

00581

2

2Ej

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**"EN BUSCA DE GENES REGULADOS POR BENCILADENINA DURANTE
LA GERMINACIÓN DE MAÍZ: PCNA COMO MODELO DE ESTUDIO"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS (BIOQUÍMICA)

PRESENTA:

MARIA IMELDA LOPEZ VILLASEÑOR

México D.F., mayo de 1995.

FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

Este trabajo fue realizado bajo la dirección de los siguientes asesores:

Asesor nacional: Dr. Jorge Vázquez Ramos, en el Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM.

Asesor extranjero: Dr. Patrick J. Hussey, en: The School of Biological Sciences, Royal Holloway, University of London.

JURADO ASIGNADO:

Presidente:	Dra. Irma Bernal Lugo
Primer Vocal:	Dra. Carmen Gómez
Segundo Vocal:	Dr. Baltazar Becerril
Tercer Vocal:	Dra. Alejandra Covarrubias
Secretario:	Dr. Fernando Montiel
Primer Suplente	Dra. Marina Gavilanes
Segundo Suplente:	Dr. Luis Servín

A MI HIJO

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Jorge Vázquez y al Dr. Patrick Hussey, por la dirección de esta Tesis.

A la Dirección General de Asuntos para el Personal Académico (DGAPA), UNAM, y al Consejo Británico por las becas otorgadas.

A los miembros del jurado.

A Roberto por su paciencia, apoyo y cariño.

A mis padres.

A mis compañeros de laboratorio.

A mi familia y amigos.

INDICE

i. Resumen

ii. Abstract

Capítulo I. Introducción

- 1.1 Las plantas productoras de semillas: Angiospermas y Gimnospermas
- 1.2 Germinación
- 1.3 Hormonas vegetales ó fitorreguladores
 - 1.3.1 Auxinas
 - 1.3.2 Giberelinas
 - 1.3.3. Citocininas
- 1.4 Algunas consideraciones acerca del ciclo celular durante la germinación de ejes embrionarios de maíz
- 1.5 Antecedentes de nuestro grupo de trabajo
- 1.6 Hipótesis
- 1.7 Objetivos
- 1.8 Estrategias experimentales

Capítulo II. Hibridación sustractiva: una estrategia para buscar secuencias reguladas por benciladenina durante la germinación de ejes embrionarios de maíz.

- 2.1 Objetivos particulares
- 2.2 Materiales y métodos
 - 2.2.1 Material biológico
 - 2.2.2 Tratamiento de los ejes embrionarios de maíz con la citocinina sintética benciladenina
 - 2.2.3 Aislamiento de RNA total y RNA mensajero
 - 2.2.3.1 Precauciones para trabajar con RNA
 - 2.2.3.2 Aislamiento de RNA total
 - 2.2.3.3 Aislamiento de RNA mensajero
 - 2.2.3.4. Estimación del rendimiento, pureza e integridad del RNA

- 2.2.4 Construcción de una biblioteca de cDNA en Lambda gt11
 - 2.2.4.1 Síntesis de la primera cadena de cDNA
 - 2.2.4.2 Síntesis de la segunda cadena de cDNA
 - 2.2.4.3 Análisis de la primera y segunda cadenas de cDNA
 - 2.2.4.4 Metilación de sitios internos de EcoRI
 - 2.2.4.5 Reparación de los extremos del cDNA
 - 2.2.4.6 Fosforilación de los adaptadores de EcoRI
 - 2.2.4.7 Ligación de los adaptadores de EcoRI al cDNA
 - 2.2.4.8 Digestión de los adaptadores de EcoRI del cDNA con la enzima EcoRI
 - 2.2.4.9 Eliminación de los adaptadores digeridos de EcoRI
 - 2.2.4.10 Ligación del cDNA en Lambda gt11
 - 2.2.4.11 Empaquetamiento del cDNA clonado en Lambda gt11
 - 2.2.4.12 Titulación de la biblioteca de cDNA
 - 2.2.4.13 Estimación del tamaño de los insertos de la biblioteca de cDNA
- 2.2.5 Hibridación sustractiva de la biblioteca de cDNA y aislamiento de clonas "positivas"
 - 2.2.5.1 Preparación de la sonda sustraída
 - 2.2.5.2 Hibridación *in situ* de la biblioteca de cDNA de ejes embrionarios de maíz
- 2.2.6 Análisis de mRNAs por "Northern blot"
- 2.2.7 Marcaje de las sondas radiactivas.
- 2.3 Resultados
 - 2.3.1 Construcción de una biblioteca de cDNA de ejes embrionarios de maíz en lambda gt11
 - 2.3.1.1 Título de la biblioteca de cDNA
 - 2.3.1.2 Estimación del tamaño de los insertos de cDNA de la biblioteca
 - 2.3.2 Hibridación sustractiva de la biblioteca de cDNA y aislamiento de clonas "positivas"
 - 2.3.3 Caracterización de las clonas "positivas"
 - 2.3.4 Cinética de expresión de los RNA mensajeros de las clonas 2, 4, 8 y 11

Capítulo III: PCNA como modelo para estudiar el efecto de benciladenina durante la germinación de ejes embrionarios de maíz.

3.1 Introducción

3.1.1 Consideraciones sobre la replicación del DNA.

3.1.2 El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA)

3.2 Objetivos particulares

3.3 Métodos

3.4 Resultados

3.4.1 Artículo 1: "Molecular cloning of a maize cDNA clone encoding a putative proliferating cell nuclear antigen".

3.4.2 Artículo 2: "A maize cDNA clone encoding a second putative proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Its possible regulation by cytokinins"

Capítulo IV

4.1 Discusión

4.2 Conclusiones

Bibliografía

RESUMEN

Las citocininas son un grupo de fitorreguladores (hormonas vegetales) que promueven la división celular. Hasta la fecha se desconoce el mecanismo de acción de estas hormonas. Este trabajo se ha encaminado a identificar genes cuya expresión esté regulada por una citocinina (benciladenina, BA) durante la germinación de ejes embrionarios de maíz.

