



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DE AUXINAS EN LA ESTABILIZACIÓN
DE LOS DOS TRANSCRITOS DE RUBISCO
ACTIVASA EN PLÁNTAS DE MAÍZ.**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA DE ALIMENTOS
PRESENTA:
REBECA ELIZABETH PÉREZ MUÑOZ.**



MÉXICO, D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PROFESORES

Presidente	Estela Sánchez Quintanar.
Vocal	Gloria Gutiérrez Venegas.
Secretario	Amelia Ma. De Gpe. Farres González Sarav.
1er Suplente	Ismael Bustos Jaimes.
2do Suplente	José Pedraza Chavarri.

Sitio donde se desarrollo el tema:

Facultad de Química, Departamento de Bioquímica.
Edificio E, Laboratorio 103. UNAM.

Dra. Estela Sánchez Quintanar.
Asesor.

M. en C. Raúl Aguilar Caballero
Supervisor Técnico.

Rebeca Elizabeth Pérez Muñoz.
Sustentante.

Dedicado a:

- ☞ Dios, gracias por ayudarme a seguir adelante permitiéndome aprender de cada momento bueno o malo de la vida que me ha servido para crecer.

- ☞ Mamá, por cuidarme desde donde quiera que estés y por los valores que me enseñaste para ser la mujer que soy, esto es por ti.

- ☞ Papá, por apoyarme en mis decisiones y por tu amor incondicional.

- ☞ Héctor, mi amor por ser el mejor regalo de mi vida y por tu apoyo y estímulo para que sigamos adelante en todos nuestros proyectos.

- ☞ Marco, Héctor, Abraham, Nalle, Edu y Eban, por estar conmigo en todo momento y por compartirme su alegría.

- ☞ Bebe, porque aunque estuvimos juntos poco tiempo, me diste las fuerzas necesarias para seguir adelante en mis planes y en los de tu papi.

Agradecimientos.

- ☞ **Dra. Estela Sánchez de Jiménez**, por su apoyo y enseñanzas que me ayudaron a seguir con mi formación.

- ☞ **Dr. Martín Vargas Suárez**, por ayudarme a sacar este proyecto de mi vida adelante, por tus enseñanzas, paciencia y amistad. Espero que tus sueños también se cumplan.

- ☞ **M. en C. Raúl Aguilar**, por su apoyo y asesoría en el transcurso de este trabajo.

- ☞ **Erika, Norma, Esme, Augusto y Cesar**, por escucharme siempre que tenía alguna duda y por los buenos momentos compartidos.

- ☞ **Cecilia, Mayra, Alejandra y Mónica**, por todos los momentos vividos en la carrera y sobre todo por estar siempre juntas en momentos difíciles y alegres de cada una de nosotras.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....I

1. RESUMEN.....1

2. ANTECEDENTES.....3

 2.1 Fotosíntesis.....3

 2.2 Rubisco Activasa.....7

 2.3 mRNA y las secuencias que determinan su
 Inestabilidad.....13

 2.4 Rutas de degradación del mRNA.....26

 2.5 Regulación circadiana en la expresión de
 Genes..... 31

 2.6 Hormonas.....42

 2.6.1 Ácido Indolacético. Estructura, Biosíntesis,
 Transporte y Catabolismo.....44

 2.6.2 Estímulo exógeno con Ácido Indolacético..... 48

3. HIPÓTESIS.....51

4. OBJETIVOS.....52

 4.1 Objetivo General.....52

 4.2 Objetivos Particulares.....52

5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
5.1 Material Biológico.....	53
5.2 Tratamiento con auxinas ácido indolacético, (AIA).....	55
5.2.1 Lote control.....	55
5.2.2 Lote tratado con 5 μ M y 50 μ M de AIA.....	55
5.3 Expresión de Rubisco Activasa durante Una oscilación diurna.....	56
5.4 Tratamiento con 50 μ M de AIA en dos horas clave de la oscilación diurna.....	57
5.5 Métodos.....	58
5.5.1 Extracción de Proteínas.....	58
5.5.2 Cuantificación de Proteínas.....	58
Curva patrón de albúmina sérica bovina.....	59
5.5.3 Electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida.....	60
5.5.4 Western-Blot.....	61
5.5.5 RT-PCR.....	62
6. RESULTADOS.....	72
6.1 Efecto de las dos concentraciones de Ácido Indolacético.....	72
6.2 Expresión de Rubisco Activasa durante una oscilación diurna.....	78
6.3 Efecto de AIA 50 μ M en dos horas claves en la Oscilación diurna.....	80

7. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	84
7.1 Cambios en la expresión de RCA debidos al Ácido Indolacético.....	85
7.1.1 Lote Control.....	86
7.1.2 Lote Tratado con 5 μ M y 50 μ M de AIA...	89
7.2 Expresión de Rubisco Activasa durante una oscilación diurna.....	91
7.3 Cambios en la expresión de RCA en plántulas tratadas con 50 μ M de AIA en dos horas clave de la oscilación diurna.....	94
7.3.1 Lote Control.....	95
7.3.2 Lote Tratado con 50 μ M de AIA.....	95
8.CONCLUSIONES.....	94
9.BIBLIOGRAFÍA.....	101

ABREVIATURAS

AAA+:	<u>A</u> TPasa <u>A</u> sociada con una variedad de <u>A</u> ctividades celulares.
ADP:	Adenosina difosfato.
AIA:	Ácido Indolacético
AREs:	Elementos ricos en adenina-uracilo.
ATP:	Adenosina trifosfato.
.bp:	Pares de bases.
CCG:	Genes controlados por oscilaciones.
cDNA:	Ácido desoxirribonucleico complementario.
dNTPs:	Desoxirribonucleotidos trifosfatados.
DST:	Elementos downstream.
kDa:	kilo daltones.
mA:	mili amperes.
mRNA:	Ácido ribonucleico mensajero.
NADPH:	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido.
NADP+:	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado.
Odu/mm²	Unidad de Densidad óptica por milímetro cuadrado.
ORF:	Marco de lectura abierto (<u>O</u> pen <u>R</u> eading <u>F</u> rame).
RuBP:	Ribulosa-1,5-bifosfato.
Rubisco:	Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa.
RBCL:	Subunidad grande de Rubisco.

- RBCS:** Subunidad pequeña de Rubisco.
- RCA:** Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa oxigenasa
activasa o Rubisco activasa.
- RT-PCR:** Reacción en cadena de la Polimerasa
en transcripción reversa.
- SAUR:** mRNAs pequeños regulados por auxinas
(small-auxin-up RNA).
- SDS-PAGE:** Electroforesis en gel desnaturizante
de poliacrilamida.
- 3-PGA:** 3-fosfoglicerato.
- 3'UTR:** Región 3' no traducible del transcrito
(Untranslated Region).

1. RESUMEN

Rubisco activasa es una chaperona molecular cloroplástica soluble, constituida en maíz por dos polipéptidos, uno de 43 kDa y otro de 41 kDa. Rubisco activasa facilita la remoción de azúcares fosfatados como RubP, del sitio activo de Rubisco por medio de la hidrólisis de ATP, permitiendo así seguir con la fotosíntesis.

Los polipéptidos de Rubisco activasa de maíz están codificados por dos genes con diferente tamaño en su región 3'UTR; los cuales presentan el mismo marco de lectura abierto, el cual corresponde únicamente al polipéptido de 43 kDa. Dichos transcritos difieren en sus regiones 3'UTR, ya que en ella se encuentran motivos similares a los elementos DST encontrados en los genes SAUR del frijol de soya, los cuales confieren inestabilidad a los transcritos que los contienen y que podrían ser estabilizados con auxinas. En el caso del producto de amplificación de 287 bp se presentan los subdominios I y II y corresponde al mensaje Zmrca1 con un tamaño de 1.4 Kb; en tanto que en el producto de 635 bp se presentan ambos subdominios, además del subdominio III repetido dos veces y corresponde al mensaje Zmrca2 con un tamaño de 1.8 Kb, sugiriéndose así diferente grado de inestabilidad. Además, dichos transcritos presentan variaciones cíclicas durante un período de luz/oscuridad, teniéndose cambios muy marcados en el contenido de los transcritos.

Con el fin de conocer el efecto que presentan las auxinas en los transcritos que codifican para Rubisco activasa de maíz, así como la expresión de la proteína y su relación en sus dos isoformas, se consideró someter a las plántulas de maíz a un estímulo exógeno con auxinas (ácido indolacético), durante diferentes etapas de desarrollo, usando las hojas 3 (ver página 33), durante diferentes horas de un ciclo de luz/oscuridad.

Cuando se hacen los tratamientos con el ácido indolacético en dos concentraciones diferentes ($5\mu\text{M}$ y $50\mu\text{M}$), se observa que el aumento de la isoforma de 41 kDa, así como el desarrollo total de la plántula.

Sin embargo, la cantidad de Rubisco Activasa proteína no cambia en paralelo con el aumento del mRNA, lo cual sugiere que hay además una regulación de tipo traduccional.

En resultados preliminares, se observó la estabilización del producto de amplificación con la sonda 287 bp, indicando que se incrementa la cantidad de uno o de ambos mensajes, por efecto de auxinas, por lo que se podría sugerir que las auxinas en dichas concentraciones pudieran estabilizar al menos a uno de los transcritos de RCA.

2. ANTECEDENTES

2.1 Fotosíntesis.

La fotosíntesis es un proceso mediante el cual las plantas transforman el carbono inorgánico en carbono orgánico, principalmente en forma de hidratos de carbono, empleando energía luminosa.

En plantas este proceso se lleva a cabo en el cloroplasto mediante dos tipos de reacciones, las cuales se llevan a cabo en dos fases: las reacciones de la fase luminosa se realizan en la membrana tilacoide e incluyen procesos similares al transporte electrónico y a la fosforilación oxidativa mitocondriales; las reacciones de la fase oscura tienen lugar en el estroma, a través de un ciclo de reacciones enzimáticas.

La mayoría de las plantas producen un compuesto de tres carbonos, 3-fosfoglicerato (3-PGA), como el primer producto estable en la conversión del CO_2 a carbohidratos. Este grupo que incluye a la mayoría de las plantas cultivables, es referido como las plantas tipo C_3 , este conjunto de plantas emplean la ruta fotosintética del Ciclo de Calvin para fijar CO_2 , usando como enzima clave a la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco), para convertir CO_2 y ribulosa 1,5-bifosfato (RuBP) en 3-fosfoglicerato (Buchanan, et al, 2000).

Algunas especies de plantas, como el maíz, poseen un ciclo metabólico que concentra el CO_2 en sus células fotosintéticas, impidiendo la fotorrespiración casi por completo. Las hojas de plantas que presentan el llamado ciclo C_4 poseen una anatomía característica. Sus finas venas están rodeadas de forma concéntrica por una sola capa de las llamadas células de la vaina del haz, que a su vez están rodeadas por una capa de células mesófilas; esta característica es llamada anatomía de Kranz. El ciclo C_4 empieza con la captura del CO_2 atmosférico por parte de las células del mesófilo, las cuales al carecer de la enzima Rubisco en sus cloroplastos, lo realizan por condensación, en forma de HCO_3^- , con el fosfoenolpiruvato (PEP) para dar oxaloacetato (ácido de cuatro carbonos). El oxaloacetato es reducido por el NADPH a malato, el cual es exportado a las células de la vaina del haz. Allí, el malato sufre una descarboxilación oxidativa, por acción del NADP^+ , formándose CO_2 , piruvato y NADPH.

El CO_2 , que ha resultado concentrado en el cloroplasto de la vaina durante el proceso, entra en el ciclo de Calvin. El piruvato regresa a las células del mesófilo, donde es fosforilado para formar nuevamente PEP. (Fig. 1)

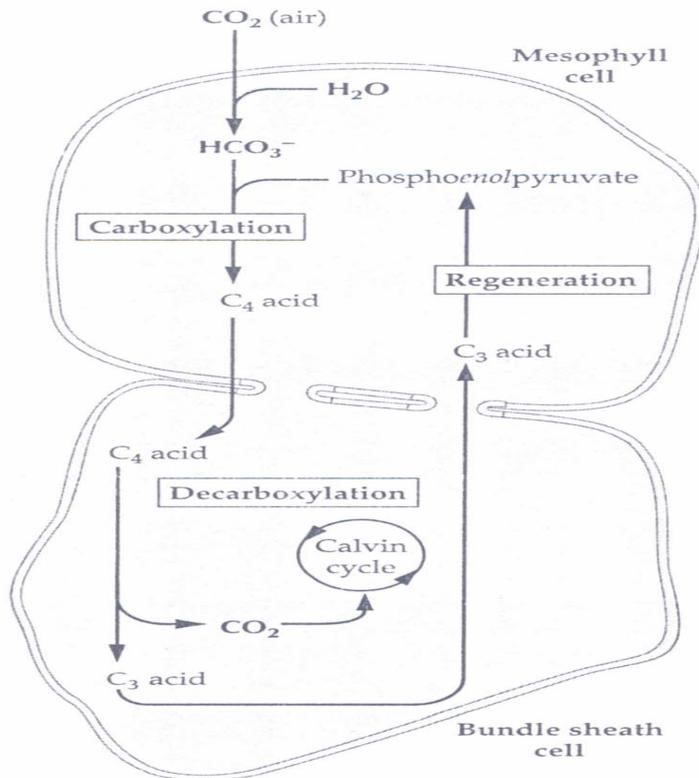


Fig. 1. Aspecto general del ciclo C_4 (Buchanan, et al, 2000).

La primera enzima involucrada en la conversión de CO_2 en carbohidratos, Rubisco desempeña un papel importante en la bioquímica del cloroplasto. Consistente con este papel, Rubisco es la proteína soluble más abundante en el cloroplasto, y es posible que sea una de las más importantes en la biosfera (Buchanan, et al, 2000).

En plantas, Rubisco consiste de ocho subunidades grandes (56kDa) y ocho pequeñas (14kDa), llamadas L y S respectivamente. La activación de Rubisco involucra la formación de un complejo carbamato- Mg^{2+} en una lisina (Lys-201) en el sitio activo. (Fig. 2.)

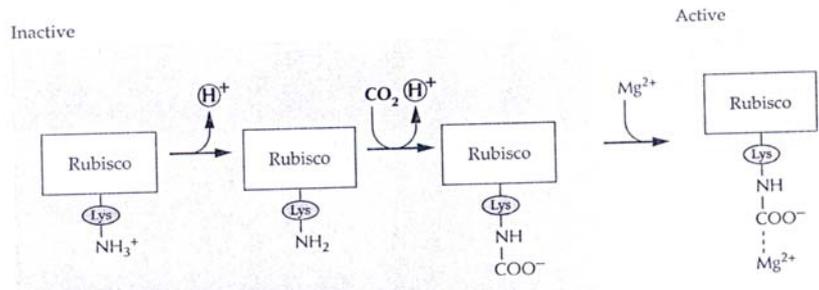


Fig. 2. Activación de Rubisco por carbamilación (Buchanan, et al, 2000).

2.2 Rubisco Activasa (RCA).

Rubisco activasa (RCA), la proteína reportada para activar a Rubisco, fue descrita por primera vez por Portis, 1990. Actualmente es conocida como una chaperona molecular (Sánchez, et al. 1995), es decir, pertenece a una familia de proteínas que asisten al correcto ensamble no covalente de muchos otros polipéptidos. Las chaperonas moleculares no son componentes de las estructuras ensambladas cuando ellas están desempeñando su función biológica normal.

La proteína RCA es codificada por genes nucleares, sintetizada en el citosol como precursor y procesada como polipéptido maduro dentro del estroma del cloroplasto (To, et al, 1999).

La proteína RCA es abundante en la naturaleza, ya que representa el 2% de la proteína total soluble en plantas (Robinson et al., 1988).

RCA es una proteína AAA+ (ATPasa asociada con una variedad de actividades celulares) que facilita la remoción dependiente de ATP del azúcar fosfato del sitio activo de Rubisco.

Esta acción libera el sitio activo de Rubisco por carbamilación espontánea por CO_2 y la unión del metal (Mg^{2+}), prerequisites para la actividad de Rubisco y así seguir con la fotosíntesis (Salvucci, et al, 2001). (Fig. 3).

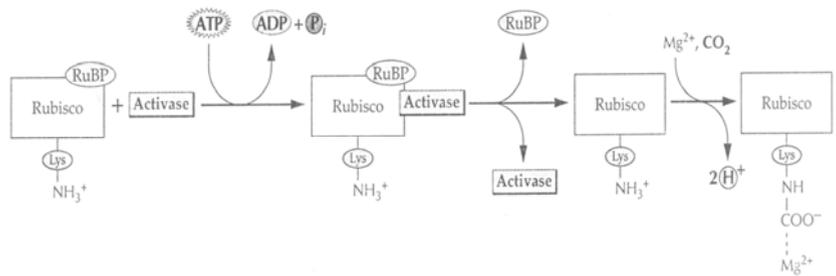


Fig. 3. Remoción del enlace de RuBP por Rubisco Activasa (Buchanan, et al, 2000).

La estructura tridimensional de la activasa es desconocida, pero el módulo AAA+ parece tener un pliegue conservado, consistente con muchas proteínas AAA+ en las cuales el módulo AAA+ se une covalentemente a los dominios que determinan la función celular activa, residuos tanto del amino como del carboxilo terminal del módulo de AAA+ en RCA parecen interactuar con Rubisco (Houtz, et al, 2003).

