. ATP-dependent recognition of eucaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature* 357:128-134.
- Baíza AM, Vázquez-Ramos, JM Sánchez de Jimenez, E. 1989. DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *J. Plant. Physiol.* 135: 416-421.
- Bewley, JD. 1997. Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9: 1055-1066.
- Bewley JD. 1985. *Seeds: physiology of development and germination*. Ed. Plenum Press N.Y and London.
- Blackwell LJ, Borowiec JA and Mastrangelo IA. 1996. Single Stranded DNA binding alters human replication protein A structure and facilitates interaction with DNA dependent protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 16: 4798-4807.
- Bradford KJ, Chen F, Cooley MB, Dahal P, Downie B, Fukunaga KK, Gee OH, Gurusinghe S, Mella RA, Nonogaki H, Wu CT, Yang H and Yim KO. 2000. Gene expression prior to radicle emergence in imbibed tomato seeds. In M. Black, KJ Bradford, J Vazquez-Ramos, eds, *Seed biology*. CABI publishing. UK. pp 231-251.
- Brill SJ, Stillman, BS. 1998. Identification and characterization of fourth single stranded-DNA domain of replication protein A. *Mol. Cell. Biol.* 18: 7225-34
- Cardoso MC, Leonhardt H and Nadal-Ginard B. 1993. Reversal of terminal differentiation and control of DNA replication :cyclin A and Cdk2 specifically localize at subnuclear sites of DNA replication. *Cell* 74:979-989.

- Carty MP, Zernik-Kobak M, McGrath S and Dixon K. 1994. UV light-induced DNA synthesis arrest in HeLa cells is associated with changes in phosphorylation of human single-stranded DNA-binding protein. *EMBO J.* 13:2114-21123.
- Chen F and Bradford KJ. 1998. Expansin genes are expressed in tomato seeds in association with germination. *Plant Biology '98 American Society of plant Physiologists, Rockville, Maryland, abstract no 47*
- Cleaver JE and States JC. 1997. The DNA damage-recognition problem in human and other eukaryotic cells: the XPA damage binding protein. *Biochem. J.* 328:1-12.
- Coello P, Rodriguez R, Garcia E and Vazquez-Ramos J M. 1992. A DNA polymerase from maize axes: its purification and possible role. *Plant Mol. Biol.* 20:1159-1168
- Dahal P, Downie B, Yang H, Mell RA, and Bradford KJ. 1997. An endosperm-specific mRNA induced by gibberellin during tomato seed germination. *Plant Physiol.(Suppl)* 114: 292.
- De la Porta, SL, Wood JA and Hicks JB. 1983. A plant DNA miniprep version II *Plant Mol. Biol. Rep.* 1:19-21
- Derek K and Black M. 1985. *Seeds Physiology of development and germination.* Plenum press New York and London pp 135-168.
- Dohmen G, and Tudzynski P. 1994. A DNA-polymerase-related reading frame (pol-r) in the mtDNA of *Secale cereal*. *Curr. Genet.* 25: 59-65
- Dong J, Park J, Lee S. 1999. In vitro analysis of zinc finger motif in human replication protein A. *Biochem. J.* 311-317.
- Egelkroun EM and Hanley-Bowdoin L. 2000. Geminivirus Infection Induces Transcription of a Plant Gene Encoding a DNA Synthesis Factor Direct Submitted (12-SEP-2000) *Biochemistry, North Carolina State University, Box 7622, Raleigh, NC 27695, USA.*
- Erdile I, Heyer W, Kolodner R and Kelly T. 1991. Characterization of a cDNA Encoding the 70-kDa Single-stranded DNA-binding Subunit of Human Replication Protein A and the Role of The Protein in DNA Replication. *J. Biol. Chem.* 26: 12090-12098.