Se siguieron dos estrategias: La hibridación sustractiva por una parte, y por la otra la clonación de un gene involucrado en el metabolismo del DNA y el análisis del efecto de BA sobre su expresión.

a) Se construyó una biblioteca de cDNA en el vector λ gt11 a partir de ejes embrionarios de maíz embebidos por 5 horas en presencia de BA. Se hibridó una alícuota de esta biblioteca con una sonda sustraída capaz de seleccionar aquellos transcritos inducidos en su expresión por BA. Las clonas positivas fueron aisladas y usadas como sondas en experimentos tipo Northern con el fin de determinar la expresión del gene durante las primeras 7.5 h de germinación de maíz. No se encontró diferencia entre la cantidad de transcrito entre el tejido tratado con BA y aquel que no recibió la hormona.

b) Se aislaron y secuenciaron dos clonas diferentes de cDNA de PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular, una proteína que estimula la actividad de la DNA polimerasa). El análisis del RNA mediante ensayos tipo Northern mostró que los dos genes de PCNA se expresan en tejidos en proliferación. Se analizó la expresión de PCNA durante las primeras 24 horas de germinación de ejes embrionarios de maíz en presencia y ausencia de BA. No se encontró diferencia en la cantidad de mensaje presente entre los embriones tratados y los control durante las primeras 15 horas de germinación. Sin embargo, a las 24 horas de germinación, los embriones tratados con BA acumularon 17 veces más transcrito que los embriones control. Estos datos sugieren que BA estimula la transcripción y/o acumulación del transcrito de PCNA.

ABSTRACT

Cytokinins are a group of phytohormones (plant hormones) that promote cell division. It is not known yet the mechanism by which these hormones act. Our aim in this work is to identify genes whose expression is regulated by a cytokinin (benzyladenine, BA) during the germination of maize embryonic axes.

Two approaches were used: First, a subtractive hybridization, and second, the cloning of a gene involved in DNA metabolism and the analysis of the effect of BA on its expression.

a) A cDNA library was constructed in the vector λ gt11, using mRNA isolated from maize embryonic axes imbibed during 5 h in BA. The library was hybridized with a subtracted probe, which would allow us the selection of mRNAs whose expression was induced by BA. Several positive clones were isolated and used as probes in Northern experiments. No difference was observed in the amount of transcripts between the tissues germinated with or without BA.

b) Two different cDNA clones of PCNA (proliferating cell nuclear antigen, an auxiliary factor of DNA polymerase) were isolated and sequenced. Northern analysis showed that both clones are expressed in proliferating tissues. PCNA expression was analyzed during the first 24 h of germination of maize embryonic axes in the presence or absence of BA. No difference was found in the amount of RNA between both populations during the first 15 h of germination. Nevertheless, at 24 h of germination BA-treated axes showed 17 times more transcript than the controls. These data suggest that BA stimulates the transcription and/or accumulation of the PCNA transcript during early maize germination.

CAPITULO I.

INTRODUCCION.

1.1 Las plantas productoras de semillas: Angiospermas y Gimnospermas.

Una de las innovaciones mas dramáticas que surgieron durante la evolución de las plantas vasculares fue la semilla, ya que permitió la dominancia de las plantas que producían semillas en la flora de nuestros días, una dominancia que ha sido cada vez mayor en un período de varios millones de años. Las semillas poseen importantes atributos de supervivencia como son el desarrollo de un embrión dentro de la semilla antes de dispersarse, y un almacén de reservas alimenticias que dará al embrión buenas oportunidades de sobrevivir (Raven *et al.*, 1986).

Las plantas que producen semillas se dividen en gimnospermas y angiospermas.

El significado literal del nombre gimnosperma es "semilla desnuda", y agrupa a las plantas que poseen semillas expuestas en estructuras que carecen de fruto. Las gimnospermas comprenden cuatro divisiones: Ginkophyta, Cycadophyta, Gnetophyta y Coniferophyta. Las plantas comprendidas dentro de las tres primeras divisiones no son muy abundantes, pero dentro de la división coniferophyta se encuentran quizá las gimnospermas mas familiares: las coníferas, ampliamente distribuidas en los bosques de nuestro planeta. (Wallace *et al.*, 1981).

Las angiospermas, o plantas con flores, comprenden alrededor de 235,000 especies. Las angiospermas son de gran importancia tanto económica como alimenticia para el hombre: el suplemento básico de alimentos se deriva de las semillas y frutos de estas plantas. Las angiospermas incluyen dos clases: las monocotiledóneas (alrededor de 65,000 especies) y las dicotiledóneas (170,000 especies). Las principales diferencias entre estas dos clases son:

Monocotiledóneas:

Semillas con un cotiledón
Hojas con venas paralelas
Partes florales en 3 (ó múltiplos)
Haces vasculares dispersos

Dicotiledóneas:

Semillas con dos cotiledones
Hojas con venas ramificadas
Partes florales en 4 ó 5 (ó múltiplos)
Haces vasculares en arreglo cilíndrico

El ciclo de vida de las angiospermas puede verse como la alternancia de dos fases: la esporofítica (diploide) y la gametofítica (haploide). En estas plantas la fase esporofítica (vegetativa) es dominante sobre la gametofítica (reproductiva). El comienzo de la etapa reproductiva se da con la formación de la flor, en donde pueden estar contenidos ambos o uno solo de los órganos sexuales masculino y femenino. El gametofito se desarrolla en los óvulos y anteras de la flor.