Una región de la subunidad grande de Rubisco, la cual es adyacente al sitio activo, ha sido identificado utilizando mutagénesis dirigida para cambiar la especificidad entre la Rubisco de *Chlamydomonas* y su heteróloga de Rubisco Activasa (Houtz, et al, 2003).

Las proteínas AAA+ usualmente participan en complejos macromoleculares compuestos de varias subunidades de proteínas AAA+, muchas veces ensamblándose en anillos hexaméricos donde la actividad de ATPasa parece actuar como un motor conductor de movimientos inter e intramolecular (Ogura, et al., 2001). Similarmente, las unidades de activasa están altamente asociadas entre ellas mismas, incrementándose así tanto la función de ATPasa como la activación de Rubisco por medio de una oligomerización (Houtz, et al, 2003).

En varias especies de plantas, la Rubisco Activasa consiste de dos polipéptidos, los cuales difieren en longitud por la presencia de un extra de 30 aminoácidos en el carboxilo terminal de una de las formas. La isoforma larga (referida como la forma α) es producida por splicing alternativo de un único pre-mRNA de activasa (Werneke, et al, 1989; Rundle, et al, 1991b).

Es así que el análisis genómico de espinaca, *Arabidopsis*, algodón y arroz ha identificado un único gen que es responsable de la producción de una isoforma larga (α) y una corta (β) encontradas en estas plantas (To, et al, 1999).

La actividad de la Rubisco Activasa es regulada por la relación ADP/ATP en el estroma, y la respuesta es modificada por cambios redox en la isoforma larga que es mediada por tioredoxina, estas características permiten la activación de Rubisco para ser regulada por la Rubisco activasa en respuesta a la intensidad de luz (Zhang, and Portis, 1999).

Rubisco activasa esta comprendida por dos polipéptidos de aproximadamente 41 y 45 kDa en la mayoría de las especies de las plantas, incluyen espinaca y *Arabidopsis thaliana* (Werneke, et al., 1989).

En maíz, se han reportado dos polipéptidos de RCA con diferentes pesos moleculares de 41 y 43 kDa respectivamente. Existen también dos transcritos que codifican para RCA, cada uno esta expresado por su gen correspondiente, sin embargo éstos contienen el mismo marco de lectura abierto (Open Reading Frame : ORF), con diferentes regiones 3'UTRs.

El ORF codifica para el polipéptido maduro de 43 kDa, en tanto que el polipéptido de 41 kDa muy probablemente proviene del procesamiento post-traducciona del polipéptido de 43 kDa en su región amino terminal (Vargas , et al., 2004). La expresión diferencial de las dos formas bioquímicamente diferentes de la Rubisco Activasa puede proveer un mecanismo para la optimización de la actividad de Rubisco bajo condiciones ambientales diferentes.

En todas las plantas, la transcripción de los mRNAs de RCA muestra que son órgano-específicos, ya que están restringidos en las partes verdes de la planta, reguladas de acuerdo a la edad de la hoja e inducción por la luz, esto causa grandes cambios en la cantidad y calidad de los mRNAs y el patrón de síntesis de estas proteínas (Rundle, et al., 1991b).

Las plantas durante su desarrollo y diferenciación reciben una gran cantidad de señales ambientales, de desarrollo y específica de tejido, para regular patrones complejos de la expresión de genes. La regulación de la expresión de genes de algunas proteínas en las semillas, sucede durante etapas específicas del desarrollo de la semilla y no en otras partes de la planta, esto es un impresionante control del tejido y su desarrollo, y es de considerable importancia en la agricultura (Singh, 1998).

Las plantas también tienen necesidades únicas y estratégicas para responder a cambios en su medio ambiente. Cuando la luz es incidida en una hoja etiolada, numerosos genes que codifican proteínas cloroplásticas, mitocondriales, peroxisomales y citoplásmicas son activadas. Similarmente, un número de estreses bióticos y abióticos son causa de que algunos genes sean activados como parte de la respuesta planta-defensa al estrés. La expresión de los genes es regulada de mejor manera al inicio de la transcripción, y esto se debe al gran porcentaje del genoma dedicado a los factores de transcripción en plantas y otros eucariontes (Singh, 1998).

2.3. mRNA y las secuencias que determinan su inestabilidad.

La expresión de genes es un proceso muy complejo constituido de varios pasos, regulado en todas las fases del crecimiento y desarrollo de las plantas. El primer paso en el proceso es la transcripción, la cual ha recibido la mayor atención y además es la mejor entendida a nivel molecular. De cualquier manera, esto ha llegado a dejar en claro que solamente los eventos transcripcionales no pueden explicar la regulación de muchos genes en plantas. Esto no es sorprendente porque después de que un transcrito es sintetizado, éste debe ser procesado en el núcleo, exportado al citoplasma, llevado al ribosoma, y traducido repetidamente hasta que es degradado por las ribonucleasas celulares (Fig. 4).

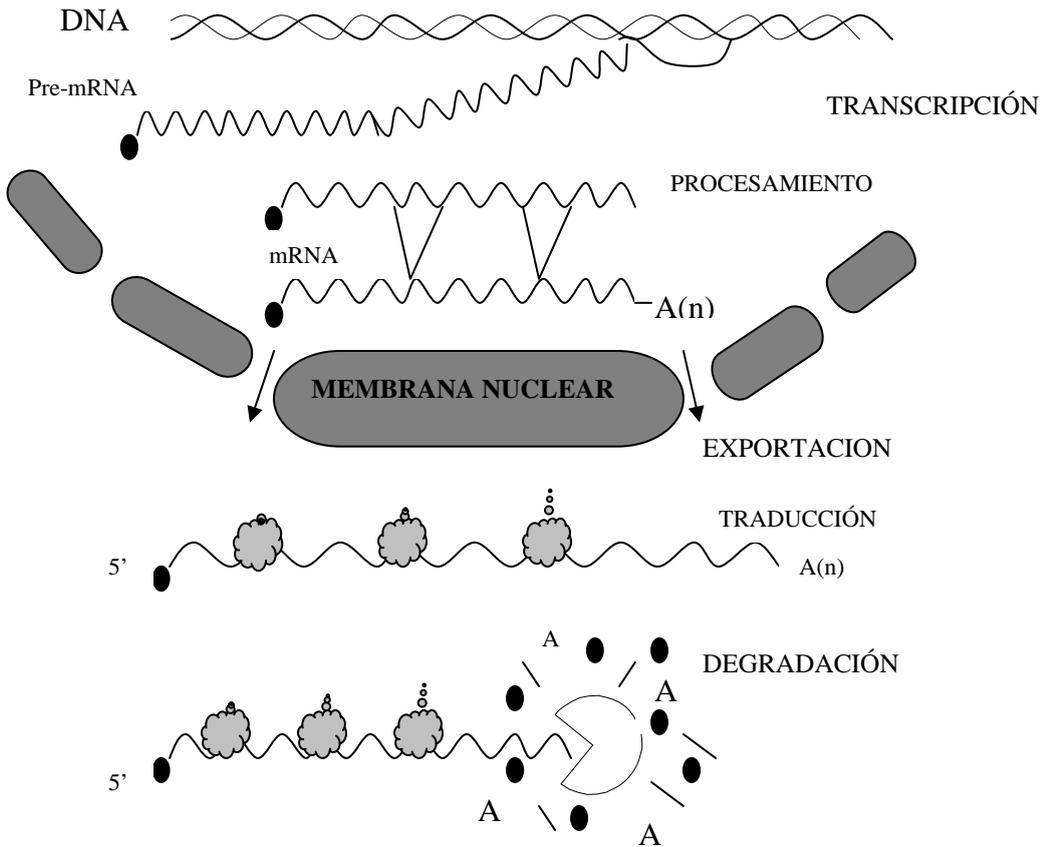


Fig. 4. Eventos durante la vida media de un mRNA
(Green, 1993).

Estos eventos pueden además continuar con algún paso de procesamiento de proteínas, proveyendo un blanco potencial para el control post-transcripcional (Green, 1993).

Las células pueden ser capaces de ajustar sus patrones de expresión genética rápidamente para responder a estímulos intracelulares y extracelulares; esto es necesario para que algunos transcritos puedan alcanzar rápidamente nuevos niveles en sus estados basales. Los niveles de los estados basales en los mRNAs eucarióticos están determinados tanto por su velocidad de síntesis como por su velocidad de degradación. El control de la estabilidad del mRNA es la principal determinante de los niveles del estado basal del mRNA en la célula y por tanto en el nivel de expresión de un gen en particular. Además la estabilidad del mRNA afecta la velocidad a la cual los mRNAs presentan cambios después de la transcripción; la mayoría de los mRNAs inestables alcanzan rápidamente su estado basal, debido a su rápida velocidad de racambio (Abler and Green, 1996).

Estudios más recientes en células eucarióticas han sido enfocados a transcritos que son particularmente inestables generalmente, con vidas medias menores a 60 minutos. Una razón de este inherente interés en los transcritos inestables, es que ellos muchas veces corresponden a genes que pueden ser controlados rápida y rigurosamente, como son aquellos involucrados en la regulación del crecimiento y diferenciación celular (Pérez-Amador, et al., 2001). Algunos transcritos que están dentro de la categoría de inestables incluyen a los transcritos del fitocromo en plantas y varios transcritos de protooncogenes en células de mamíferos (Seeley, et al., 1992)

El reconocimiento de transcritos eucarióticos inestables está considerado como un proceso activo porque los transcritos inestables y las secuencias que confieren inestabilidad a transcritos reporteros han sido identificados en varios sistemas. Estas secuencias de inestabilidad se consideran responsables de mediar la degradación selectiva de mRNAs por interacción con RNAsas u otros factores celulares.

La identificación inicial de un transcrito inestable está basada muchas veces en su rápida desaparición de las células bajo ciertas condiciones (Green, 1993).

Un acercamiento directo para medir la velocidad de degradación de los mRNAs es siguiendo las cinéticas de degradación de un transcrito in vivo después del tratamiento con un inhibidor de la transcripción. Este método es comúnmente utilizado para medir la vida media de un transcrito inestable en células animales (Gree, 1993).

Un paso crítico en la elucidación de los principios fundamentales que gobiernan las rutas de degradación de transcritos en plantas es la identificación de secuencias que actúan como determinantes en la estabilidad de los mismos.

Dentro del cuerpo del mRNA inestable, existen motivos de secuencias específicas que pueden actuar constitutivamente para estabilizar la inherente inestabilidad de un transcrito en particular o modular la estabilidad de un mRNA en respuesta a ciertos estímulos fisiológicos, de desarrollo o ambientales (Pérez , et al., 2001).

Como mínimo se ha demostrado la existencia de dos diferentes elementos que desestabilizan a los transcritos en plantas (Green, 1993).

El elemento más estudiado en células animales son los AREs (elementos ricos en adenilato/uridinato). Los transcritos que contienen AREs son blancos selectivos para una rápida degradación. Los AREs tienen una longitud aproximada de 50 a 150 nucleótidos, usualmente contienen múltiples copias de los motivos AUUUA y un alto contenido de uridina, y se encuentran localizados en la región 3'UTR de los mRNAs que codifican una gran variedad de proto-oncoproteínas, citoquinas y factores de transcripción (Chen and Shyu, 1995).

En sistemas animales, las secuencias AUUUA juegan un papel importante en la regulación post-transcripcional de la expresión de genes durante procesos como son el crecimiento celular, diferenciación y respuesta inmune (Gutiérrez, 1999). Debido al significado de los elementos AUUUA en animales, se han realizado transformaciones con transcritos reporteros que contienen 11 copias de los motivos AUUUA en su región 3'UTR en células de tabaco, logrando así una degradación más rápida de los transcritos correspondientes.

Esto indica que las rutas de degradación del mRNA mediada por repeticiones AUUUA podrían ser conservadas entre animales y plantas (Ohme-Takagi, et al, 1993).

Al parecer todos los AREs funcionales median la deadenilación como el primer paso en la degradación del mRNA, aunque diferentes clases de AREs presentan diferentes reacciones cinéticas (Chen and Shyu, 1995).

En plantas, en adición a los AREs, se han estudiado con detalle un determinante de inestabilidad llamado DST (downstream). Los elementos DST fueron identificados primeramente como una secuencia altamente conservada en la región 3'UTR de los genes SAUR (por small-auxin-up RNA) en frijol de soya (McClure, et al. 1989). Estos genes codifican transcritos inestables cuya vida media ha sido estimada en el orden de 10 a 50 minutos. Aunque la función de las proteínas SAUR es desconocida, la expresión temporal y espacial de los genes SAUR se correlaciona con la elongación celular inducida por auxinas (Johnson, et al. 2000).

El prototipo DST, del SAUR15A de frijol de soya, es aproximadamente de 45 pares de bases de largo y consiste de tres subdominios altamente conservados separados por dos regiones variables (Newman, et al. 1993). Estudios de mutagénesis han demostrado que dos residuos dentro del subdominio conservado, las secuencias ATAGAT y GTA, son necesarias para la función de inestabilidad (Sullivan and Green, 1996).

Estudios realizados por el grupo de Newman, et al., 1993, han demostrado que los elementos DST pueden desestabilizar a transcritos reporteros estables como son β -glucuronidasa y globina en tabaco.

La correlación entre la expresión de los genes SAUR y la elongación celular ha sido también observada durante la respuesta de gravitropismo (Gil, et al., 1994).

Los transcritos SAUR se acumulan en las células que están destinadas a elongar, presumiblemente debido a una redistribución de las auxinas exógenas. Su rápida desaparición de las células que no son blanco de elongación indica que los transcritos SAUR son altamente inestables (McClure, et al., 1989).

La acumulación en frijol de soya de los transcritos SAUR en respuesta a auxinas es debido por lo menos en parte al incremento en la transcripción y es probable que involucre secuencias regulatorias en la región promotora (Li, et al. 1994).

Algunas de estas secuencias regulatorias de la parte promotora de los genes SAUR, y que son elementos conservados, son los elementos NDE, DUE, elemento Z y caja A; dichos elementos son candidatos para responder a auxinas por arriba de la caja TATA de los genes SAUR (McClure, et al., 1989).

Los elementos NDE contienen dos secuencias cortas que han sido propuestas como AuxRES (elementos que responden a auxinas). Las secuencias que conforman dichos elementos en los genes SAUR son TGTCTC y GGTCCCAT y son los elementos mínimos para conferir inducibilidad por auxinas en la parte del promotor de los genes SAUR (Li, et al., 1994).

Tanto los elementos DST encontrados en la región 3'UTR, como los elementos encontrados dentro de la región codificante sugieren una evidencia de que los genes SAUR no son regulados solamente a nivel transcripcional, sino también a nivel post-transcripcional (Knauss, et al., 2003).

Transcritos con múltiples determinantes de inestabilidad han sido identificados en levaduras y animales. Algunos ejemplos de este tipo de transcritos encontrados en plantas (Li, et al., 1994), son los siguientes:

<u>Planta</u>	<u>Gen</u>
Frijol de soya	15A
Frijol de soya	X15
Frijol de soya	6B
Frijol de soya	X10A
Frijol de soya	10A5
Arabidopsis	SAURAC1
Tabaco	GNT1/CNT110
Tabaco	GNT35/CNT11

Los genes SAUR codifican transcritos cortos con un marco de lectura altamente conservado y se acumulan rápidamente después del tratamiento con auxinas (Green, 1996).

La función de las secuencias DST es desestabilizar a los transcritos SAUR en plantas superiores, estos pueden constitutivamente facilitar el ajuste del gen a la respuesta de cambios en los niveles de auxinas o en la sensibilidad a ellas (Newman, et al. 1993).

Estudios realizados a partir de una biblioteca de cDNA de hojas de maíz (*Zea mays L.*), revelaron que en el genoma de maíz se encuentran presentes dos genes que codifican para RCA, el Zmrca1 y el Zmrca2 (Ayala , et al. 2004).

Ambos transcritos difieren en la secuencia de la región 3'UTR ya que en ella se encuentran algunos motivos similares a los elementos DST encontrados en un principio en los mensajes SAUR del frijol de soya. Estos elementos estructurales tal vez estén involucrados en la expresión diferencial de dichos genes.

Tanto el transcrito Zmrca1 como Zmrca2 presentan el subdominio I y el subdominio II con las secuencias CGA y ATAGGAT respectivamente en su región 3'UTR, solo que éste último presenta una G adicional al subdominio clásico; en tanto que el Zmrca2 presenta además dos subdominios III, los cuales presentan las secuencias CATGTA y TACGTA, estos subdominios se encuentran separados entre sí por 14 bp (Ayala, et al., 2004) (Fig. 5).