- Fairman MP and Stillman B. 1988. Cellular factors required for multiple stage of SV40 DNA replication in vitro. *EMBO J.* 7:1211-1218.
- García E, Orjuela D, Camacho Y, Zuniga JJ, Plasencia J and Vazquez-Ramos JM. 1997. Comparison among DNA polymerases 1, 2 and 3 from maize embryo axes. A DNA primase activity copurifies with DNA polymerase 2. *Plant Mol. Biol.* 33: 445-455.
- Glick BR y Thompson JE. 1993. *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*. Ed. CRC press pp29-64.E.U.
- García-Maya MM, Buck KW. 1997. Isolation and characterization of replication protein A (RP-A) from tobacco cells. *FEBS Letters* 413: 181-184.
- Geogieva E I, López-Rodas G, Hittmair A, Feichtinger H, Brosch G and Loidl P. 1994. Maize embryo germination. *Planta* 192: 118-124.
- González-Carranza ZH, Lozoya-Gloria E and Roberts JA. 1998. Recent developments in abscission: Shedding light on the shedding process. *Trends in plant Science* 3: 10-14
- Gomes XV and Wold MS. 1995. Structural analysis of human replication protein A mapping functional domains of 70 kDa subunit. *J. Biol. Chem.* 270: 4534-4543.
- Gomes XV and Wold MS. 1996. Functional domains of 70 kDa subunit of human replication protein A. *Bioch.* 35: 10558-10568.
- Groot SPC Kieliszewska-Rokicka B, Vermeer E and Karssen CM. 1988. Gibberellin-induced Hydrolysis of endosperm cell wall in gibberellin-deficient tomato seeds prior to radicle protrusion. *Planta*: 174, 500-504.
- Gunz D, Hess MT and Naegeli H. 1996. Recognition of DNA adducts by human nucleotide excision repair. Evidence for a thermodynamic probing mechanism. *J. Biol. Chem.* 271:25089-25098.
- Hadfield KA and Bennet AB. 1998. Polygalacturonases: many genes in search of a function. *Plant Physiology.* 117: 337-343.
- Hata S, Kouchi H, Tanaka Y, Minami E, Matsumoto T, Suzuka I and Hashimoto J. 1992. Identification of carrot cDNA clones encoding a second putative proliferating cell-nuclear antigen, DNA polymerase delta auxiliary protein *Eur. J. Biochem.* 203: 367-371.

- Hatanaka M, Kimura S and Sakaguti K. Submitted (FEB-2000) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases
- Hays SL, Firmenich AA, Massey P, Banerjee R and Berg P. 1998. Studies of the interaction between Rad52 protein and the yeast single-stranded DNA binding protein RPA. *Mol. Cell. Biol.* 18: 4400-4406.
- He Z, Henricksen LA, Wold MS and Ingles CJ. 1995. RPA involvement in the damage-recognition and incision steps of nucleotide excision repair. *Nature* 374:566-569
- Henricksen LA, Umbricht CB and Wold MS. 1994. Recombinant replication protein A: expression, complex formation, and functional characterization. *J. Biol Chem.* 269:11121-11132.
- Henricksen LA, Wold MS 1994 Replication protein A mutants lacking phosphorylation sites for p34 cdc2 kinase support DNA replication. *J. Biol Chem.* 269 :24203-24208.
- Herzon M, Dorne AM and Grellet F. 1995. GASA, a gibberellin-regulated gene family in *Arabidopsis thaliana* related to the tomato GAST1 gene. *Plant Mol. Biol.* 27: 743-752.
- Heyer W, Rao MRS, Erdile LF, Kelly TJ and Kolodner RD. 1990. An essential *Saccharomyces cerevisiae* single stranded DNA binding protein is homologous to the large subunit of human RP-A. *EMBO J.* 9: 2321-2329.
- Iftode C, Daniely Y and Borowiec J. 1999. Replication Protein A (RPA): The Eucaryotic SSB. *Critical Rev. Biochem. Mol. Biol.* 34:141-180
- Inoue H; Nojima H; Okayama H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96:23-28.
- Ishimi Y. 1997 A DNA helicase activity is associated with an MCM 4, 6 and 7 protein complex. *J. Biol. Chem.* 272: 24508-24513.
- Jacobsen JV, Gubler F and Chandler PM. 1995. Gibberellin action in germinated cereals. In Pj Davies, ed. *Plant Hormones*, Ed 2. Martinus Nijhoff, Boston, Pp 246-271.