Después de la división meiótica que se lleva a cabo en la estructura reproductiva femenina (óvulos), la megaspora entra a tres ciclos de división mitótica luego de los cuales el gametofito femenino haploide (megagametofito) emerge como un saco embrionario de seis células mononucleadas y una binucleada. Una de las células mononucleadas será el huevo, mientras que la binucleada dará origen al endospermo de la semilla, tejido en donde se encuentran las reservas alimenticias.

Luego de la meiosis que se lleva a cabo en las anteras (estructuras masculinas), cada microspora haploide resultante entra a una ronda de mitosis, produciendo el gametofito masculino (microgametofito) que posee dos células: la célula tubular y la célula generativa. El gametofito masculino, o grano de polen, es encapsulado en una cubierta resistente y es dispersado mediante diversos mecanismos como pueden ser el viento, los insectos, el agua, etc. hasta llegar al estigma, que es la estructura más externa del gametofito femenino. Luego de la polinización, los granos de polen germinan y el tubo polínico crece en dirección a los óvulos. Durante esta etapa, el núcleo de la célula generativa se divide por mitosis, produciendo dos espermis. Al llegar al saco embrionario, un espermis fertiliza al huevo, mientras que el otro fertiliza a la célula binucleada. La primera célula será el cigoto, mientras que la segunda se convertirá en el endospermo triploide. A continuación, el cigoto se desarrolla y forma el embrión que estará contenido en la semilla, mientras que el ovario continúa su desarrollo y se desarrolla para formar el fruto. La pared del ovario (pericarpio), generalmente se engrosa y diferencia hacia capas que son más conspicuas en frutos carnosos.

Los frutos de las monocotiledóneas (como el maíz) son diferentes de los frutos de las dicotiledóneas, y frecuentemente son confundidos y llamados semillas. Un grano de maíz parece ser una semilla, pero debido a que posee pericarpio (proveniente de la pared del ovario), el grano es en realidad un fruto que contiene una sola semilla. (Fig. 1.1)

El proceso de maduración y deshidratación es normalmente el evento terminal en el desarrollo de muchas semillas, después de lo cual pasan a un estado metabólico quiescente en el que pueden permanecer varios días o años sin perder su viabilidad. Después de que la semilla se hidrata en condiciones favorables, comienza la germinación.

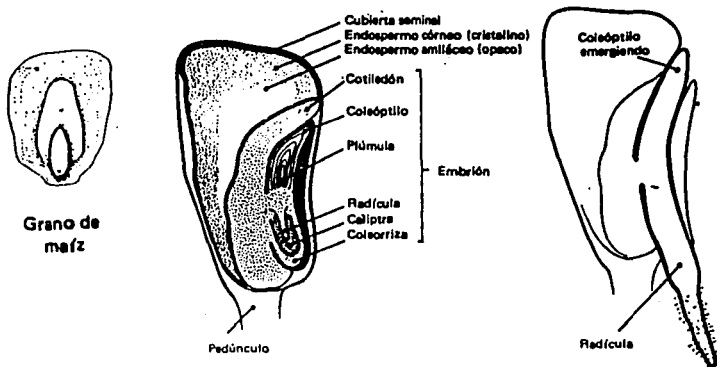


Fig. 1.1 Estructura de un grano de maíz.

1.2 Germinación

Entre los diferentes estados de desarrollo de una planta, la germinación representa un proceso de diferenciación en donde el núcleo celular sufre cambios que lo llevan de un metabolismo muy bajo hasta una actividad completamente restablecida. En embriones quiescentes, la síntesis de macromoléculas y la división nuclear se han detenido, pero estas actividades se reanudan de manera secuencial durante las primeras horas después de iniciarse la imbibición (Rejman and Buchowicz, 1971; Dobrzanska *et al.*, 1973; Deltour and Jacquard, 1974)

La germinación de una semilla se puede ver como la serie de eventos consecutivos que provocan, en respuesta a la entrada de agua, que una semilla seca viable muestre un incremento en su actividad metabólica general e inicie el crecimiento de una plántula a partir del embrión. Durante la germinación se llevan a cabo numerosos eventos como la hidratación de proteínas, cambios estructurales subcelulares, respiración, síntesis de macromoléculas y elongación celular. En un sentido estricto, la germinación no incluye el crecimiento de la plántula, pero sí del embrión. El momento exacto en el que finaliza la germinación ha sido causa de polémicas, pero en general se ha considerado que la germinación culmina con la protrusión de una parte del embrión, que frecuentemente es la radícula. Este evento puede ser el resultado de la elongación celular, la división celular, o de ambos (Mayer and Poljakoff-Mayber, 1989).

Durante la germinación de una semilla se llevan a cabo eventos fundamentales que preparan al embrión para el crecimiento y desarrollo de la planta, como son:

a. Imbibición.

La toma de agua por la semilla es el paso inicial y esencial para la germinación. La cantidad de agua que entra a la semilla durante la imbibición es generalmente de dos o tres veces el peso seco de la semilla. La cinética de la toma de agua por la semilla está en función tanto de las propiedades de la semilla como del entorno en el que se encuentra. La permeabilidad de la semilla depende de su morfología, estructura, composición, contenido inicial de agua y temperatura de imbibición (Bewley and Black, 1994). Durante la imbibición, los organelos y las células recuperan el tamaño y la forma que presentaban antes de comenzar la deshidratación. Ocurren cambios significativos en las membranas celulares, que pasan a ser de estructuras altamente permeables a los solutos en general, a membranas con una permeabilidad selectiva (Simon, 1984).

b. Respiración.