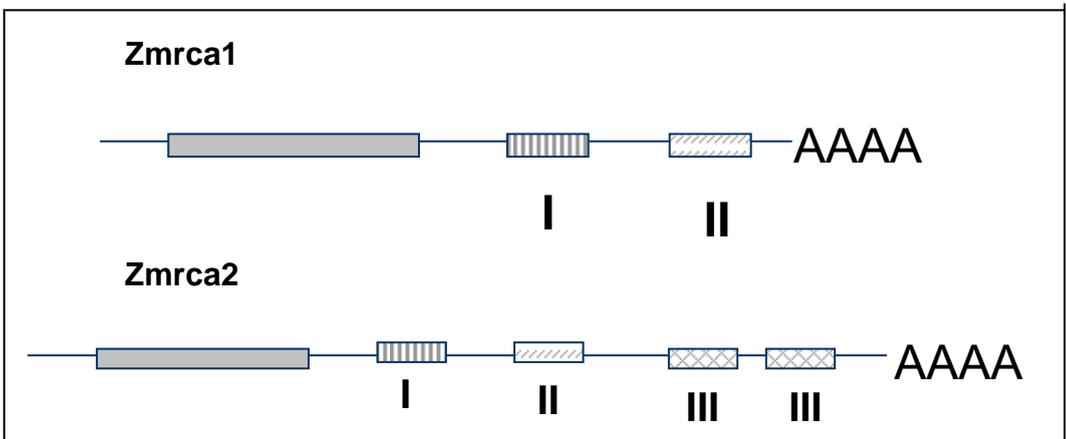


Fig. 5 Representación esquemática de los transcritos de RCA (Ayala, et al.,2004).

Por medio de análisis de Northern Blot y utilizando como prueba específica la región conservada de RCA, se logró determinar que los dos mensajes completos de RCA presentan tamaños de 1.8 kb para Zmrca2 y 1.4 kb para Zmrca1, además se encontró una banda de 1.0 kb la cual corresponde a un fragmento de degradación por deadenilación de uno o ambos transcritos de RCA (Ayala , et al. 2004).

2.4. Rutas de degradación del mRNA.

La velocidad de degradación de los transcritos en plantas parece ser muy parecido al observado en otros eucariontes multicelulares. El rango de vida media de los mensajes inestables es menor a una hora y hasta de varios días para los transcritos estables, siendo el promedio para el grupo. Por tanto, las rutas de degradación de los transcritos son moduladas por la integración coordinada de estímulos internos y externos (Wilusz and Wilusz, 2004).

Estudios realizados en animales y levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), indican que la mayoría de los mRNAs son degradados a diferentes velocidades utilizando un mecanismo común llamado ruta de degradación dependiente de la deadenilación, la cual presenta una ruta alterna que involucra un complejo de exonucleasas conocido como exosoma (Wilusz and Wilusz, 2004) (Fig. 6).

El primer paso de esta ruta involucra la deadenilación del transcrito, cortando la cola de poly(A) a un oligo(A) de aproximadamente 10-15 residuos. En este paso se han identificado varias exoribonucleasas específicas para poly(A) (Wilusz and Wilusz, 2004).

Seguido de la deadenilación, el transcrito es sujeto de degradación por una de dos rutas. En la ruta principal de degradación una vez que en el transcrito la cola de poly(A) ha sido cortada, el transcrito es susceptible a decapitación por las proteínas Dcp1 y Dcp2, en este caso la decapitación de un transcrito inestables es más rápida que la de un transcrito estable, sugiriendo que se trata de un mecanismo dependiente de secuencias específicas dentro del mRNA. Después de la decapitación, el mensaje es degradado en dirección 5'→3' por la exonucleasa Xrn1(Wilusz and Wilusz, 2004).

En la ruta alterna para la degradación del mRNA la degradación se da en dirección 3'→5' involucrando la acción de un complejo protéico conocido como exosoma. Este complejo consiste de por lo menos cinco diferentes 3' a 5' exonucleasas y fue identificado primeramente como un complejo esencial para el procesamiento del 5.8 S rRNA. La estructura del m7Gpppx cap es degradada al final por una enzima conocida como DcpS (Wilusz and Wilusz, 2004).

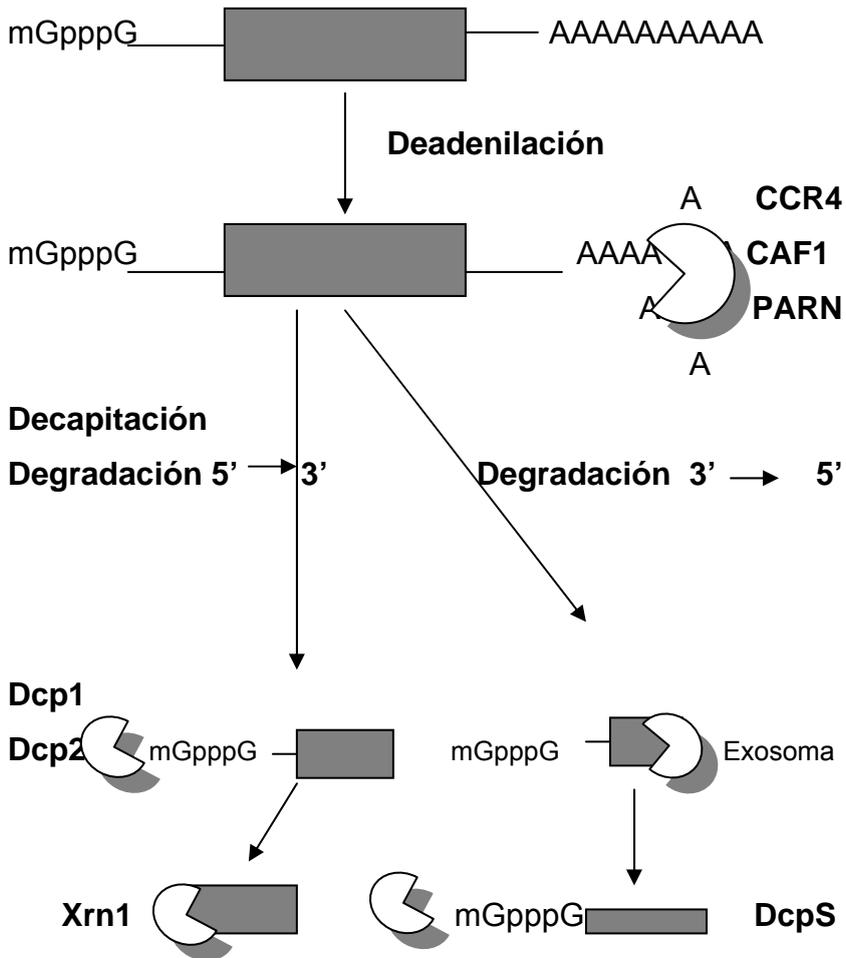


Fig. 6 Rutas de degradación del mRNA (Wilusz and Wilusz, 2004).

Una de las estrategias más efectivas para elucidar los mecanismos de degradación del mRNA es la de analizar las estructuras y formación de intermediarios de degradación. Desafortunadamente, la mayoría de los mRNAs de plantas y eucariotes, no presentan intermediarios de la degradación detectables por medio de geles de RNA, implicando que una vez iniciada la degradación, ésta es extremadamente rápida (Abler and Green, 1996).

Sin embargo, existen excepciones a esto, como es el caso del mRNA del gen SRS4, el cual codifica para la subunidad pequeña de la ribulosa-1, 5-bifosfato carboxilasa del frijol de soya. Estudios realizados *in vivo* e *in vitro* han revelado una serie de productos 5' y 3' de degradación discretos, que *in vitro* son generados por transcritos de gran longitud. Mapeando estos fragmentos se demostró que muchos de los fragmentos 5' se encuentran cerca de un sitio adyacente al inicio de un fragmento 3'; indicándose así que los fragmentos son generados principalmente por rompimiento endonucleolítico, probablemente por una única enzima, la cual concuerda con una comparación de secuencia de los sitios de nucleólisis, reconociendo estriucturas secundarias y no una secuencia específica de elementos dentro del transcrito (Tanzar , et al., 1995).

Como se puede observar, el recambio del mRNA es un proceso complejo que requiere de múltiples factores y enzimas las cuales pueden ser reguladas en muchos puntos. Por tanto la regulación de la degradación del mRNA puede ser muy específica, afectando solamente a uno o dos mRNAs que contienen secuencias particulares de elementos bajo ciertos estímulos o más claramente, por la degradación de un grupo de transcritos con funciones relacionadas. Esto ha sugerido que el control de la degradación del mRNA es utilizado por la célula para coordinar la expresión de genes involucrados en procesos específicos. La regulación del recambio del mRNA no está aislada de la modulación de otros pasos como son la transcripción, procesamiento, exportación y traducción del mRNA (Wilusz and Wilusz, 2004).

En levaduras, el primer evento en la degradación es la deadenilación seguido por la decapitación. En cambio, las plantas pueden iniciar la degradación utilizando principalmente endonucleasas o una enzima que decapite. Una vez que la degradación es iniciada, una exonucleasa parecida a Xrn1 y un complejo parecido al exosoma podrían terminar el proceso (Gutiérrez, et al. 1999).

2.5 Regulación circadiana en la expresión de genes.

Existen muchas oscilaciones biológicas, en particular los relojes circadianos que controlan la vida diaria de la mayoría de organismos sensibles a la luz, como son desde las cianobacterias hasta los humanos (Roenneberg and Merrow, 2005).

Los ritmos diurnos son definidos como ritmos con un período largo de aproximadamente 24 horas que están presentes en el crecimiento de las plantas y se mantienen en un ciclo de luz-oscuridad; y los ritmos circadianos están definidos como ritmos con un período largo de aproximadamente 24 horas y que persisten en condiciones constantes de intensidad de luz, es decir oscuridad-oscuridad o luz-luz (Pilgrim, et al., 1993).

Una gran variedad de procesos moleculares generan ritmicidad celular, y relojes celulares. Esta jerarquía de relojes genera un complejo, aproximadamente 24 horas de un programa temporal que es sincronizado con la rotación de la tierra. Los sistemas circadianos aseguran anticipación y adaptación de cambios ambientales diarios, y funcionan a diferentes niveles, desde la expresión de genes hasta el comportamiento del organismo en general (Roenneberg and Merrow, 2005).

Existe un modelo conocido como traducción-membrana, el cual explica las oscilaciones por un mecanismo de dos pasos. Este postula que en el primer paso, uno o varios polipéptidos esenciales son sintetizados en el ribosoma 80 S. En el segundo paso, este polipéptido es integrado en el interior de la membrana. Esta integración altera las propiedades de la membrana tanto que la síntesis de este polipéptido es suspendida. Por recambio, la cantidad de este polipéptido esencial en la membrana cae debajo de un umbral crítico, restaurándose así la síntesis de esta proteína esencial y permitiendo el inicio de un nuevo ciclo. De acuerdo con este modelo, la síntesis de esta proteína esencial podría exhibir oscilaciones bajo condiciones constantes (Hartwing, et al., 1985).

Si el modelo de traducción-membrana es correcto, entonces las condiciones siguientes se podrían cumplir:

- (i)* Podría ser que por lo menos un polipéptido exhibe síntesis bajo una característica de oscilación diurna en condiciones constantes.
- (ii)* La síntesis de este polipéptido podría ser inhibida por cicloheximida (CHX).

También, dicho modelo postula que una o varias proteínas son sintetizadas a diferentes velocidades en diferentes tiempos del día (Hartwing , et al., 1985).

En plantas superiores, la luz y el calor causan grandes cambios en la cantidad y calidad de los mRNAs y los patrones de la síntesis de proteínas. Al transferir plantas etioladas a la luz, los mRNAs de algunas proteínas son inducidas dentro de unas pocas horas, mientras que los mRNAs de otras proteínas desaparecen (Apel and Klopsstech, 1978).

La señal de la luz es percibida vía el fotorreceptor del fitocromo. En todas las plantas verdes y cultivos celulares, la luz azul también es efectiva, involucrando al menos un receptor de luz en la fotopercepción por plantas superiores en adición al fitocromo.

La mayoría de los genes regulados por luz residen en el núcleo y codifican para proteínas plasmáticas. La inducción de una proteína en particular dada por una señal de luz, es temporalmente controlada por la aparición sucesiva de los mRNA después de la iluminación, aunque el orden de aparición de una proteína en particular puede variar entre especies diferentes (Meyer, et al., 1983).

Otto et al. 1988, realizaron experimentos con traducciones en plantas de guisantes, encontrando que los niveles de un número de mRNAs inducibles por luz y calor de proteínas cloroplásticas codificadas en el núcleo varía significativamente durante el día. Primeramente las células de las plantas parecen sufrir variaciones cíclicas en el programa de síntesis de proteínas, indicando que no todas las proteínas pueden ser sintetizadas continuamente durante el día. Esto es verdad no solamente para las hojas de guisante, sino también para otras especies estudiadas, como son cebada, espinaca, pepino y maíz.

Considerando la importancia del factor ambiental de la luz, no sorprende que las plantas se adapten a sus cambios diurnos, por lo que ellas no solamente son capaces de responder con el encendido y apagado de las señales sino también con la intensidad de la luz, ya que anticipan los cambios diurnos vía un reloj circadiano (Adamska, et al., 1991).

Las oscilaciones circadianas han sido descritas para muchas funciones de las plantas, como son el movimiento de las hojas, producción de O₂ fotosintético, así como la expresión de genes inducibles por luz, los cuales son controlados primeramente al nivel de la transcripción. Los cambios circadianos a nivel de proteína y también en la actividad de la misma, han sido reportados para un gran número de proteínas; de cualquier manera, no se sabe a que nivel es regulado este proceso (Adamska, et al., 1991).

Por otro lado, la información faltante es la cual podría indicar los cambios circadianos observados en el nivel de los transcritos, principalmente de genes inducidos por luz, conduciendo a una oscilación en el nivel de los productos finales del gen (Adamska, et al., 1991).

Nagy et al., 1988, concluyeron que la intensidad de la luz juega un papel muy importante en la regulación del nivel de expresión de los genes.

Mientras los niveles del transcrito de genes nucleares fluctúan considerablemente al transferir de la oscuridad a la luz, los niveles del transcrito de genes cloroplásticos quedan a una velocidad constante. Esto también se refleja a nivel de las proteínas, en contraste a su contraparte nuclear, la expresión de genes del cloroplasto parecen ser regulados primeramente a nivel traduccional y post-traduccional. (Adamska, et al., 1991).

A nivel molecular, experimentos de micro arreglos de DNA han mostrado que del 2% al 6% de los mRNAs de *Arabidopsis thaliana* pueden oscilar. Para los ciclos circadianos de *Arabidopsis* y otros ciclos estudiados hasta la fecha la importancia de oscilaciones circadianas son las reacciones transcripcionales (Lidder, et al., 2005).

Es claro que el control transcripcional juega un papel importante en la expresión circadiana. En adición al cuerpo de la evidencia para el control circadiano de la transcripción, resultados en varios sistemas sugieren que los mecanismos de regulación postranscripcional a nivel del RNA son también requeridos para la función circadiana (Lidder, et al., 2005).

Probablemente, el ejemplo mejor caracterizado corresponde al gen *period* (*per*), uno de los componentes de la oscilación central de *Drosophila melanogaster*, en donde la comparación de las velocidades de transcripción de *per* y los niveles de mRNA implican una regulación temporal de la vida media del mRNA (Panda et al., 2002). Elementos regulatorios localizados tanto en la región promotora como en la región que se transcribe del gen *per* son necesarias para la replicación cíclica. Además la interrupción de la región 3'UTR del gen *per* afecta el comportamiento de los ritmos circadianos de *Drosophila*. En tanto, que los mecanismos post-transcripcionales no solamente son importantes para una expresión circadiana normal del gen sino también para la propia función de *per* (Lidder, et al., 2005).

Otro ejemplo es el gen *Crg-1*, para el cual la falta de una actividad cíclica transcripcional en experimentos de run-on sugieren que los mecanismos post-transcripcionales podrían contribuir a la expresión circadiana del gen. Esto indica que el control post-transcripcional podría ser significativo para la expresión de genes CCG adicionales en *Drosophila* (Lidder, et al., 2005).

Los mecanismos post-transcripcionales que afectan los niveles de mRNA han sido utilizados también para explicar las oscilaciones circadianas de los genes de plantas (Lidder, et al., 2005).

Aunque ningún ejemplo de cambios en la estabilidad del mRNA regulados por el reloj circadiano han sido reportados, evidencias recientes sugieren un papel más prominente del control de la estabilidad del mRNA en la expresión de los genes *CCG* en *Arabidopsis* (Lidder, et al., 2005).

Análisis de micro arreglos muestran que un supuesto transcrito inestable en *Arabidopsis* es controlado por el reloj circadiano (Gutiérrez et al., 2002).

Estudios adicionales al micro arreglo conducen a que un porcentaje alto de transcritos que presentan cambios en su abundancia en una mutante deficiente de elementos “downstream” que median la degradación, *dst1*, fueron regulados circadianamente, indicando que el significado biológico de la ruta de degradación del mRNA mediada por elementos DST puede estar asociada con el reloj circadiano (Pérez-Amador et al., 2001).

Además se sugiere que un rápido recambio del mRNA, tal vez en un tiempo específico del día, puede ser importante para la oscilación circadiana específica de los genes CCG en *Arabidopsis*.

En un estudio realizado por Pilgrim et al., 1993, se examinó la expresión de genes requeridos para la síntesis, ensamble y activación de Rubisco, para evidenciar la regulación por un reloj circadiano. Ellos muestran que la acumulación del mRNA de RCA y RBCS, pero no de RBCL, son controlados por un reloj biológico en *Arabidopsis*.

Los cambios dependientes de luz en la actividad de Rubisco activasa han sido observados en espinaca, y los cambios diurnos en la activación del estado de Rubisco han sido documentados tanto para cebada como para alcachofa dulce (Kobza y Seemann, 1989).