- Jacobsen SE and Olszewski Ne.1996. SPINDLY, a tetratricopeptide repeat protein involved in gibberellin signal transduction in *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.93: 9292-9296.
- Joshi CP. 1987. Putative polyadenylation signals in nuclear genes of higher plants: a compilation and analysis. Nucleic Acids Res.15 vol 23.
- Keshav KF, Chen C and Dutta A. 1995. Rpa4, a homolog of the 34-kilodalton subunit of the replication protein A complex. Mol. Cell. Biol. 15:3119-3128.
- Kimm D, Stigger E and Lee S. 1996. Role of 70-kDa Subunit of Human Replication Protein A (I). J. Biol. Chem.271,25: 15124-15129.
- Kodama H, Ito M, Ohnishi N, Suzuka I and Komamine A. 1991. Molecular cloning of the gene for plant proliferating-cell nuclear antigen and expression of this gene during the cell cycle in synchronized cultures of *Catharanthus roseus* cells Eur. J. Biochem. 197: 495-503
- Kornberg A and Baker T. 1992. DNA replication 2<sup>a</sup> edición Pp197-212. EUA.
- Kozak M. 1984. Compilation and analysis of sequences upstream from the traslational start site in eucaryotic mRNA. Nucleic Acids Res. 12, 857-872
- Lao Ye, Geun Lee and C Wold, MS. 1999. Replication protein A interacting with DNA.2 Characterization of double-stranded DNA-binding/helix-destabilization activities and role of the zinc-finger domain in DNA interactions. Biochemistry 39: 3974-3984.
- Lee SH, Kwong AD, Pan ZQ and Hurwitz J. 1991. Studies on the activator 1 protein complex, an accessory factor for proliferating cell nuclear antigen-dependent DNA polymerase delta. J. Biol. Chem. 266: 594-602.
- Lehman IR, Kaguni LS. 1989. DNA polymerase alpha. J. Biol. Chem.. 264:4265-8.
- Lin YL, Chen C, Keshav KF, Winchester E and Dutta A. 1996. Dissection of functional domains of the human DNA replication protein complex replication protein A. J Biol. Chem. 271:17190-17198.
- Lin X, Kaul S, Rounsley SD, Shea TP, Benito M-I, Town CD, Fujii CY, Mason TM, Bowman CL, Barnstead ME, Feldblyum TV, Buell CR, Ketchum KA, Lee JJ, Ronning CM, Koo H, Moffat KS, Cronin LA, Shen M, VanAken SE, Umayam L, Tallon LJ, Gill JE, Adams MD, Carrera AJ, Creasy TH, Goodman HM, Somerville CR, Copenhaver GP, Preuss D, Nierman C, White , Eisen JA,