La respiración en las semillas maduras y secas (con un contenido de agua de 10-15%) es extremadamente baja si se compara con semillas en desarrollo o en germinación. Durante la imbibición, la respiración se reinicia con un marcado incremento en el consumo de oxígeno, posiblemente debido a que se activan e hidratan las enzimas mitocondriales involucradas en el ciclo del ácido cítrico y el transporte de electrones.

c. Síntesis de mRNA y proteínas.

La transición del estado de desarrollo al estado germinativo requiere de cambios fundamentales en el control de la expresión genética de la semilla. La expresión de los genes que codifican para las proteínas involucradas con el material de reserva se apaga, mientras que se activa la transcripción de genes que codifican para enzimas involucradas en la germinación, movilización de reservas, y el crecimiento.

Los componentes necesarios para la síntesis de proteínas están presentes en la semilla seca, incluyendo a los mRNAs. Algunos de estos mRNAs se encuentran en una forma protegida, posiblemente asociados a proteínas en el núcleo o en el citoplasma (partículas de mRNP). Los mensajeros que no están protegidos posiblemente son degradados durante las últimas etapas de la maduración de la semilla o durante la germinación temprana. La síntesis de proteínas se inicia minutos después de la hidratación de la semilla, y algunos mRNAs almacenados son utilizados para dirigir esta síntesis. Pocos minutos después de iniciarse la hidratación de la semilla se inicia la síntesis de mRNAs, y la síntesis de proteínas durante la germinación dependerá cada vez más de estos nuevos mRNAs (Bewley and Black, 1994).

d. Síntesis de DNA y división celular.

Como se mencionó anteriormente, la expansión de la radícula en la semilla ocurre inicialmente por elongación celular, y su protrusión puede o no estar acompañada por un proceso de división celular. Así, la división celular se considera como un proceso comprometido con el crecimiento y establecimiento de la plántula, que puede iniciarse alrededor del tiempo de emergencia de la radícula. Se han descrito dos fases en la síntesis de DNA después de la imbibición de embriones de maíz. Durante las primeras horas después de la imbibición se presenta una incorporación de timidina en el DNA que no está acompañada de un aumento sustancial en la cantidad total de DNA. Esta síntesis se ha atribuido tanto a una reparación del DNA, para restituir el daño provocado por el proceso de secado y almacenamiento de la semilla, como a una síntesis de DNA organelar. Posteriormente existe una segunda fase de incorporación de timidina al DNA, acompañada de un incremento en la cantidad total de DNA. Esta segunda fase se debe a la replicación

del DNA asociada a la subsecuente división celular (Bewley and Black, 1994). Una representación gráfica del tiempo aproximado en el que se llevan a cabo estos procesos durante la germinación de maíz puede verse en la figura 1.2.

1.3 Hormonas vegetales ó fitorreguladores.

Para que se lleve a cabo la germinación, se requiere que la semilla se encuentre en condiciones favorables tanto externas como internas. Entre las condiciones externas o ambientales están el suplemento adecuado de agua, temperatura, gases y luz. (Mayer and Poljakoff-Mayber, 1989). Los factores internos, que actúan no sólo en la germinación sino a todo lo largo del desarrollo y crecimiento de la planta, son los fitorreguladores u hormonas vegetales

Los fitorreguladores son mensajeros químicos que promueven el crecimiento integral de la planta y regulan su comportamiento metabólico durante la germinación y desarrollo. Se han identificado 5 clases de fitorreguladores: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno. En términos generales, las auxinas y giberelinas se han clasificado como reguladores de la elongación celular, las citocininas como reguladores de la división celular, mientras que el ácido abscísico y etileno como inhibidores del crecimiento.

1.3.1 Auxinas.

Las auxinas son un grupo de hormonas, naturales y sintéticas, que regulan varios procesos del crecimiento y desarrollo en plantas superiores. La aplicación exógena de auxinas a plantas, órganos o células vegetales en cultivo afecta de manera dramática la elongación celular, así como la división celular y la morfogénesis. Los eventos bioquímicos y moleculares involucrados en la respuesta a auxinas no se conocen completamente (Raven et. al., 1986). Se ha propuesto que las auxinas tienen dos efectos diferentes en el proceso de elongación celular: un efecto rápido inicial en el que se incrementa la plasticidad de la pared celular y un efecto posterior en el que se modifica la expresión génica (Reddy *et al.* 1990).

1.3.2 Giberelinas.

Las giberelinas provocan crecimiento en la planta, estimulando tanto la elongación como el crecimiento celular.

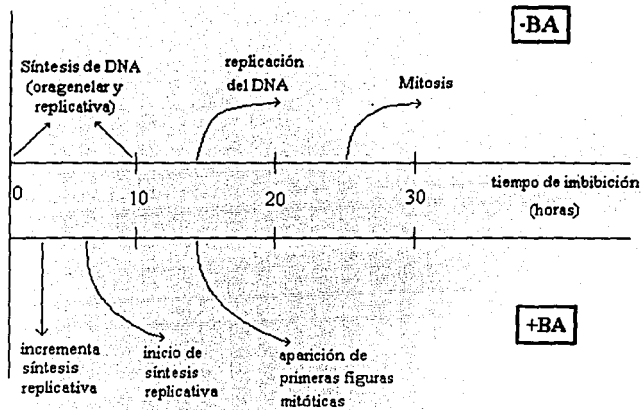


Fig. 1.2. Tiempo aproximado de aparición de algunos eventos celulares relacionados con la primera división celular durante la germinación de ejes embrionarios de maíz, y el efecto que sobre ellos tiene benciladenina.

