



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**FUNCIÓN DE LOS ELEMENTOS DST
EN LA REGULACIÓN DE LA
EXPRESIÓN DE RUBISCO ACTIVASA
DE MAÍZ**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

M. en C. BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A :

ERIKA VICTORIA ALMERAYA DEL VALLE.



MÉXICO, D.F.

2009



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.

Para mis padres y hermanos con cariño

Para ti Eric

AGRADECIMIENTOS:

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO GRACIAS AL APOYO ECONÓMICO
BRINDADO POR EL PROGRAMA PAIP No. 6290-10 DE LA FACULTAD DE
QUÍMICA.

Agradezco especialmente a la Dra. Estela Sánchez Quintanar por su invaluable ayuda, por su constante apoyo y por la confianza depositada en mí, pero sobre todo por sus enseñanzas.

Mil gracias!!!

Al Maestro Raúl por su siempre gentil trato, su amistad y por todo el apoyo que siempre me ha brindado.

A todos mis compañeros de laboratorio, por su bonita amistad.

A mis maestros y tutores por su valiosa contribución a mi formación académica.

CONTENIDO

RESUMEN	7
SUMMARY	9
JUSTIFICACIÓN	11
INTRODUCCIÓN	13
ANTECEDENTES	15
1. EL PROCESO DE FOTOSÍNTESIS EN LAS PLANTAS	15
2. RUBISCO ACTIVASA, CLAVE DEL PROCESO FOTOSINTÉTICO	19
3. EXPRESIÓN DE RUBISCO ACTIVASA	23
4. LOS ELEMENTOS DST Y SU RELACIÓN CON LAS AUXINAS	26
5. LOS ELEMENTOS DST Y SU RELACIÓN CON EL CICLO CIRCADIANO	31
HIPÓTESIS	33
OBJETIVO GENERAL	34
OBJETIVOS PARTICULARES	34
ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN	35
MATERIALES Y MÉTODOS	36
1. MATERIAL BIOLÓGICO	36
2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS	36
3. OBTENCIÓN DE OLIGOSONDA	37
4. EXTRACCIÓN DE RNA POLISOMAL	38

5.	PREPARACIÓN DE OLIGOSONDA	39
6.	ANÁLISIS NORTHERN BLOT	40
7.	ANÁLISIS Y COMPARACIÓN DE DATOS	41
8.	DETERMINACIÓN DEL VALOR DE VIDA MEDIA	42
9.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	42
	RESULTADOS	43
1.	DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA DE TRABAJO	43
2.	EFEECTO DE LA INHIBICIÓN DEL PROCESO DE TRANSCRIPCIÓN SOBRE LA ACUMULACIÓN DE LOS TRANSCRITOS ZMRCA. ESTIMACIÓN DE SU VIDA MEDIA	47
3.	EFEECTO DE AUXINAS SOBRE LA ACUMULACIÓN DE LOS TRANSCRITOS ZMRCA	55
	DISCUSIÓN	64
1.	EFEECTO DE LA INHIBICIÓN DEL PROCESO DE TRANSCRIPCIÓN SOBRE LA ACUMULACIÓN DE LOS TRANSCRITOS ZMRCA. ESTIMACIÓN DE SU VIDA MEDIA	64
2.	EFEECTO DE AUXINAS (ÁCIDO INDOL ACÉTICO) SOBRE LA ACUMULACIÓN DE LOS TRANSCRITOS ZMRCA	67
	CONCLUSIONES	70
	BIBLIOGRAFÍA	71

RESUMEN

Rubisco activasa, la chaperona molecular de la enzima Rubisco, es hoy en día una proteína ampliamente estudiada por su potencial como blanco para mejorar la capacidad fotosintética de las plantas.

Resultados anteriores de nuestro laboratorio demostraron que en plantas adultas de maíz el aumento en el contenido celular de Rubisco activasa promueve un incremento en la tasa fotosintética de la planta con lo cual se sugiere fuertemente la posibilidad de que la actividad chaperona de Rubisco activasa representa también una opción para disminuir la contaminación ambiental ocasionada por el aumento de CO₂ en la atmósfera.

En la planta de maíz, la Rubisco activasa es codificada por dos genes con idéntico marco de lectura abierto: Zmrca 1 y Zmrca 2, cada uno de ellos posee en su región 3' no traducible (UTR) diferente número de copias de elementos semejantes a los motivos llamados DST.

Los elementos DST son secuencias altamente conservadas que se encuentran en los extremos 3'UTR de un conjunto de pequeños mRNAs inestables y regulables por auxinas conocidos como SAURs (small auxin-up RNAs).

Dada la importancia de la función fotosintética de las plantas, el objetivo de este trabajo de investigación es identificar si los elementos similares a DST encontrados en los mRNAs de la Rubisco activasa de maíz funcionan como determinantes de inestabilidad en estos transcritos.

Para ello se determinó la vida media de los transcritos Zmrca 1 y Zmrca 2 en plántulas de maíz mediante ensayos tipo Northern-blot, después de inhibir el proceso de transcripción con α -amanitina.

Los resultados indicaron que la vida media de los transcritos Zmrca 1 y Zmrca 2 es menor a 60 min tal como sucede para los RNAs mensajeros considerados como inestables; sin embargo, cuando las plántulas de maíz se sometieron a un

tratamiento externo de ácido 3 – indol acético se promovió un incremento en la vida media de Zmrca 1 y Zmrca 2.

Por otra parte, además de observar que la abundancia de Zmrca 1 y Zmrca 2 se modifica por variaciones en sus velocidades de degradación, también se observó que su abundancia es regulada de forma importante por el proceso activo de transcripción.

Nuestros resultados señalan que aunque los elementos DST encontrados en la región 3'UTR de los transcritos Zmrca no tienen la secuencia típica descrita en los RNA mensajeros SAUR, su presencia se relaciona fuertemente con el decaimiento acelerado en la abundancia de los transcritos Zmrca.

Además, ambos transcritos Zmrca incrementan su acumulación como respuesta al estímulo hormonal externo de auxinas indicando con ello que las auxinas ejercen un control positivo sobre la regulación de la vida media de los transcritos Zmrca y eventualmente sobre la actividad chaperona de la Rubisco activasa.

SUMMARY

Rubisco activase, the molecular chaperone of Rubisco enzyme, is today an extended studied protein by its potential for improving the plant photosynthetic capacity.

Previous results from our laboratory strongly suggest the possibility that the chaperone activity of Rubisco activase might represent an option to diminish the environmental contamination caused by the increase of CO₂ in the atmosphere.

In the maize plant, Rubisco activase is codified by two genes with identical open reading frame: Zmrca 1 and Zmrca 2. Each one of the transcripts has different number of copies of DST like elements in its 3' untranslatable region (UTR).

DST elements are highly conserved sequences located in the 3'UTR region of a set of unstable and auxin-regulated mRNAs known as SAURs (small auxin-up RNAs).

Given the importance of plant photosynthetic function, the objective of this investigation is to prove if the DST like elements found in maize are determinants of instability in Rubisco activase transcripts.

The half-life of Zmrca 1 and Zmrca 2 transcripts was determined by Northern-blot after inhibiting the transcription process by α -amanitine in maize plant.

The results indicated that half-life of Zmrca 1 Zmrca 2 transcripts is less than 60 min, as reported for mRNAs considered unstable "like", nevertheless, external acid 3 - indol acetic treatment to maize plants, promoted an increase in the average life of Zmrca 1 and Zmrca 2.

On the other hand, the abundance of Zmrca 1 and Zmrca 2 mRNAs was found to be also regulated by active transcription in addition to modifications of their degradation speeds.

Our results indicate that although DST like elements found in the 3' UTR region of Zmrca transcripts do not have the typical sequence found in messenger SAURs, their presence is strongly related to the accelerated abundance decay in Zmrca transcripts. In addition, both Zmrca 1 and Zmrca 2 transcripts increase their accumulation as response to external hormonal stimulus of auxins, indicating that

auxins possibly exert a positive control in its half-life regulation and on the Rubisco activase chaperone activity.

JUSTIFICACIÓN

El uso indiscriminado de combustibles fósiles (petróleo, carbón y gas natural), como fuentes de energía para la actividad industrial humana, ha traído como consecuencia una alarmante acumulación de gases con efecto invernadero en la atmósfera terrestre.

El metano, los clorofluorocarbonos, los óxidos de nitrógeno y el principal contaminante bióxido de carbono, forman parte del grupo de gases con efecto invernadero; el cual transmite la luz solar visible hacia el interior de la atmósfera y al mismo tiempo absorbe algo de la radiación infrarroja que se emite atrapando así el calor.

De forma análoga, los gases con efecto invernadero y el vapor de agua pueden retener mucha de la radiación saliente de la tierra y por lo tanto el exceso de estos gases en la atmósfera puede afectar el balance térmico global terrestre, lo cual presume catastróficas consecuencias con tan sólo una elevación de 3° a 5° C en la temperatura global, pues sería suficiente para provocar que se derritieran glaciares y grandes capas de hielo. Esto a su vez elevaría el nivel del mar con la consiguiente inundación de áreas costeras.

Es claro que el efecto invernadero o calentamiento global, es uno de los aspectos ambientales más urgentes que debe encarar la humanidad.

Además de tratar de revertir y evitar estos efectos mediante la sustitución de fuentes de energía, la restitución de áreas verdes y el desarrollo de nuevas tecnologías menos agresivas con el ambiente, también se pueden adoptar otras estrategias tal como la manipulación genética dirigida de las plantas, para maximizar el proceso de fijación de CO₂ que estas llevan a cabo de forma natural obteniendo como beneficio adicional, la acumulación de mayor biomasa en las plantas.

En el presente trabajo de investigación se pretende aportar más conocimiento acerca de la regulación de la expresión de una proteína clave para incrementar la tasa fotosintética de las plantas: Rubisco activasa.

Se conoce que la Rubisco activasa induce un cambio conformacional beneficioso para la enzima Rubisco, que resulta en el incremento de la fijación fotosintética del CO₂. La Rubisco activasa es codificada por dos transcritos (Zmrca 1 y Zmrca 2) que tienen idéntica región codificante pero que difieren en el número de elementos similares a DST encontrados en su secuencia 3'UTR. Los elementos DST son secuencias nucleotídicas que marcan a los mRNAs que los contienen como moléculas susceptibles a la degradación. Es por ello que el principal objetivo de este trabajo es identificar si los transcritos Zmrca cumplen con las características que tienen en común los RNAs mensajeros plenamente identificados como portadores de elementos DST y además buscar una alternativa que revierta o disminuya los efectos de inestabilidad provocados por los elementos DST.

INTRODUCCIÓN

Como es bien sabido, las plantas verdes realizan fotosíntesis, con lo cual participan de forma importante en el reciclamiento del CO₂. Estas lo utilizan junto con el agua para reducirlo y formar los metabolitos útiles para su crecimiento y desarrollo, al mismo tiempo que liberan oxígeno a la atmósfera.

Sin embargo la asimilación de CO₂ por las plantas no es infinita, su principal limitante tiene que ver con la actividad enzimática de la proteína Rubisco, la cual cataliza el paso de fijación de CO₂ durante el proceso de la fotosíntesis (Somerville *et al.* 1982).

Aunque se sabe que Rubisco es la proteína más abundante en las plantas, no toda ella tiene la capacidad para catalizar la incorporación del CO₂ (Somerville *et al.* 1982), pues ello depende de la conformación espacial que la Rubisco adopte (Portis *et al.* 1986).

Rubisco activasa es una proteína que funciona como chaperona molecular de la enzima Rubisco provocando que esta última restaure y mejore su actividad enzimática al provocarle un cambio conformacional compatible con su actividad catalítica (Portis *et al.* 1986). Sin embargo, la cantidad de la Rubisco activasa es limitada en la célula, pues su concentración es mucho menor que la de la Rubisco.

Aunque se desconocen muchos aspectos relacionados con su expresión, estudios anteriores realizados en este laboratorio demostraron que la selección para incrementar la Rubisco activasa en poblaciones de maíz favorece la fotosíntesis neta y se refleja en un incremento de la biomasa producida por esas plantas (Morales *et al.* 1999).

Por otro lado, existen estudios que han demostrado que la actividad de Rubisco activasa también varía de acuerdo a las condiciones ambientales y de desarrollo de la planta o bien de la capacidad de auto-asociación entre sus subunidades y al menos para el caso del maíz se conoce que la intervención de una enzima proteolítica no identificada, influye de forma positiva sobre la actividad de chaperona de la Rubisco activasa (Vargas *et al.* 2004).

Se ha demostrado que la Rubisco activasa es una proteína medianamente estable en cuanto a su vida media, mientras que los aspectos relacionados a la velocidad de la síntesis, traducción y degradación de sus mRNAs se desconocen aún.

Investigaciones anteriores de este laboratorio demostraron que la Rubisco activasa de maíz es codificada por los transcritos *Zmrca 1* y *Zmrca 2*, cada uno expresado a partir de su gen correspondiente. Los dos transcritos *Zmrca* contienen en sus extremos 3' UTR motivos muy parecidos a elementos denominados DSTs descritos en los RNAs mensajeros inestables SAURs de soya y *Arabidopsis* (Ayala *et al.* 2004). Los elementos DST fueron identificados plenamente como causantes de inestabilidad en experimentos que consistieron en transformar células (NT-1) y plantas de tabaco con la construcción quimérica pMON505-70 que contenía genes reporteros codificantes para cloranfenicol acetil transferasa y β - glucouronidasa en cuyos extremos 3'UTR se insertaron una o dos copias de elementos DST, los resultados demostraron que la inserción de motivos DST en la secuencia de los genes reporteros aceleró la degradación de los transcritos (Newman *et al.* 1993).

Además de la presencia de motivos DST, los mensajeros SAURs comparten la característica de que su acumulación en las células se incrementa como respuesta al estímulo externo de auxinas (Mc Clure *et al.* 1989)

El hallazgo de elementos similares a los motivos DST en los transcritos *Zmrca 1* y *Zmrca 2* sugirió fuertemente la posibilidad de que tal como sucede en los RNAs mensajeros SAURs los transcritos que codifican para la Rubisco activasa de maíz estén marcados para ser inestables, lo cual podría contribuir de forma importante al contenido celular de la proteína.

En este contexto, el presente trabajo de investigación aborda el estudio de la expresión de los mRNAs que codifican a la proteína Rubisco activasa de maíz para conocer si los motivos DST marcan a sus transcritos como inestables y también si este efecto se puede revertir mediante estímulos hormonales como la aplicación externa de auxinas.

ANTECEDENTES

1. EL PROCESO DE FOTOSÍNTESIS EN LAS PLANTAS

Las plantas pueden prosperar en la naturaleza gracias a su capacidad de fijar el carbono, nitrógeno y azufre en sus estados más oxidados (CO_2 , NO_3^- y SO_4^{2-}) y reducirlos a grupos químicos compatibles con la vida [CH_2O]. Los cloroplastos que se encuentran en las células vegetales poseen maquinaria indispensable para capturar la energía lumínica y convertirla en energía química mediante la articulación de diversos procesos. El ciclo reductor de las pentosas fosfato o ciclo de las pentosas fosfato, que se muestra en la figura 1, constituye la interfase entre las membranas tilacoidales del cloroplasto y el citosol de los compartimientos celulares de la planta.

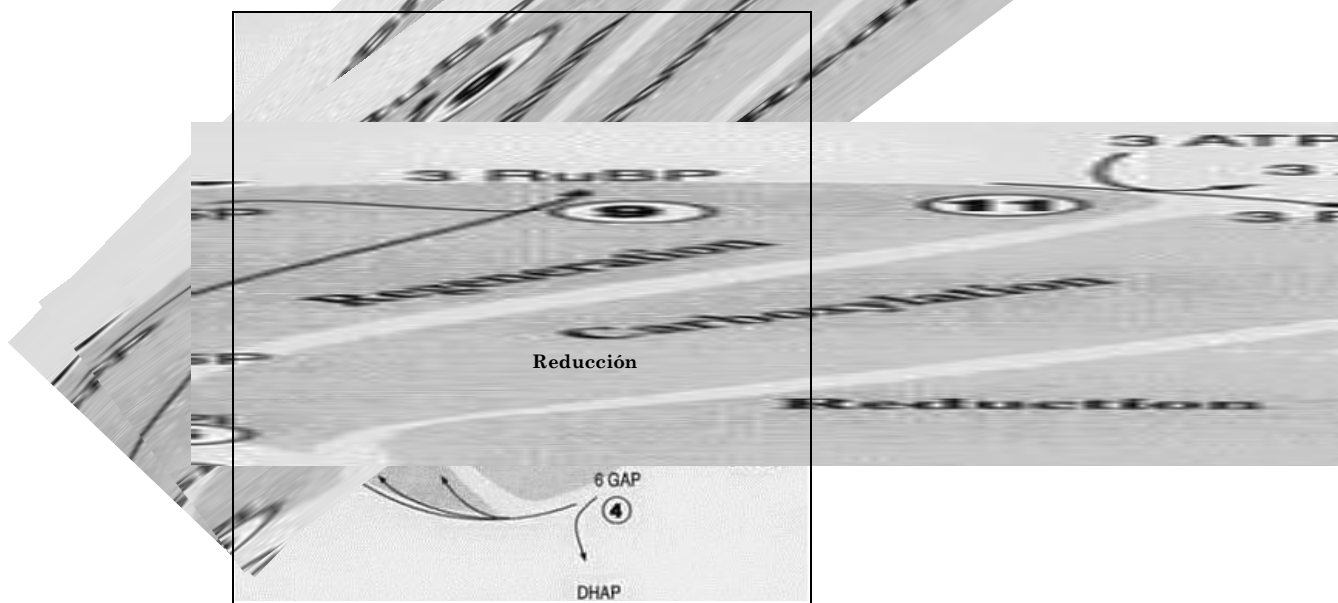


Figura 1. Esquema del funcionamiento del ciclo de Calvin. El ATP y NADPH formados en el estroma de los cloroplastos se utilizan en la reducción del CO_2 , para formar triosas fosfato: DHAP y GAP. Estas triosas son las que inician la síntesis de sacarosa, almidón y además recuperan al aceptor de CO_2 , la RuBP.

El ciclo de reducción de las pentosas fosfato comienza con una fase de carboxilación en la cual el CO_2 se combina con una molécula de ribulosa 1, 5-bifosfato (*RuBP*),

mediante la actividad catalítica de la enzima bifuncional Rubisco (*ribulosa 1, 5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa*). Las 2 moléculas de 3-fosfoglicerato que se producen son sucesivamente fosforiladas por ATP y reducidas por NADPH en la fase reductiva.

En la fase regenerativa una serie de nueve reacciones enzimáticas genera ribulosa 5-fosfato que se fosforila subsecuentemente, restaurando la molécula de ribulosa 1-5-bifosfato para iniciar nuevamente la asimilación de otra molécula de CO₂ (Wolosiuk *et al.*, 1993).

La etapa de carboxilación del ciclo Calvin-Benson resulta vital para las plantas porque es la reacción que les permite asimilar el CO₂ atmosférico que utilizarán como fuente de energía para su desarrollo. En consecuencia, el correcto funcionamiento de esta etapa es importante también para otros organismos que dependen del crecimiento de las plantas para sobrevivir (Spreitzer y Salvucci, 2002). Rubisco, una proteína localizada en el estroma de los cloroplastos compuesta por ocho subunidades grandes; que varían en tamaño de acuerdo a la especie (52 – 60 kDa) y ocho subunidades pequeñas (12 – 18 kDa) es la responsable de catalizar la reacción de fijación del CO₂ en la fotosíntesis:



La enzima responsable de esta catálisis es referida como ribulosa bifosfato carboxilasa. En 1971 se descubrió que esta proteína cataliza una reacción adicional en la que está involucrado el O₂ molecular:



Esta actividad se denominó oxigenasa y constituye la primera reacción del proceso de fotorrespiración (Ellis, 1979). Rubisco tiene una velocidad de catálisis lenta (2 μmol/min-mg), presenta baja afinidad por el CO₂ atmosférico y además usa O₂ como sustrato alternativo para el proceso competitivo de fotorrespiración.