- Salzberg SL, Fraser CM and Venter JC. 1999. Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 402 : 761-768.
- Liu VF, Weaver DT. 1993. The ionizing radiation-induced replication protein A phosphorylation response differs between ataxia telangiectasia and normal human cells. *Mol. Cell. Biol.* 13:7222-7231.
- Lopez I, Khan S, Vazquez-Ramos J and Hussey PJ. 1995. Molecular cloning of a maize cDNA clone encoding a putative proliferating cell nuclear antigen. *Biochim. Biophys. Acta* 1260: 119-121.
- Lopez I, Khan S, Vazquez J, Hussey PJ. 1997. The proliferating cell nuclear antigen (PCNA) gene family in *Zea mays* is composed of two members that have similar expression programmes. *Biochim. Biophys. Acta* 1353:1-6.
- Maclachlan G and Brady C. 1994. Endo-1,4- $\beta$ -glucanase, xiloglucanase, and xyloglucan endo-transglycosylase activities potential substrates in ripening tomatoes. *Plant Physiol.* 105: 965-974.
- Maniar HS, Wilson R and Brill SJ. 1997. Roles of replication protein-A subunits 2 and 3 in DNA replication fork movement in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 145: 891-902.
- Markley NA, Bonham-Smith PC and Moloney MM. 1993. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the proliferating cell nuclear antigen from *Brassica napus* (oilseed rape). *Genome* 36: 459-466.
- Melvin L (ed.). 1999. Concepts in eucaryotic DNA replication. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Mitsis PG, Kowalczykowski SC and Lehman IR. 1993. A single stranded DNA binding protein from *Drosophila melanogaster*: characterization of the heterotrimeric protein and its interaction with single- stranded DNA. *Biochemistry* 32: 5255-5268.
- Misumi M and Weissbach A. 1982. The isolation and characterization of DNA polymerase alpha from spinach. *J. Biol. Chem.* 257: 2323-2329.
- Mukherjee S. Direct Submission Submitted (04-MAR-1998) S. Mukherjee, International Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Plant Molecular Biology Lab, PO Box: 10504, Aruna Asaf Ali Marg New Delhi 110067, INDIA

- Neill SJ, Horgan R and Parry AD. 1986. The carotenoid and abscisic acid content of viviparous kernels and seedlings of *Zea mays*. L. Planta 169:87-96
- New JH, Sugiyama T, Zaitseva E and Kowalczykowski. 1998. Intermediates stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A. Nature 392: 407-410.
- Niu HH, Erdjument-Bromage ZQ, Pan SH, Lee P., Tempst, and Hurwitz, J.1997. Mapping of amino acid residues in the p34 subunit of human single. stranded DNA binding protein phosphorylate by DNA-dependent protein kinase and Cdc2 kinase *in vitro*. J. Biol. Chem. 272:12634-12641.
- Ozawa K, Dean, FB, Chen M, Lee SH, Shitatori A. 1993. Mapping of the 70 KDa, 34KDa and 11 KDa subunit genes of the human multimeric single-stranded DNA binding protein (hSSB/RPA) to chromosome bands 17p13, 1p35-p36.1 and 7p21-p22. Cell Struct. Funct. 18:221-230.
- Parker AE, Clyne RK, Carr AM and Kelly TJ. 1997. The *Schizosaccharomyces pombe* rad II gene encodes the large subunit of replication protein A. Cell. Biol. 17:2381-2390.
- Park Jang S, Wang M, Park SJ and Lee SH. 1999. Zinc Finger of replication protein A, a non-DNA binding element, regulates its DNA binding activity through redox. J. Biol. Chem. 274: 29075-29080.
- Philipova D, Mullen JR, Manier HS, Lu J, Gu C and Brill SJ. 1996. A hierarchy of SSB protomers in replication protein A. Genes Dev. 10:2222-2233.
- Reyes-Jimenez J. 1991. Estimulación de la síntesis de DNA durante las primeras horas de la germinación de *Zea-mays* por benciladenina. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Reyes-Jiménez J, Jiménez García LF, González MA and Vázquez-Ramos JM. 1991. Benzyladenine stimulation of nuclear DNA synthesis and cell division in germinating maize. Seed Science Research 1: 113-177.
- Sato S, Nakamura Y, Kaneko T, Katoh T, Asamizu E, Kotani H and Tabata S. 2000. Structural analysis of *Arabidopsis thaliana* chromosome 5. X. Sequence features of the regions of 3,076,755 bp covered by sixty P1 and TAC clones. DNA Res. 7: 31-63.