Adaptado de: Baíza *et al.* (1989), Zarain *et al.* (1987), Vázquez Ramos *et al.* (1990) y Reyes *et al.* (1991).

Las giberelinas también están asociadas a la movilización de las reservas almacenadas en la semilla. Durante las primeras horas de germinación de cereales, las giberelinas contenidas en el embrión y/o escutelo se liberan en el endospermo de donde difunden hacia la capa de aleurona. En este sitio controlan la producción y secreción de enzimas hidrolíticas (entre ellas la α -amilasa) capaces de degradar y utilizar las reservas acumuladas en el endospermo (Roberts and Hooley, 1988).

1.3.3. Citocininas.

Las citocininas son un grupo de fitorreguladores que al ser agregados a plantas, semillas o cultivo de tejidos, promueven la división celular (Miller *et al.* 1956; Skoog *et al.* 1965). La primera citocinina natural identificada fue la zeatina, que se aisló a partir de granos de maíz inmaduros (Letham, 1963). En los años que siguieron al descubrimiento de la zeatina, varias citocininas más fueron aisladas y caracterizadas químicamente. Se demostró que todas ellas son derivados de la isopentenil adenina (Roberts and Hooley, 1988). También se han construido derivados sintéticos, siendo la benciladenina (N^6 -bencilaminopurina) una citocinina sintética ampliamente utilizada para el estudio de estos fitorreguladores.

Se ha encontrado que las citocininas participan en varios eventos fisiológicos y metabólicos del desarrollo de una planta. Entre los efectos fisiológicos se encuentran un estímulo en la diferenciación celular (Varnell and Vasil, 1978) y un retraso en la senescencia (Tetley and Thimann, 1974).

Entre los efectos metabólicos reportados están: El incremento en el contenido total de proteínas (Tepfer and Foslet, 1978), y en particular en la actividad específica de algunas enzimas como endopeptidasas, pirofosfatasa, fosfoenol piruvato carboxilasa, nitrato reductasa, RNA polimerasa y DNA polimerasa (Karavaiko *et al.*, 1987; Kulaeva, 1981; Vázquez-Ramos y Reyes, 1990). El incremento en la síntesis de alguno o de todos los tipos de RNA (Fletcher, 1969; Yokoyama *et al.*, 1980; Chen *et al.*, 1987), específicamente en los niveles de mRNAs de nitrato reductasa, fosfoenol piruvato carboxilasa y anhidrasa carbónica (Lu, 1992; Sugiharto, 1992), así como la estimulación de la biogénesis de cloroplastos (Longo *et al.*, 1979).

Una interrogante fundamental en el estudio de la regulación metabólica por citocininas recae sobre el mecanismo de acción de estos fitorreguladores.

1.4. Algunas consideraciones acerca del ciclo celular durante la germinación de ejes embrionarios de maíz

La mayor parte de los datos disponibles acerca de la germinación de ejes embrionarios de maíz indican que, durante la maduración de las semillas, gran parte de las células del embrión se encuentran bloqueadas en la fase G1 del ciclo celular (Deltour and Jacquard, 1974; Conger and Carabia, 1976; Deltour, 1985). Recientemente, Georgieva *et al.* (1994) encontraron que durante las primeras 4 horas de germinación, la mayoría de las células se sincronizan en la fase G1 y parte de esta población entra a la fase S entre 12-15 horas después de iniciarse la imbibición. Se ha estimado que solamente el 20-30% de todas las células entran a la fase S durante la etapa inicial de la germinación, pero la población que lo hace se encuentra sincronizada.

1.5 Antecedentes de nuestro grupo de trabajo.

Uno de los temas de interés en la actualidad es el estudio de las hormonas vegetales: cómo es que estas moléculas son capaces de regular el metabolismo y cómo son captadas estas moléculas por los tejidos blanco.

El interés de nuestro laboratorio ha sido estudiar el efecto que tiene la citocinina sintética Benciladenina (BA) sobre el metabolismo del DNA durante la germinación de ejes embrionarios de maíz. Se ha encontrado que:

1. BA incrementa la síntesis reparativa del DNA a las 3 horas de germinación de ejes embrionarios de maíz (Zarain *et al.*, 1987).

2. BA promueve el inicio de la síntesis replicativa del DNA y aumenta la actividad específica de la DNA polimerasa a las 6 horas de imbibición; este aumento es dependiente de transcripción y traducción (Vázquez-Ramos y Reyes, 1990; Reyes *et al.*, 1991).

3. BA incrementa (hasta tres veces) el número de figuras mitóticas entre las 15 y 24 horas de imbibición. (Reyes *et al.* 1991).

4. Al analizar los productos de traducción *in vitro* de los mRNAs aislados de ejes embrionarios embebidos por 5 horas con y sin BA, se encontró que BA cambia el patrón de

expresión de algunas proteínas, aumentando la cantidad de por lo menos dos y promoviendo la aparición de por lo menos una proteína de 77 Kd aprox. (Zúñiga, 1991).

Los hallazgos anteriores nos sugieren que BA modifica o acelera la aparición de algunos de los eventos que participan en la división celular y nos han permitido suponer que la benciladenina puede estar ejerciendo su efecto, al menos parcialmente, a nivel de modificación de la expresión génica.

1.6 Hipótesis

La citocinina Benciladenina regula la expresión génica durante la germinación de ejes embrionarios de maíz.