Estas características de la enzima hacen que bajo condiciones fisiológicas la función carboxilasa de Rubisco opere a un nivel muy por debajo de su potencial de actividad catalítica (Salvucci y Ogren 1996).

Para compensar esto, las plantas utilizan alrededor del 50% del nitrógeno de sus hojas en la síntesis de la Rubisco, haciendo de esta proteína la más abundante en el mundo (Ellis, 1979).

Otra alternativa la constituyen las adaptaciones que se observaron en las plantas con metabolismo C_4 como el maíz, en donde la anatomía de las hojas permite compartimentalizar la asimilación de CO_2 en dos fases tratando de maximizar la actividad de la Rubisco dependiente de CO_2 (Furbank y Taylor, 1995).

Tal como se describe en la figura 2 la primera etapa de este proceso ocurre en las células mesofílicas, donde la enzima fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC) cataliza la fijación de CO_2 atmosférico en una molécula de cuatro carbonos: oxalacetato (de ahí el nombre *Vía metabólica C_4*), la cual es reducida a malato o aspartato que difunden hacia las células en vaina del haz vascular, donde se lleva a cabo la segunda fase de fijación de CO_2 que comprende la descarboxilación de los ácidos C_4 y la reincorporación del CO_2 por la enzima Rubisco hacia el ciclo de Calvin-Benson.

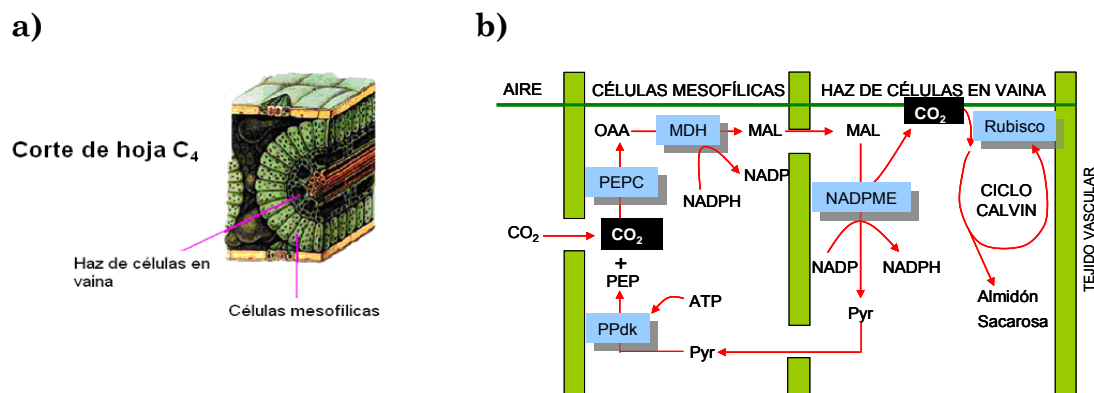


Figura 2. Estructura y esquema simplificado de la vía fotosintética en plantas C_4 . a) Las plantas C_4 tienen en sus hojas una capa de células mesofílicas que envuelven por completo al haz de células en vaina, este contiene los cloroplastos en donde ocurre la fijación de CO_2 catalizada por Rubisco. b) El CO_2 fijado por la enzima fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC) en forma de oxalacetato (OAA) es reducido por NADPH para formar malato (MAL), el cual es transportado al haz de células en vaina. El malato es descarboxilado en las células de la vaina donde el CO_2 liberado es fijado por la enzima Rubisco para incorporarse al ciclo de reducción fotosintética del carbono (Ciclo de Calvin). El compuesto de tres carbonos Piruvato (Pyr) regresa a las células mesofílicas, donde es fosforilado para regenerar el aceptor de CO_2 .

Gracias a este mecanismo concentrador de CO_2 , el resultado neto de este proceso es la disminución en la actividad oxigenasa de la Rubisco mientras que la actividad de carboxilasa se incrementa permitiendo con ello que la reducción fotosintética del

carbono opere de forma más eficiente que en las plantas con metabolismo C_3 en donde la enzima tiene accesible de igual manera tanto al CO_2 como al O_2 (Furbank y Taylor, 1995).

Desde hace ya varios años, diversos estudios científicos se han enfocado al estudio de la actividad enzimática de la Rubisco como blanco de modificaciones de su sitio activo para mejorar la tasa fotosintética de las plantas, sin embargo estos esfuerzos no han sido exitosos (Gifford y Evans, 1983). Trabajos más recientes (Morales *et al.* 1999, Spreitzer y Salvucci, 2002, Portis 2003), han dirigido sus esfuerzos hacia el estudio de la **Rubisco activasa** (ribulosa 1, 5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa activasa), por las posibilidades reales que esta representa para lograr mayor eficiencia en la fotosíntesis de las plantas. Esta proteína “activadora” fue descrita por primera vez por Somerville y colaboradores en un estudio donde aislaron una mutante de *Arabidopsis* en la que Rubisco aparentemente no era funcional, por lo cual la planta requería altas concentraciones de CO_2 para sobrevivir (Somerville *et al.*, 1982). Cuando midieron la actividad carboxilasa de Rubisco no encontraron diferencias significativas entre la proteína aislada a partir de plantas mutantes o de plantas silvestres; la causa del alto requerimiento de CO_2 se adjudicó a la falta de una proteína que posteriormente fue purificada y nombrada como Rubisco activasa por su capacidad para promover la activación de la Rubisco (Portis, 2003, Portis *et al.*, 2007).

Habiendo demostrado que el mantenimiento de la actividad catalítica de Rubisco requiere que la Rubisco activasa funcione como chaperona molecular (Sánchez *et al.* 1995, Portis, 2003), surgió la propuesta de que la Rubisco activasa tal vez constituya la alternativa principal para mejorar la actividad fotosintética de las plantas (Spreitzer y Salvucci, 2002).

2. RUBISCO ACTIVASA, CLAVE DEL PROCESO FOTOSINTÉTICO

Está bien establecido que el proceso de activación de Rubisco requiere de CO_2 y Mg^{2+} . Primero se carbamila el grupo amino ϵ de la lisina 201 en la subunidad grande

de la Rubisco y subsecuentemente el Mg^{2+} interactúa con el carbamato formado para estabilizar la forma activa de la proteína (Lorimer y Misiorko, 1980).

Aunque este proceso de activación ocurre espontáneamente *in vitro* parece no ser funcional *in vivo*, porque el azúcar RuBP (ribulosa 1, 5-bifosfato) se une fuertemente a la forma nativa de la Rubisco impidiendo con ello la carbamilación espontánea de la enzima (Portis *et al.*, 2007).

Además, ciertos azúcares fosfato como carboxiarabinitol 1 – fosfato, 3- cetoarabinitol bifosfato y xilulosa bifosfato también se unen fuertemente a Rubisco una vez que su sitio activo ha sido carbamilado. Estos compuestos se consideran inhibidores competitivos, pues impiden la catálisis de Rubisco al prevenir su unión con RuBP (revisado en Salvucci y Ogren, 1996).

En ausencia de la actividad de chaperona, la conversión de la Rubisco no funcional hacia una forma funcional es extremadamente lenta. Para facilitar este proceso las plantas contienen a la Rubisco activasa, una proteína soluble que es dependiente de ATP, la cual libera los azúcares fuertemente unidos al sitio activo de la Rubisco (Portis *et al.*, 2007).

La función de chaperona de la Rubisco activasa supone un mecanismo en el que están involucradas dos estructuras de la Rubisco: una *cerrada* que comprende la asociación Rubisco-azúcares fosfato y que constituye el sustrato de la Rubisco activasa y una estructura *abierta* o producto de la Rubisco activasa donde la transición de Rubisco de la forma cerrada a la abierta requiere el movimiento concertado de varias subunidades de la Rubisco activasa en un mecanismo dependiente de la hidrólisis de ATP (Portis, 2003).

La interacción de Rubisco activasa con Rubisco implica cambios en la conformación de la Rubisco, de manera que promueve la apertura de su configuración cerrada (ver figura 3).

Una vez que Rubisco activasa abre el sitio cerrado, el azúcar fosfato puede disociarse y liberar el sitio para la activación espontánea vía carbamilación y unión de Mg^{2+} (Portis *et al.*, 2007).

Los estudios realizados en plantas carentes de la Rubisco activasa, eliminada por mutación o por inhibición de su expresión mediante RNAs antisentido, han demostrado que con niveles normales de CO₂, la fotosíntesis es gravemente afectada porque Rubisco permanece secuestrada en una forma inactiva (Portis, 2003).

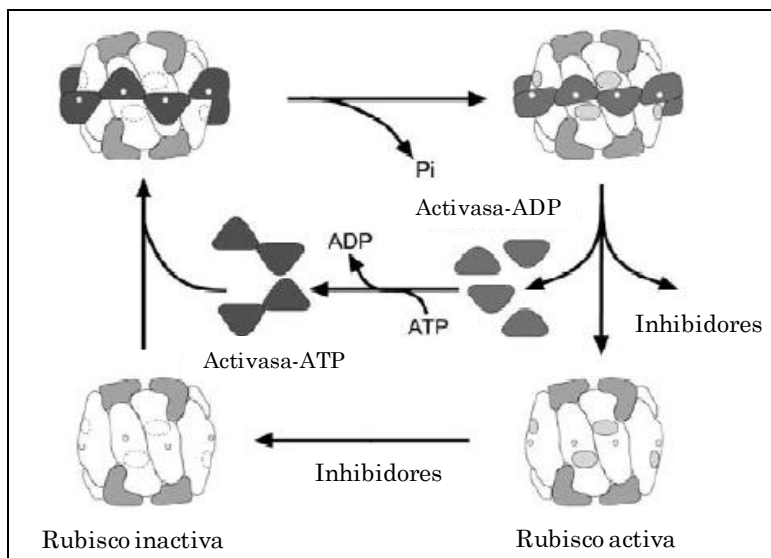


Figura 3. Modelo simplificado del modo de acción de Rubisco activasa. El ATP induce pequeños cambios en la conformación de Rubisco activasa que conducen a su oligomerización para envolver a la holoenzima en una estructura de anillo, provocando cambios conformacionales que ocasionan la disociación del complejo Rubisco-inhibidores, dando como resultado la liberación de la Rubisco funcional (Portis, 2003).

De este modo, la Rubisco activasa es requerida en todos los organismos fotosintéticos que contienen Rubisco cuyos sitios activos están propensos a formar una configuración fuertemente cerrada con azúcares fosfato en su estado no carbamilado (Portis, 2003).

Las chaperonas moleculares son una familia de proteínas de diferentes clases que median el ensamblaje correcto durante la síntesis, transporte y funcionamiento normal de algunos polipéptidos así como en respuesta a estrés ambiental (Ellis y van der Vies, 1991).

Rubisco activasa se agrupa dentro de esta gran familia. Su actividad de chaperona se comprobó en experimentos en los que se observó que la incubación de la Rubisco

activasa con Rubisco impulsa la recuperación de la actividad enzimática de la Rubisco, después de someterse a estrés por calor (Sánchez de Jiménez, *et al.* 1995).

La activación de Rubisco por Rubisco activasa depende de la relación ATP / ADP, porque la hidrólisis de ATP proporciona la energía química necesaria para efectuar el auto-ensamblaje dinámico monómero-oligómero de Rubisco activasa durante su función de chaperona (Lilley y Portis, 1997).

El tamaño de los oligómeros formados por la auto-asociación de Rubisco activasa se desconoce todavía, pero se ha observado en experimentos *in vitro* en los que se usan generalmente de 0 a 100 μg de Rubisco activasa, que su actividad incrementa con la concentración. En presencia de polietilenglicol, un agente desecante conocido por promover la auto-asociación de proteínas, la actividad de la Rubisco activasa se incrementa aún más, lo cual indica que la Rubisco activasa exhibe mayor capacidad de chaperona en un estado asociado (Salvucci 1992). La oligomerización de la Rubisco activasa ha sido también monitoreada a través de su fluorescencia intrínseca.

La actividad de ATPasa de la Rubisco activasa puede estar presente en pequeños oligómeros, sin embargo la activación de la Rubisco parece ocurrir sólo cuando se forman grandes agregados moleculares (revisado en Portis, 2003).

Aunque la estructura tridimensional de Rubisco activasa no se conoce todavía, en 1988 se reportó la existencia de un fragmento consenso de unión a nucleótidos (elementos AAA⁺) en la secuencia de Rubisco activasa de espinaca y en consecuencia se caracterizó también como integrante de la familia AAA⁺ por sus siglas en inglés “ATPases associated with various cellular activities”. Estas proteínas se distinguen principalmente por contener en su secuencia una o más copias de los motivos AAA⁺ y porque en general operan promoviendo cambios conformacionales en sus proteínas blanco que en muchos casos conducen a la disociación de agregados moleculares (Hanson y Whiteheart, 2005).

La enzima Rubisco exhibe su máxima actividad catalítica como fijadora de CO₂ cuando sus sitios activos están en la conformación apropiada y por lo tanto están disponibles para la catálisis. Sin embargo, la velocidad de desactivación de los sitios

de Rubisco se incrementa con la temperatura comenzando a ser irreversible generalmente a temperaturas superiores a los 40°C, aunque el umbral de termoequilidad puede ser mayor dependiendo de la aclimatación y la especie de la planta (DeRidder y Salvucci, 2007).

Debido a que las plantas C₄ disponen de una mayor concentración de CO₂ en sus hojas, la actividad oxigenasa de Rubisco se ve disminuida dando como resultado que las plantas C₄ mantengan una temperatura óptima para la fotosíntesis superior a la temperatura que exhiben las plantas C₃ (Spreitzer y Salvucci, 2002).

En las plantas C₃ las temperaturas moderadamente elevadas (> 32° C) ocasionan un incremento en la relación oxigenasa / carboxilasa de Rubisco, que favorece la actividad oxigenasa y resulta en la inhibición neta de la fotosíntesis.

Aunque el sistema fotosintético de las plantas C₄ es más complejo que el sistema de las plantas C₃, la última limitación para la fijación de CO₂ en ambos tipos de plantas es la actividad de la Rubisco (Jordan y Ogren 1981).

Este fenómeno puede deberse a la actividad chaperona de la Rubisco activasa, la cual es responsable de mantener a la Rubisco en un estado completamente activo tanto en condiciones de estrés por calor como en condiciones normales. Se piensa que durante el estrés por calor la velocidad de inactivación de Rubisco ocurre más rápido que la habilidad de Rubisco activasa para mediar la reactivación, ocasionando una pérdida en la capacidad fotosintética de las plantas (Law y Crafts, 2001).

3. EXPRESIÓN DE RUBISCO ACTIVASA

La proteína Rubisco activasa ha sido detectada inmunológicamente en todas las plantas superiores que han sido examinadas, también se ha reportado su expresión en dos especies de algas verdes y en la cianobacteria *Synechococcus* sp (Salvucci y Ogren, 1996).

A diferencia de las bacterias fotosintéticas, las algas y las plantas superiores poseen una enzima Rubisco que une con mayor especificidad a sus sustratos. Esto hace suponer que Rubisco activasa evolucionó para contrarrestar los efectos negativos de la unión más fuerte entre la Rubisco y los azúcares fosfato. Además, la expresión de la Rubisco activasa es selectiva para cada especie. Por ejemplo, la Rubisco activasa de especies solanáceas como tabaco o tomate activan en menor grado a la Rubisco de las especies no solanáceas como espinaca, *Arabidopsis*, chícharo y cebada (Salvucci y Ogren, 1996).

La Rubisco activasa es sintetizada en los ribosomas citosólicos e importada hacia el cloroplasto y puede presentarse dependiendo de la especie como una o dos isoformas con masas moleculares estimadas entre 41 a 43 kDa y 45 a 46 kDa (Portis *et al.*, 2007).

En espinaca (Werneke *et al.* 1989), *Arabidopsis* (Werneke *et al.*, 1989), cebada (Rundle y Zielinski, 1991) y arroz (To *et al.* 1999, Zhang y Komatsu, 2000), la Rubisco activasa comprende dos isoformas que son codificadas a partir de un gen nuclear que experimenta empalme alternativo.

La relación que las isoformas presentan depende de estímulos ambientales. Por ejemplo en el caso del maíz se ha observado que durante el verano es decir en ambiente caluroso, aumenta la expresión de la subunidad menor de la Rubisco activasa (Vargas *et al.*, 2004).

Detecciones inmunológicas de los polipéptidos de la Rubisco activasa en diferentes especies de plantas (Salvucci *et al.*, 1987) y recientes búsquedas de secuencias de cDNA disponibles en las bases de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) revelaron que la mayoría de las especies contienen las dos isoformas de la Rubisco activasa, las cuales probablemente surgen a partir de procesos de empalme alternativo (Portis, 2003).

Sin embargo hay excepciones, por ejemplo en cebada existe otro gen que codifica únicamente para la isoforma de 41 kDa (Rundle y Zielinski 1991). Otro ejemplo lo constituye la planta de algodón que contiene un gen para codificar cada isoforma (Salvucci *et al.*, 2003)

Tabla 1. Número de genes que codifican Rubisco activasa (RA) en diferentes especies

Especie	Número de genes que codifican RA	Referencia
Espinaca	1	Werneke <i>et al.</i> 1989
<i>Arabidopsis</i>	1	Werneke <i>et al.</i> 1989
Trigo	1	Law and Crafts-Brandner, 2001
Cebada	2	Rundle y Zielinski, 1991
Algodón	2	Salvucci <i>et al.</i> 2003
Maíz	2	Ayala-Ochoa <i>et al.</i> 2004
Tabaco	<i>Familia multigénica</i>	Quian y Rodermel, 1993
Arroz	1	To <i>et al.</i> 1999
	2	Zhang y Komatsu, 2000

Resultados publicados por este laboratorio demostraron que en la planta de maíz se observa la particularidad de que dos genes: *Zmrca1* y *Zmrca2* expresan la Rubisco activasa. Cada uno de ellos origina su correspondiente transcrito: *Zmrca1* (1.4 kb) y *Zmrca2* (1.8 kb). Estos tienen idéntica secuencia de nucleótidos en la región codificadora y originan con ello el mismo polipéptido de aproximadamente 381 aminoácidos y masa molecular alrededor de 43 kDa.

Los dos transcritos se distinguen entre sí porque tienen en su región 3' UTR, diferente número de motivos similares a los llamados elementos DST, los cuales han sido clasificados como subdominios I, II ó III.

Ambos mRNAs poseen una copia de los subdominios I y II, pero sólo *Zmrca2* cuenta adicionalmente con dos subdominios III *ver figura 4*, (Ayala *et al.*, 2004).