- Sambrook J, Fritsch EE and Maniatis TM. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> ed. CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanchez de Jimenez, E Aguilar and R Lopez S. 1981. Distinctive characteristics of protein synthesis in maize embryos during the early stages of germination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 99:445-50
- Sanjuan Badillo A. 2001. Efecto de la fumonisisna B1 sobre la expresión de genes relacionados con la respuesta de hipersensibilidad en ejes embrionarios de maíz durante la germinación. Tesis maestría. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Shi, L, Gast RT, Golpalraj M and Olszewski NE. 1992 Characterization of a shoot-specific, GA3 and ABA-regulated gene from tomato. *Plant Journal* 2: 153-159
- Sijbers AM, De Laat, Wariza RR, Biggerstaff M, Wei YF, Moggs JG, Carter KC, Shell BK, Evans E, De Jong MC, Rademarkers SD, Rooij J, Jaspers N, Hoeijmarkers JH and Stillman B. 1994. Smart machines at the DNA replication fork. *Cell* 78:725-728.
- Suzuka I, Hata S, Matsuoka M, Kosugi S, Hashimoto J. 1991. Highly conserved structure of proliferating cell nuclear antigen (DNA polymerase delta auxiliary protein) gene in plants. *Eur. J. Biochem.* 195:5715
- Strit Y, Haldfield KA, Bennet AB, Bradford K J and Downie B. 1999. Expression of polygalacturonase associates with tomato seed germination. *Plant Physiology* 121: 419-428.
- Tanaka T and Nasmyth K. 1998. Association of RPA with chromosomal replication origins requires Mcm protein, and is regulated by Rad53, and Cyclin-and Dbp4-dependent kinases. *EMBO J.* 17: 5182-5191.
- Taylor EM and Lehmann AR. 1998. Review: Conservation of eukaryotic DNA repair mechanisms. *Int. J. Radiat. Biol* 74: 277-286
- The Arabidopsis Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815
- Theologis A, Ecker JR, Palm CJ, Federspiel NA, Kaul S., White O, Alonso J, Altafi H, Araujo R, Bowman CL, Brooks SY, Buehler E, Chan A, Chao Q, Chen H, Cheuk RF, Chin CW, Chung MK, Conn L, Conway AB, Conway AR, Creasy TH, Dewar K, Dunn P, Etgu P, Feldblyum TV, Feng J-D, Fong B, Fujii CY, Gill JE, Goldsmith AD, Haas B, Hansen NF, Hughes B, Huizar L, Hunter JL,

Jenkins J, Johnson-Hopson C, Khan S, Khaykin E, Kim CJ, Koo HL, Kremenetskaia I, Kurtz DB, Kwan A, Lam B, Langin-Hooper S, Lee A, Lee JM, Lenz CA, Li JH, Li Y-P, LinX, Liu SX, Liu ZA, Luross JS, Maiti R, Marziali A, Militscher J, Miranda M, Nguyen M, Nierman WC, Osborne BI, Pai G, Peterson J, Pham PK, Rizzo M, Rooney T, Rowley D, Sakano H, Salzberg SL, Schwartz JR, Shinn P, Southwick AM, Sun H, Tallon LJ, Tambunga G, Toriumi MJ, Town CD, Utterback T, Van Aken S, Vaysberg M, Vysotskaia VS, Walker M, Wu D, Yu G, Fraser CM, Venter JC and Davis RW. 2000. Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 816-820.

Treuner K, Okuyama A, Knippers R and Fackelmayer FO. 1999. Hyperphosphorylation of replication protein A middle subunit (RPA32) in apoptosis. *Nucleic Acids Res.* 27:1499-504.

Tsurimoto T, Melendy T and Stillman B. 1990. Sequential initiation of lagging and leading strand synthesis by two different polymerase complexes at the SV40 DNA replication origin. *Nature* 346: 534-539.

Umbricht LB, Erdile LF, Jabs EW and Kelly TJ. 1993. Cloning overexpression and genomic mapping of the 14-KDa subunit of human replication protein A. *J. Biol. Chem.* 268:6131-6138.