1.7 Objetivos

- 1. Aislar clonas de cDNA de genes cuya expresión esté regulada por benciladenina durante la germinación de ejes embrionarios de maíz.**
- 2. Medir la cinética de aparición de los RNA mensajeros de dichos genes durante la germinación de ejes embrionarios de maíz imbibidos tanto en presencia como en ausencia de Benciladenina.**
- 3. Secuenciar y caracterizar los genes cuya expresión esté regulada por BA durante la germinación de ejes embrionarios de maíz.**

1.8 Estrategias experimentales.

Para lograr los objetivos planteados, se siguieron dos estrategias distintas:

1.- Hibridación sustractiva (Sambrook *et al.*, 1989).

Para detectar diferencias en la expresión genética entre células o tejidos muy relacionados, se puede hacer uso de sondas sustraídas de cDNA (capítulo II). Debido a que se remueven las secuencias de mRNA abundantes comunes a los dos tipos celulares, la proporción de radiactividad en la sonda sustraída que corresponde a mRNAs raros se ve incrementada. Esto permite el aislamiento de clones de cDNA que corresponden a genes que se expresan en un tejido celular pero no en otro.

2.- El estudio de un gen involucrado con el metabolismo del DNA y cuya expresión pudiera estar regulada por BA durante la germinación de ejes embrionarios de maíz (capítulo III).

Como ya se mencionó, el incremento en la síntesis de DNA y en la actividad de la DNA polimerasa inducidos por BA son dependientes de transcripción y/o traducción, sin haberse encontrado un aumento en la cantidad total de esta proteína. Por lo tanto, se decidió clonar el cDNA para PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular) de maíz, un factor que estimula la actividad de la DNA polimerasa, y estudiar el efecto de BA sobre la expresión de este gene durante la germinación de maíz.

CAPITULO II.

HIBRIDACION SUSTRACTIVA: UNA ESTRATEGIA PARA BUSCAR SECUENCIAS REGULADAS POR BENCILADENINA DURANTE LA GERMINACIÓN DE EJES EMBRIONARIOS DE MAÍZ.

2.1 Objetivos particulares.

2.1.1 Construir una biblioteca de cDNA de ejes embrionarios de maíz germinados por 5 horas en presencia de Benciladenina

2.1.2 Haciendo uso de la metodología de hibridación sustractiva, aislar clonas de DNA complementario a RNAs mensajeros cuya expresión sea regulada por benciladenina durante las primeras horas de germinación de ejes embrionarios de maíz.

2.1.3 Corroborar la expresión diferencial de las clonas identificadas en el inciso 2.1.2 mediante ensayos tipo Northern.

2.1.4 Caracterizar y secuenciar las clonas que muestren respuesta diferencial a benciladenina.

2.2. Materiales y Métodos

2.2.1 Material Biológico.

Se utilizaron semillas de maíz variedad Chalqueño, con un 95% de viabilidad.

Los ejes embrionarios se extraen manualmente con ayuda de una navaja, procurando que los ejes queden libres de escutelo pero cuidando de no dañarlos.

2.2.2 Tratamiento de los ejes embrionarios de maíz con la citocinina sintética Benciladenina.

Todas las soluciones y el material utilizado deben ser estériles. El amortiguador de imbibición se esteriliza por filtración. Los ejes embrionarios se desinfectan en una solución de NaClO al 0.1% durante 30 segundos, luego se lavan 5 veces durante 30 segundos cada vez con agua destilada y estéril, y se escurren sobre papel filtro. Los ejes embrionarios se embeben en una caja de Petri sobre papel filtro saturado con el amortiguador de imbibición.

Amortiguador de imbibición:

- 50 mM Tris-HCl pH 7.6
- 50 mM KCl
- 10 mM MgCl₂
- 2% sacarosa
- 10 μM cloranfenicol
- 10⁻⁵ M Benciladenina (Sigma)

La benciladenina se prepara como una solución "stock" 10⁻³ M en etanol al 10% e inmediatamente se diluye para usarse en una concentración 10⁻⁵ M.

Para los experimentos control, los ejes embrionarios se tratan en condiciones iguales, excepto que al amortiguador de imbibición no se le agrega benciladenina.

Los ejes embrionarios se incuban en una estufa de temperatura controlada a 25°C por el periodo de tiempo correspondiente al experimento a realizar.

2.2.3 Aislamiento de RNA total y RNA mensajero.

2.2.3.1 Precauciones para trabajar con RNA (Sambrook *et al.* 1989).

Todo el material utilizado debe estar libre de RNAsas:

a. El agua se trata con dietilpirocarbonato (DEPC, un potente inhibidor de RNAsas) de la siguiente manera: se agrega DEPC al 0.1% con agitación continua durante por lo menos 15 horas y se esteriliza en autoclave durante por lo menos 30 minutos.

b. Todo el material de cristalería debe ser siliconizado, enjuagado con agua tratada con dietilpirocarbonato y horneado a 180°C por un mínimo de 24 horas.

c. Las puntas para pipetas y tubos de plástico deben ser nuevos y estériles, guardados en contenedores especialmente apartados para este fin.

d. Siempre debe trabajarse con guantes y cambiarlos frecuentemente por ser esta una fuente común de RNAsas.

e. De ser posible, todas las soluciones de trabajo se tratan con DEPC de la manera descrita.

2.2.3.2 Aislamiento de RNA total

El aislamiento de RNA de ejes embrionarios de maíz se hizo siguiendo el procedimiento descrito en Sambrook *et al.* (1989).