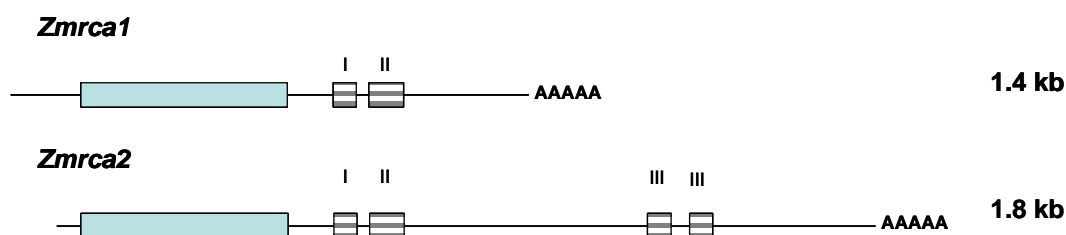


Figura 4. Representación esquemática de los transcritos que codifican a la Rubisco activasa de maíz. Los rectángulos rayados muestran la distribución de los elementos DST (subdominios I, II y III) y los rectángulos azules indican la misma región codificadora en cada gen.

Actualmente se desconoce si los genes *Zmrca 1* y *Zmrca 2* son diferentes a nivel de sus regiones 5'UTR, pues aún no se ha secuenciado por completo dicha región en el gen *Zmrca 2*.

Pero además de las diferencias encontradas en la región 3'UTR de los genes *Zmrca* se demostró que los transcritos codificantes para Rubisco activasa de maíz, muestran un patrón de expresión diferente durante el ciclo día/noche. Siendo *Zmrca 2* el transcrito que observa cambios más pronunciados durante dicho ciclo (Ayala *et al.*, 2004).

Aunque las acumulaciones de los transcritos *Zmrca1* y *Zmrca 2* responden a un ciclo circadiano, análisis por western-blot durante el mismo ciclo circadiano revelaron que la expresión de la proteína no se ve afectada por el mismo. La expresión de una o las dos isoformas responde más bien a las necesidades de adaptación a cambios ambientales o bien a la diferenciación durante el desarrollo de la planta. La aparición de la isoforma más pequeña (41 kDa) en maíz, se explica en términos de un mecanismo de regulación post-traducciona en el que se ha implicado a una proteasa que corta al polipéptido de 43 kDa en su región amino terminal; dicho mecanismo resulta novedoso porque no coincide con los mecanismos que explican la existencia de diferentes isoformas de la Rubisco activasa en otras especies (Vargas *et al.* 2004).

4. LOS ELEMENTOS DST Y SU RELACIÓN CON LAS AUXINAS

Las auxinas son un grupo de reguladores del crecimiento en las plantas, capaces de inducir una variedad de respuestas de crecimiento y desarrollo como son la división, la extensión y la diferenciación celular. Desde hace ya varias décadas se tiene conocimiento de que algunos de estos efectos hormonales ocurren muy rápido: en

menos de 1h (Evans, 1974) y por ello los aspectos de la señalización mediada por auxinas permaneció por mucho tiempo como una interrogante.

Los compuestos ácido 3-indol acético (IAA), ácido 4-cloroindol- 3-acético, ácido 3-indol butírico y ácido fenil-acético, han sido identificados como auxinas que normalmente se encuentran en las plantas. Posteriormente se demostró que los compuestos sintéticos como el ácido 1-naftil acético (NAA), ácido 2, 4, 5-tricloro-fenoxi-acético, ácido 2, 4, 6-tricloro-fenoxi-acético y el ácido 2, 4-diclorofenoxiacético promueven efectos similares a las auxinas, cuando éstos son aplicados a las plantas (McClure y Guilfoyle 1987).

Estudios más recientes de los procesos mediados por auxinas han revelado que existe un factor protéico que se une a auxinas (ABP1, *auxin binding protein*), con algunas características consistentes con la función de un receptor. Sin embargo, su papel en la señalización hormonal no ha sido totalmente determinado (Napier, *et al.*, 2002).

Por otra parte, del 2005 a la fecha se ha avanzado vertiginosamente sobre el conocimiento de algunos aspectos de la regulación transcripcional mediada por auxinas (Steffen, 2007).

Estudios moleculares realizados por dos grupos de investigación (Dharmasiri *et al.* 2005, Kepinski y Leyser 2005) en plantas de *Arabidopsis*, han revelado una vía de señalización intracelular que implica a dos familias de factores de la transcripción: los factores de respuesta a auxinas ARF (*auxin response factor*) y las proteínas Aux IAA.

Mediante ensayos de pull down se demostró que las auxinas regulan la transcripción de diversos genes al estimular la degradación de las proteínas Aux IAA, las cuales a mínimas concentraciones de auxinas se encuentran unidas a los ARF.

Cuando la concentración de auxinas aumenta los ARF son liberados de su unión con las proteínas Aux IAA, lo cual les permite activar o reprimir la transcripción de los genes regulados por auxinas.

El mecanismo mediante el cual las auxinas promueven la degradación de las proteínas Aux IAA se inicia con el incremento en la concentración de auxinas y la

subsecuente unión de estas a las proteínas Aux IAA, la unión de las auxinas con la ligasa de ubiquitina TIR1 promueve el reclutamiento de los represores Aux IAA para ser degradados rápidamente por el proteosoma (ver figura 5).

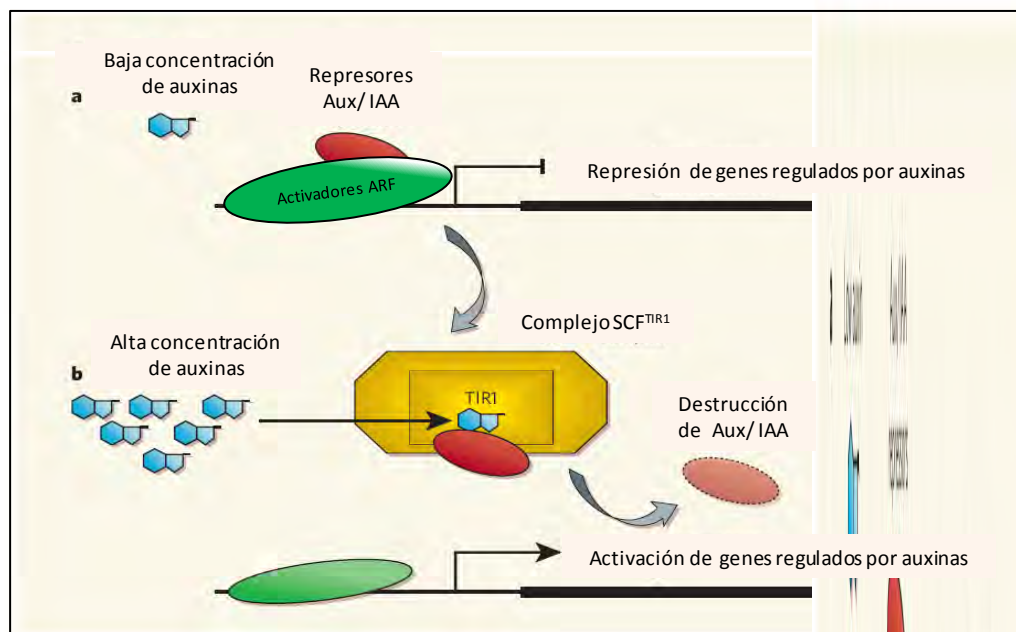


Figura 5. Vía de señalización de auxinas. Los activadores ARF se unen a elementos de respuesta a auxinas en los promotores de los genes responsivos a auxinas. Cuando la concentración de auxinas es baja, los represores Aux IAA están asociados con los activadores ARF y reprimen la expresión de los genes (a). Cuando la concentración de auxinas incrementa, las auxinas se unen al receptor TIR1 del complejo SCF^{TIR1} promoviendo el reclutamiento de los represores Aux IAA a TIR1 (b). Una vez reclutados al complejo SCF^{TIR1} , los represores son dirigidos hacia su degradación, con la subsiguiente activación de los genes responsivos a auxinas (Guilfoyle, 2007).

La degradación dependiente de auxinas de las proteínas AuxIAA supone un novedoso modelo molecular en el que las auxinas actúan como un “pegamento molecular” entre la ligasa de ubiquitina TIR1 acoplada al complejo SCF^{TIR1} y las proteínas Aux IAA (Dharmasiri *et al.* 2005, Kepinski y Leyser 2005, Guilfoyle, 2007).

Recientes estudios cristalográficos se han enfocado a la elucidación del mecanismo que facilita la percepción de auxinas y la unión de respuesta a auxinas de las proteínas Aux IAA al receptor de auxinas (Tan *et al.*, 2007).

Por otra parte, los elementos DST fueron descritos por primera vez como las secuencias nucleotídicas comunes encontradas (*down stream*) después del codón de paro de la traducción en pequeños (~ 0.5 kb) mRNAs inestables que estimulan su acumulación por la señal hormonal de auxinas. Constan de tres regiones altamente conservadas, subdominios I, II y III, separadas entre sí por dos regiones variables. Los mRNAs que mostraron dichos elementos DST fueron denominados SAURs por sus siglas en inglés *small auxin-up RNAs* (Mc Clure *et al.*, 1989). La vida media estimada para los SAURs fue aproximadamente de 10 min cuando se midió poco después de detener la elongación de semillas de soya, pero aumentó significativamente aproximadamente a 43 min cuando el mismo sistema se trató con un inhibidor de la transcripción en presencia de auxinas (Franco *et al.*, 1990).

El análisis de la secuencia de los genes SAURs sugirió a los motivos DST como responsables de la inestabilidad de los SAURs por ser el elemento común entre todos ellos y se planteó la hipótesis de que las auxinas actúan como reguladoras de esta actividad (McClure *et al.*, 1989). En 1993, Newman y colaboradores analizaron la posibilidad de que los elementos DST pudieran desestabilizar a los transcritos y demostraron en un modelo de transcritos modificados de tabaco que la multimerización e inserción de elementos DST confieren inestabilidad a los mensajes que los contienen ocasionando disminución notable de su vida media (Newman *et al.*, 1993). Posteriormente se demostró también con células transformadas de tabaco, que las regiones conservadas II (ATAGAT) y III (GTA) de los elementos DST son fundamentales para señalar a los mRNAs que los llevan, como transcritos de rápido decaimiento (Sullivan y Green, 1996). Adicionalmente, Pérez-Amador y colaboradores demostraron que en dos líneas mutantes de *Arabidopsis*, un grupo de transcritos que contenían elementos similares a DST en sus 3'UTR; incrementaban su abundancia. Dichas líneas mutantes (*dst1* y *dst2*), fueron originalmente aisladas por mostrar deficiencia en el procesamiento de los mRNAs codificados por transgenes que contenían tetrámeros de elementos DST en sus secuencias 3 UTR. (Pérez Amador *et al.*, 2001).

La inestabilidad como característica intrínseca de algunos mRNAs, ha sido estudiada ampliamente en mamíferos, en donde se ha demostrado la existencia de elementos AU como determinantes de inestabilidad, incluso se demostró con transcritos reporteros en plantas transgénicas que la inserción de elementos AU provocan un decremento en su estabilidad (Ohme *et al.*, 1993). Sin embargo a diferencia de las secuencias AU, los elementos DST son motivos determinantes de inestabilidad exclusivos de sistemas vegetales (Feldbrügge *et al.*, 2001).

Mientras que la función desestabilizadora de los motivos DST ha sido comprobada, la posibilidad de que las auxinas actúen como señales post-transcripcionales en la regulación de la vida media de algunos mRNAs que contienen secuencias DST no ha sido estudiada, por ello el análisis de esta posibilidad es interesante pues constituye un mecanismo de regulación de la expresión genética diferente a los mecanismos mediados por auxinas descritos anteriormente.

En la secuencia de los dos genes que codifican Rubisco activasa de maíz, se han encontrado motivos similares a los elementos DST, éstos se localizan a 31 pb después del codón de paro de la traducción, *ver figura 6* (Ayala *et al.*, 2004).

Planta	Gen	Distancia desde el codón de paro	Secuencia DST		
			I	II	III
Soya	15A	19	GGAG - 5 -	CATAGATTG - 7 -	CATTTTGTAT
Soya	X15	19	GGAG - 5 -	CATAGATTG - 7 -	CATTTTGGTAC
Soya	6B	19	GGAG - 4 -	CATAGATTG - 7 -	CATTTTGTAC
Soya	X10A	19	GGAT - 5 -	GATAGATTG - 8 -	AAATTTGTAC
Soya	10A5	19	GGAG - 5 -	GATAGATTG - 8 -	AAATTTGTAC
Mungbean	ARG7	14	GGTT - 2 -	CATAGATTG - 8 -	ATTTTGTAA
<i>Arabidopsis</i>	SAUR-AC1	83	GGAA - 9 -	CATAGATCG - 8 -	CAATGCGTAT
Maíz	Zmrca1	31	CGA - 7 -	ATAGGAT	
Maíz	Zmrca2	31	CGA - 7 -	ATAGGAT - 108 -	CATGTA - 14 - TACGTA
Consenso			promedio	promedio	
			GGA g - 5 -	cATAGATTa - 6 -	C/A A T/A TTt GTAc

Figura 6. Localización y estructura de los elementos DST. Secuencias DST identificadas en siete genes SAUR y en maíz. Los números indican la distancia en pares de bases. En el consenso los residuos subrayados señalan, aquellos que fueron invariables en los siete genes SAUR, los residuos mostrados en minúsculas se conservaron en cuatro de los siete genes SAUR. El gen Zmrca 2 de maíz muestra dos copias del subdominio III.

Los elementos DST descritos en la secuencia de los transcritos Zmrca sugieren fuertemente la posibilidad de que estos señalan a los transcritos como mensajes

inestables, mismos que eventualmente podrían estabilizarse en presencia de auxinas, lo cual plantearía la hipótesis de que la expresión de Rubisco activasa en maíz es regulada también por señales hormonales a nivel post-transcripcional.

Si bien los productos de los mensajes SAUR se han relacionado con el proceso de elongación celular como respuesta al estímulo por auxinas (Franco *et al.* 1990) la función precisa de dichos productos se desconoce todavía, de tal forma que la función de los elementos DST en los mensajes SAUR no se ha identificado plenamente. En este sentido y considerando que el decaimiento programado de los mRNAs parece estar íntimamente relacionado con el papel fisiológico de sus productos (Wang *et al.*, 2002), el estudio del papel que desempeñan los elementos DST en la regulación de la expresión de Rubisco activasa -una proteína cuya función en el proceso fotosintético es indudablemente esencial, que además está involucrada en otras actividades como la protección de la maquinaria de traducción durante estrés por calor (Rokka *et al.* 2001)-, contribuye a la elucidación de la función de los elementos DST y su posible papel en la regulación mediada por señales hormonales en maíz.

5. LOS ELEMENTOS DST Y SU RELACIÓN CON EL CICLO CIRCADIANO

El ritmo circadiano se define como un ciclo biológico con un periodo de aproximadamente 24 h que persiste bajo condiciones constantes. Este comportamiento no se ha entendido completamente todavía, sin embargo se sabe que las plantas y otros organismos tienen la capacidad de comandar ritmos biológicos que les proveen ventajas de adaptación porque pueden anticiparse a los posibles cambios de las condiciones ambientales durante el día (Green *et al.* 2002).

Las plantas llevan a cabo diversos procesos responsivos al ciclo circadiano, como son, el movimiento de hojas, la inducción de la floración y la apertura de estomas; A nivel molecular, se ha demostrado que existen genes que se regulan transcripcionalmente de forma circadiana, es decir que la eficiencia de su transcripción se modifica durante el ciclo circadiano (Gardner *et al.*, 2006). Sin embargo, recientemente se ha sugerido que pueden existir mecanismos de regulación post-transcripcional que

contribuyen o determinan la abundancia de mRNAs circadianos, quizá el ejemplo más estudiado hasta la fecha lo constituye el gen *per* de *Drosophila melanogaster*, el cual sigue un patrón de acumulación circadiano que persiste aún cuando se elimina del gen la región promotora, pero que se afecta seriamente cuando se altera la región 3'UTR (Chen *et al.* 1998). La importancia de los eventos post-transcripcionales en la regulación de la expresión circadiana del gen *per* se demostró cuando se evidenció que en condiciones ambientales de baja temperatura hay un proceso de empalme alternativo que origina otra forma del gen, lo cual provee ventajas de adaptación al organismo (Majercak *et al.*, 1999 citado en Preetmoninder *et al.*, 2005).

Otro mecanismo de regulación post-transcripcional que ha sido propuesto como responsable de las oscilaciones de los transcritos circadianos es el cambio en la estabilidad de los mRNAs. Esto se demostró parcialmente en un estudio donde se siguió por análisis de microarreglos la degradación de mRNA en plantas intactas de *Arabidopsis* tratadas con cordycepina como inhibidor de la transcripción. El experimento permitió identificar entre otros a un grupo de mRNAs inestables que no observaron una secuencia nucleotídica común, pero que sí compartían la característica de ser genes controlados por el ciclo circadiano (Gutiérrez *et al.*, 2002)

Un estudio más reciente en el que se determinó la vida media de diferentes mRNAs en diferentes horas de un ciclo circadiano, señaló que los motivos DST incrementan la inestabilidad de los transcritos durante el ciclo circadiano (Preetmoninder *et al.* 2005).

La literatura expuesta anteriormente sugiere fuertemente que los elementos DST presentes en los transcritos que codifican Rubisco activasa de maíz pueden acelerar su degradación y por otra parte también es probable que un estímulo externo de auxinas modifique este efecto mediante la estabilización de los transcritos *ZmrcA*. Como consecuencia estos dos mecanismos podrían influir para que la expresión de la Rubisco activasa se ajuste rápidamente en respuesta a diferentes condiciones ambientales y/o de crecimiento.

Para comprobar estas hipótesis, es importante resaltar que la planta de maíz constituye un excelente modelo para estudiar los motivos DST ya que en dos

transcritos que codifican la misma proteína se encuentran elementos DST bajo un reordenamiento y disposición diferente a los elementos DST descritos anteriormente en los RNAs SAURs.

HIPÓTESIS

Debido a que los elementos DST son la característica común encontrada en RNAs mensajeros inestables y regulables por auxinas. La hipótesis central de esta investigación es la siguiente:

Si los transcritos que codifican para la Rubisco activasa en maíz: Zmrca 1 y Zmrca 2 contienen motivos funcionalmente semejantes a los elementos DST entonces los transcritos Zmrca mostrarán las características de inestabilidad y de respuesta positiva a auxinas propias de los transcritos que tienen elementos DST.