Rubisco Activasa juega un papel muy importante en contrarestar la inactivación de Rubisco resultante de acumulaciones nocturnas de un segundo inhibidor de Rubisco, RuBP, el cual se une fuertemente a Rubisco e inactiva y excluye el CO₂ activador de Rubisco, esto ocurre tanto *in vivo* como *in vitro*.

Experimentos realizados con Rubisco activasa obtenida de hojas de plántulas de maíz (Vargas-Suárez, et al., 2004), han demostrado que la proteína de Rubisco activasa presenta dos isoformas, una de 43kDa y otra de 41kDa, la isoforma mayor no presenta diferencia significativa durante el transcurso de las oscilaciones diurnas, pero en cambio la isoforma pequeña, muestra oscilaciones principalmente al acercarse al período de oscuridad, indicándose así la desigual regulación de las dos isoformas del polipéptido de RCA. Para investigar los patrones rítmicos en la expresión de los genes que codifican para RCA (Ayala-Ochoa, et al., 2004), se realizaron experimentos de RT-PCR y Northern-Blot, con los cuales se determinó que los mRNAs de RCA en plántulas de maíz presentan cambios rítmicos muy marcados durante el día probablemente debido a las secuencias de desestabilización DST localizadas en la región 3'UTR de estos genes.

La conexión entre una secuencia específica de mRNA de la ruta de degradación y los ritmos circadianos proveen un mecanismo para seguir los patrones oscilatorios precisos de la expresión controlada por el ciclo (Lidder, et al., 2005).

Por lo regular, aunque muchos mRNAs de plantas oscilan, no todas las proteínas codificadas por estos mRNAs demuestran ritmicidad circadiana. Así como el caso anterior en plántulas de maíz, en *Arabidopsis*, la transcripción del fitocromo B es rítmica, pero el volumen total de proteína del fitocromo B no oscila (Bognar et al., 1999), teniéndose como resultado que un defecto molecular a nivel de RNA no siempre tiene un impacto obvio en el nivel total de la planta.

2.6 Hormonas.

Las hormonas de plantas son moléculas señales, presentes en cantidades trazas. Los cambios en las concentraciones de las hormonas y la sensibilidad del tejido median un gran rango de procesos de desarrollo en plantas, muchos de los cuales involucran interacciones con factores ambientales. La atención de los científicos se ha enfocado a las primeras cinco hormonas descubiertas- giberelinas, ácido abscisico, citokininas, ácido 3-indolacético y etileno-.

Más recientemente se han descubierto compuestos que tienen un papel regulatorio en el desarrollo de la planta, llamados, brasinoesteroides, poliaminas, ácido jasmónico y ácido salicílico (Buchanan, et al., 2000) (Fig.7).

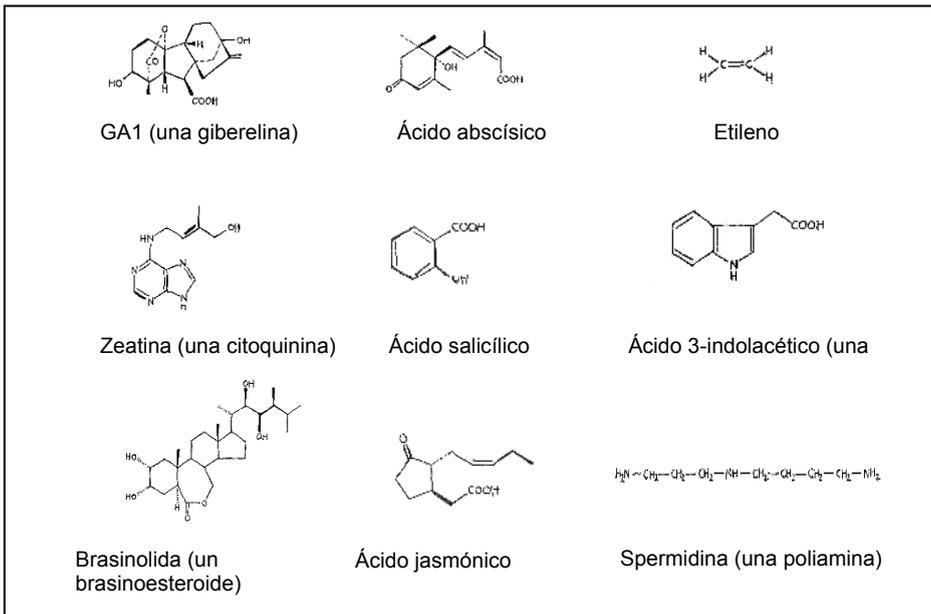


Fig. 7 Estructuras representativas de nueve tipos de hormonas en plantas (Buchanan, et al., 2000)

Las hormonas juegan un papel indiscutible en la regulación de una gran cantidad de procesos fisiológicos y de desarrollo en plantas. Aunque es claro que las hormonas pueden influir en la expresión de genes tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional (Gutiérrez, et al., 1999).

2.6.1 Ácido indolacético. Estructura, biosíntesis, transporte y catabolismo.

La auxina primaria presente en la mayoría de las plantas fue identificada eventualmente como ácido 3-indolacético (AIA). AIA es activo en cantidades de submicrogramos en un rango de bioensayos y está asociado con una gran variedad de procesos fisiológicos, incluyendo dominancia apical, tropismo, inducción de la división celular, e iniciación de raíces. Auxinas sintéticas como son el ácido-2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y el ácido naftalen-1-acético (Fig.8), son utilizadas extensivamente en horticultura para inducir raíces y promover el desarrollo de frutos. En altas concentraciones, las auxinas sintéticas funcionan como herbicidas efectivos (Buchanan, et al., 2000).

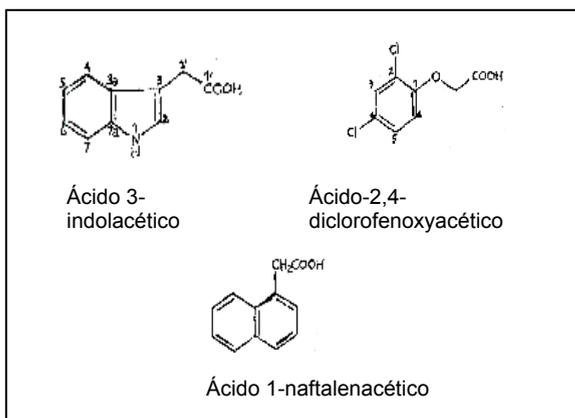


Fig. 8 AIA y auxinas sintéticas (Buchanan, et al., 2000).

El AIA contenido en los tejidos de las plantas es regulado por varios procesos. El AIA común es alimentado por la síntesis de novo del L-triptofano, por precursores independientes del triptofano y por hidrólisis de AIA conjugado. AIA se encuentra inactivo por varias conjugaciones y rutas catabólicas. El contenido de AIA en tejidos individuales también puede ser influenciado por un sistema de transporte polar que resulta en la sala baja del movimiento del AIA de los meristemos apicales y en hojas jóvenes hacia el sistema de raíces (Zazimalova and Napier, 2003).

Evidencia acumulada desde 50 años atrás, indica que las plantas pueden sintetizar AIA a partir de L-triptofano por tres diferentes rutas: la del ácido indol-3-piruvato, el indol-3-acetaldoxima, y las rutas de triptamina (Zazimalova and Napier , 2003) (Fig. 9).

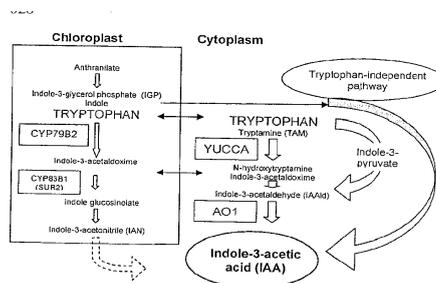


Fig. 9 Rutas paralelas para la biosíntesis de AIA (Zazimalova and Napier, 2003).

Bartel. et al., 2001; Ribnicky, et al 2002, sugieren que la ruta independiente del triptofano, gobierna constitutivamente el mantenimiento de los niveles de AIA y que la ruta dependiente del triptofano se emplea cuando se requieren altos niveles de AIA como sucede durante la embriogénesis y el movimiento de las hojas de la planta.

La concentración de auxinas, el radio de auxinas y otras hormonas, o la sensibilidad de las células a las auxinas han sido involucradas como los determinantes primarios de la actividad de las auxinas.

El balance entre la biosíntesis de auxinas y su metabolismo (el cual comprende transporte, conversión, conjugación, reconjugación y catabolismo), determina el nivel actual de las auxinas en una célula en cualquier tiempo (Zazimalova and Napier, 2003).

La mayoría de los avances recientes para entender el metabolismo de las auxinas se ha hecho a través de estudios con la auxina más abundante naturalmente, el ácido 3-indolacético (AIA).

El AIA es transportado primeramente por un mecanismo polar activo, así como de una manera no polar pasiva.

El transporte polar está mediado por membrana asociada a un transporte de flujo y es extravascular . En tanto que generalmente es aceptado que el AIA es sintetizado en la porción apical de la planta y es transformado fuera del ápice. La relevancia fisiológica del movimiento del AIA exógeno vía el polen permanece pendiente de determinar , muchos estudios muestran que el AIA es central en la inducción, organización y mantenimiento de la vasculatura de la planta. El catabolismo del AIA ocurre vía oxidación de cualquiera de los dos lados de la cadena, por un lado por vía de descarboxilación y por el otro lado de la cadena, el anillo del indol es degradado sin descarboxilación (Normanly, 1997).

Los gradientes de auxinas o la distribución asimétrica de las auxinas están muchas veces involucradas en la explicación de respuestas diferenciales de las auxinas por las células

involucradas. Por ejemplo, los genes SAUR responden a auxinas. Los mRNAs SAUR se distribuyen asimétricamente dentro de minutos de graviestimulación, implicando pero no proveyendo distribución asimétrica de las auxinas. Esto ha postulado que los gradientes de AIA existen y que el AIA actúa como una señal posicional (Normanly, 1997).

2.6.2 Estímulo exógeno con Ácido Indolacético.

Primeramente, los genes que responden a auxinas son inducidos rápida y específicamente por auxinas y no requieren de síntesis de proteínas para su inducción (Walter and Estelle, 1998). Los genes inducidos por auxinas consisten de varias familias de multigenes que se encuentran expresados en una gran variedad de tejidos. Las familias mejor caracterizadas son los genes GH3, los genes SAUR y los genes AUX / IAA (Abel and Theologis , 1996).

Los genes GH3 se encuentran fuertemente expresados en los tejidos vasculares, mientras que los genes SAUR esta expresados fuertemente en células epidermales y corticales. Después del tratamiento con auxinas, los niveles del mRNA de GH3 son incrementados en todas las partes de las plantas, en tanto que la expresión de los SAUR está restringida a las regiones de elongación, proponiendose así que las rutas de traducción de auxinas difieren para ambos genes (Sitbon, Perrot-Rechenmann, 1997).

Debido a lo expuesto anteriormente, es de gran importancia analizar el efecto de la aplicación de auxinas exógenas sobre la expresión y actividad de Rubisco activasa, ya que en estudios realizados en nuestro laboratorio, se aislaron varias clonas de Rubisco activasa de una biblioteca de cDNA en hoja de maíz. Dichas clonas, codifican para un mismo polipéptido, pero difieren en las regiones 3'UTR, ya que son de tamaños diferentes (Ayala-Ochoa, et al., 2004).

Ambas clonas presentan elementos DST, los cuales se han identificado como una región conservada en las regiones 3'UTR de los genes SAUR, pensándose así que tal vez dichos transcritos pueden estabilizarse por medio de la aplicación de auxinas.

Estudios realizados en arroz, respecto a la relación que existe entre el ácido giberélico y Rubisco activasa han sido realizados por Komatsu y colaboradores (1996), quienes detectaron e identificaron una proteína capaz de unirse a giberelinas marcadas con tritio [³H] GA₁ en hojas de arroz. Dicha proteína presenta un peso molecular relativo de 47 kDa y un punto isoeléctrico de 5.1.

La secuencia de aminoácidos fue determinada parcialmente y mediante la búsqueda de secuencias homólogas indica que la proteína de unión a giberelinas es homóloga a Rubisco activasa de cebada, espinaca, *Arabidopsis* y *Chlamydomonas*. Además se logró identificar que la proteína de unión a giberelina se fosforila en presencia de Ca^{2+} , Mg^{2+} y ATP.

3. HIPÓTESIS

Rubisco Activasa se expresa en dos transcritos los cuales presentan inestabilidad del mRNA debido a la presencia de las secuencias DST, las cuales pueden ser reguladas por auxinas; por lo tanto, si sometemos a las plántulas de maíz a distintas concentraciones de auxinas, los niveles endógenos de Rubisco activasa podrían incrementarse por estabilización de sus mensajes.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar el efecto de la adición de auxinas exógenas en la planta de maíz, sobre la estabilización de los transcritos de Rubisco Activasa (RA).

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el efecto de la concentración de auxinas exógenas sobre la expresión de Rubisco Activasa durante el desarrollo de la plántula de maíz.
- Determinar el efecto que presentan las auxinas sobre los mRNAs de RCA con diferentes secuencias DST.
- Determinar si existe una relación entre la presencia de auxinas y la expresión y producción de RCA.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material biológico y condiciones de crecimiento:

Los experimentos se realizaron con plántulas de maíz (*Zea mays* L. var. Chalqueño), sembradas y cultivadas en el invernadero en tierra en recipientes de plástico, bajo un fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad, a 16-20°C, de acuerdo a trabajos anteriores realizados en el laboratorio (Fig. 10).

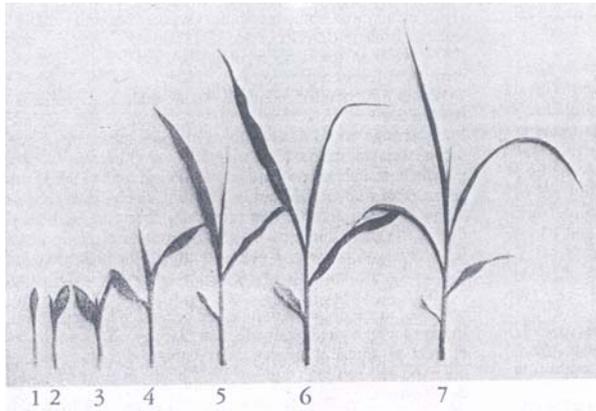


Fig. 10. Etapas del desarrollo de la plántula de maíz.

1ª etapa: se observa la primera hoja, pero no tiene aún la ligula expuesta; la segunda hoja se encuentra enrollada.
2ª etapa: la primera hoja muestra la lígula, pero no se encuentra totalmente expuesta, la segunda hoja se encuentra enrollada en la base pero abierta en la punta.
3ª etapa: la primera hoja presenta la lígula expuesta, mientras que en la segunda hoja, la ligula se encuentra al nivel de la primera, pero no se encuentra expuesta; se puede observar la punta de la tercera hoja.
4ª etapa: la primera y la segunda hojas presentan la ligula expuesta, la tercera hoja se encuentra expandida casi a la mitad; se puede observar la punta de la cuarta hoja.
5ª etapa: la primera y la segunda hojas presentan la ligula expuesta, la tercer hoja se encuentra casi totalmente expandida, pero la ligula no se encuentra expuesta, la cuarta hoja se encuentra expandida a la mitad.
6ª etapa: la primera, segunda y tercera hojas muestran signos de envejecimiento en la punta.
7ª etapa: de la primera a la cuarta hojas presentan la ligula expuesta, la quinta hoja se encuentra expandida casi completamente, la sexta hoja muestra la punta; la primera hoja se encuentra totalmente seca, la segunda hoja muestra signos de envejecimiento en la punta (Loza T. et al., 1990).

5.2 Tratamiento con auxinas (ácido indolacético, AIA):

5.2.1 Lote control.

Se sembraron cinco lotes con 30 plántulas cada uno, los cuales se designaron como plántulas control, el riego fue diario, consistiendo de aspersion con 100 ml de agua desionizada por tres días a partir de la tercera etapa de desarrollo, alternándose con otros tres días sin aspersion y continuando este procedimiento hasta que se llegó a la quinta, sexta y séptima etapas de desarrollo para cosechar la tercera hoja a las 06:00 horas. Las hojas se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido, una parte de la muestra se utilizó inmediatamente para la obtención del mRNA, el resto de la muestra se almacenó a -70°C hasta su utilización en la obtención y el análisis de proteínas.

5.2.2 Lote tratado con 5 μ M y 50 μ M de AIA.

Para realizar el análisis del efecto de auxinas, se sembraron 10 lotes de plántulas con 30 plántulas cada uno, las cuales fueron regadas diariamente con 100 ml de agua desionizada para el lote control y asperjadas con 100 ml de solución 5 μ M ó 50 μ M de AIA para cada lote experimental respectivamente. A partir de

la tercera etapa de desarrollo, las plántulas se asperjaron en forma alternada cada tres días, junto con el riego diario con agua, siguiéndose el mismo procedimiento que para el lote control, cosechándose las hojas terceras a las 06:00 horas en la quinta, sexta y séptima etapas del desarrollo. Las hojas se congelaron con nitrógeno líquido, una parte de la muestra se utilizó inmediatamente para la obtención del mRNA, el resto de la muestra de almacenó a -70°C para el análisis de proteínas.