El procedimiento que se describe es para un gramo de ejes embrionarios. El tejido se congela en nitrógeno líquido, en morteros pre-enfriados en N₂. El tejido se macera hasta obtener un polvo fino. Es importante no dejar descongelar la muestra, agregando continuamente N₂. Una vez obtenido el polvo, se agregan por la pared del mortero 6 ml de solución de ITG (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 4M Isotiocianato de guanidina, 25mM EDTA) y 0.5 ml de β-mercaptoetanol. Se deja descongelar la muestra, y a medida que se va descongelando se macera hasta obtener una pasta no densa. El líquido obtenido se traspasa a tubos COREX y se agregan lo más rápido posible 5 ml de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 que se encuentre a temperatura ambiente. Se agita vigorosamente en vortex durante 1 minuto por lo menos y se centrifuga 30 minutos a 10,000 rpm (SS34, Sorvall). Se toma la fase superior, se mide el volumen y se agrega 1/10 de volumen de ácido acético 1M y 0.7 volúmenes de etanol absoluto. Los ácidos nucleicos se precipitan a -70°C durante 20 minutos. Se centrifuga a 10,000 rpm (SS34, Sorvall)

durante 10 minutos y la pastilla se lava con 1 ml de acetato de sodio 3M (pH 5.2), agitando bien en vortex para eliminar el máximo posible de polisacáridos. Se centrifuga a 10,000 rpm por 10 minutos. La pastilla se lava dos veces con etanol al 70% (como en los pasos anteriores), y se deja secar con el tubo invertido durante aproximadamente 20 min. Los ácidos nucleicos se resuspenden en agua destilada, tratada con DEPC y estéril, y se estima su concentración por densidad óptica a 260 nm ($1 \text{ UDO}_{260 \text{ nm}} = 40 \mu\text{g de RNA/ml}$).

2.2.3.3 Aislamiento de RNA mensajero.

Para aislar mRNA se siguió el procedimiento descrito para el aislamiento de RNA total, pero la pastilla obtenida en el último paso se resuspende en 3 ml de amortiguador de unión (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA, 0.3M NaCl, 0.1% SDS). La solución de RNA se calienta a 70°C en baño maría durante 5 minutos y se enfría en hielo por otros 5 minutos. Si existen partículas que no se resuspenden, se deben eliminar por centrifugación a $1000 \times g$ por 5 minutos a temperatura ambiente. El RNA disuelto (no más de 20 mg) se carga en una columna de 100 mg de oligo dT celulosa (BRL, USA) y se permite que fluya por gravedad. La columna se lava con 4 ml de amortiguador de unión para lavar el RNA no unido. El mRNA se eluye de la columna con 1.5 ml de amortiguador de elución (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.1% SDS) y el eluato se recoge en una sola fracción. Este mRNA se calienta a 70°C en baño María por 5 minutos, se enfría en hielo otros 5 minutos, se incuba a temperatura ambiente durante 20 minutos, se le agregan 90 μl de NaCl 5M e inmediatamente se carga nuevamente en la columna de oligo-dT previamente equilibrada con 4 ml de amortiguador de unión. El RNA de la columna se lava con 4 ml de amortiguador de unión y el mRNA se eluye con 1.5 ml de amortiguador de elución; el eluato se recoge en una sola fracción. El mRNA se precipita con 90 μl de NaCl 5M y 3 ml de etanol y se guarda a -20°C hasta que sea utilizado.

2.2.3.4 Estimación del rendimiento, pureza e integridad del RNA.

La cantidad de RNA extraído se obtiene a partir de la relación:

1 unidad de densidad óptica a 260 nm equivale a 40 μg de RNA /ml

La pureza conseguida se evalúa considerando:

A_{260} / A_{280} debe ser cercana a 2.0

La integridad del RNA total obtenido se puede analizar en un gel nativo de agarosa al 1.5% en TAE 1X (40mM Tris Base, 20mM Acido acético, 2mM EDTA, pH 8.1) como amortiguador de electroforesis. A las muestras a analizar (2-5 μ l), se les añade 1/5 de solución de colorante 5X (0.25% Xilencianol, 0.25% Azul de Bromofenol, 10mM EDTA pH8, 50% glicerol) y se calientan a 65°C durante 3-5 minutos para desnaturalizar los ácidos nucleicos; se enfrían rápidamente en hielo y se cargan en el gel. Es conveniente cargar también una muestra de RNA ya analizado como control. La electroforesis se realiza con el gel totalmente sumergido en el amortiguador de electroforesis a una corriente de 5-10 voltios constantes/cm de gel, hacia el polo positivo. Los ácidos nucleicos se tiñen con bromuro de etidio (0.5 μ g/ml) durante 15 min y se visualizan con luz ultravioleta (366 nm). Si los RNA ribosomales se ven formando bandas definidas puede considerarse que no ha habido una degradación significativa.

La pureza del mRNA se analiza en las mismas condiciones que para el RNA total. En este caso, el mRNA debe observarse como un barrido continuo sin que se observen las bandas características de los RNA ribosomales (figura 2.2, ver inciso 2.3.1).

2.2.4 Construcción de una biblioteca de cDNA en Lambda gt11

La construcción de una biblioteca de cDNA de ejes embrionarios de maíz germinados durante 5 horas en presencia de Benciladenina se hizo utilizando el kit comercial de BRL (Bethesda Research Laboratories, USA) para la clonación de cDNA en el vector lambda gt11.

La estrategia general para la construcción de la biblioteca de cDNA se presenta en la figura 2.1.