OBJETIVO GENERAL

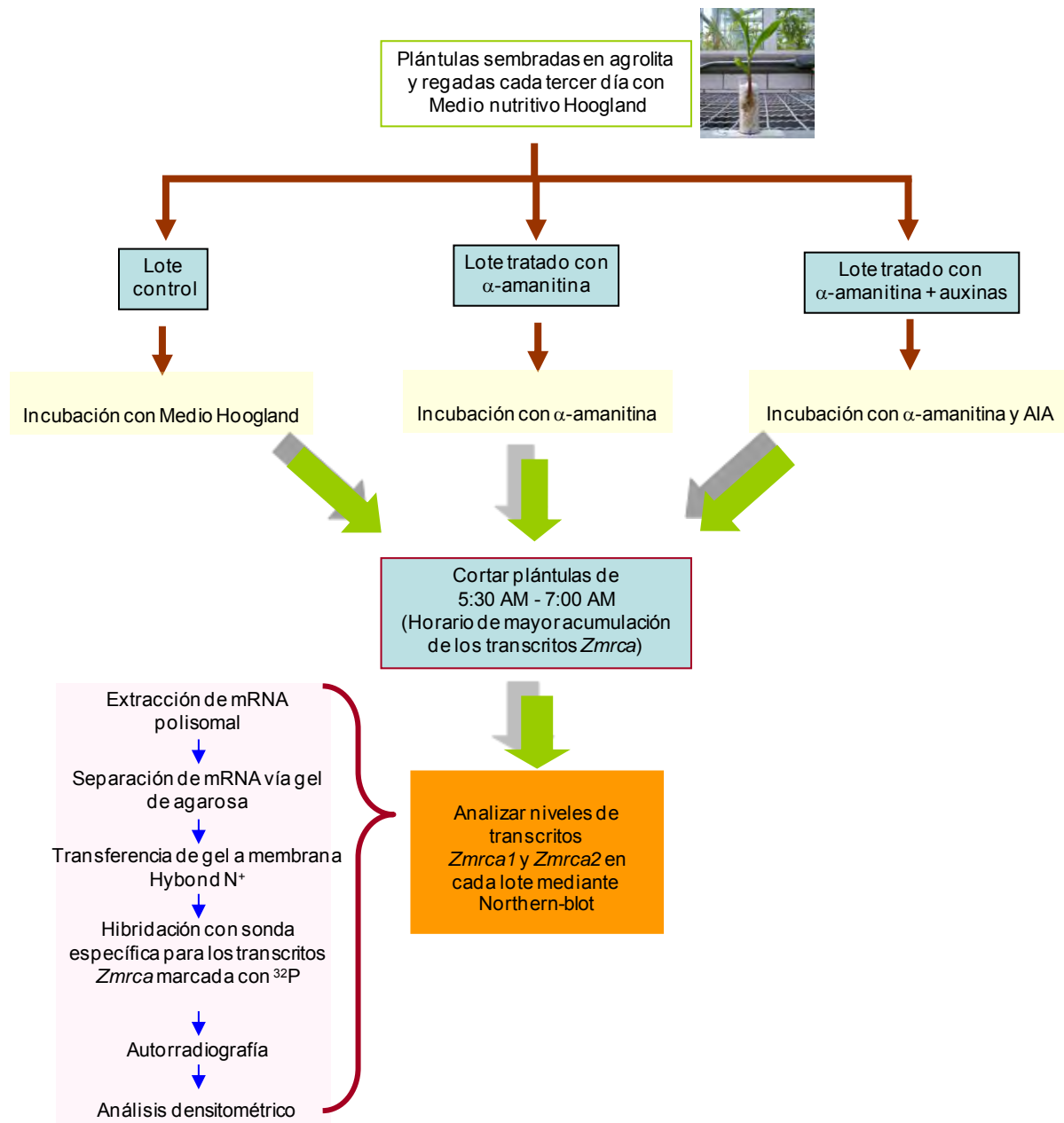
Analizar la función de los elementos DST en la regulación de la expresión de la Rubisco activasa de maíz y su posible relación con la señal hormonal de auxina.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Estimar la vida media de los transcritos Zmrca 1 y Zmrca 2
- 2.- Evaluar el efecto de la aplicación de un estímulo de auxinas en la abundancia de los transcritos Zmrca 1 y Zmrca 2.

ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN

Para alcanzar nuestro objetivo de investigación, se planteó la siguiente estrategia experimental:



MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

Los experimentos se realizaron con plántulas de maíz variedad Chalqueño, cultivadas en invernadero con un fotoperiodo natural de 12 h luz / 12 h oscuridad.

Las semillas se sembraron independientemente en tubos de vidrio conteniendo agrolita, el riego de cada plántula se efectuó cada tercer día con 2 a 5 ml de solución Hoagland.

2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Cuando las plántulas alcanzaron la etapa de crecimiento cinco (ver figura 8) estas fueron divididas en tres lotes, cada lote se trató de forma distinta:

- 1) lote control: se aplicaron 3 ml de medio Hoagland a cada plántula.
- 2) lote tratado con α -amanitina: para cada plántula se aplicaron 3 ml de solución Hoagland con α -amanitina a una concentración final de 10 $\mu\text{g/ml}$.
- 3) lote tratado con α -amanitina y auxinas: para cada plántula se aplicaron 3 ml de solución Hoagland con α -amanitina a una concentración final de 10 $\mu\text{g/ml}$ y ácido 3-indol acético a una concentración final de 20 μM .

Las plántulas se cortaron a diferentes tiempos después de iniciar cada tratamiento en un rango desde 30 hasta 120 minutos.

Inmediatamente después se congelaron con N_2 líquido y se almacenaron a $-70\text{ }^\circ\text{C}$ para su posterior análisis. Los tratamientos y el corte de las plántulas se realizaron durante el periodo de las 5:30 a las 7:00 AM porque en ese horario se observa la máxima acumulación de los transcritos *Zmrca* (Ayala *et al.*, 2004).

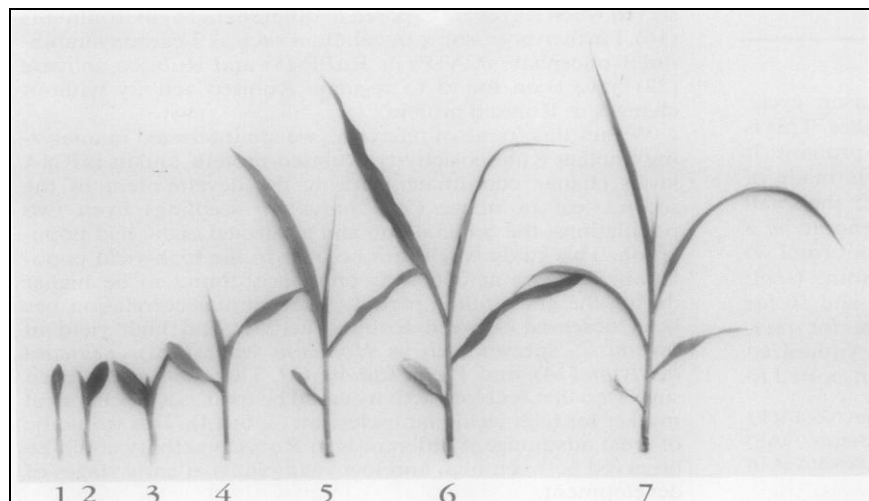


Figura 8. Etapas del desarrollo de la plántula de maíz. 1ª etapa: se observa la primera hoja, pero no tiene aún la lígula expuesta; la segunda hoja se encuentra enrollada. 2ª etapa: la primera hoja muestra la lígula, pero no se encuentra totalmente expuesta, la segunda hoja se encuentra enrollada en la base, pero abierta en la punta. 3ª etapa: la primera hoja presenta la lígula expuesta, mientras que en la segunda hoja, la lígula 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 hoja presentan la lígula 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 hoja presentan la lígula expuesta, la tercera hoja se encuentra casi totalmente expandida, pero la lígula no se encuentra expuesta, la cuarta hoja se encuentra expandida a la mitad. 6ª etapa: la primera, segunda y tercera hoja muestran signos de envejecimiento en la punta. 7ª etapa: de la primera a la cuarta hoja presentan la lígula 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 (Tomado de Loza *et al.*, 1990).

3. OBTENCIÓN DE OLIGOSONDA

A partir de 100 mg de hoja de plántula de maíz se extrajo RNA total utilizando el protocolo de extracción que acompaña al reactivo TRIZOL™ de GIBCO Life Sciences.

Se realizó RT-PCR, con cebadores específicos para la región conservada de los transcritos *Zmrca 1* y *Zmrca 2*

Forward: 5' TTC ATG GAC AAG CTC GTC GTC CAC 3'

Reverse: 5' GTA GAA CTT CTC CAT GCG GCC GTC 3'

La reacción se hizo mezclando 0.05 µg de RNA, 1 µl del cebador Forward (5µM), 1 µl del cebador Reverse (5µM), 12.5 µl de 2X Reaction Mix (Invitrogen), 0.25 µl de SuperScript™ One – Step RT-PCR with Platinum® Taq y H₂O- DEPC c.b.p. 25 µl bajo las siguientes condiciones:

Transcripción reversa en un solo paso, desnaturalización a 94 °C por 5 minutos, 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 67 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto y extensión final a 72 °C por 10 minutos.

El producto de RT-PCR se visualizó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio en el que se incluyó un marcador de tamaño molecular. La banda correspondiente al tamaño del producto esperado (\approx 500 pb) se cortó y purificó usando el kit comercial QIAquick® Gel Extraction.

La secuenciación del amplicón se realizó en el Instituto de Fisiología Celular Unidad de Biología Molecular. El resultado se alineó con un fragmento de la cadena complementaria de mRNA del precursor de la Rubisco activasa de maíz (Número de acceso en el banco de genes: AF305876) usando el programa BLAST de NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

4. EXTRACCIÓN DE RNA POLISOMAL

A partir de las plántulas de maíz se separaron las hojas de sus tallos y fueron trituradas con N₂ líquido hasta obtener un polvo fino que se transfirió a tubos de polipropileno de 10 ml, especiales para centrifugación previamente estériles.

Se agregaron 9 ml de buffer de extracción (Tris-HCl 0.2 M pH 9, KCl 0.2 M, MgCl₂ 35 mM, EGTA 25 mM, Sacarosa 0.2 M, *y al momento de usar*: éter tridecil polioxietileno (PTE) al 0.2%, Heparina 0.05 mg/ml, β -mercaptoetanol 100 mM) y se homogeneizó con vortex durante 5 s, la mezcla se dejó reposando en hielo durante 15 min y se centrifugó a 10 000 rpm por 15 min a 4° C (centrífuga Survall RC 5C, rotor SS-35). El sobrenadante se transfirió a otro tubo estéril de teflón y se volvió a centrifugar a 4° C durante 15 min a 10 000 rpm (centrífuga Survall RC 5C, rotor SS-35). El sobrenadante se transfirió lentamente a un tubo estéril de policarbonato que contenía 4 ml de sacarosa preparada al 50% en buffer A (Tris-HCl pH 7.4-7.5, NaCl 25 mM, MgCl₂ 5 mM). Se centrifugó a 45000 rpm durante 3.5 h a 4 ° C (ultracentrífuga Beckman XL-100K, rotor 75 Ti). Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 200 μ l de agua con DEPC, se adicionaron 20 μ l de

Heparina (5000 UI), 25 μ l de EDTA 0.5 M y 25 μ l de SDS al 10%, la mezcla se transfirió a un tubo eppendorf de 1500 μ l de capacidad.

Se añadió un ml de trizol, se agitó con vortex durante 2 s y se dejó reposando a temperatura ambiente durante 5 min. Se adicionaron 200 μ l de cloroformo y se agitó suavemente con la mano en movimientos de inversión durante 2 min, la mezcla se dejó en reposo durante 3 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 12 000 g (centrífuga GS-15 R) por 15 min a 4° C.

Se recuperó la fase acuosa (fase superior) en otro tubo eppendorf cuidando de no llevarse también la interfase. A la fase recuperada se añadieron 250 μ l de isopropanol y 250 μ l de una solución con citrato de sodio 0.8 M y cloruro de sodio 0.15 M, la mezcla se dejó en reposo durante 10 min a temperatura ambiente, transcurrido ese tiempo se mantuvo durante al menos 20 min a - 20° C. Después se centrifugó a 12 000 g (centrífuga GS-15 R) por 10 min a 4° C y el precipitado se lavó dos veces con un ml de etanol frío al 75% recuperando cada vez el precipitado mediante centrifugación a 7500 g (centrífuga GS-15 R) por 5 min a 4° C

El precipitado se resuspendió en 14 μ l de H₂O DEPC y se calentó durante 10 min a 65°C, se midió absorbancia a 260 nm y 280 nm (espectrofotómetro Beckman DU650) para conocer la concentración de RNA total.

Para medir la absorbancia se tomaron 2 μ l del RNA total resuspendido y se llevaron a un volumen final de 100 μ l con H₂O DEPC en una celda de 100 μ l, empleando como blanco H₂O DEPC.

5. PREPARACIÓN DE OLIGOSONDA

La oligosonda se marcó radiactivamente con [α -³²P] d-CTP tal como se describe en el protocolo de RAdPrime DNA Labeling System (Invitrogen) partiendo de 300 ng de DNA de la oligosonda.

6. ANÁLISIS NORTHERN BLOT

Con este método de detección y cuantificación de los niveles de mRNA se comparó la abundancia relativa de los dos transcritos que codifican a la Rubisco activasa de maíz.

–*Electroforesis*: En esta primera etapa el RNA es separado de acuerdo a su tamaño en un gel desnaturizante de agarosa.

Debido a que las moléculas de RNA son cadenas simples y por lo tanto pueden formar estructuras secundarias que afectan su migración a través del gel de agarosa, se utiliza formaldehído que desnaturiza el RNA y provoca que este migre de acuerdo a su tamaño real.

Se pesaron 1.2 g de agarosa en un matraz estéril y se disolvieron en 100 ml de buffer MOPS 1X (MOPS ácido 3-N-morfolino-propanosulfónico 20 mM, Acetato de Sodio 5 mM, EDTA 0.1 mM) se añadieron 2 ml de Formaldehído al 37% y 2 µl de bromuro de etidio al 1%. La mezcla se vertió en el soporte de la cámara electroforética y se esperó hasta la polimerización total. Las muestras se prepararon agregando 10 µg de RNA y dos volúmenes de buffer de carga (MOPS 1.5 X, 9% Formaldehído, 60% Formamida desionizada y Dyes 1.5 X que contiene 0.06% de azul de bromofenol y 0.06% de xilencianol) la mezcla se calentó por 10 min a 55-65 °C e inmediatamente después se mantuvo en hielo por 5 min. La corrida electroforética se realizó a 90 V por aproximadamente una hora utilizando como buffer de corrida MOPS 1X.

–*Transferencia*. En esta etapa del ensayo Northern-blot, el RNA es transferido por capilaridad desde el gel de agarosa hacia una membrana de nylon usando el buffer SSC 20X (NaCl 3 M, Citrato de Sodio 0.3 M, pH 7.4 con NaOH)

Un recipiente de tamaño adecuado para el gel se llenó hasta la mitad con solución SSC 20X, adentro se colocó una plataforma que se cubrió con papel filtro con dos extremos sumergidos en el buffer, encima se colocaron dos piezas más del papel filtro y sobre estas se colocó boca abajo el gel evitando en todo momento la formación de burbujas. Encima se colocó al tamaño del gel la membrana Hybond N⁺

previamente hidratada en agua y luego en SSC 10X. Sobre la membrana se colocaron otras dos piezas de papel filtro y sobre estos una pila de 5 cm de papel periódico al que se le colocó encima un peso de aproximadamente 1 kg. La torre se rodeó con papel adherible para evitar la evaporación del buffer y se mantuvo así durante 20 horas.

Posteriormente el RNA se inmovilizó en la membrana de nylon con luz ultravioleta

–*Hibridación*. La hibridación puede ser dividida en tres pasos: (1) la membrana es prehibridada para bloquear sitios de unión remanentes, (2) la membrana es hibridada con la sonda y (3) la membrana es lavada para deshacer uniones no específicas de la sonda empleada.

Las membranas se pre-hibridaron durante 2h a 60° C en 50 ml de solución de pre-hibridación (Buffer de fosfatos 1 M pH 7.0, EDTA 0.5 M, BSA 1%, SDS al 10% y agua estéril)

La hibridación con la sonda marcada con [α -³²P] d-CTP se realizó durante una noche a 60 ° C en la misma solución.

–*Lavados y exposición*. Las membranas hibridadas se lavaron dos veces con SSC 2X durante 15 min a temperatura ambiente cada vez y a continuación se realizó un lavado adicional con SSC 0.2X y SDS al 1% durante 15 min a 55 ° C.

Las membranas hibridadas se expusieron durante 3 días a placas para autorradiografía y se analizaron en un equipo Phosphorimager (Personal Molecular Imagen, Bio Rad) empleando el programa Quantity One para obtener datos densitométricos de las señales observadas.

7. ANÁLISIS Y COMPARACIÓN DE DATOS

La abundancia de los transcritos ZmrcA durante el curso temporal analizado (de 30 a 120 min cada 30 min) se evaluó por triplicado.

A partir de las lecturas densitométricas del control de carga de cada ensayo se corrigieron los resultados de las autorradiografías.

El contenido de mRNA se reportó como porcentaje para permitir la comparación de resultados entre distintos ensayos, para ello se designó arbitrariamente al valor más alto de abundancia de mRNA obtenido en cada experimento como el 100 %, para que a partir de este se calcularan los demás porcentajes.

8. DETERMINACIÓN DEL VALOR DE VIDA MEDIA

De acuerdo a la literatura, la vida media de un mRNA es inversamente proporcional a su constante de decaimiento:

$$t_{1/2} = \ln 2 / k_{\text{decaimiento}}$$

Donde la constante de decaimiento es igual al valor de la pendiente, en una gráfica semilogarítmica que represente la concentración de RNA en función del tiempo (Belasco y Brawerman, 1993).

Para calcular el valor de la vida media de cada transcrito, se procedió en el siguiente orden:

- a) Se calculó el logaritmo natural (ln) de cada valor relativo de abundancia de mRNA que se obtuvo del análisis densitométrico.
- b) Se realizaron gráficas de ln de la abundancia de mRNA vs. tiempo.
- c) Posteriormente, se realizó una regresión lineal de cada gráfico para obtener su valor de pendiente (m), es decir su constante de decaimiento (k).

Finalmente se determinó el valor de la vida media ($t_{1/2}$) empleando la definición matemática: $t_{1/2} = \ln 2 / k_{\text{decaimiento}}$

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar si los resultados obtenidos mostraban diferencias significativas, se analizaron estadísticamente con el programa GraphPad InStat 3.0 mediante la prueba t de student a un nivel de confianza del 95%.

En cada condición experimental se obtuvieron tres valores de vida media de Zmrca 1 y Zmrca 2 respectivamente. Primero se compararon las triadas de datos entre transcritos y posteriormente entre tratamientos.

RESULTADOS

1. DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA DE TRABAJO

Como se puede apreciar en la estrategia experimental, nuestros análisis se basan en la realización de ensayos tipo northern- blot para determinar la acumulación de los mRNAs de rubisco activasa, bajo diferentes condiciones experimentales.

Dichos ensayos requirieron la separación electroforética de extractos de RNA, debido a que los transcritos Zmrca 1 y Zmrca 2, tienen el mismo ORF y sin embargo difieren en tamaño molecular; 1.4 y 1.8 kb respectivamente.

Los ensayos se realizaron con aislados de RNA polisomal, por considerar importante tomar en cuenta el proceso activo de traducción y para garantizar de este modo la integridad de los transcritos. Dado que nuestro objetivo principal se centra en analizar el efecto de elementos localizados en la secuencia 3' no traducible de los transcritos Zmrca, se requiere evaluar la acumulación de transcritos completos y no sólo de fragmentos, como pudiera ocurrir con extractos de RNA total.

Por otra parte, se obtuvo una sonda para diferenciar a los mRNAs que codifican rubisco activasa de entre el total de mRNAs presentes en los extractos, para ello fue necesario amplificar mediante RT-PCR un fragmento aproximadamente de 500 bp, de la secuencia traducible de ambos transcritos utilizando un par de oligonucleótidos específicos.