5.3 Expresión de Rubisco Activasa de maíz durante una oscilación diurna.

Se sembraron cinco lotes con 30 plántulas cada uno y se regaron diariamente, hasta llegar a la quinta etapa de desarrollo (Fig. 10). Las hojas tres fueron cosechada a diferentes tiempos en un período de 12 horas:

06:00, 09:00, 12:00, 15:00, 18:00 horas.

Una vez colectadas las hojas, fueron congeladas con nitrógeno líquido, la muestra se utilizó inmediatamente para la extracción del mRNA.

Las muestras fueron procesadas de igual manera que en los experimentos de las plántulas tratadas con Ácido Indolacético, en todos los aspectos.

5.4 Tratamiento con 50 μ M de AIA en dos horas claves de la oscilación diurna:

Se sembraron cinco lotes de plántulas con 30 plántulas cada uno, los cuales se designaron como plántulas control, las cuales fueron cultivadas bajo condiciones del invernadero, regadas como se mencionó anteriormente, con 100 ml de agua desionizada para el lote control. Otros lotes iguales se crecieron en las mismas condiciones y fueron asperjadas con 100 ml de AIA 50 μ M. hasta la quinta etapa de desarrollo. Las hojas terceras se cosecharon a las 06:00 y 15:00 horas, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Una parte de la muestra se utilizó inmediatamente para la obtención del mRNA, el resto de la muestra se almaceno a -70°C para la obtención posterior de proteína.

5.5 Métodos:

5.5.1 Extracción de proteínas:

Un gramo de hoja por muestra fue macerada en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, posteriormente se le adicionó 1.5ml de buffer de extracción (0.1M Tricina-NaOH (pH 8.1), 10 mM MgCl₂, 10 mM NaHCO₃, 5mM EDTA, 10 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidina), el extracto fue homogeneizado y centrifugado a 14000 rpm/10 min

5.5.2 Cuantificación de proteínas (Bradford, 1976):

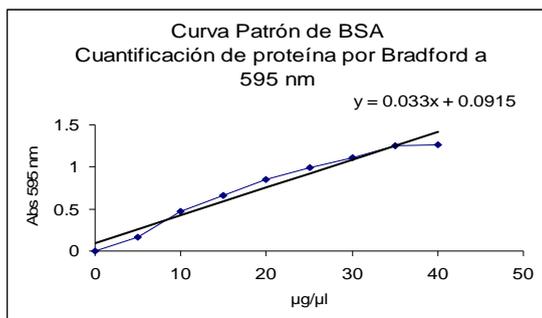
El método consiste en la formación de un compuesto de adsorción de color azul entre los residuos de aminoácidos básicos de las proteínas y el colorante Azul de Coomassie.

Las lecturas de absorción se realizan a 595 nm.

El rango de determinación de proteína es de 0.5-1.4 mg/ml. La intensidad de absorción depende del contenido de aminoácidos básicos y aromáticos.

Materiales y Métodos

Del sobrenadante obtenido de los extractos crudos, se tomó una alícuota de 2 μl de cada una de las muestras, a la cual se le añadió 798 μl de agua desionizada y 200 μl del reactivo de Bradford, las lecturas se hicieron a 595nm en un espectrofotómetro (Du 650 de Beckman), la lectura obtenida se extrapolo a una curva patrón de BSA (albúmina sérica bovina) que se muestra en la Fig. 11, para obtener así los $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteína total de cada extracto.



μl de BSA [1 mg/ml]	Cant. De proteína $\mu\text{g} / \mu\text{l}$	absorbancia a 595 nm
0	0	0
5	5	0.167
10	10	0.4737
15	15	0.6641
20	20	0.8487
25	25	0.9939
30	30	1.1071
35	35	1.2513
40	40	1.2662

Fig. 11. Curva patrón de Albúmina Sérica Bovina.

5.5.3 Electroforesis en Gel de Poliacrilamida Desnaturalizante (SDS-PAGE)

(Laemmli, 1970):

La electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante es un método excelente con el cual se pueden analizar y monitorear proteínas durante su purificación. La separación de proteínas por SDS-PAGE es utilizada para determinar la abundancia relativa de la mayoría de las proteínas en una muestra, basándose en su peso molecular y carga y por tanto su capacidad para desplazarse a través de una corriente eléctrica.

El peso molecular aproximado de las proteínas de interés se puede determinar comparando las bandas de proteína con marcadores de pesos moleculares conocidos.

Para separar electroforéticamente Rubisco Activasa de cada extracto crudo de las muestras, se utilizaron 30 µg de proteína total determinada por el Método de Bradford, y se utilizaron 10 µl de un marcador de pesos moleculares preteñido (Precision Plus Protein Standards Dual Color de Bio-Rad). Las muestras se sometieron a electroforesis desnaturalizante en geles al 10 % de acrilamida, con una corriente de 7 mA, dejándose correr toda la noche, para tener una mejor separación de las bandas.

5.5.4 Western Blot (Towbin H.T., et al, 1979):

Las proteínas separadas en un SDS-PAGE son transferidas a una membrana de PVDF (Millipore) aplicando una corriente eléctrica de 17 mA/cm² durante 35 min. Una vez que las proteínas son transferidas, las membranas son incubadas durante 90 min a 37 °C con un anticuerpo contra Rubisco Activasa de espinaca (1er anticuerpo) a una concentración de 1:12000, posteriormente son lavadas con TBS-T 15 M por 30 min. Para revelar la membranas, se utiliza un segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa (Sigma) a una concentración de 1:2000 durante 90 min a 37 °C, finalmente se volvieron a lavar las membranas con TBS-T 15 M por 15 min.

La reacción se visualizó por fluorescencia (Sistema ECL Amersham), utilizando una película de rayos x (Kodak x-omat). Las imágenes se adquirieron en un Phosphorimager (Personal Molecular Imagen, Bio-Rad) y se analizaron empleando el programa Quantity One.

5.5.5 RT-PCR (Krug M., Berger S.L., 1987; Myers T.W., et al., 1991):

La reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa es la técnica más sensible para la detección y cuantificación del mRNA a partir de muestras muy pequeñas. Este método consiste en sintetizar DNA a partir de RNA, formando primeramente una cadena complementaria de DNA (cDNA) utilizando dNTPs, una transcriptasa reversa y como molde mRNA. Todos estos componentes se combinan con unos primers de DNA los cuales son específicos para el gen de interés.

Después de que la reacción de la transcriptasa reversa es completada y la cDNA es generada de la cadena original sencilla del mRNA, la reacción en cadena de la polimerasa es iniciada y después de varios ciclos son generadas millones de copias de la secuencia del gen de interés.

-Preparación de resina oligo dT:

El aislamiento por oligo dT es un método muy útil para el aislamiento de secuencias con colas de poly A+ (mRNA).

La preparación de la resina consiste en el siguiente esquema de trabajo:

Pesar 0.4g de resina y disolver en 8ml de H₂O-DEPC en un matraz estéril



Mezclar y dejar en reposo 20 min a T. amb.



Separar en tubos eppendorf; 1 ml en cada tubo



Lavar 3 veces cada tubo con 1ml de solución (NaOH 0.1M y EDTA 5 mM). En cada lavado centrifugar a 1000 rpm/1min.



Lavar con 1ml de H₂O-DEPC hasta que el pH sea menor a 8.



Equilibrar con buffer de columna (0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH=7.5)



Almacenar a 4°C (si el almacenamiento es prolongado, añadir azida de sodio al 0.05%)



Para regenerar la resina, lavar 2 veces con solución (NaOH 0.1M y EDTA 5mM) y dos veces más con Buffer de columna.

-Extracción de RNA total:

La extracción consiste en el siguiente esquema de trabajo:

Homogeneizar 1.2 g de hojas en nitrógeno líquido



Pasar a un tubo eppendorf y añadir 1ml de Trizol[®]



Vortex medio



Incubar 5 min /T. amb.



Vortex medio



Centrifugar a 12000g /10 min. A 4°C



Pasar el sobrenadante a otro tubo e incubar 5 min. /Tamb.



Añadir 0.2 ml de cloroformo /ml de Trizol[®]



Agitar vigorosamente (vortex)



Incubar 5 min. /Tamb.



Centrifugar a 12000 rpm/15 min. A 4°C



Colectar la fase acuosa y añadir isopropanol frío
0.750ml/ml de Trizol[®]



Mezclar e incubar a -20°C /2.5 hrs.



Centrifugar a 6000 rpm /20 min. A 4°C



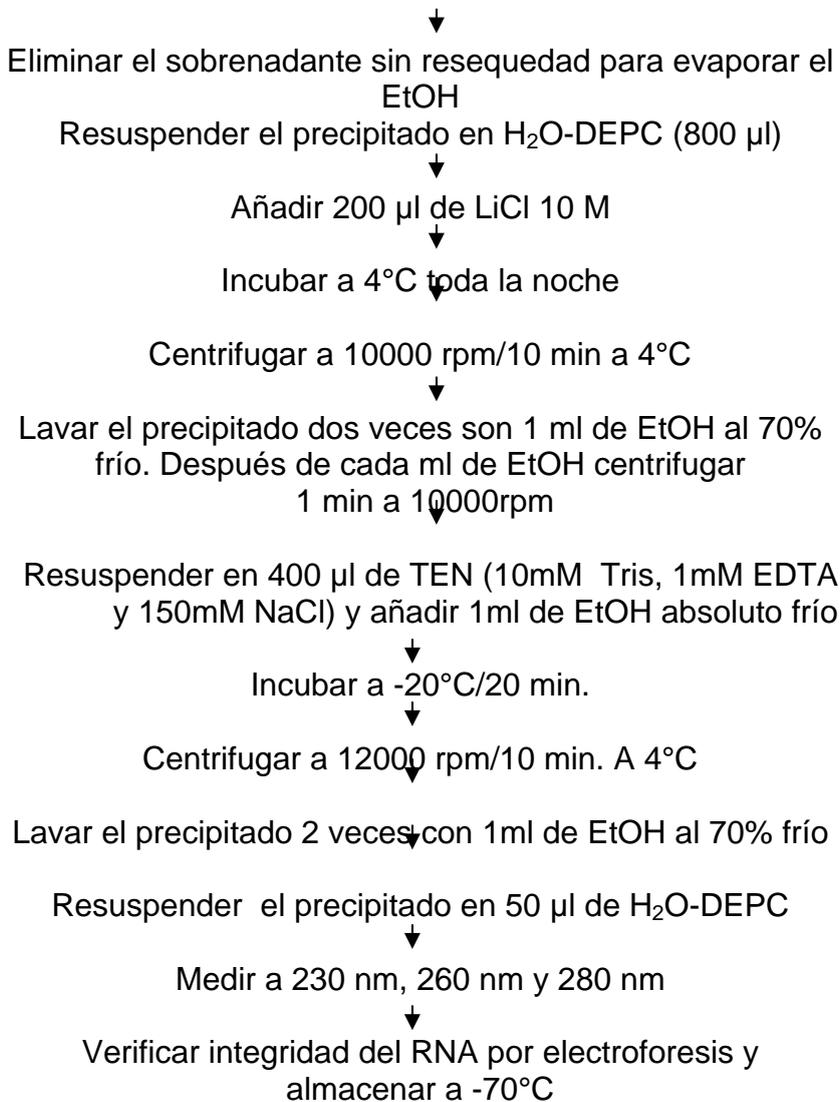
Lavar el precipitado con 1ml de EtOH al 70% frío



Centrifugar a 6000rpm/2 min a 4°C



Materiales y Métodos



-Electroforesis de RNA:

La concentración y la pureza del RNA total se midieron por la absorbancia a 260 nm y por el cociente de absorbancia a 260 nm/280 nm respectivamente, en un espectrofotómetro (Du 650 de Beckman). La integridad del RNA se determinó por electroforesis en un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio (BrEt), en base a la integridad de las bandas del RNA ribosomal y utilizando RNA ribosomal de ejes embrionarios de maíz como control positivo.

El método consiste en el siguiente esquema de trabajo:

Lavar el equipo de electroforesis (placa, peine y cámara) con H₂O-DEPC como mínimo 30 min. antes de usar.



Pesar 0.3g de agarosa y adicionarle 30ml de buffer (25ml de TBE 5X (aforados a 250 ml con H₂O-DEPC en una probeta libre de rnasas.



Una vez disuelto adicionar 1ml de EtBr.



Verter en la placa, colocar el peine, tapar y dejar que gelifique



Cargar el volumen equivalente a 1-3 μg de RNA total más 2 μl de buffer de carga de RNA y H_2O -DEPC para tener un volumen total de 12 μl .

↓
Correr el gel a 85 volts
↓

Bandas bien definidas indican que no hay degradación.
(Ver el gel en luz UV).

-Extracción de mRNA:

El aislamiento del mRNA es requerido para analizar la expresión de los genes, éste está capitalizado en un homopolímero de 20-300 residuos de adenina, comúnmente llamado cola de poly A+. La cola de poly A+ provee una única ventaja para el aislamiento de mRNA. El aislamiento del mRNA respecto a los demás RNAs se logra por hibridación en altas concentraciones de sal de los mRNA poliadenilados a unos primers de oligo dT(desoxitimidinas) acoplados a un soporte sólido que consiste de celulosa. Los RNAs que carecen de cola de poly A+ no se unen a la resina o se unen muy débilmente, pudiendo ser removidos lavando la matriz con un buffer con baja concentración de sales. El mRNA es entonces eluido de la resina con un buffer con cero concentración de sales.

La extracción consiste en el siguiente esquema de trabajo:

Diluir el RNA total en H₂O-DEPC hasta tener 100 µl.

Añadir 200 µl más de H₂O-DEPC.

Calentar a 65 °C/ 5 min.

Añadir 1ml de tampón de carga

Mezclar con la resina (200 µl) y mantener de 30 -60min. A Tamb. Agitando suavemente.

Centrifugar a 1500 g/ 5 min. (guardar el eluido)

Lavar la pastilla con 1 ml de tampón de lavado, centrifugar a 1500g/5 min. Y volver a separar el eluido.

Repetir el proceso de lavado-centrifugación hasta que el agua de lavado tenga una absorbancia a 260 nm menor a 0.01

Una vez que se ha alcanzado el valor de absorbancia deseado, separar la pastilla del eluido y añadirle a la pastilla 220 µl de tampón de elución y centrifugar otra vez a 1500 g/ 10 min

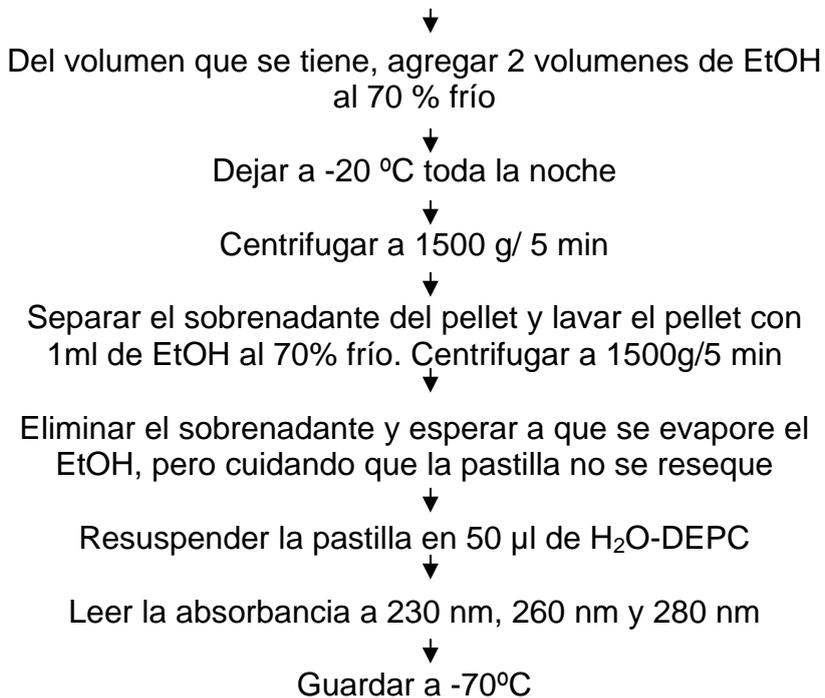
Separar el eluido y ponerlo en un tubo aparte.

Repetir el proceso 2 veces más separando el eluido cada vez, pero juntandolos en el mismo tubo en el que coloco el primer eluido.

Después de la última centrifugación, separar la pastilla y en el tubo de los eluidos, agregar 286 µl de NH₄Oac 0.75M para 660 µl de volumen de eluidos



Materiales y Métodos



Después de la obtención de mRNA de las muestras, se realizaron las reacciones de RT-PCR (SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq de Invitrogen) en un volumen final de 25 µl, con una mezcla de reacción que contenía: buffer 2X Reaction Mix (buffer que contiene 0.4 mM de cada dNTP, 2.4 mM de MgSO₄), 1 µl de cada primer (100 ng/µl), 0.25 µl de RT/Platinum® Taq Mix para cada reacción, la reacción se llevo a cabo en un termociclador (Gene Amp PCR System 9700 de Applied Biosystems). Se utilizaron 60 picogramos de cada muestra, siguiendo con los programas de amplificación para cada par de primers que se muestran en la Fig. 12.