Umez K, Sugawara N, Chen C, Haber JE and Kolodner RD. 1998. Genetic analysis of yeast RPA1 reveals its multiple functions in DNA metabolism. *Genetics.* 48:989-1005.

Van der Keemp PA, Thomas D, Barbey De Oliveira R and Boiteux S. 1996. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, which codes for a DNA glycosylase that excises 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamidopyrimidine. *Proc. Nat Acad. Sci. USA.* 93: 5197-5202.

Van der Knaap E, Jagoueix S and Kende H. 1997. Expression of an ortholog of replication protein A1 (RPA1) is induced by gibberellin in deepwater rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 9979-9983.

Vázquez-Ramos JM and Reyes J. 1990. Stimulation of DNA synthesis and DNA polymerase activity during early germination of maize embryo axis. *Can. J. Bot.* 45: 649-655.

- Vögeli-Lange R, Fründt C, Hart CM, Beffa R, Nagy F and Meins F.Jr. 1994. Evidence for a role of  $\beta$ -1,3-glucanase in dicot seed germination. *Plant Journal* 5: 273-278.
- Waga S and Stillman B. 1998. The DNA replication fork in eucaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.* 67:721-751
- White CN and Rivin CJ. 2000. Gibberellins and seed development in maize. II. Gibberellin synthesis inhibition enhances abscisic acid signaling in cultured embryos. *Plant Physiol.* 122:1089-1097.
- White CN, Proebsting WM, Hedden P and Rivin CJ. 2000. Gibberellins and seed development in maize. I. Evidence that gibberellin/abscisic acid balance governs germination versus maturation pathways. *Plant Physiol.* 122: 1081-1088.
- Wobbe CR, Weissbach L, Borowiec JA, Dean FB, Murakami, Bullock P and Hurwitz. J. 1987. Replication of SV40-origin-containing DNA with purified proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:2523-2527.
- Wold MS. 1997. Replication protein A. *Annu. Rev. Biochem.* 66:61-92
- Wold MS and Kelly TJ. 1988. Purification and characterization of replication protein A a cellular protein required for in vitro replication of simian virus 40 DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:2523-2527.
- Wold MS, Weinberg DH, Virshup DM, Li JJ and Kelly TJ. 1989. Identification of cellular proteins required for simian virus 40 DNA replication. *J. Biol. Chem.* 264: 2801-2809.
- Wold MS. 1997. Replication Protein A: a Herotrimeric, Single-Stranded DNA-Binding Protein Required for Eukaryotic DNA Metabolism. *Annu. Rev Biochem.* 66:61-69
- Wood RD. 1996. Xeroderma Pigmentosum group F caused by a defect in a structure-specific DNA repair endonuclease. *Cell.* 86: 811-822.
- Wood RD. 1996., DNA repair en euckaryotes. *Anuu. Rev. Biochem.* 65:135-167.
- Wu CT, Bradford Kj, Leubner-Metzger G and Meins F.Jr. 1998. Class I beta-q,3-glucanasa and chitinase are expressed in endosperm caps of tomato seeds

prior to radicle emergence. Plant Biology '98 American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, abstract no.46.

Yokoi M, Ito M, Izumi M, Miyazawa H, Nakai H and Hanaoka F. 1997. Molecular cloning of the cDNA for the catalytic subunit of plant DNA polymerase alpha and its cell-cycle dependent expression. Genes Cells 2: 695-709.

Zuñiga-Aguilar JJ. 1998 Efecto de citocininas a niveles transcripcional y traduccional durante la germinación de maíz. Tesis de Doctorado. Facultad de Química UNAM.

## Apéndice A

### MEDIOS

#### Agar suave

NaCl	5 g
MgSO <sub>4</sub>	2 g
Extracto de levadura	5 g
Agarosa	0.7 % (w/v)
Agua	hasta 1 L

#### Medio LB

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g
Agua	hasta 1L.