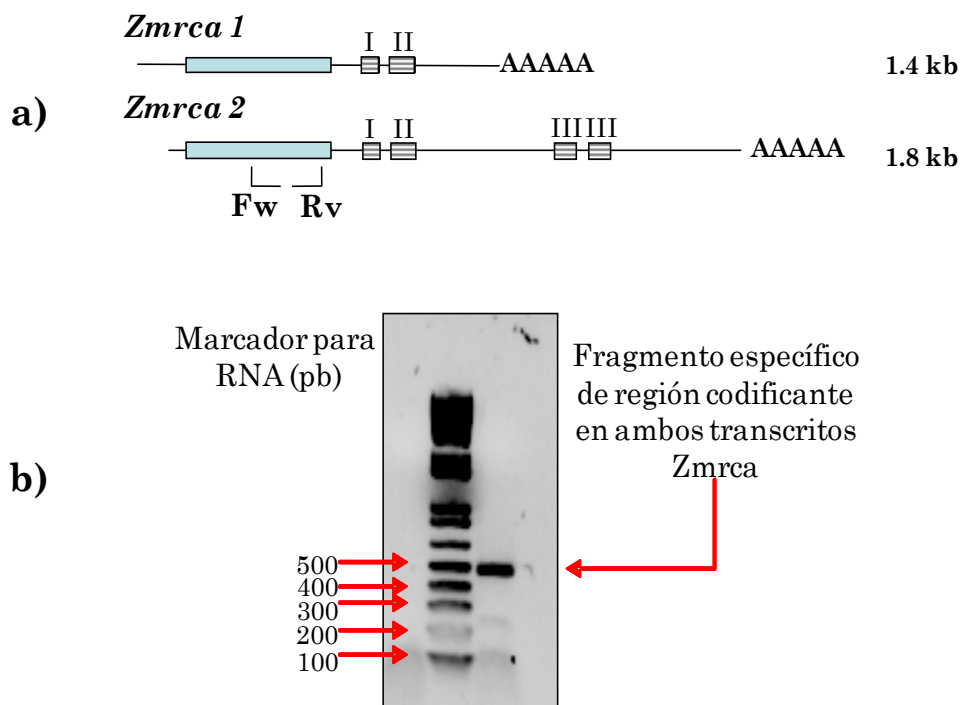


Figura 7. Sonda de cDNA usada para identificar transcritos *Zmrca*. Los oligonucleotidos Fw y Rv esquematizados en la figura a), permitieron obtener el producto de RT-PCR que se observa en la imagen del gel de agarosa del inciso b). Nótese que la secuencia amplificada puede unirse a la misma región en ambos transcritos.

El producto de RT-PCR fue identificado como se observa en el inciso (b) de la figura 7 de acuerdo a su tamaño (~ 500 pb) en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Posteriormente, la sonda amplificada fue separada del gel para comprobar su identidad mediante secuenciación.

El resultado después de alinear la secuencia obtenida con la secuencia ya reportada de los genes *Zmrca* se muestra en la figura 8, en la cual podemos apreciar que la semejanza del amplicón con la secuencia reportada de DNA de Rubisco activasa fue cercana al 100%.

En la figura 9 se observa la imagen representativa de un gel desnaturalizante con 1.2 % de agarosa, en el que se muestra como las subunidades ribosomales 28 S y 18 S migran de forma similar a los estándares de RNA que corresponden a 2 y 1.0 Kb.

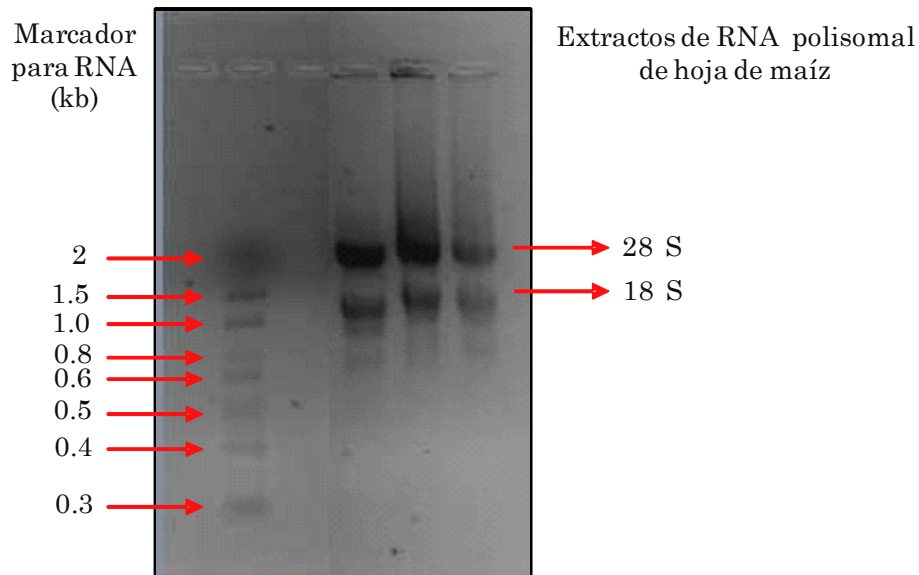


Figura 9. Migración de subunidades ribosomales. Gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio. A la izquierda estándares de RNA y a la derecha extractos de RNA polisomal de hoja de plántula de maíz. El patrón de migración de las subunidades ribosomales corresponde al patrón de corrimiento de RNAs entre 1.0 y 2 Kb.

Debido a que los transcritos Zmrca 1 y Zmrca 2 tienen idéntico marco de lectura abierto, la sonda obtenida puede hibridar con los dos transcritos. La diferenciación entre ellos se logra cuando los extractos de RNA se separan a través de un gel desnaturalizante, el cual permite que el RNA adopte una conformación lineal y como consecuencia se separe de acuerdo a su tamaño.

Por tanto, la hibridación entre nuestra sonda-dCTP³² marcada y el RNA desnaturalizado e inmovilizado en una membrana, resulta en dos señales

radiactivas que se observan a 1.4 Kb y 1.8 Kb correspondientes a Zmrca 1 y Zmrca 2 respectivamente (Ayala *et al.*, 2004).

El tamaño de los transcritos Zmrca 1 y Zmrca 2 y el patrón electroforético de las subunidades ribosomales nos permite identificarlos.

En los ensayos northern-blot, la señal radiactiva es proporcional a la cantidad de RNA presente en cada extracto analizado; con lo cual, la precisión de nuestros resultados se asegura al evitar en lo posible las señales inespecíficas mediante lavados adecuados y empleando como control de carga a la subunidad ribosomal 28 S.

2. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DEL PROCESO DE TRANSCRIPCIÓN SOBRE LA ACUMULACIÓN DE LOS TRANSCRITOS Zmrca. ESTIMACIÓN DE SU VIDA MEDIA

De acuerdo a los resultados reportados por Ayala *et al.* (2004), la cantidad de los transcritos Zmrca de maíz cambia en un patrón de ciclo circadiano, observando su máxima acumulación entre las 4:00 am y las 7:00 am, razón por la cual, las plántulas que analizamos fueron cortadas entre las 5:30 am y las 6:30 am.

La abundancia de RNA mensajero es el resultado del equilibrio entre sus velocidades de síntesis y degradación, de ahí que al eliminar la síntesis de mRNA, su abundancia en función del tiempo reflejará la velocidad de degradación del RNA mensajero en cuestión (Green, 1993).

Con la finalidad de estimar la vida media de los transcritos Zmrca diseñamos un experimento en el que evaluamos el cambio de abundancia de Zmrca 1 y Zmrca 2 en función del tiempo después de inhibir el proceso de transcripción usando α -amanitina, una potente toxina conocida por su capacidad para detener específicamente la acción de la RNA polimerasa II de sistemas eucariotes a concentraciones entre 0.01 μ M – 0.05 μ M (De Mercoyrol *et al.*, 1989) o bien, a

concentraciones mayores (10 μM) por ejemplo en el caso de ejes embrionarios de maíz (Sánchez de Jiménez y Aguilar, 1984).

De la misma forma y a manera de control negativo analizamos la cantidad relativa de los transcritos *Zmrca* en plántulas no tratadas que fueron cortadas a los mismos tiempos que las plántulas sometidas al bloqueo de la transcripción.

En la figura 10 se observa la imagen de una autorradiografía representativa de estos ensayos en la cual se aprecia de acuerdo a la corrección por variación en la carga del gel, que la acumulación de *Zmrca* 1 y *Zmrca* 2 en plántulas incubadas desde 60 hasta 90 min con α -amanitina disminuye notablemente en comparación con la cantidad de *Zmrca* 1 y *Zmrca* 2 observada en las plántulas control, para las cuales, en esta imagen en particular se muestra el cambio de abundancia registrado de 75 a 90 min de incubación sólo con el buffer que sirvió de vehículo para la aplicación del inhibidor.

Por otra parte, en ambos tratamientos se observa que conforme incrementa el tiempo de incubación la acumulación de *Zmrca* 1 y *Zmrca* 2 va disminuyendo. Sin embargo en las plántulas control la incubación no representa ningún tratamiento en sí, por lo que la disminución de ambos transcritos *Zmrca* corresponde al decaimiento programado debido al ciclo circadiano del día en que se efectuó el experimento.

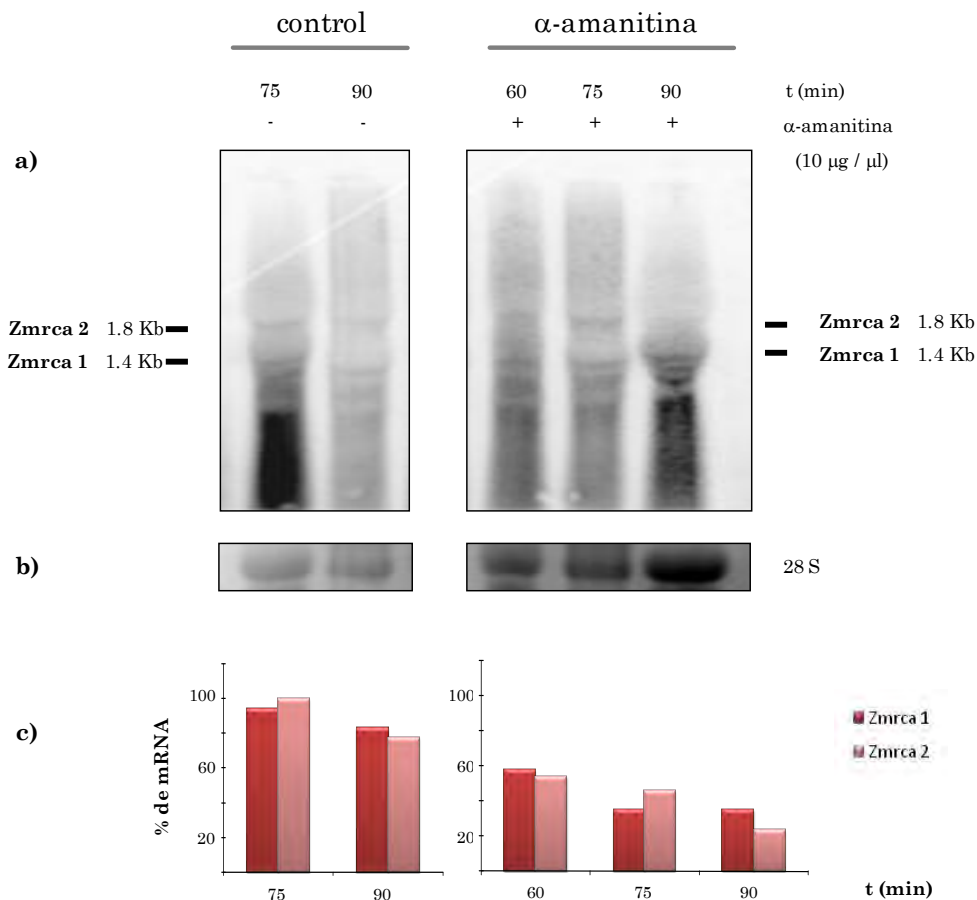


Figura 10. Efecto de α - amanitina sobre la abundancia de los transcritos Zmrca. Plántulas de maíz sembradas en agrolita se incubaron con α -amanitina (inhibidor de la transcripción) durante 60, 75 y 90 min. (a) Autorradiografías, muestran los cambios de acumulación de Zmrca 1 y Zmrca 2 en plántulas control (a la izquierda) y plántulas con proceso de transcripción bloqueado (a la derecha). (b) La subunidad ribosomal 28 S se utilizó como control de carga. (c) Las medidas densitométricas corregidas con el control de carga 28 S se graficaron para mostrar la acumulación de los transcritos Zmrca expresada como %. En las plántulas con α -amanitina, se observa menor contenido de ambos Zmrca desde 60 min.

Para obtener datos cuantitativos de estos comportamientos, se repitió por triplicado cada experimento usando un intervalo de tiempo desde 30 hasta 120 minutos de incubación con los tratamientos control e inhibidor de la transcripción. Los resultados de éstos ensayos se muestran de forma resumida en la siguiente tabla de datos.

Tabla 2. Contenido relativo de Zmrca 1 y Zmrca 2 en plántulas control y en plántulas tratadas con α - amanitina.

TRATAMIENTO: control																	
t (min)	30		60		75		80		90		100		120		k decaimiento	t _{1/2} (min)	
abundancia de RNA	%	ln	%	ln	%	ln	%	ln	%	ln	%	ln	%	ln			
Zmrca 1	105.54	4.66	95.18	4.56	94.40	4.55	88.27	4.48	83.30	4.42	81.36	4.40	74.45	4.31	-0.0039	178	
	101.85	4.62	85.20	4.45	75.41	4.32	70.50	4.26	66.60	4.20	60.72	4.11	61.70	4.12	-0.0062	112	
	106.57	4.67	90.44	4.50	82.37	4.41	79.68	4.38	74.31	4.31	68.93	4.23	68.18	4.22	-0.0067	103	
	\bar{x}	104.65	4.65	90.27	4.50	84.06	4.43	79.48	4.38	74.73	4.31	70.34	4.25	68.11	4.22	-0.0051	136
	S.D.	2.48		4.99		9.61		8.89		8.36		10.39		6.38			41
Zmrca 2	101.94	4.62	89.08	4.49	100.00	4.61	92.56	4.53	77.70	4.35	62.83	4.14	63.37	4.15	-0.0059	117	
	92.93	4.53	76.08	4.33	70.01	4.25	67.68	4.21	58.91	4.08	58.37	4.07	52.10	3.95	-0.0066	105	
	113.98	4.74	100.00	4.61	90.81	4.51	85.29	4.45	83.08	4.42	79.40	4.37	67.63	4.21	-0.0057	122	
	\bar{x}	102.95	4.63	88.39	4.48	86.94	4.47	81.84	4.40	73.23	4.29	66.87	4.20	61.03	4.11	-0.0060	116
	S.D.	10.56		11.98		15.37		12.79		12.69		11.08		8.02			16
TRATAMIENTO: α - amanitina																	
t (min)	30		60		75		80		90		100		120		k decaimiento	t _{1/2} (min)	
abundancia de RNA	%	ln	%	ln	%	ln	%	ln	%	ln	%	ln	%	ln			
Zmrca 1	76.92	4.34	57.69	4.06	34.61	3.54	38.46	3.65	34.61	3.54	23.07	3.14	7.68	2.04	-0.0237	29	
	48.30	3.88	35.20	3.56	28.65	3.36	26.47	3.28	22.11	3.10	17.74	2.88	9.01	2.20	-0.0178	39	
	57.53	4.05	43.26	3.77	36.13	3.59	33.75	3.52	28.99	3.37	24.24	3.19	14.73	2.69	-0.0147	47	
	\bar{x}	60.92	4.11	45.38	3.82	33.13	3.50	32.89	3.49	28.57	3.35	21.68	3.08	10.47	2.35	-0.0186	37
	S.D.	14.61		11.39		3.95		6.04		6.26		3.46		3.74			9
Zmrca 2	87.17	4.47	53.80	3.99	46.10	3.83	35.83	3.58	23.00	3.14	15.30	2.73	5.23	1.66	-0.0306	23	
	51.39	3.94	38.20	3.64	31.61	3.45	29.41	3.38	25.02	3.22	20.62	3.03	11.83	2.47	-0.0157	44	
	73.48	4.30	49.25	3.90	37.13	3.61	33.10	3.50	25.02	3.22	16.94	2.83	0.79	-0.24	-0.0431	16	
	\bar{x}	70.68	4.26	47.08	3.85	38.28	3.64	32.78	3.49	24.34	3.19	17.62	2.87	5.95	1.78	-0.0261	27
	S.D.	18.06		8.02		7.31		3.22		1.16		2.72		5.56			15

Se indica la abundancia celular de Zmrca 1 y Zmrca 2 expresada como porcentaje -con su correspondiente logaritmo natural (ln), promedio (\bar{x}) y desviación estándar ($S.D.$)-, para cada intervalo de tiempo analizado tanto en plántulas control como en plántulas tratadas con α -amanitina. A la derecha, en las últimas dos columnas, se indican los valores de pendiente o constante de decaimiento y la vida media de cada transcrito calculados a partir de las gráficas semilogarítmicas: ln de la abundancia celular vs, tiempo.

Al examinar los datos vertidos en la tabla 2 se puede visualizar fácilmente que se obtuvieron diferentes medidas de contenido relativo de mRNA a un determinado tiempo tanto en las plántulas control como en las plántulas tratadas con α -amanitina sin embargo, tales diferencias se consideraron como variaciones inherentes a la ejecución de distintos ensayos.

A partir del valor promedio de acumulación celular de Zmrca 1 y Zmrca 2 calculado con las repeticiones experimentales se graficaron los siguientes histogramas, en los cuales se observa que la abundancia de los dos transcritos Zmrca se ve seriamente disminuida cuando las plántulas son sometidas al bloqueador de la transcripción, lo

cual da cuenta de que la aplicación de α -amanitina a las plántulas de maíz causó un claro efecto de disminución en la cantidad total de mRNA y por lo tanto también en la cantidad de Zmrca 1 y Zmrca 2.

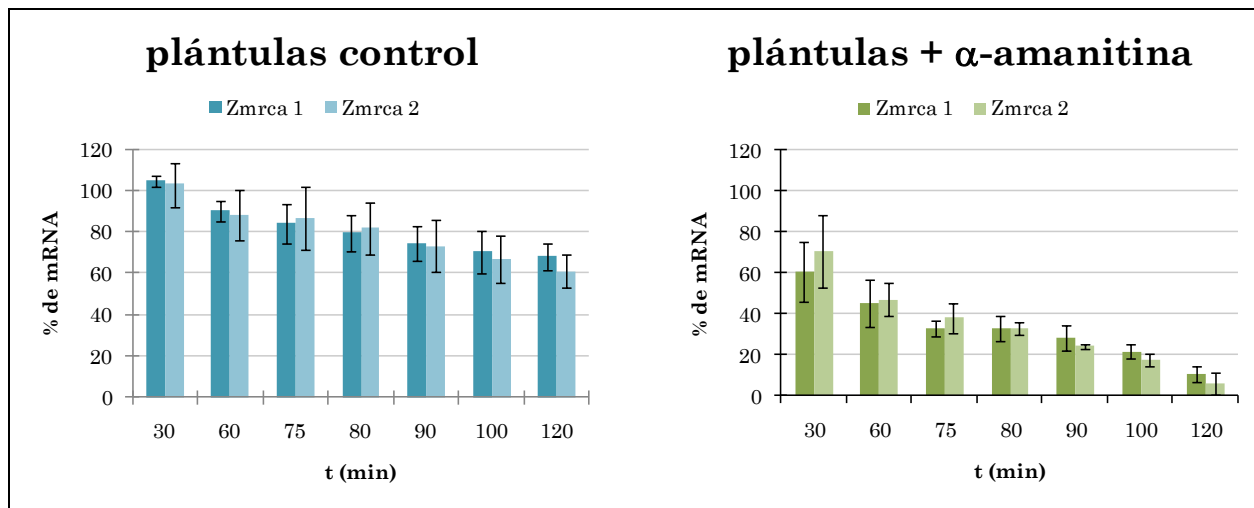


Figura 11. Acumulación promedio de Zmrca 1 y Zmrca 2 en plántulas de maíz control y tratadas con α -amanitina. Las gráficas representan el promedio y la desviación estándar de tres ensayos independientes realizados para cada tiempo de incubación señalado en el eje x.