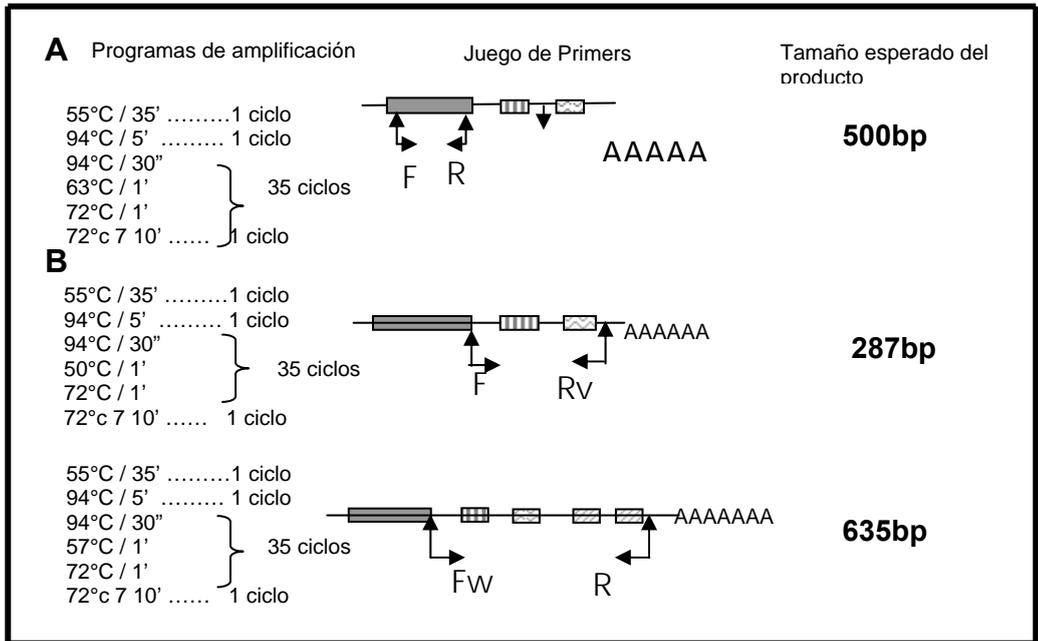


Fig. 12. Programas de amplificación, juego de primers y tamaños esperados de los productos en las reacciones de RT-PCR. A) Primers para la zona conservada con un producto esperado de 500 bp. B) Primers para zonas diferenciadas con productos esperados de 287 y 635 bp respectivamente.

Las secuencias de amplificación de cada primer son las siguientes:

Forward (Fw): 5' AGGAAGCTCGTCAACTC

Reverse (Rv) mensaje de 287 bp:

5' AACTATCCAAGTAATATAT

Reverse (Rv) mensaje de 635 bp:

5' TTTTATGGCAGAGTCAAAC

6. RESULTADOS

6.1 Efecto de dos concentraciones de Ácido Indolacético:

Los estudios fueron realizados en plántulas de maíz a partir de la quinta etapa de desarrollo hasta llegar a la séptima etapa (Loza-Tavera et al., 1990) , en las hojas “tres” de la plántula de maíz. De acuerdo a datos obtenidos anteriormente en el laboratorio y a trabajos de otros investigadores (Newman, et al., 1993), se sugiere que los genes que codifican para Rubisco activasa pueden ser regulados por auxinas. En base a lo anterior se analizó la expresión de la proteína de Rubisco Activasa por Western-Blot en extractos de hojas , así mismo se midió el efecto del AIA sobre los mensajes, por medio de RT-PCR con la sonda de 287 bp para los transcritos de Rubisco activasa.

Las plántulas fueron sembradas y regadas durante todo su desarrollo con agua, pero al llegar a la quinta etapa, fueron asperjadas con 100 ml de AIA 5 μ M ó 50 μ M para los lotes experimentales respectivamente y con 100 ml de agua desionizada para el lote control, repitiéndose el tratamiento hasta llegar así a la séptima etapa del desarrollo.

Durante todo el desarrollo, las plántulas se encontraban en perfecto estado físico, es decir erguidas y con una coloración verde (Fig. 13). Las plántulas tratadas con AIA presentaron un desarrollo más rápido en comparación con el lote control, por lo que alcanzaron la séptima etapa de desarrollo, aproximadamente dos a tres semanas antes que los controles.

Con respecto a la cantidad de Rubisco activasa de la hoja tres, se puede observar en el Western Blot (Fig. 14 A) para el lote control, que tiene una tendencia a disminuir la isoforma de 43 kDa conforme la planta se va desarrollando, en tanto que la isoforma de 41 kDa va aumentando. Esta misma tendencia se observa en los lotes tratados con 5 μ M y 50 μ M de AIA, pero de manera más acentuada respecto al lote control (Fig 14 B).

En cuanto a los mensajes de la hoja tres, se obtiene una sola banda de transcrito, por lo que se sugiere que el producto observado de 287 bp, reconoce a ambos mensajes; como se observa en el RT-PCR (Fig. 15 A).

Así la amplificación de 287 bp que se obtuvo en el lote control presenta una tendencia a disminuir conforme el desarrollo de la plántula avanza. Para el caso de los lotes tratados con 5 μM y 50 μM de AIA, se observa que durante el primer tratamiento el mensaje aumenta drásticamente y después presenta la misma tendencia a disminuir, manteniéndose por más tiempo (Fig. 15 B). Este patrón es más acentuado en el lote tratado con 50 μM de AIA.

**Aspecto Físico de los lotes tratados con AIA
5 y 50 μM .**



Lote Control



Lote 5 μM de AIA

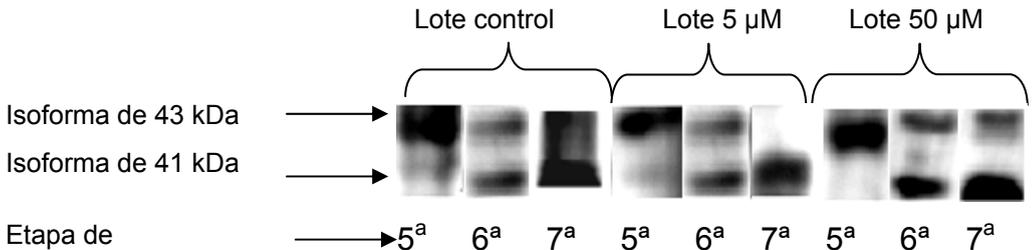


Lote 50 μM de AIA

Fig. 13. Aspecto físico de las plántulas controles y de los lotes tratados con 5 y 50 μM de AIA, crecidas en el invernadero, temperatura: 20°C +/- 2°C; intensidad de la luz: 120 μmol de fotón $\text{s}^{-1}\text{m}^{-2}$, regadas diariamente con agua y asperjadas con 100 ml de agua desionizada para el lote control y con 100 ml de cada una de las concentraciones de AIA para los lotes tratados, respectivamente.

Efecto de dos concentraciones de ácido indolacético (AIA) en las dos isoformas de RCA en hoja 3 de plántulas de maíz, a diferentes etapas del desarrollo.

A. Western-Blot.



B. Densitometría.

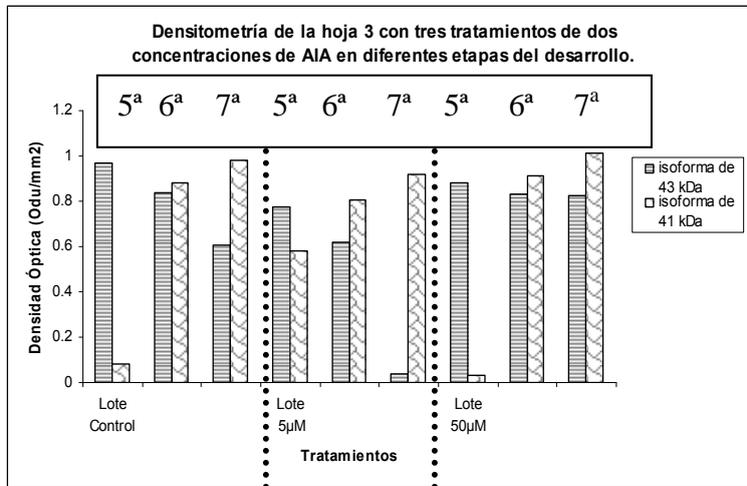
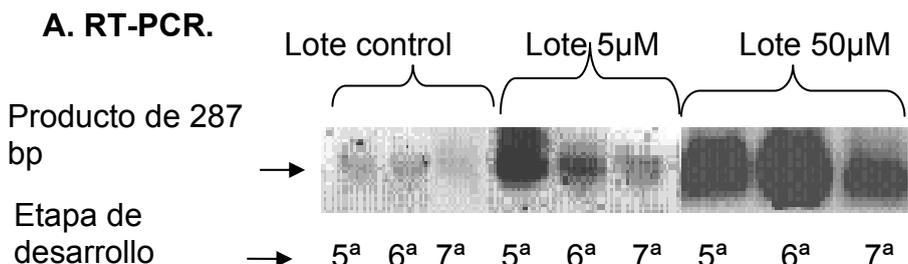


Fig. 14. Plántulas con tres tratamientos de aspersion (100ml) de AIA con dos concentraciones diferentes (5 y 50 µM), hoja 3 cosechada a las 06:00 horas. A) Western Blot de extractos proteicos de cada muestra, 30µg de proteína total en cada carril; B) Densitometrías de la cantidad de Rubisco Activasa (isoformas 41 y 43 kD) de cada una de las muestras.

Efecto de dos concentraciones de ácido indolacético (AIA) en los dos transcritos de RCA en hoja 3 de plántulas de maíz.



B. Densitometría.

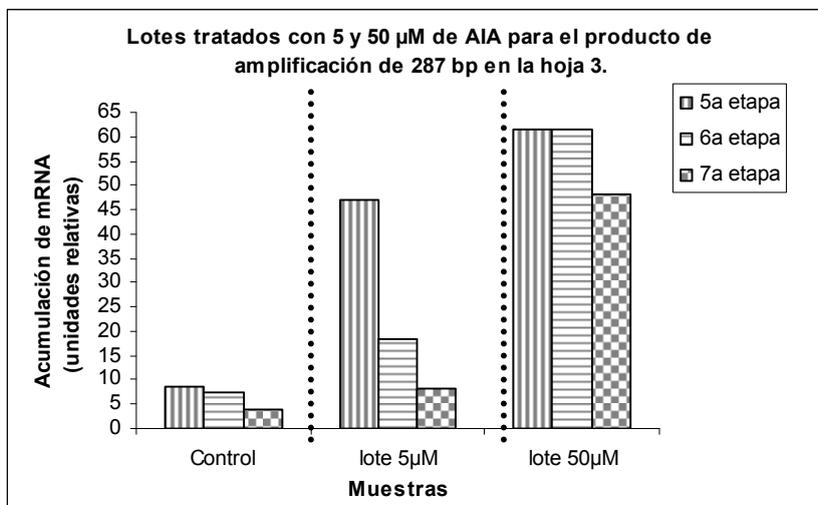


Fig. 15. Plántulas con tres tratamientos de aspersion (100ml) de AIA con dos concentraciones diferentes (5 y 50 µM), hoja 3 cosechada a las 06:00 horas. A) Productos de RT-PCR utilizando la sonda de 287 bp (Fig. 12 B), 60 ng de RNA Poly A+ de cada una de las muestras. B) Análisis densitométrico para los transcritos.

6.2 Expresión de Rubisco Activasa de maíz durante una oscilación diurna.

Los resultados que se presentan a continuación muestran una oscilación diurna de los transcritos que codifican para Rubisco activasa.

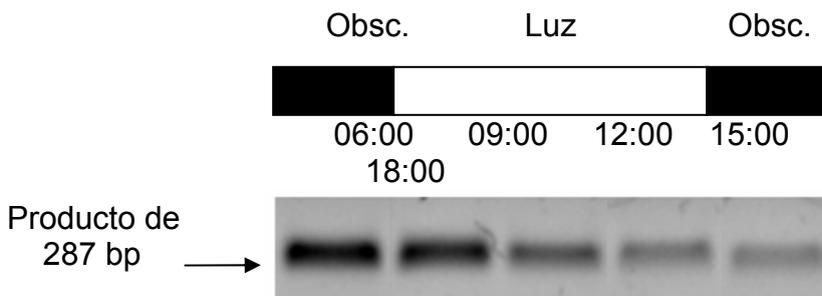
La expresión de los dos transcritos se determinó en unidades relativas de la acumulación de los mRNA de Rubisco Activasa detectados por RT-PCR a partir de la sonda que reconoce a ambos transcritos.

Además resulta importante determinar la expresión de Rubisco Activasa en el transcurso de una oscilación diurna para poder explicar las variaciones que podrían presentar los transcritos que codifican a RCA a lo largo del día.

En cuanto al ciclo circadiano de la hoja tres correspondiente al mensaje de RCA, podemos observar (Fig. 16 A), que durante la oscilación, el producto de amplificación de 287 bp, presenta una tendencia a ir disminuyendo conforme transcurre el día, hasta casi ya no ser detectado en el período de oscuridad.

Expresión de los transcritos de Rubisco Activasa durante una oscilación diurna en hoja tres de plántula de maíz, por medio de RT-PCR.

A. RT-PCR.



B. Densitometría.

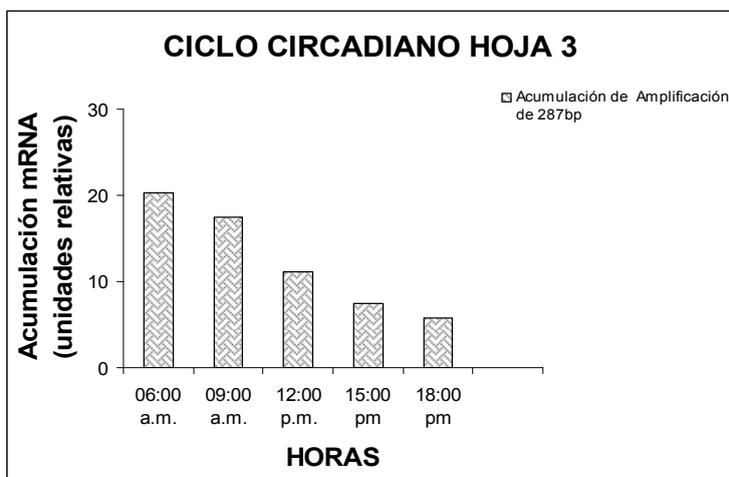


Fig. 16. Oscilaciones de los niveles de los dos transcritos de RCA analizados por RT-PCR durante una oscilación diurna, en hoja 3. A) Producto de RT-PCR utilizando la sonda de 287 bp (Fig. 12 B). B) Densitometría del transcrito de RCA durante la oscilación diurna.

6.3 Efecto de AIA 50 μ M en dos horas diferentes en la oscilación diurna.

Desde el momento de la siembra, las plántulas fueron regadas con agua, pero al llegar a la quinta etapa de desarrollo se asperjaron con 100 ml de una solución de AIA 50 μ M conjuntamente con el riego diario por tres días seguidos en el caso del lote experimental, y en el caso del lote control la aspersion fue con 100 ml de agua desionizada, las hojas tres fueron cosechadas en dos horas que resultaron claves en cuanto a los mensajes dentro de la oscilación diurna, dichas horas son la 06:00 y 15:00 horas.

En el Western Blot (Fig. 17 A), podemos observar que la expresión de Rubisco activasa en el lote control presenta una tendencia a mantener casi constante la cantidad de la isoforma de 43 kDa en ambas horas del muestreo.

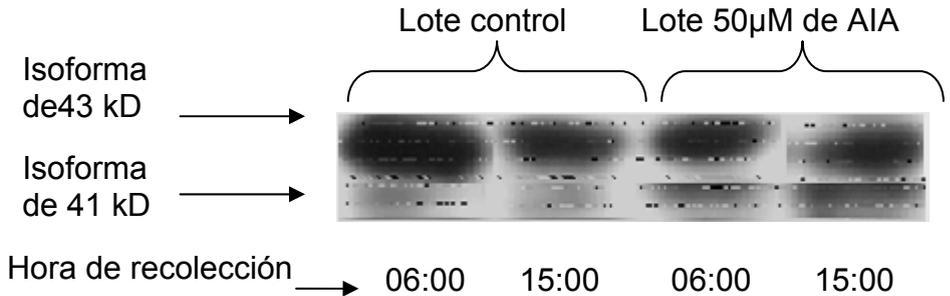
En el caso del lote tratado con 50 μ M de AIA, podemos observar que ambas isoformas se mantienen constantes en las dos horas del muestreo (Fig. 17 A, B).

Respecto a los productos de amplificación de la hoja tres, nuevamente no se logro la amplificación de ambos transcritos de manera independiente, por lo que se piensa que el producto de 287 bp contiene a ambos mensajes; lo que se observa en el RT-PCR (Fig. 18 B) respecto al producto de amplificación de 287 bp es que en el caso del lote control se presenta una tendencia a disminuir de este transcrito durante el transcurso del día.

En el caso de lote tratado, podemos ver que dicha tendencia también se lleva a cabo, pero que aún así el mensaje se mantiene en mayor cantidad respecto al lote control (Fig. 18 A, B).

Efecto del ácido indolacético (AIA) en las dos isoformas de RCA en hoja 3 de plántula de maíz cosechadas a las 06:00 y 15:00 horas.