#### Medio SOB

Triptona	2%
Extracto de levadura,	0.5%
NaCl	10mM
KCl	2.5 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub> , pH 6.7-7.0	10 mM

#### Medio TB

Peptona	1.65% (w/v)
Extracto de levadura	0.4% (w/v),
NaCl	136 mM
Glucosa	20 mM

#### Medio SOC

Peptona	1.6% (w/v)
Extracto de levadura	0.4%(w/v)
NaCl	136 mM
Glucosa	20mM

## SOLUCIONES

### Solución alcalina de lisis

NaOH	0.2 N
SDS	1%

### Amortiguador B boehringer<sup>MR</sup> para enzimas de restricción

Tris-HCl	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
NaCl	100 mM,
2-Mercaptoetanol pH 8.0	1 mM

### Amortiguador de carga para DNA

Azul de bromofenol	0.25%
Glicerol	50%
Na <sub>2</sub> EDTA2H <sub>2</sub> O pH 8.0	2.0 mM

### Amortiguador de carga para RNA

glicerol	50%
Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH7	10 mM
Azul de bromofenol	0.4%

### Amortiguador para desfosforilación

Tris-HCl pH 8.5.	500 mM
EDTA	1 mM

### Amortiguador de dilución

Glicerol	50%
Tris HCl pH7.6	25 mM
MgCl <sub>2</sub> ,	1 mM
ZnCl <sub>2</sub>	0.1 mM

#### Amortiguador de extracción de DNA

Tris- HCl pH 8.0	0.1 M
Na <sub>2</sub> EDTA 2H <sub>2</sub> O pH 8.0	50 mM
NaCl	0.5 M

#### Amortiguador 5 X para ligación

Tris-HCl pH7.5	250 mM
MgCl <sub>2</sub>	50 m
ATP	5 mM
DTT	5 mM
polietilen glicol 8000	25%

#### Amortiguador para PCR

Tris-HCl, pH 8.9	10 mM
KCl	50 mM

#### Amortiguador para síntesis de cadena sencilla

Tris-HCl pH 8.3	250 mM
MgCl <sub>2</sub>	375 mM
DTT	0.1 M

#### Amortiguador SM

Tris -HCl pH 7.5	0.05 M
NaCl	0.1 M
MgSO <sub>4</sub>	0.01 M
gelatina	0.01 %

#### Amortiguador TE

Tris- Cl	10 Mm
EDTA, pH 8	4 mM
Amortiguador TAE 1 X	

Tris base 1X	
Trizma base	40 mM,
ácido acético glacial	20 mM
Na <sub>2</sub> EDTA2H <sub>2</sub> O pH 8.0	2.0 mM

## FCI

Fenol	50 %-
cloroformo	49%
alcohol isoamilico	1 %

## Solución GTE

Glucosa	50 mM
Tris-Cl	25 mM pH 8
EDTA	10 mM pH 8

## Solución de Hibridación

SSC	6X
SDS	0.5%,
DNA de esperma de salmón	1%
Denhart	5X

## Solución de neutralización

CH <sub>3</sub> COOK 5M	60%
CH <sub>3</sub> COOH glacial	11.5 %
H <sub>2</sub> O	28.5 %

## SSC 2X

## SSC 20X

Para preparar 1 L de solución.

NaCl	173 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	27.6 g
H <sub>2</sub> O	800 ml
Ajustar pH 7	

## Solución TB

Pipes	10 mM
MnCl <sub>2</sub>	55 mM
CaCl <sub>2</sub>	15 mM
KCl pH 6.7	250 mM



## Apéndice B

### Secuencia de oligonucleótidos usados en este trabajo

rpa 1.- 5' GCTGGTGGTTTCAAGTCCAT 3'

rpa2.- 5' ATCCAGACCCAAAAGCTTCA 3'

λgt11F.- 5' ATTGGTGGCGACGACTCCTGGAG 3'

λgt11rev.- 5' CAGACCAACTGGTAATGGTAGCG 3'

rpa7.- 5' AACTGGGTCATTAAGGTGCG 3'