En concordancia con los resultados de la figura 10, los histogramas de la figura 11 muestran que la acumulación promedio de Zmrca 1 y Zmrca 2 en plántulas control es mayor respecto a la acumulación observada en las plántulas tratadas con α -amanitina y tal como sucede en estas últimas la acumulación de los transcritos Zmrca también va disminuyendo con el curso temporal aunque no en la misma proporción. Este fenómeno se explica como se mencionó anteriormente en los resultados de la figura 10, porque de acuerdo a lo reportado por Ayala y colaboradores (2004) la abundancia de los transcritos Zmrca 1 y Zmrca 2 está regida por un ciclo circadiano y su acumulación aminora significativamente durante las primeras horas del día justo dentro del horario en el que se llevaron a cabo los experimentos por lo cual la disminución observada en la cantidad de Zmrca 1 y

Zmrca 2 de las plántulas control obedece a la programación del ciclo circadiano al que está sujeta su abundancia celular.

En la gráfica que representa la acumulación promedio de los transcritos Zmrca en plántulas tratadas con α -amanitina se observa que el decaimiento en la cantidad de Zmrca 1 y Zmrca 2 es más acelerado como consecuencia de la inhibición de la síntesis de mRNA y puesto que desde 30 minutos de incubación con α -amanitina la acumulación de los transcritos Zmrca decae rápidamente podemos inferir que la vida media de Zmrca 1 y Zmrca 2 oscila alrededor de los 30 min.

También se observó que en cada una de las condiciones experimentales analizadas la expresión de Zmrca 1 y Zmrca 2 es parecida entre sí, de tal modo que no se encontraron diferencias significativas de acumulación de mRNA, aún cuando los dos transcritos Zmrca son diferentes en cuanto al número de copias de subdominios DST presentes en su región 3'UTR.

Por otra parte, a partir de los resultados promedio de abundancia de mRNA, se siguió el procedimiento descrito en el apartado número 7 del capítulo *Materiales y Métodos* y se construyeron gráficos semilogarítmicos en función del tiempo que permitieron calcular con mayor precisión la vida media de los dos transcritos Zmrca. Dichos gráficos se muestran en la siguiente figura.

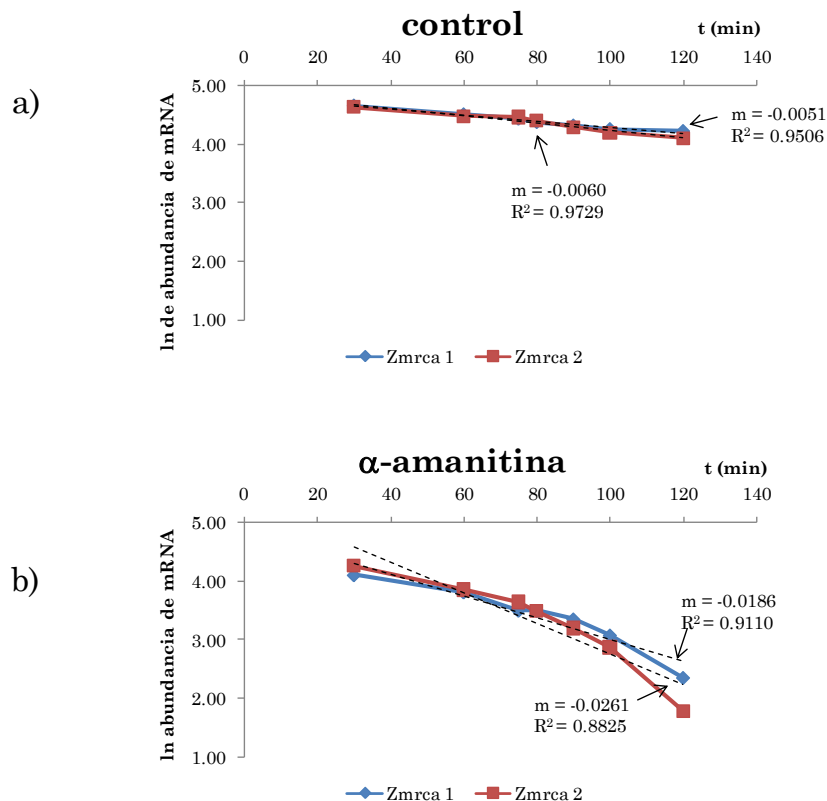


Figura 12. Estimación de la constante de decaimiento de los transcritos Zmrca bajo condiciones control y con α -amanitina. Se muestra el ln de la abundancia promedio de Zmrca 1 y Zmrca 2 en función del tiempo. La pendiente (m) de la regresión lineal de cada gráfica corresponde a la constante de la velocidad de decaimiento. a) plántulas control y b) plántulas sin proceso activo de transcripción.

En la figura 12 se señalan los valores de la pendiente o constante de decaimiento que permitieron calcular la vida media de cada transcrito. Los resultados se resumen en la tabla 3.

Tabla 3. Estimación de la vida media de Zmrca 1 y Zmrca 2. Tratamiento con α -amanitina

Transcrito	control		α -amanitina	
	k (cte. de decaimiento)	$t_{1/2} = \ln 2 / k$ (min)	cte de decaimiento	$t_{1/2} = \ln 2 / k$ (min)
Zmrca 1	-0.0051	136 ± 41	-0.0186	37 ± 9
Zmrca 2	-0.0060	116 ± 16	-0.0261	27 ± 15

Se calculó que la vida media de Zmrca 1 y Zmrca 2 cuando se bloquea la síntesis de RNA mensajero es de 37 ± 9 min y 27 ± 15 min respectivamente, mientras que para las plántulas control se obtuvieron valores de vida media cercanos a los 100 min. El análisis estadístico de estos resultados usando la prueba t de student a un nivel de probabilidad $p = 0.05$ indicó que las vidas medias de Zmrca 1 y Zmrca 2 en el tratamiento control son significativamente diferentes a su vida media calculada cuando las plántulas son tratadas con α -amanitina.

Es pertinente aclarar que la estimación de vida media en las plántulas control, sólo nos brinda una aproximación del tiempo que tarda en decaer naturalmente la acumulación de los transcritos Zmrca durante el tiempo en que se recolectaron las muestras para realizar el experimento; porque al no someter las plántulas a ningún inhibidor del proceso de transcripción, la cantidad de mRNA obtenida en los ensayos northern-blot, indica la suma de los eventos de síntesis y degradación de mRNA a un determinado tiempo, mientras que la estimación de vida media en las plántulas tratadas con α -amanitina analiza semi-cuantitativamente el tiempo que tarda en desaparecer la acumulación de los transcritos Zmrca cuando se ha detenido por completo la síntesis de los mismos.

Si bien se observó que el tiempo de decaimiento de los transcritos Zmrca fue significativamente menor respecto a las plántulas control debido a la falta de síntesis mRNA, no se encontraron diferencias significativas de vida media entre Zmrca 1 y Zmrca 2 aún cuando el transcrito Zmrca 2 presenta dos copias extras del subdominio III DST. Esta observación sugiere que en el caso de los mRNAs que codifican Rubisco activasa de maíz, la diferencia estructural de sus secuencias 3'UTR no ocasiona la degradación acelerada selectiva de alguno de ellos.

Por otra parte, es importante notar que la señal de inestabilidad en los transcritos Zmrca, mediada por los elementos DST es eficiente, pues la vida media resultante (alrededor de los 30 min) sitúa a los transcritos Zmrca dentro del grupo de RNAs mensajeros inestables para los cuales se han reportado vidas medias oscilantes entre 10 y 60 min (Geen, 1993).

Adicionalmente, un análisis más detallado de los resultados mostrados en la tabla 2 revela que para los dos transcritos *Zmrca* la inhibición de la transcripción provoca que su cantidad relativa disminuya alrededor del 50% respecto a sus contrapartes en las plántulas control, lo cual indica que en general la vida media de ambos mRNAs se ve claramente disminuida por efecto de la inhibición de la transcripción con α -amanitina, sugiriendo fuertemente que la abundancia de los transcritos *Zmrca* es regulada de forma importante tanto por su estabilidad, como por su velocidad de transcripción.

3. EFECTO DE AUXINAS (ÁCIDO INDOL ACÉTICO) SOBRE LA ACUMULACIÓN DE LOS TRANSCRITOS *Zmrca*

Como se describió anteriormente en el capítulo de antecedentes, los RNAs mensajeros que contienen elementos DST en sus secuencias 3' UTR muestran la característica común de acumularse como respuesta a estímulos externos de auxinas (Franco *et. al*, 1990, Newman *et. al*, 1993).

En estudios anteriormente realizados en este laboratorio se demostró mediante la técnica RT-PCR, que la abundancia de los transcritos *Zmrca* se incrementa en plántulas de maíz cuando estas son estimuladas externamente con ácido indol acético (Pérez-Muñoz, 2007).

Para comprobar una vez más dicha observación, se analizaron mediante Northern-blot los cambios en la acumulación de *Zmrca* cuando plántulas de maíz fueron sometidas a un tratamiento con ácido 3-indol acético, el cual es conocido por ser la principal auxina presente en la mayoría de las plantas (Woodward y Bartel, 2005).

Un ejemplo de los resultados obtenidos se muestra en la figura 12, en la cual podemos apreciar la autorradiografía del ensayo northern blot en el inciso (a) y la representación gráfica del análisis densitométrico en el inciso (c). El gráfico muestra la abundancia relativa de *Zmrca* 1 y *Zmrca* 2 corregida de acuerdo al control de carga que se observa en el inciso (b). Los resultados hacen evidente que en las

plántulas control, el transcrito *Zmrca 2* decae naturalmente por efecto del ciclo circadiano que rige su abundancia de la misma forma que lo reporta Ayala *et. al* (2004).

Sin embargo, cuando plántulas de maíz se asperjan con ácido 3-indol acético, la acumulación de *Zmrca 1* y *Zmrca 2* se modifica sustancialmente llegando incluso a aumentar su cantidad relativa. Estos resultados indican que tal como se ha reportado para los RNAs mensajeros SAURs (Franco *et. al* 1990), la cantidad detectada de los transcritos *Zmrca* se incrementa con el estímulo de las auxinas. Sin embargo, este ensayo no nos proporciona mayor información que permita discernir si el cambio en la abundancia de los transcritos *Zmrca* responde a modificaciones en su vida media, o bien a alteraciones en su velocidad de transcripción.

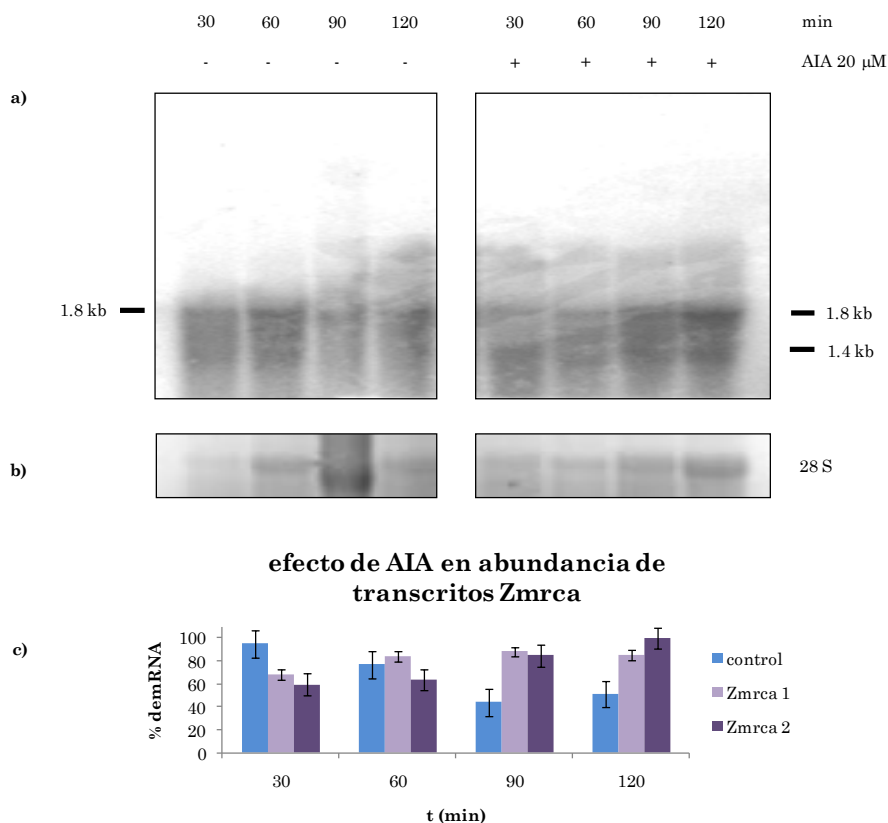


Figura 12. Abundancia de los transcritos *Zmrca 1* y *Zmrca 2* cuando se aplica estímulo hormonal de auxinas. Plántulas de maíz sembradas en tierra se asperjaron con ácido 3-indol acético (AIA) 20 μ M. A partir de estas se separaron 10 μ g de RNA polisomal en gel desnaturante y se transfirieron a una membrana Hybond N⁺ la cual se hibridó con la sonda-dCTP³² de la región codificante de los transcritos *Zmrca*. (a) Autorradiografía. (b) Control de carga 28 S. (c) Gráfico con medidas densitométricas normalizadas.

4. EFECTO DE AUXINAS (ÁCIDO INDOL ACÉTICO, AIA) SOBRE LA VIDA MEDIA DE LOS TRANSCRITOS *Zmrca*

Para determinar si los cambios de abundancia celular observados en los transcritos *Zmrca* de plántulas tratadas con AIA obedecen a modificaciones de su vida media o a diferencias en su velocidad de transcripción, se realizaron ensayos en los que se analizó la cantidad relativa de cada transcrito *Zmrca* en plántulas sometidas a inhibición del proceso de transcripción, tanto en presencia como en ausencia del estímulo de auxinas.

Paralelamente y a manera de control positivo se realizaron los mismos tratamientos siguiendo la acumulación de un mRNA distinto a los transcritos *Zmrca*. Para ello se utilizó una sonda específica que hibrida con una región del mRNA de una proteína de maíz con actividad glutatión transferasa (GST) cuya función está reportado que es regulada por auxinas tal como su homóloga en *Arabidopsis* que incrementa su expresión en presencia de auxinas (Dixon *et al.*, 1998).

Los resultados de este ensayo control se observan en la figura 13, en la cual se describe en la parte superior los tratamientos que se realizaron a diferentes lotes de plántulas de maíz. El inciso (a) muestra la autorradiografía que indica la cantidad de transcrito GST encontrada en cada grupo de plántulas y el inciso (c) corresponde a las gráficas que representan la acumulación del transcrito GST corregida de acuerdo al control de carga mostrado en el inciso (b).

De forma similar a los mensajeros *Zmrca*, se observa que el transcrito GST se acumula mayormente en las plántulas control en comparación con las plántulas tratadas con α -amanitina. Sin embargo, con el transcurso del tiempo los cambios de contenido celular no parecen ser tan acentuados como en el caso de los transcritos *Zmrca* para los cuales se registraron cambios desde 100% hasta 80% de contenido celular en un intervalo de 15 min en las plántulas control, o bien desde 60% hasta 30% en un intervalo de 30 min en el caso de las plántulas con α -amanitina (ver figura 10). En contraste, el transcrito GST observa cambios más moderados que van

desde 100% hasta 90% y de 50% a 30% en las plántulas control y tratadas con α -amanitina respectivamente en un intervalo de 40 min.

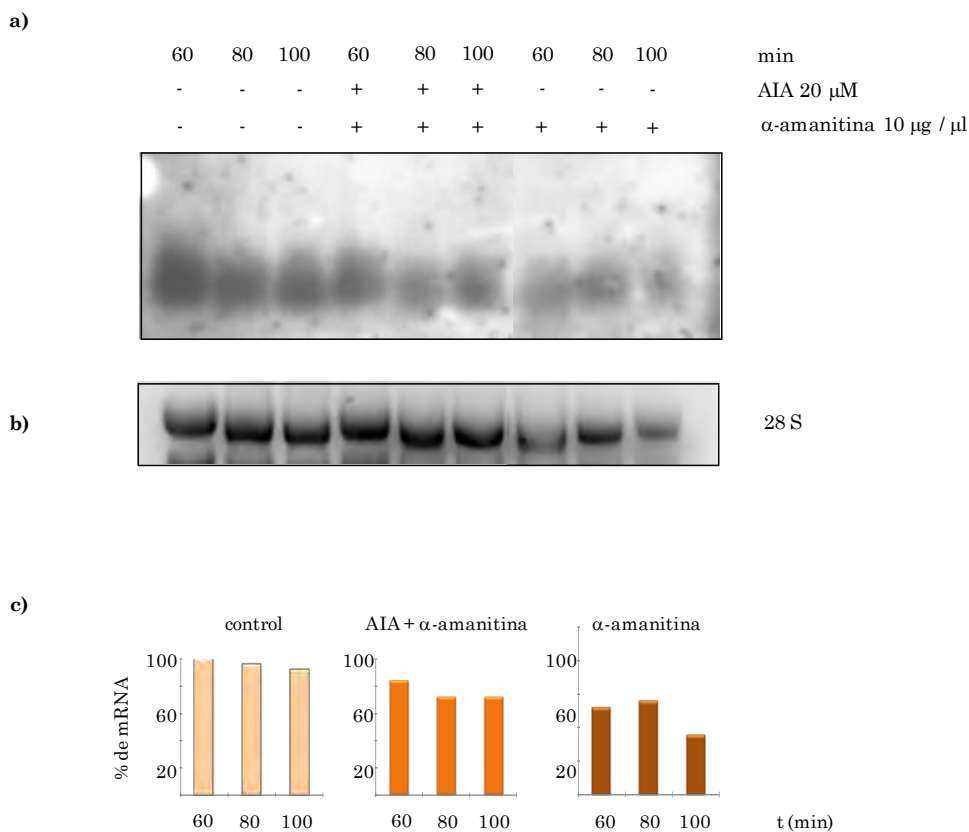


Figura 13. Efecto de auxinas sobre la abundancia del transcrito GST. Plántulas de maíz, se incubaron con AIA y/o α -amanitina en los tiempos indicados en la parte superior de la figura. (a) Autorradiografía de ensayo Northern-blot obtenido con RNA polisomal y una sonda específica del gen GST. (b) Gel desnaturante en el que se muestra la subunidad ribosomal 28 S como control de carga. (c) Análisis densitométrico de la autorradiografía. Se observa que AIA sí modifica la abundancia del transcrito GST, aunque no promueve mayor acumulación que en las plántulas control.

En resumen, el análisis de la figura 13 revela que a diferencia de los transcritos Zmrca (ver figura 10) la abundancia del transcrito GST se altera en proporciones más modestas por efecto de la aplicación de auxinas, lo cual apunta hacia el efecto acumulado de inestabilidad que muy probablemente promueve la señalización de los elementos DST en la secuencia de los transcritos Zmrca.

Sin embargo, para comparar de forma más precisa el comportamiento de los transcritos Zmrca en función del transcrito GST, se calculó la vida media de este último utilizando las gráficas semi-logarítmicas que se observan en la figura 14 y a partir de la constante de decaimiento mostrada en ellas se calculó que la vida media para el transcrito GST cuando las plántulas son tratadas con α -amanitina es de 231 min y 77 min en presencia y en ausencia de AIA respectivamente.