A. Western-Blot.



B. Densitometría.

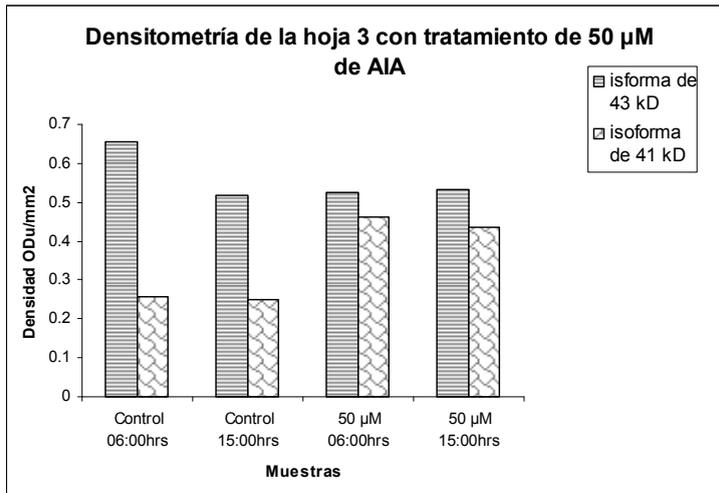
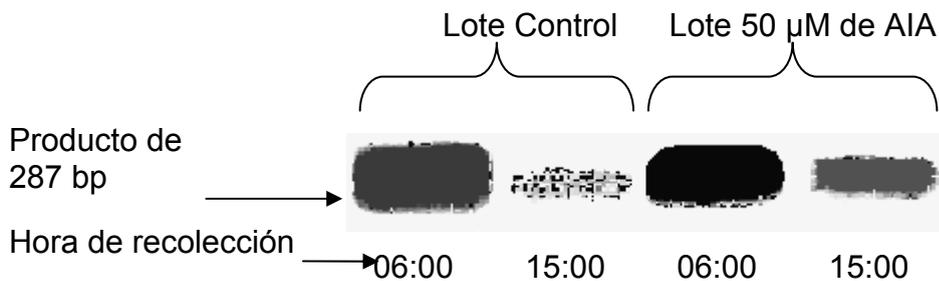


Fig. 17. Plántulas asperjadas con 100ml de AIA 50μM en la etapa quinta de desarrollo, hoja 3, cosechadas a las 06:00 y 15:00 horas. A) Western Blot de extractos proteicos de cada muestra, 30μg de proteína total en cada carril; B) Densitometrías de la cantidad de Rubisco Activasa (isoformas 41 y 43 kD) de cada una de las muestras.

Expresión de los dos transcritos de Rubisco Activasa después del tratamiento con AIA 50 μ M, por medio de RT-PCR para la hoja 3 de plántula de maíz.

A. RT-PCR.



B. Densitometría.

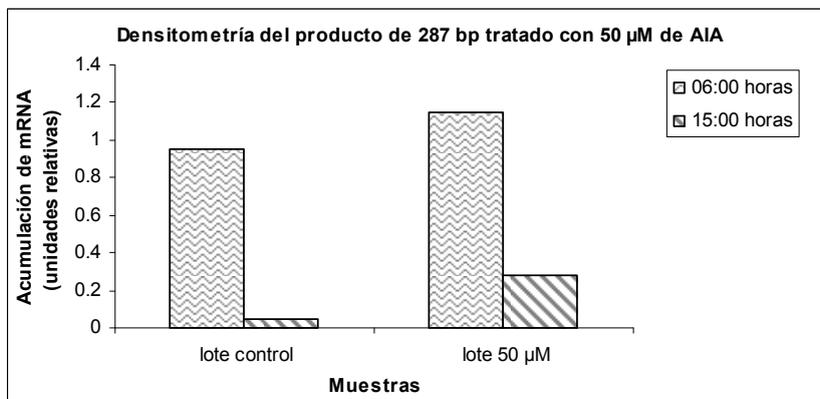


Fig. 18. Efecto de AIA 50 μ M en los niveles de los dos transcritos de RCA analizados por RT-PCR, hoja 3, cosechadas a las 06:00 y 15:00 horas. A) Productos de RT-PCR utilizando la sonda de 287 bp (Fig. 12.B). B) Análisis densitométrico de los dos transcritos de RCA.

7. ANÁLISIS DE RESULTADOS

El objetivo principal de este trabajo fue determinar el efecto que presenta la adición de una auxina natural, el ácido indolacético, aplicado de manera exógeno a las plántulas de maíz, sobre la estabilización de los dos transcritos que codifican para Rubisco Activasa, así como el efecto en la expresión de la misma a nivel de proteína.

Todas las muestras fueron analizadas por Western-Blot para detectar las dos isoformas de Rubisco Activasa proteína en plántulas de maíz utilizando un anticuerpo contra Rubisco Activasa de espinaca. La masa molecular de estas isoformas es de 43 y 41 kDa respectivamente.

Las muestras también fueron analizadas por RT-PCR para detectar y cuantificar por medio de densitometría, la cantidad de los transcritos que codifican para Rubisco Activasa de maíz. El diseño experimental original mostrado en la figura 12, se modificó, ya que solo se utilizó la sonda que da un producto de amplificación de 287 bp, ya que dicha sonda parece reconocer a ambos transcritos debido a la semejanza que presentan éstos en sus secuencias. Por ello es que sólo se presenta el producto de amplificación de 287 bp.

7.1 Cambios en la expresión de RCA debido al ácido indolacético.

Las hormonas de plantas conocidas como auxinas, juegan un papel muy importante en numerosos procesos de desarrollo y crecimiento en plantas. La auxina más importante en plantas superiores es el ácido indolacético.

En los últimos años, se han realizado estudios respecto al papel que juegan las auxinas en la expresión de genes así como en la de sus proteínas correspondientes, principalmente en genes que responden a auxinas minutos después de la aplicación de éstas; dichos genes corresponden a los Aux/IAAs, GH3s y los SAUR.

Toda esta información ha servido como base para este estudio, ya que los dos mensajes que codifican para RCA de maíz presentan en su región 3'UTR las características clásicas de los genes SAUR, es decir presentan elementos DST, los cuales en presencia de auxinas podrían ser estabilizados y por tanto incrementar la abundancia del transcrito, pero no necesariamente la cantidad de su proteína.

Desde el momento en que se hizo la aplicación del ácido indolacético a los lotes tratados con 5 y 50 μ M respectivamente, estos comenzaron a presentar un desarrollo más acelerado en comparación con el lote control; además de que los lotes tratados se mantuvieron más grandes y con una coloración más verde; ya que se ha demostrado que en una gran variedad de plantas, la aplicación de auxinas y giberelinas retardan el envejecimiento y el amarillamiento de las hojas.

7.1.1 Lote Control.

En el lote control el cambio que presenta la expresión de las isoformas de Rubisco activasa se debe principalmente al envejecimiento de la hoja y no al desarrollo completo de la plántula, ya que conforme la plántula presenta una edad de desarrollo más avanzada, la isoforma de 41 kDa va aumentando, en tanto que la isoforma de 43 kDa va disminuyendo notablemente, pero sin desaparecer completamente (Fig. 14). Se han reportado eventos asociados al envejecimiento de las hojas, que afectan la traducción de proteínas, lo cual nos llevaría a pensar que estos también podrían afectar a RCA.

El envejecimiento de las hojas es el paso clave en el ciclo de la vida de una planta, ya que se considera la etapa final del desarrollo de las hojas. Durante el proceso, los materiales utilizados para aumentar las hojas durante el crecimiento vegetativo son removidos y transportados a las semillas, ocasionando la muerte de las hojas (Smart 1994; Smart et al., 1995). Los síntomas visibles del envejecimiento de las hojas son la pérdida de los pigmentos de clorofila (amarillamiento) y desecación; en tanto que los eventos celulares y moleculares que contribuyen a estos síntomas visuales incluyen la desintegración de cloroplasto, una declinación en la fotosíntesis, así como la pérdida de proteínas y ácidos nucleicos (Smart 1994; Buchanan Wollaston 1997; Chandlee 2001).

Adicional a los síntomas internos al envejecimiento, existe una disminución de capacidad para acumular proteínas y ácidos nucleicos debido a un aumento en la degradación y/o reducción de síntesis (Smart 1994; Buchanan Wollaston 1997).

Debido a estos cambios, es probable que Rubisco Activasa presente cambios en la relación de sus isoformas para poder continuar activando a Rubisco, además de que al envejecer las plantas disminuyen su actividad fotosintética lo que podría explicar porque la cantidad total de RCA proteína disminuye, pero que es compensada con el aumento de la isoforma de 41 kDa ya que dicha isoforma funciona mejor como chaperona molecular (Vargas Suárez M. et al, 2004).

En cuanto a los mensajes que codifican para Rubisco activasa, sabemos que éstos sólo codifican para la isoforma de 43 kDa, por lo que podríamos considerar una relación estrecha entre la cantidad de mensaje total y la cantidad de proteína expresada; por lo que en el lote control, podemos ver que conforme la plántula se va desarrollando y la hoja en cuestión para el estudio va envejeciendo, el mensaje va disminuyendo considerablemente aunque no llega a desaparecer completamente (Fig. 15), siguiendo así el mismo patrón de la isoforma de 43 kDa correspondiente, por lo que se corrobora que conforme la planta envejece, tanto la proteína como el mensaje que la codifica disminuye.

7.1.2 Lote Tratado con 5 μ M y 50 μ M de AIA.

Para el caso de las isoformas del lote tratado con 5 μ M de AIA, podemos observar exactamente el mismo efecto en relación a las isoformas que para el lote control, ya que el cambio en la relación de las isoformas comienza a darse desde el primer tratamiento con la auxina, teniéndose un aumento en la relación 41 /43 en general por efecto de la auxina aunque el valor coincida con el aumento en la edad de la planta (Fig. 14).

En cuanto a los mensajes correspondientes, se observó que cuando tenemos mayor cantidad de RCA, tenemos mayor cantidad de mensaje total (Fig. 15).

Posteriormente cuando comienza a aumentar la isoforma menor, el mensaje disminuye, aunque se encuentra presente al final a pesar de que casi no hay isoforma de 43 kDa, lo que nos podría indicar que el tratamiento con AIA, logra estabilizar el mensaje, pero no necesariamente todo se esta expresando en la cantidad de proteína.

Este mismo efecto se observa para el lote tratado con 50 μ M de AIA, pero el efecto se ve de una manera más acentuada, además conforme se va desarrollando el tejido de la hoja, la isoforma menor sigue aumentando presentando así el mismo comportamiento que el lote control (Fig. 14).

En cuanto al mensaje correspondiente a este lote (Fig. 15), podemos notar que con el tratamiento de AIA, el mensaje se mantiene estable durante etapas más avanzadas de desarrollo de la hoja, teniéndose una ligera disminución en la 7^a etapa.

Este comportamiento del mensaje se ve repercutido en el comportamiento de la isoforma de 43 kDa, ya que esta permanece casi constante, aunque siga aumentando la cantidad de la isoforma de 41 kDa.

Por lo que se puede determinar que el tratamiento de 50 μ M de AIA resulta ser más efectivo para estabilizar el mensaje, ya que tenemos un aumento en la cantidad de RCA proteína casi constante, favoreciéndose la isoforma de 41 kDa a medida que envejece la hoja debido a que tenemos mayor cantidad de mensaje durante las diferentes etapas de desarrollo de la plántula.

7.2 Expresión de Rubisco activasa de maíz durante una oscilación diurna.

Resulta muy importante mencionar que estudios realizados en el laboratorio han arrojado datos que revelan que en maíz existen dos genes que codifican para Rubisco Activasa, pero ambos genes codifican para un solo péptido, el cual corresponde a la isoforma de 43 kDa; además de que dichos genes presentan variaciones en sus expresiones durante una oscilación diurna, por lo que se piensa que los cambios en las isoformas, así como la aparición de la isoforma de 41 kDa durante el desarrollo de la plántula de maíz se deban a cambios post-traduccionales.

Respecto a la oscilación diurna, se decidió tomar la quinta etapa de desarrollo de la plántula, para poder contar con hojas jóvenes para el estudio, estas fueron las hojas tres; y así observar si la oscilación diurna repercute en la expresión de Rubisco activasa dependiendo de la etapa de desarrollo de la plántula.

Las expresiones circadianas de los dos transcritos de RCA, han sido observadas en gran variedad de plantas. Particularmente en *Arabidopsis*, se ha observado que los niveles de mRNA disminuyen durante el transcurso del día y aumenta durante la noche (Green R.M., et al, 2002).

En el caso de los transcritos de RCA de maíz, se observa que los productos de amplificación de los mensajes presentan patrones de expresión diferenciados durante el día y la noche, tendiendo a ser más prominente la acumulación de éstos durante el período de obscuridad (Ayala-Ochoa eta al., 2004).

La determinación de la cantidad de los transcritos que codifican para Rubisco activasa se realizaron por medio del RT-PCR, en donde solo se utilizó la sonda que da un producto de amplificación de 287 bp, ya que dicha sonda parece reconocer a ambos transcritos debido a la semejanza que presentan éstos en sus secuencias. Por ello es que sólo se presenta el producto de amplificación de 287 bp.

Podemos observar (Fig. 16), que dicho mensaje va disminuyendo en el transcurso del día, ya que conforme nos acercamos a la noche, el mensaje casi no se encuentra presente, dicho comportamiento no corresponde con lo reportado por Ayala-Ochoa y colaboradores; ya que el muestreo en nuestro experimento se realizó en la época de verano, en tanto que para Ayala y colaboradores, dicho experimento fue realizado durante el invierno, por lo que podemos darnos cuenta que el comportamiento de RCA es sumamente dependiente de las condiciones ambientales que rodean a la plántula. Lo que si podemos notar es que se tiene una tendencia similar en el sentido de que el mensaje tiende a ir disminuyendo aunque no corresponda a las horas reportadas por los autores mencionados para dichas acumulaciones.

Las velocidades de degradación o recambio de los mRNAs en plantas superiores pueden variar y estar reguladas por una gran cantidad de estímulos exógenos y endógenos; así como por un gran número de secuencias específicas que median la rápida degradación del mRNA.

Una de estas secuencias son los elementos DST, los cuales se encuentran de manera conservada en la región 3'UTR de muchos genes que presentan una rápida velocidad de recambio, por lo tanto en transcritos inestables.

En el caso de los mensajes que codifican para RCA de maíz se ha encontrado que ambos mensajes presentan la misma región codificante pero que difieren en su región 3'UTR, la cual presenta repeticiones de diferentes secuencias DST.

7.3 Cambios en la expresión de RCA en plántulas tratadas con 50 μ M de AIA en dos horas importantes de una oscilación diurna.

Para ver el fenómeno del comportamiento de las isoformas durante una oscilación diurna, se tomaron dos horas claves para realizar el experimento, estas horas son las 06:00 horas ya que es cuando tenemos mayor cantidad de mensaje y a las 15:00 horas que es cuando comienza a desaparecer el mensaje.

7.3.1 Lote Control.

Al realizar el experimento con el lote control, se ve en relación a las proteínas (Fig. 17) que en el transcurso del día, la isoforma de 43 kDa esta mayoritariamente respecto a la isoforma de 41 kDa de una hora respecto a la otra.

En cuanto al mensaje correspondiente (Fig. 18), se puede observar el comportamiento determinado en las oscilaciones diurnas, es decir, va disminuyendo conforme transcurre el día, observándose que en la oscilación, la disminución de la cantidad de mensaje es más pronunciada que la cantidad de proteína expresada, por lo que podemos decir que la oscilación diurna no afecta a la cantidad total de RCA ya que se ve compensada con el aumento de la isoforma de 41 kDa.

7.3.2 Lote Tratado con 50 μ M de AIA.

Para el caso de proteína de este lote, se puede observar (Fig. 17) que nuevamente la cantidad de la isoformas se mantienen constantes debido al tratamiento con la auxina y que esto mismo ayuda a que la isoforma de 43 kDa no cambie en el transcurso del día, aunque las auxinas aumenten la isoforma de 41 kDa, además de que dicha isoforma es mayor en relación al lote control.

En cuanto a los mensajes (Fig. 18), se observa un aumento en la cantidad del mensaje debido a la aplicación del ácido indolacético y que el mensaje también disminuye pero en menor cantidad que el lote control, por lo que se puede decir que el AIA a $50\mu\text{M}$ si estabiliza al mensaje, repercutiendo nuevamente en el comportamiento de la isoforma de 43 kDa.

Estudios realizados con hormonas, principalmente el ácido giberélico, citoquininas y ácido indolacético de plantas, han demostrado que concentraciones de auxinas exógenas superiores $100\mu\text{M}$ comienza a tener un efecto inhibitorio en términos de respuesta de crecimiento (Brock G.T., 1988), en tanto que en pequeñas concentraciones ($0.1\mu\text{M}$) se representan un aumento en la cantidad total de Rubisco Activasa y por tanto un mayor crecimiento de la planta, lo cual es muy notorio en el aspecto físico de nuestras plántulas tratadas con auxinas.

El incremento en la abundancia de algunos mRNAs, como son los genes SAUR, puede ser detectados 2.5 minutos después del tratamiento con auxinas. El incremento de estos mRNAs seguidos de la aplicación de las auxinas está regulado primeramente a nivel de la transcripción, pero también pueden regularse post-transcripcionalmente, por lo que se puede pensar que esto sucede con los mRNAs que codifican para RCA, debido a que sus características son muy similares a los genes SAUR (Franco R.A., et al, 1991).