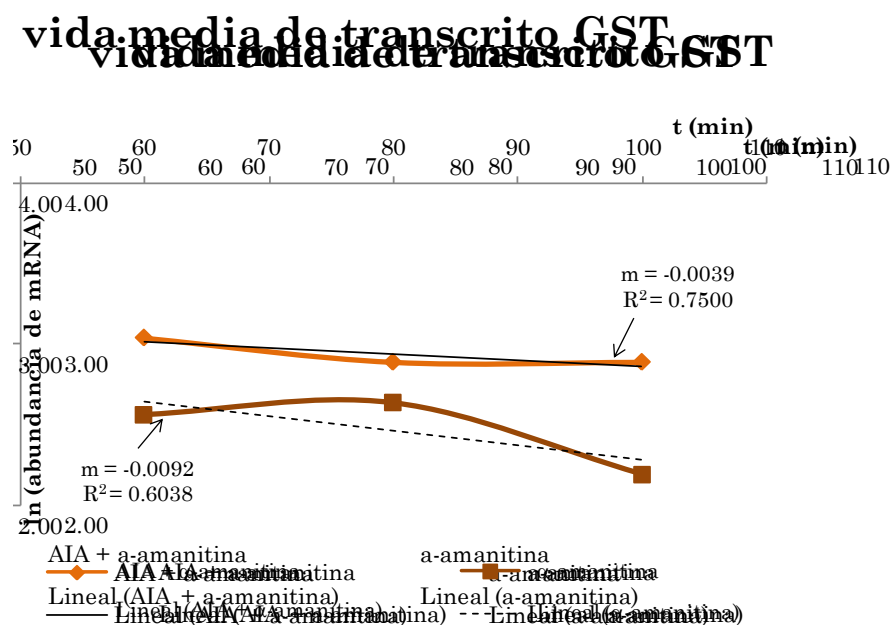


Figura 14. Efecto de AIA sobre la vida media del transcrito GST. Las líneas sólidas representan el decaimiento del transcrito GST en función del tiempo, el valor m indica la constante de decaimiento y R^2 es el coeficiente de las regresiones lineales indicadas como líneas punteadas.

En cuanto a los transcritos Zmrca, la figura 15 muestra una imagen representativa de los resultados obtenidos; en esta imagen en particular se muestran los cambios de abundancia celular de Zmrca 1 y Zmrca 2 a los 60 min, 80 min, y 100 min de incubación en plántulas control y plántulas tratadas con ácido indol-acético más α -amanitina. Para el caso de las plántulas tratadas únicamente con α -amanitina sólo se observa la acumulación de los transcritos Zmrca a los 60 min y 80 min de incubación.

Las gráficas de esta figura demuestran nuevamente que el proceso activo de transcripción contribuye de forma importante a la acumulación de los transcritos Zmrca, porque una vez que se ha bloqueado la síntesis de mRNA, la abundancia celular de los transcritos Zmrca decae notablemente.

Este efecto, repetidamente observado (ver figura 10), es amortiguado en el caso de las plántulas que fueron tratadas con ácido indol acético.

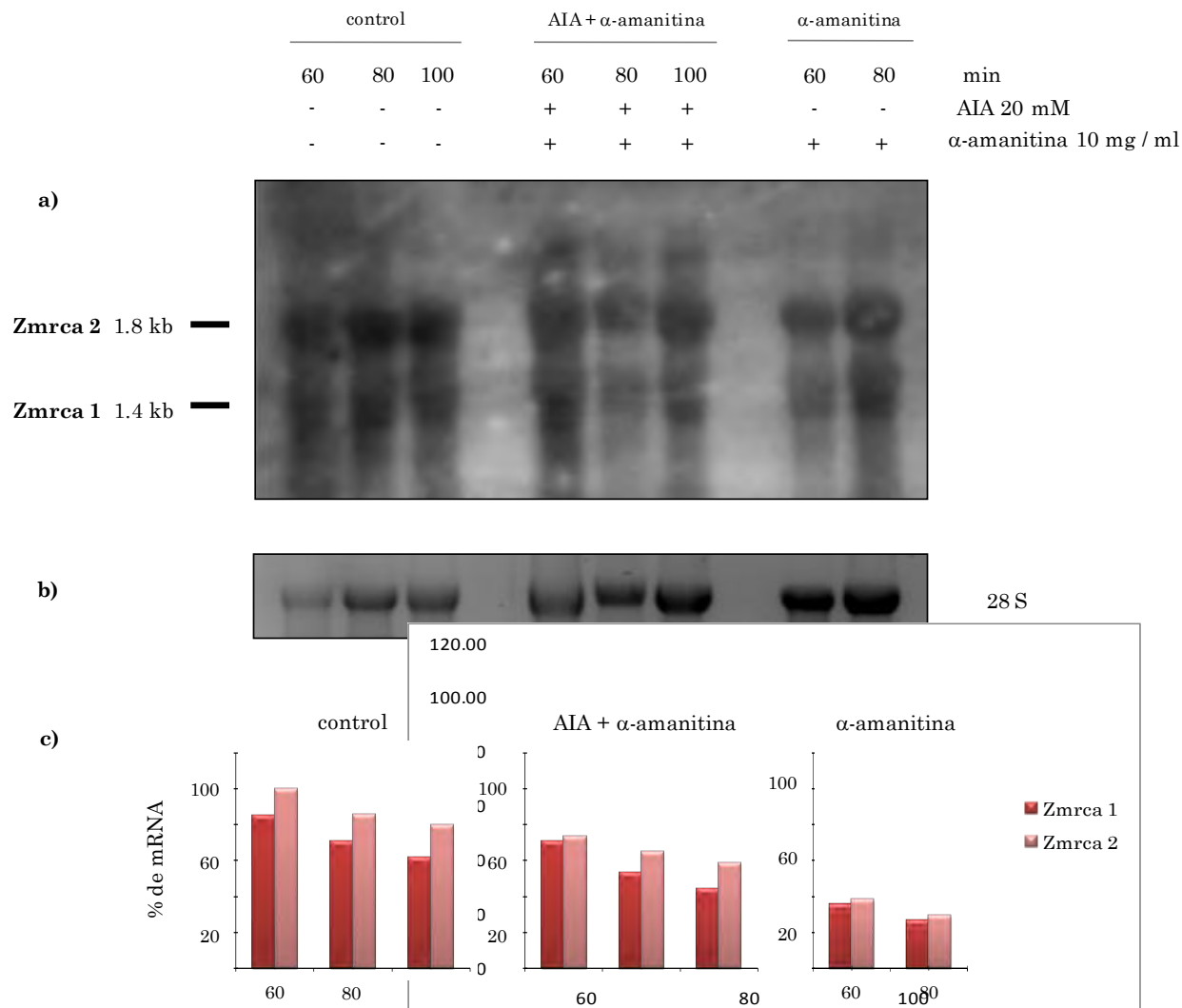


Figura 15. Efecto de auxinas sobre la abundancia celular de los transcritos Zmrca.

(a) Autorradiografía con 15 μ g de RNA polisomal en cada carril. Los extractos polisomales se hicieron a partir de plántulas tratadas con los reactivos y el tiempo que se indican en la parte superior. (b) Control de carga. (c) Análisis densitométrico normalizado de Zmrca 1 y Zmrca 2 en cada tratamiento. AIA tiene un efecto positivo en la acumulación de los transcritos Zmrca cuando se ha bloqueado el proceso de transcripción, este efecto no iguala a las condiciones control.

Para obtener datos más confiables de estos comportamientos se midió por triplicado la acumulación de Zmrca 1 y Zmrca 2 en plántulas de maíz que fueron incubadas con α -amanitina más ácido indol acético en un intervalo desde 30 min hasta 120 min. El promedio y la desviación estándar de las réplicas experimentales se resumen en la tabla 4.

Tabla 4. Contenido relativo de Zmrca 1 y Zmrca 2 en plántulas tratadas con α - amanitina y ácido indol acético (AIA).

TRATAMIENTO: AIA + α -amanitina																	
t (min)	30		60		75		80		90		100		120		k decaimiento	t _{1/2} (min)	
abundancia de RNA	%	ln	%	ln	%	ln	%	ln	%	ln	%	ln	%	ln			
Zmrca 1	88.83	4.49	70.50	4.26	59.13	4.08	52.90	3.97	49.23	3.90	44.10	3.79	29.43	3.38	-0.0119	58	
	46.07	3.83	39.25	3.67	36.85	3.61	37.17	3.62	33.78	3.52	31.05	3.44	27.63	3.32	-0.0057	122	
	67.45	4.21	54.48	4.00	48.00	3.87	45.83	3.83	41.51	3.73	37.19	3.62	28.54	3.35	-0.0094	74	
	\bar{x}	67.45	4.21	54.74	4.00	47.99	3.87	45.30	3.81	41.51	3.73	37.45	3.62	28.53	3.35	-0.0094	85
	S.D.	21.38		15.63		11.14		7.877		7.727		6.527		0.901			33
Zmrca 2	84.04	4.43	73.50	4.30	67.50	4.21	64.70	4.17	61.99	4.13	58.80	4.07	50.97	3.93	-0.0055	126	
	38.78	3.66	35.17	3.56	34.57	3.54	35.73	3.58	33.17	3.50	31.42	3.45	30.36	3.41	-0.0027	257	
	61.42	4.12	54.50	4.00	51.04	3.93	49.89	3.91	47.59	3.86	45.28	3.81	40.67	3.71	-0.0046	151	
	\bar{x}	61.41	4.12	54.39	4.00	51.04	3.93	50.11	3.91	47.58	3.86	45.17	3.81	40.67	3.71	-0.0046	178
	S.D.	22.63		19.17		16.47		14.49		14.41		13.69		10.3			69

Se indica la abundancia celular de Zmrca 1 y Zmrca 2 expresada como porcentaje -con su correspondiente logaritmo natural (ln), promedio (\bar{x}) y desviación estándar ($S.D.$)- , para cada intervalo de tiempo analizado en plántulas tratadas con AIA + α -amanitina. A la derecha, en las últimas dos columnas, se indican los valores de la constante de decaimiento y la vida media de cada transcrito calculados a partir de las gráficas semilogarítmicas: ln de la abundancia celular Vs, tiempo.

Con los datos mostrados en la tabla 4 se trazó la gráfica de la figura 16, que en comparación con la figura 11, se observa que la aplicación de ácido indol acético a las plántulas de maíz tratadas con α -amanitina provoca un incremento en la acumulación de ambos transcritos. El cambio de abundancia se nota sobre todo en los últimos tiempos de incubación; por ejemplo, a los 120 min la cantidad de Zmrca 1 y Zmrca 2 aumentó 18% y 34 % respectivamente respecto a las plántulas tratadas únicamente con α -amanitina, aunque cabe aclarar que el incremento logrado no igualó nunca la cantidad de mRNA detectada en las plántulas control.

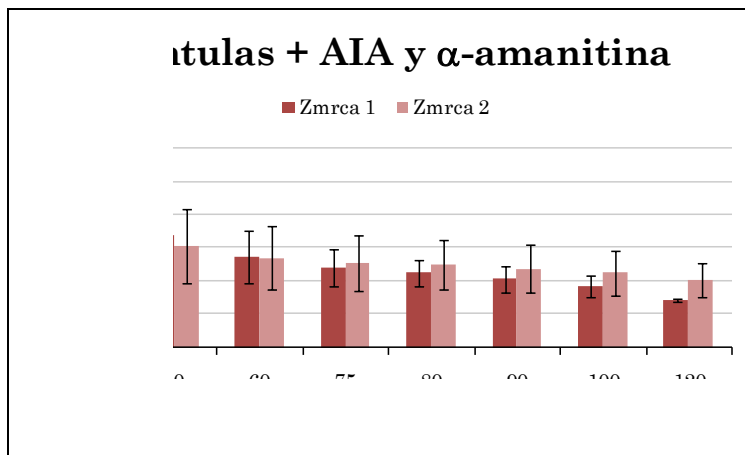


Figura 16. Acumulación promedio de Zmrca 1 y Zmrca 2 en plántulas de maíz tratadas con ácido indol acético (AIA) y α -amanitina. Las gráficas representan el promedio y la desviación estándar de tres ensayos independientes realizados para cada uno de los tiempos de incubación señalados.

El análisis de la figura 16 reveló que la cantidad de ambos transcritos se mantiene casi constante a lo largo del tiempo; por lo cual se infirió que la aplicación de auxinas a las plántulas de maíz sí ocasiona un alargamiento de la vida media de los transcritos Zmrca, aunque para demostrar esto, fue necesario calcular la constante de decaimiento de cada transcrito usando la gráfica semi logarítmica que se muestra en la figura 15. Los valores de vida media calculados se resumen en la tabla 5.

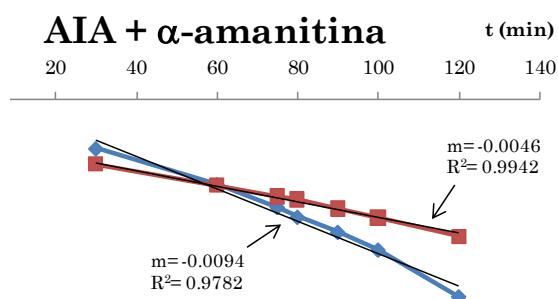


Figura 15. Estimación de la constante de decaimiento en plántulas de maíz incubadas con ácido indol acético (AIA) y α -amanitina. Gráfica semi logarítmica de la abundancia de mRNA en función del tiempo. m simboliza la pendiente de cada línea o la k de decaimiento del transcrito en cuestión. R^2 es el coeficiente de las regresiones lineales mostradas como líneas más delgadas.

Tabla 5. Estimación de la vida media de Zmrca 1 y Zmrca 2 en todos los tratamientos analizados

Transcrito	control t ½ (min)	α-amanitina t ½ (min)	AIA + α- amanitina t ½ (min)
Zmrca 1	136 ± 41	37 ± 9	85 ± 33
Zmrca 2	116 ± 16	27 ± 15	178 ± 69

Los resultados demuestran que la aplicación de ácido indol acético a plántulas de maíz, favorece la prolongación de la vida media de los transcritos Zmrca, desde aproximadamente 30 minutos hasta alrededor de los 100 minutos, según los datos obtenidos en las plántulas tratadas con α-amanitina en ausencia y en presencia de auxinas.

El análisis estadístico de los resultados mediante la prueba t de student reveló que entre tratamientos, la acumulación de Zmrca 1 y Zmrca 2 sí muestra diferencia significativa a un nivel de probabilidad de 0.05, siendo que la inhibición de la transcripción promueve un abrupto descenso en el contenido celular de Zmrca 1 y Zmrca 2, y la presencia de auxinas en la plántula amortigua tal efecto.

Éstos resultados también indican que el incremento en la acumulación de los transcritos Zmrca, es un efecto selectivo del estímulo hormonal de auxinas, y aunque el grado de respuesta de cada mensajero es diferente –por ejemplo en el caso del transcrito GST-, AIA puede provocar cambios en la abundancia de los mRNAs analizados.

DISCUSIÓN

1. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DEL PROCESO DE TRANSCRIPCIÓN SOBRE LA ACUMULACIÓN DE LOS TRANSCRITOS *Zmrca*. ESTIMACIÓN DE SU VIDA MEDIA

La degradación del mRNA *in vivo* obedece a una cinética de primer orden, es decir, su velocidad de decaimiento es proporcional a su constante de decaimiento y a su concentración celular. Usualmente es más fácil entender el decaimiento del mRNA en términos de tiempo, por ello, la estabilidad de un mRNA se reporta como vida media, que corresponde al tiempo requerido para que la mitad del RNA existente sea degradado. (Belasco y Brawerman, 1993).

Las velocidades de degradación del mRNA pueden variar mucho en una célula, por ejemplo en *E. coli*, la vida media de sus mRNAs puede ser tan corta como 20 a 30 segundos o bien 50 minutos y hasta de 2 a 4 horas. Comúnmente las bacterias muestran periodos promedio de vida media menores (0.5 a 50 min) que los RNAs de células en vertebrados, los cuales exhiben en promedio una vida media de varias horas pero puede variar desde 15 minutos hasta algunas semanas (revisado en Belasco y Brawerman, 1993).

En las células de las plantas, la mayoría de los transcritos tienen vidas medias de varias horas aunque también se han reportado mRNAs inestables tales como el transcrito que codifica para un fitocromo en avena y los propios SAURs entre otros. En general, se consideran como RNAs inestables aquellos que muestran una vida media menor o cercana a los 60 minutos (Green, 1993).

Los resultados presentados en este trabajo de investigación demuestran que los transcritos *Zmrca 1* y *Zmrca 2* exhiben una vida media similar entre ellos, con una duración menor a 60 minutos.

Este parámetro nos permite clasificar a los transcritos *Zmrca*, como RNAs mensajeros inestables.

La funcionalidad de los elementos DST como determinantes de inestabilidad de las moléculas de mRNA se ha comprobado en repetidas ocasiones, por citar un ejemplo el trabajo de Preetmoninder *et al.* 2005 describe cómo los niveles de mRNA de los genes CCL y SEN1 en *dst1* -plantas mutantes de *Arabidopsis* con fallas en la degradación mediada por DST- , muestran patrones inusuales de decaimiento tardío, que ocasionan alteraciones en la oscilación circadiana habitual de dichos transcritos.

En el caso particular del maíz (Ayala *et al.*, 2004), los elementos DST encontrados no corresponden totalmente con las características típicas de tamaño y separación entre motivos que muestran los transcritos SAUR (ver Figura 6). Sin embargo, los resultados presentados en este trabajo sugieren fuertemente que aunque se trata de elementos DST atípicos, estos sí logran promover la inestabilidad de los transcritos *Zmrca*, tal como se ha reportado para los motivos DST de otros transcritos. Aunque sería necesario contar con plantas que carezcan de estas secuencias para demostrar de manera inequívoca que los transcritos *Zmrca* son inestables debido a los elementos DST que contienen.

De acuerdo con los resultados publicados por Newman y colaboradores en 1993, la inserción de varias copias de elementos DST en la región 3'UTR de genes reporteros en células de tabaco, favorece notablemente la velocidad de degradación de los transcritos. Sin embargo, aunque sus experimentos probaron que ese mismo efecto podría ocurrir en plantas transgénicas de tabaco, existe la posibilidad de que *in vivo*, en las plantas normales podría no ser necesaria la presencia de varias copias de elementos DST para conferir inestabilidad a los transcritos que los contienen.

Al respecto, se ha documentado que no es inusual encontrar que copias múltiples de un solo elemento regulatorio son necesarias para maximizar su función en un contexto extraño o alterado. Por ejemplo, en plantas transgénicas se requieren múltiples copias del elemento box II del gen *rbcS-3A* de chícharo para conferir propiedades responsivas a la luz a derivados de un promotor viral, mientras que los

derivados del gen *rbS-3A* son regulados por la luz con sólo una copia de box II (Lam y Chua, 1990). Por otra parte, en el *enhancer* (intensificador o estimulador) del virus 40 de simio *SV40*, la duplicación de un dominio funcional puede compensar la pérdida de otro (revisado en Newman *et al.*, 1993).

Los resultados del análisis de vida media en los transcritos *Zmrca* demuestran que aunque *Zmrca1* carece de las dos copias del subdominio DST III que el transcrito *Zmrca 2* sí tiene, (ver figura 4) ambos decaen con velocidades similares; ello podría sugerir que sólo una copia de los subdominios DST I y II es suficiente para señalar a los transcritos *Zmrca* como RNAs mensajeros de alto recambio.

El recambio de mRNA es un importante componente regulador de la expresión genética. En muchos casos la cantidad de mRNA parece estar determinada más por su velocidad de decaimiento que por su velocidad de transcripción. En algunas ocasiones un mRNA abundante tiene una transcripción lenta, mientras que un mRNA escaso se puede derivar de una transcripción más rápida (Peltz *et al.*, 1991).

En las figuras 10 y 15 se puede notar que al detener la síntesis de mRNA con α -amanitina el contenido de *Zmrca 1* y *Zmrca 2* disminuye drásticamente sugiriendo con ello que la abundancia de los transcritos *Zmrca* es regulada de forma importante tanto por su velocidad de transcripción como por su velocidad de degradación.

La expresión genética es un proceso muy complejo, controlado a diferentes niveles. La regulación transcripcional ha recibido mucha atención y es probablemente el mecanismo más entendido a nivel molecular. Sin embargo, los eventos transcripcionales no explican en su totalidad la expresión de diversos genes, lo cual no es sorprendente considerando que después de que se ha sintetizado un transcrito, este es susceptible a eventos regulatorios, tales como procesamiento, exportación, unión a ribosomas, traducción o degradación (revisado en Belasco y Brawerman, 1993).

Actualmente, se desconocen los eventos transcripcionales que influyen en la abundancia de los transcritos *Zmrca*, y en ese sentido, dado que la secuencia 5'UTR del gen *Zmrca 2* y las secuencias adyacentes a cada gen *Zmrca* se desconocen

todavía, no se excluye la posibilidad de que respondan a diferentes elementos de regulación localizados en sus extremos 5'UTR, (Ayala *et al.*, 2004).

La regulación post-transcripcional a nivel de estabilidad del mRNA es una forma potencialmente rápida de alterar la expresión genética, lo cual parece ser un proceso del que se benefician considerablemente las plantas porque para sobrevivir como organismos incapaces de desplazarse en busca de condiciones ambientales idóneas, las plantas deben tener la habilidad de ajustar rápidamente sus patrones de expresión génica en respuesta a los cambios en su entorno (Abler y Green, 1996).

En este contexto, podemos advertir que la presencia de los motivos DST en la secuencia de los mRNAs que codifican para Rubisco activasa de maíz, es una característica intrínseca que podría ser responsable de regular su expresión ante diversos cambios en las condiciones ambientales y/o fisiológicas.

2. EFECTO DE AUXINAS (ÁCIDO INDOL ACÉTICO) SOBRE LA ACUMULACIÓN DE LOS TRANSCRITOS *Zmrca*

Los resultados mostrados en la figura 15 indican de acuerdo con la hipótesis planteada, que la aplicación de ácido 3-indol acético a plántulas de maíz, sí promueve la acumulación de los transcritos *Zmrca*.

Una propiedad de todos los transcritos que contienen motivos DST, es que las auxinas pueden inducir su abundancia celular (Mc Clure *et al.*, 1989, Van der Zaal *et al.*, 1991). Si bien no podemos descartar que en la región 5' UTR de los genes *Zmrca* haya elementos responsivos a auxinas.

Las investigaciones recientes acerca de la vía de señalización mediada por auxinas, indican que estas actúan principalmente a nivel de control transcripcional (Dharmasiri *et al.* 2005, Kepinski y Leyser 2005).

En ese sentido, los resultados del análisis northern – blot en plántulas de maíz tratadas con α -amanitina demuestran que el proceso activo de transcripción determina en buena medida la acumulación de los transcritos *Zmrca*. Sin embargo, los mismos análisis demuestran que la acumulación celular de los transcritos *Zmrca*

también está influida de forma importante por la estabilidad de sus mRNAs (ver tratamientos con α -amanitina, figuras 10 y 15).

Para varios de los genes SAURs, ha sido demostrado que el efecto de auxinas está mediado al menos en parte a nivel de la transcripción (Franco *et al.*, 1990) Sin embargo, esas conclusiones no eliminan la posibilidad de que las auxinas también actúen para retardar el decaimiento de los mRNAs; los resultados aquí presentados de la cuantificación de los transcritos Zmrca en las plántulas tratadas con ácido indol acético demuestran que la aplicación de auxinas modifica la velocidad de decaimiento de Zmrca 1 y Zmrca 2, logrando con ello que la vida media de ambos se prolongue (ver tratamiento AIA + α - amanitina, figura 15).

De este modo, si las secuencias DST funcionan como desestabilizadoras de los mRNAs, el efecto de estabilización provocado por auxinas puede constituir un método para facilitar ajustes rápidos en la expresión genética de las plantas superiores en respuesta a los cambios en los niveles de auxinas.

Al respecto, se conocen patrones circadianos de variación de diferentes fitohormonas. Por ejemplo en el caso de la planta de tabaco cuando se midieron por HPLC los niveles de citocininas, auxinas y ácido absísico durante un ciclo circadiano, se demostró que éstos oscilan durante el día, presentando la máxima acumulación de ácido 3-indol acético a 9 horas del inicio del periodo luminoso (Novácova *et al.*, 2005); sin embargo, este patrón puede variar entre especies y/o entre diferentes condiciones ambientales, porque los niveles de auxinas en las plantas responden a la interacción entre las señales ambientales como la luz (Jones *et al.* 1991) y los factores endógenos que maximizan su percepción, como los receptores de auxinas.

El análisis de vida media de los transcritos Zmrca en presencia de auxinas, muestran un cambio significativo de estabilidad en comparación con los análisis control (ver tabla 5).

Esta observación nos indica que el incremento en la acumulación celular de los transcritos Zmrca cuando las plántulas de maíz son estimuladas con auxinas se debe en parte al alargamiento de su vida media, sin dejar de lado la posibilidad de que también haya cambios en su regulación transcripcional. Lo que nos conduce a

proponer que la acumulación de Zmrca 1 y Zmrca 2 es el producto de una compleja coordinación entre los procesos transcripcional y post-transcripcional.

Los resultados aquí mostrados sugieren fuertemente la posibilidad de implementar un tratamiento que incluya la aplicación de ácido indol acético a plantas de maíz en etapas cruciales de crecimiento para favorecer la acumulación de los transcritos Zmrca, con la consecuente sobre-expresión de Rubisco activasa, lo cual eventualmente favorecería la fijación de CO₂ y por lo tanto la fuente de carbono que se requiere para incrementar la biomasa de la planta, con el beneficio adicional de favorecer la descontaminación del ambiente.

Este planteamiento, se fundamenta también en resultados preliminares de este laboratorio (Pérez-Muñoz, 2007), en los cuales se ha demostrado -con análisis Western-blot-, que la aplicación externa de ácido indol acético (5 y 50 µM) a plántulas de maíz, estimula el aumento de la expresión de Rubisco activasa, en especial la formación de la isoforma de 41 kDa, la cual está relacionada con el incremento de su actividad chaperona (Vargas *et al.*, 2004).

Del mismo modo, los resultados de Morales *et al* (1999) demostraron que en plantas adultas de maíz con alto contenido de Rubisco activasa, tienen una tasa de fotosíntesis neta significativamente mayor que en plantas con menor expresión de Rubisco activasa.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos, las principales conclusiones de este trabajo de investigación, son:

- ▶ Los mRNAs Zmrca 1 y Zmrca 2, son transcritos que contienen elementos DST y presentan tiempos de vida media cortos, sugerente de que los elementos DST les confieren la característica de inestabilidad propia de los mensajeros SAUR's.

- ▶ La vida media calculada de los transcritos Zmrca 1 y Zmrca 2 tiene un valor de 37 ± 9 min y 27 ± 15 min respectivamente.

- ▶ La respuesta de acumulación de Zmrca 1 y Zmrca 2 es semejante entre sí.

- ▶ La abundancia celular de los transcritos Zmrca está determinada de forma importante, tanto por sus velocidades de transcripción, como por sus velocidades de degradación.

- ▶ En las plántulas de maíz, el estímulo hormonal de auxinas, induce procesos que dan lugar al incremento de la vida media de los transcritos Zmrca.

BIBLIOGRAFÍA

Abler M.L., Green P.J. (1996) Control of mRNA stability in higher plants. *Plant Molecular Biology* **32** (1-2): 63-78

Ayala-Ochoa A., Vargas-Suárez M., Loza-Tavera H., León P., Jiménez-García L., Sánchez-de-Jiménez E. (2004) In maize, two distinct ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase transcripts have different day/night patterns of expression. *Biochimie* **86**:439-449

Belasco J.G., Brawerman G. (1993) Control of messenger RNA stability. Edit. Academic, Press, Inc. pp. 475 - 493

Chen Y., Hunter-Ensor M., Scotland P., Sehgal A. (1998) Alterations of per RNA in noncoding regions affect periodicity of circadian behavioral rhythms. *Journal of Biology Rhythms* **13**: 364-379

DeRidder B.P., Salvucci M.E. (2007) Modulation of rubisco activase gene expression during heat stress in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) involves post-transcriptional mechanisms. *Plant Science* **172**: 246 – 254

De Mercoyrol L., Job C., Job D. (1989) Studies on the inhibition by α -amanitin of single-step addition reactions and productive RNA synthesis catalysed by wheat-germ RNA polymerase II. *The Biochemical Journal* **258**: 165-169

Dharmasiri N., Dharmasiri S., Estelle M. (2005) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**: 441-445

Dixon D.P., Cole D.J., Edwards R. (1998) Purification, regulation and cloning of glutathione transferase (GST) from maize resembling the auxin-inducible type-III GSTs. *Plant Molecular Biology* **36**: 75 - 87

Ellis R.J. (1979) The most abundant protein in the world. *Trends in Biochemical Sciences* **4**: 241-244

Ellis R.J., van der Vies S.M. (1991) Molecular chaperones. *Annual Review Biochemistry* **60**: 321-347

Evans Michael L. (1974) Rapid responses to plant hormones. *Annual Review Plant Physiology* **25**: 195-223

Franco A.R., Gee M.A., Guilfoyle T.J. (1990) Induction and superinduction of auxin-responsive mRNAs with auxin and protein synthesis inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry* **265**: 15845-15849

- Feldbrügge M., Arizti P., Sullivan M.L., Zamore P.D., Belasco J.G., Green P.J.** (2001) Comparative analysis of the plant mRNA-destabilizing element, DST, in mammalian and tobacco cells. *Plant Molecular Biology* **49**: 215-223
- Furbank R.T., Taylor W.C.** (1995) Regulation of photosynthesis in C₃ and C₄ plants: A molecular approach. *The Plant Cell* **7**: 797-807
- Gardner M.J., Hubbard K.E., Hotta C.T., Dodd A.N., Webb A.A.** (2006) How plants tell the time. *Biochemical Journal* **397** (1): 15 - 24
- 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
- Green P.J.** (1993) Control of mRNA stability in higher plants. *Plant Physiology* **102**: 1065-1070
- Gifford R.M., Evans L.T.** (1983) Photosynthesis, carbon partitioning and yield. *Annual Review Plant Physiology* **32**: 485-509
- Guilfoyle T.** (2007) Sticking with auxin. *Nature* **446**: 621-622
- Gutierrez R.A., Ewing R.M., Cherry J.M., Green P.J.** (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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* **99**: 11513-11518
- Hanson P.I., Whiteheart S.W.** (2005) AAA⁺ proteins: Have engine, will work. *Molecular Cell Biology* **6**: 519-529
- Jones A.M., Cochran D.S., Lamerson P.M., Evans M.L., Cohen J.D.** (1991) Changes in the abundance of indolacetic acid and a 22 kilodalton auxin-binding protein in the maize mesocotyl. *Plant Physiology* **97**: 352-358
- Kepinski S., Leyser O.** (2005) The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**: 446- 451
- Lam E., Chua N.H.** (1990) GT-binding site confers light responsive expression in transgenic tobacco. *Science* **248**: 471-474
- Law R.D., Crafts-Brandner S.J.** (2001) High temperature stress increases the expression of wheat leaf ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase protein. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **386**: 261-267
- Lilley R.M., Portis A.R.** (1997) ATP hydrolysis activity and polimerization state of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxigenase activase. *Plant Physiology* **114**: 605-613
- Lorimer G.H., Miziorko H.M.** (1980) Carbamate formation on the α -amino group of a lysyl residue as the basis for the activation of ribulose bisphosphate carboxylase by CO₂ and Mg²⁺. *Biochemistry* **19**: 5321 - 5328

- Majercak J., Sidote D., Hardin P.E., Edery I.** (1999) How a circadian clock adapts to seasonal decreases in temperature and day length. *Neuron* **24**: 219-230
- McClure B.A., Guilfoyle T.J.** (1987) Characterization of a class of small auxin-inducible soybean polyadenylated RNAs. *Plant Molecular Biology* **9**: 611-623
- McClure B.A., Guilfoyle T.J.** (1989) Rapid redistribution of auxin regulated RNAs during gravitropism. *Science* **243**: 91 - 93
- McClure B.A., Hagen G., Brown C.S., Gee M.A., Guilfoyle T.J.** (1989) Transcription, organization and sequence of an auxin-regulated gene cluster in soybean. *The Plant Cell* **1**: 229-239
- Mignone F., Gissi C., Liuni S., Pesole G.** (2002) Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biology* **3** (3): 1-9
- Morales A., Ortega-Delgado M.L., Molina-Galán J., Sánchez de Jiménez E.** (1999) Importance of rubisco activase in maize productivity based on mass selection procedures. *Journal of Experimental Botany* **50**: 823-829
- Napier R.M., David K.M., Perrot-Rechenmann C.** (2002) A short history of auxin binding proteins. *Plant Molecular Biology* **49**: 339-348
- Newman T.C., Ohme-Takagi M., Taylor C.B., Green P.J.** (1993) DST sequences, highly conserved among plant SAUR genes, target reporter transcripts for rapid decay in tobacco. *The Plant Cell* **5**: 701-714
- Novácova M., Motyka V., Dobrev P.I., Guadinová A., Vankova R.** (2005) Diurnal variation of cytokinin, auxin and abscisic acid levels in tobacco leaves. *Journal of Experimental Botany* **56** (421): 2877-2883
- Ohme-Takagi M., Taylor C.B., Newman T.C., Green P.J.** (1993) The effect of sequences with high AU content on mRNA stability in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* **90**: 11811-11815
- Peltz S.W., Brewer G., Bernstein P., Hart P.A., Ross J.** (1991) Regulation of mRNA turnover in eukariotic cells. *Critical Review. Eukariotic Gene Expression* **1**(2): 99 – 126
- Pérez-Amador M.A., Lidder P., Johnson M.A., Landgraf J. and Wisman E.** (2001) New molecular phenotypes in the *dst* mutants of *Arabidopsis* revealed by DNA microarray analysis. *The Plant Cell* **13**: 2703-2717
- Pérez-Muñoz R.** (2007) Efecto de auxinas en la estabilización de los dos transcritos de Rubisco activasa en plantas de maíz. Tesis de Licenciatura UNAM. Facultad de Química.
- Portis A.R.** (2001) The Rubisco activase-Rubisco system: an ATPase-dependent association that regulates photosynthesis. In: McManus M.T., Laing W.L. and Allen A. C. *Protein Interactions in Plant Biology*, pp 30-52. Sheffield Academic Press, Sheffield, England

- Portis A.R.** (2003) Rubisco activase-rubisco's catalytic chaperone. *Photosynthesis Research* **75**: 11-27
- Portis A.R., Li C., Wang D., Salvucci M.E.** (2007) Regulation of rubisco activase and its interaction with rubisco. *Journal of Experimental Botany* **59** (7): 1597-1604
- Portis A.R., Salvucci M.E., Ogren W.L.** (1986) Activation of ribulosebiphosphate carboxylase/oxygenase at physiological CO₂ and ribulosebiphosphate concentrations by rubisco activase. *Plant Physiology* **82**: 967-971
- Preetmoninder L., Gutiérrez R.A., Salomé P.A., McClung R., Green P.J.** (2005) Circadian control of messenger RNA stability. Association with a sequence-specific messenger RNA decay pathway. *Plant Physiology* **138**: 2374-2385
- Quian J., Rodermeil S.R.** (1993) Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase cDNAs from *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiology* **102**: 683-684
- Robinson S.P., Portis A.R.** (1989) Adenosine triphosphate hydrolysis bypurified Rubisco activase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **268**: 93-99
- Rokka A., Zhang L., Aro E.M.** (2001) Rubisco activase: an enzyme with a temperature-dependent dual function? *Plant Journal* **25**: 463-471
- Runle S.J., Zielinski R.E.** (1991) Organization and expression of two tandemly oriented genes encoding ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase in barley. *Journal Biology Chemistry* **266**: 4677-4685
- Salvucci M.E., Werneke J.M., Ogren W.L., Portis A.R.** (1987) Purification and species distribution of rubisco activase. *Plant Physiology* **84**: 930-936
- Salvucci M.E.** (1992) Subunit interactions of rubisco activase-polyethylene glycol promotes self-association, stimulates ATPase and activation activities, and enhances interactions with rubisco. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **298**: 688-696
- Salvucci M.E., Ogren W.L.** (1996) The mechanism of rubisco activase: Insights from studies of the properties and structure of the enzyme. *Photosynthesis Research* **47**: 1-11
- Salvucci M.E., van de Loo F.J., Stecher D.** (2003) Two isoforms of rubisco activase in cotton, The products of separate genes not alternative splicing. *Planta* **216**: 736-744
- Sánchez de Jiménez E., Aguilar R.** (1984) Protein Synthesis Patterns. *Plant Physiology* **75**: 231-234
- Sánchez de Jiménez E., Medrano L., Martínez-Barajas, E.** (1995) Rubisco activase, a possible new member of the molecular chaperone family. *Biochemistry* **34**: 2826-2831
- Somerville C.R., Portis A.R., Ogren, W.L.** (1982) A mutant of *Arabidopsis thaliana* wich lacks activation of RuBP carboxylase in vivo. *Plant Physiology* **70**: 381-387

Spreitzer R.J., Salvucci M.E. (2002) Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. *Annual Review of Plant Biology* **53**: 449-475

Steffen A. (2007) Auxin is surfacing. *ACS Chemical Biology* **2**(6): 380-384

Tan X., Calderón-Villalobos L.I.A., Sharon M., Zheng C., Robinson C.V., Estelle M., Zheng N. (2007) Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* **446**: 640-645.

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

Vargas-Suárez M., Ayala-Ochoa A., Lozano-Franco J., García-Torres I., Díaz-Quiñones A., Ortiz-Navarrete V.F., Sánchez de Jiménez E. (2004) Rubisco activase chaperone activity is regulated by a post-translational mechanism in maize leaves. *Journal of Experimental Botany* **55**(408): 2533-2539

Wang Y., Chih Long Liu, Storey J.D., Tibshirani R.J., Herschlag D., Brown P. (2002) Precision and functional specificity in mRNA decay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* **99**: 5860-5865

Werneke J.M., Chatfield J.M., Ogren W.L. (1989) Alternative mRNA splicing generates the two ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase activase polypeptides in spinach and *Arabidopsis*. *Plant Cell* **1**: 815-825

Wolosiuk R.A., Ballicora M.A., Hagelin K. (1993) The reductive phosphate cycle for photosynthetic CO₂ assimilation: enzyme modulation. *FASEB Journal* **7**: 622 - 637

Woodward A.W., Bartel B. (2005) Auxin: Regulation, Action and Interaction. *Annals of Botany* **95**: 707-735

Zhang Z., Komatsu S. (2000) Molecular cloning and characterization of cDNAs encoding two isoforms of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase in rice (*Oryza sativa L.*) *Journal Biochemistry* **128**: 383-389