En nuestro estudio, se observa que el ácido indolacético a nivel de plántula y con la concentración de 50 μ M, parece estabilizar a uno de los mensajes de Rubisco Activasa ya que el mensaje que se esperaba como un producto de amplificación de 635 bp no se pudo amplificar para ninguno de los casos, por lo que se considera que probablemente ambos mensajes se encuentren juntos en el producto que localizamos, ya que la diferencia de bases que se presentan entre los primers es mínima, además el AIA a 50 μ M no afecta la relación 43/41 kDa de Rubisco activasa, ya que en el caso de las hoja tres, se puede pensar que la proteína se mantiene casi constante durante el desarrollo de la plántula, aunque este proceso físicamente es más lento respecto al lote control.

Con la concentración de 50 μ M el efecto obtenido finalmente, es mantener por más tiempo la cantidad de Rubisco Activasa en las hojas, durante el proceso de envejecimiento inherente del desarrollo de la planta, como consecuencia de la estabilidad de uno o ambos de sus transcritos.

8. CONCLUSIONES

El análisis de nuestros resultados ha permitido llegar a las siguientes conclusiones:

- ❖ El contenido de Rubisco activasa depende del estado de desarrollo del tejido de la hoja, edad de la hoja y estación del año.
- ❖ El ácido indolacético a concentraciones de 5 y 50 μ M provoca el aumento y mantenimiento casi constante de la proteína RCA durante el desarrollo de la plántula de maíz, favoreciendo la isoforma de 41 kDa vs 43 kDa.
- ❖ El ácido indolacético favorece el aumento en la cantidad de mensaje debido posiblemente a su estabilización, pero no existe una correlación directa con la cantidad de proteína expresada.

- ❖ Existe una fuerte degradación diurna en la acumulación de los mensajes que codifican para Rubisco Activasa de maíz probablemente debido a los elementos DST presentes en los mensajes.
- ❖ Los genes de Rubisco Activasa de maíz son regulados al menos parcialmente a nivel post-transcripcional, debido a las velocidades de degradación de los mRNAs.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abel S., Theologis A., (1996). "Early genes and auxin action". *Plant Physiology*. 111:9-17.
- Abler L.M., Green J.P., (1996). "Control of mRNA stability in higher plants". *Plant Molecular Biology*. 32:63-78.
- Alwine J.C., Kemp D.J., Stark G.R., (1977). *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 74, 5350.
- Apel K., Kloppstech K., (1978). "The plastid membranes of barley (*Hordeum vulgare*). Light-induced appearance of mRNA coding for the apoprotein of the light-harvesting chlorophyll a/b protein". *Eur. J. Biochem.* 85:582-588.
- Apel K., Kloppstech K., (1978). "Light-induced appearance of mRNA coding for the apoprotein of the light-harvesting chlorophyll a/b protein of Barley (*Hordeum vulgare*)". *Eur. J. Biochem.* 97: 183-188.

- Ayala O.A., Vargas S.M., Loza T.H., León P., Jiménez G.L.F., Sánchez J.E., (2004). "In Maize, two distinct ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase transcripts have different day/night patterns of expresión". *Biochimie*, 86:439-449.

- Bartel B., Le Clere S., Magidin M., Zolman B. K., (2001). "Inputs to the active indole-3-acetic acid pool: de novo synthesis, conjugate hydrolysis, and indole-3-butyric acid β -oxidation". *J. Plant Growth Regul.*, 20:198-216.

- Berlet T., Krogan T.N., Scarpella E., (2004). "Auxin signals-turning genes on and turning cells around". *Current Opinion in Plant Biology*. 7:553-563.

- Bishopp A., Mähönen P.A., Helariutta Y., (2006). "Sings of change: hormone receptors that regulates plant development". *Development* 133(10):1857-1869.

- Bognar L.K., Hall A., Adam e., Thain S.C., Nagy F., Millar A.J., (1999). "The circadian clock controls the expression pattern of the circadian input photoreceptor, phytochrome B". Proc Natl Acad Sci USA. 96:14652-14657.

- Bradford M., (1976). "A rapid and sensitive methods for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding". Anal. Rev. Biochem. 72:248-254.

- Buchanan B.B., Gruissem W., Jones L.R., (2000). Biochemistry & Molecular Biology of Plants, American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, p.p:610-626, 850-981.

- Caemmerer V.S., Hendrickson L., Quinn V., Vella N., Millgate G.A., Furbank T.R :, (2005). "Reductions of Rubisco Activase by antisense RNA in the C₄ plant *Flaveria bidentis* reduces Rubisco carbamylation and leaf photosynthesis". Plant Physiology. 137:747-755.

- Chen C.Y. and Shyu A.B. (1995). "AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation". Trends Biochem Sci. 20: 465-470.

- Deng M. D., Moureaux T., Leydecker M. T., Caboche M. (1990). « Nitrate-reductase expression is under the control of a circadian rhythm and is light inducible in *Nicotiana tabacum* leaves". Planta. 180:257-261.

- Dharmasiri N., Estelle M., (2004). "Auxin signaling and regulated protein degradation". Trends in Plant Science. 9(6):302-308.

- Franco R.A., Gee M., Guilfoyle J.T., (1991). "Induction and superinduction of auxin-responsive mRNA with auin and protein s̀ntesis inhibitors". The Journal of Biological Chemistry. 265(15):15845-15849.

- Frigerio M., Alabadì D., Pèrez-Gòmez J., Garcia-Càrcel L., Phillips L.A., Hedden P., Blàzque A.M., (2006). “Transcriptional Regulation of Gibberellin Metabolism Genes by Auxin Signaling in *Arabidopsis*”. *Plant Physiology*. 142:553-563.
- Gardner J.M., Hubbard E.K., Hotta T.C., Dodd N.A., Webb A.A., (2006). “How plants tell the time”. *Biochem J*. 397:15-24.
- Gil P., Green J.P., (1996). “Multiple regions of the *Arabidopsis* SAUR-AC1 gene control transcript abundance: the 3’ untranslated region functions as an mRNA instability determinant”. *EMBO J*. 15(7):1678-1686.
- Giuliano G., Hoffman N. E., Ko K., Scolnik P. A., Cashmore A. R., (1988). “A light-entrained circadian clock controls transcription of several plants genes”. *EMBO J*. 7:3635-3542.
- Guilfoyle T., (2007). “Sticking with auxin”. *Nature*. 446:621-622.

- Gutiérrez A.R., MacIntosh C.G., Geen J.P., (1999). "Current perspectives on mRNA stability in plants: multiple levels and mechanisms of control". *TIPS*. 4:429-438.

- Gutiérrez A.R., Ewing R.M., Cherry J.M., Green J.P., (2002). "Identification of unstable transcripts in Arabidopsis by cDNA microarray analysis: Rapid decay is associated with a group of touch and specific clock controlled genes". *Proc Natl Acad Sci USA*. 99:11513-11518.

- Green J.P., (1993). "Control of mRNA stability in higher plants". *Plant Physiology*. 102:1065-1070.

- Green R.M., Tingay S., Wang Z.Y., Tobin E.M., (2002). "Circadian rhythms confer a higher level of fitness to Arabidopsis plants". *Plant Physiology*. 129:576-584.

- Harmer L.S., Panda S., Kay A.S., (2001), "Molecular Bases of Circadian Rhythms". *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17:215-253.

- Hartwing R., Schweiger M., Schweiger R., Schweiger H. G., (1985). "Identification of a high molecular weight polypeptide that may be part of the circadian clockwork in *Acetabularia*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 6899-6902.

- He P., Osaki M., Takebe M., Shinano T., Wasaki J., (2005). "Endogenous hormones and expression of senescence-related genes in different senescent types of maize". Journal of Experimental Botany. 56(414):1117-1128.

- Houtz L.R., Portis A.R. Jr. (2003). "The life of ribulosa a, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase-posttranscriptional facts and mysteries". Archives of Biochemistry and Biophysics, 414:150-158.

- Hughes A.T., (2006). "Regulation of gene expression by alternative untranslated regions". TRENDS in Genetics. 20(20):1-4.

- Johnson A.M., Pérez-Amador A.M., Lidder Preetmoninder and Green P., (2000). “Mutants of *Arabidopsis* defective in a sequence specific mRNA degradation pathway”. PNAS, 97(25):13991-13996.
- Knauss S., Rohrmeier T., Lehle L., (2003). “The auxin-induced maize gene ZmSAUR2 encodes a short-lived nuclear protein expressed in elongating tissues”. The Journal of Biological Chemistry. 278(26):23936-23943.
- Kobza J., Seemann J. R., (1989). “Regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity in response to diurnal changes in irradiance”. Plant Physiology. 89:918-924.
- Krug M.S., Berger S.L., (1987). “First-strand cDNA synthesis primed with oligo (dt)”. Academic Press Inc., New York, 316-325.
- Laemmli U.K., (1970). “Clavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4”. Nature. 227:680-685.

- Li Y., Strabala J.T., Hagen G., Guilfoyle J.T., (1994). "The soybean SAUR open reading frame contains a *cis* element responsible for cycloheximide-induced mRNA accumulation". *Plant Molecular Biology*. 24:715-723.

- Li Y., Liu B.Z., Shi X., G., Guilfoyle J.T., (1994). "An auxin-inducible element in soybean SAUR promoters". *Plant Physiology*. 106:37-43.

- Lidder P., Gutiérrez A., Salomé A.P. McClung R., Green J.P., (2005). "Circadian control of messenger RNA stability. Association with a sequence-specific messenger RNA decay pathway". *Plant Physiology*. 138:2374-2385.

- Loza T.H., Martínez B.E., Sánchez J.E., (1990). "Regulation of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase expresión in second leaves of Maite seedlings from low and high yield populations". *Plant Physiology*. 93:541-548.

- McClung C.R., (2001). "Circadian rhythms in plants". *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 52:139-162.
- McClung C.R., (2006). "Plant Circadian Rhythms". *The Plant Cell.* 18:792-803.
- McClure A.B., Hagen G., Brown S.C., Gee A.M., Guilfoyle J.T., (1989). "Transcription, organization and sequence of an auxin-regulated gene cluster in soybean". *The Plant Cell.* 1:229-239.
- Meyer G., Bliedung H., Klopstech K. (1983). "NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase: reciprocal regulation in mono and dicotyledonean plants". *Plant Cell Rep.* 2:26-29.
- Myers T.W., Gelfand D.H., (1991): "Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase". *Biochemistry.* 30:7661-7666.
- Nagy F., Kay S.A., Chua N.H., (1988). "A circadian clock regulates transcription of the wheat cab-1 gene". *Genes Dev.* 2:376-382.

- Nemhauser L.J., Hong F., Chory J., (2006). “Different Plant Hormones Regulate Similar Processes through largely nonoverlapping transcriptional responses”. *Cell*. 106:167-175.

- Newman C.T., Ohme-Takagi M., Taylor B.C., Green J.P., (1993). “DST sequences, highly conserved among plant SAUR genes, target reporter transcripts for rapid decay in tobacco”. *The Plant Cell*. 5:701-714.

- Normanly J., (1997). “Auxin metabolism”. *Physiologia Plantarum*. 100:431-442.

- Novàková M., Motyka V., Dobrev U.P., Malbeck J., Gaudinová A., Vanková R., (2005). “Diurnal variation of cytokinin, auxin and abscisic acid levels in tobacco leaves”. *Journal of Experimental Botany*. 56(421):2877-2883.

- Ohme T.M. (1993). “The effect of sequences with high AU content on mRNA stability in tobacco”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:11811-11815.

- Ogura T., Wilkinson J.A. (2001). "AAA+ superfamily ATPases: common structure diverse function". *Genes to Cells*. 6:575-597.
- Otto B., Grimm B., Ottersbach P., Kloppstech K., (1988). "Circadian control of the accumulation of mRNAs for light- and heat-inducible chloroplast proteins in pea (*Pisum sativum* L.)". *Plant Physiology*. 88:21-25.
- Panda S., Hogenesch J.B., Kay S.A., (2002). "Circadian rhythms from flies to human". *Nature*. 417:329-335.
- Parry G., Estelle M., (2006). "Auxin receptors: a new role for F-box proteins". *Current Opinion in Cell Biology*. 18:152-156.
- Pérez A.A.M., Lidder P., Jonson A.M., Landgraf J., Wilman E., Green J.P., (2001). "New molecular phenotypes in the *dst* mutants of *Arabidopsis* revealed by DNA microarray analysis". *The Plant Cell*. 13:2703-2717.

- Pilgrim L.M., McClung R., (1993). “Differential involvement of the circadian clock in the expression of genes required for Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase synthesis, assembly, and activation in *Arabidopsis thaliana*”. Plant Physiology. 103:553-564.
- Portis A.R. Jr. (1990). “Rubisco Activase”. Biochimica et Biophysica Acta, 1015:15-28.
- Raghavan C., Kok-Ong E., Dalling J.M., (2006). “Regulation of genes associated with auxin, ethylene and ABA pathways by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in *Arabidopsis*”. Funct. Integr. Genomics. 6:60-70.
- Ribnicky D.M., Cohen J.D., Hu W.S., Cooke J.J. (2002). “An auxin surge following fertilization in carrots: a mechanism for regulating plant totipotency”. Planta 214:505-509.
- Roennenberg T. and Mellow M., (2005). “Timeline: Circadian clocks-the fall and rise of physiology”. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 6(12):965-971.

- Roh K.S., Im E.J., Yeo S.E., Oh M.J., Song J.S., Chung H.S., Song S.D., (2001). "Exogenous GA3 increases rubisco activation in soybean leaves". *Journal of Plant Biology*. 44(1):53-60.

- Rundle S. J., Zielinski R. E., (1991-b). "Alterations in barley ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase gene expression during development and in response to milluminatio". *J. Biol. Chem*. 266:14802-14807.

- Salvucci E.M., Osteryoung W.K., Crafts-Brandner J.S., Vierling E. (2001). "Exceptional sensitivity of Rubisco Activase to thermal denaturation in vitro and in vivo". *Plant Physiology*. 127: 1053-1064.

- Sánchez J.E., Medrano L., Martínez B.E., (1995). "Rubisco activase, a posible new member of the molecular chaperone family". *Biochemistry*. 34:2826-2831.

- Seeley K.A., Byrne D.H., Colbert J.T. (1992). "Red light-independent instability of oat phytochrome mRNA *in vivo*". *Plant Cell*. 4:29-38.

- Shu Y., hong-Hui L., (2004). “Transcription, translation, degradation, and circadian clock”. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 321 :1-6.

- Singh B.K., (1998). “Transcriptional regulation in plants: the importance of combinatorial control”. *Plant Physiol*. 118:1111-1120.

- Sitbon F., Perrot-Rechenmann C., (1997). “Expression of auxin-regulated genes “. *Physiologia Plantarum*. 100:443-455.

- Sullivan L.M., Green J.P., (1996). “Mutational analysis of the DST element in tobacco cells and transgenic plants: Identification of residues critical for mRNA instability”. *RNA*. 2:308-315.

- Swarup R., Parry G., Graham N., Allen T., Bennett M., (2002). “Auxin cross-talk:integration of signalling pathways to control plant development”. *Plant Molecular Biology*. 49:411-426.

- Tanzer M.M. and Meagher R.B. (1995). “Degradation of the soybean ribulosa-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit mRNA, SRS4 initiates with endonucleolytic cleavage”. *Mol. Cell. Biol.* 15:6641-6652.

- To Y. K., Suen F.D., Grace Chen s.C., (1999). “Molecular characterization of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase in rice leaves”. *Planta.* 209:66-76.

- Towbin H., Staehelin T., Gordon J., (1979). “Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose, sheets: Procedure and some applications”. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 76:4350-4354.

- Vargas S.M., Ayala O.A., Lozano F.J., García T.I., Díaz Q.A., Ortiz N.F.V., Sánchez J.E., (2004). “Rubisco activase chaperone activity is regulated by a post-transcriptional mechanism in maize leaves”. *Journal of Experimental Botany.* 55:2533-2539.

- Venter M., Botha C.F., (2004). “Promoter analysis and transcription profiling: integration of genetic data enhances understanding of gene expression”. *Physiologia Plantarum*. 120:74-83.

- Walker L., Estelle M., (1998). “Molecular mechanisms of auxin action”. *Current Opinion in Plant Biology*. 1:434-439.

- Werneke M.J., Zielinski K., Ogren W, L., (1988). “Structure and expression of spinach leaf cDNA encoding ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase”. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85:787-791.

- Wilusz J.C., Wilusz J., (2004). “Bringing the role of the mRNA decay in the control of gene expression into focus”. *TRENDS in Genetics*. 21(10):491-497.

- Woodward W.A., Bartel B., (2005). “Auxin: regulation, action and interaction”. *Annals of Botany*. 95: 707-735.

- Yakir E., Hilman D., Harir Y., Green M.R., (2006). "Regulation of output from the plant circadian clock". *FEBS Journal*. 274:335-345.

- Zazimalova E., Napier M.R., (2003). "Points of regulation for auxin action". *Plant Cell Rep.* 21:625-634.

- Zhang N., Portis A.R. Jr. (1999). "Mechanism of light regulation of Rubisco: A specific role for the larger Rubisco activase isoform involving reductive activation by thioredoxin-f". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 9438-9443.