2.2.4.1 Síntesis de la primera cadena de cDNA.

Para la síntesis de la primera cadena de cDNA se utilizaron como molde 8 μ g de mRNA (RNA poli A⁺) extraído de ejes embrionarios de maíz incubados por 5 horas en presencia de Benciladenina, y la transcriptasa reversa M-MLV, en un volumen de 50 μ l en

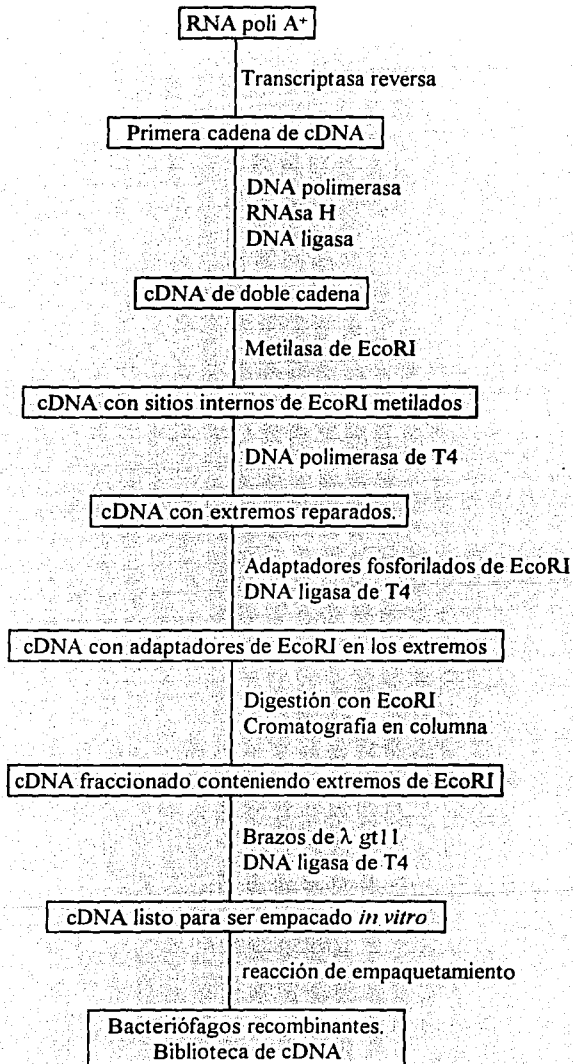


Figura 2.1.- Esquema de la construcción de la biblioteca de cDNA de ejes embrionarios de maiz.

las siguientes condiciones: 50mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3mM MgCl₂, 10mM dithiothreitol, 500μM (cada uno) dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 50 μg/ml oligo (dT)₁₂₋₁₈, 160 μg/ml poly A⁺ RNA, 10,000 u/ml Transcriptasa Reversa M-MLV (clonada).

Inmediatamente después de iniciar la reacción con la transcriptasa reversa, se transfieren 5 μl de ésta a otro tubo que contiene 1 μCi de [α³²P]dCTP para obtener la reacción trazadora. Ambas reacciones se incuban a 37°C por 1 hora y se paran agregando 1 μl de 0.25 M EDTA (pH 7.5). Se determina el rendimiento en la síntesis de cDNA por medio de la reacción trazadora y se prosigue con la síntesis de la segunda cadena de cDNA.

2.2.4.2 Síntesis de la segunda cadena de cDNA.

La síntesis de la segunda cadena de cDNA se lleva a cabo agregando DNA polimerasa I y RNasa H. La RNasa H es una endonucleasa que produce cortes al azar sobre el RNA del híbrido RNA:DNA, lo que produce un sustrato para que la DNA polimerasa I sintetice la segunda cadena del cDNA. Esta reacción también incluye [α³²P]dCTP, de manera que los productos de la síntesis de la segunda cadena puedan ser cuantificados y examinados por electroforesis en gel. La reacción se lleva a cabo en 360 μl en las siguientes condiciones: 25 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 5 mM MgCl₂, 250 mM (cada uno) dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 10 μCi [α³²P]dCTP, 0.15 mM NAD, 5mM Ditiotretitol, 250 u/ml DNA polimerasa I, 8.5 u/ml RNasa H, 30 u/ml DNA ligasa.

La reacción se incuba durante 2 horas a 16°C, y se para con 25 μl de EDTA 0.25 M (pH 7.5). Se toman 10 μl para medir la incorporación de radiactividad y estimar el rendimiento de la reacción.

2.2.4.3 Análisis de la primera y segunda cadenas de cDNA.

El tamaño de los productos de la primera y segunda cadenas de cDNA se estimó en un gel de agarosa al 1.4% en 0.03M NaCl, 2mM Na₂EDTA (pH 7.5) usando como amortiguador de corrida 0.03 M NaOH, 2mM EDTA. Se utilizó DNA del fago lambda cortado con la enzima de restricción HindIII como referencia para estimar el tamaño de los fragmentos. El gel se tiñó con bromuro de etidio, se fotografió y se expuso en una placa de rayos X.

2.2.4.4 Metilación de sitios internos de EcoRI.

El dscDNA puede contener sitios internos de reconocimiento de la endonucleasa de restricción EcoRI. Dado que los adaptadores de EcoRI deberán ser digeridos con EcoRI después de ser adicionados a los extremos del dscDNA, éste podría ser cortado internamente si estos sitios no son protegidos. Esto se logra mediante la metilación del dscDNA antes de la adición de los adaptadores de tal manera que el cDNA pueda ser clonado completo. La reacción de metilación se llevó a cabo en 50 μ l en las siguientes condiciones: 1 μ g cDNA, 50 mM Tris-acetato (pH 8), 5 mM ditioneitol, 1 mM EDTA, 10 μ M S-adenosil-L-metionina, 60 u de metilasa de EcoRI.

La reacción se incubó a 37°C durante 30 minutos, y posteriormente a 70°C durante 10 minutos para inactivar la enzima. Inmediatamente se procede a reparar los extremos del cDNA.

2.2.4.5 Reparación de los extremos del cDNA.

Dado que el procedimiento de síntesis de cDNA no produce dscDNA con extremos romos, los extremos del cDNA deberán ser reparados para asegurar que la adición de adaptadores por la enzima DNA ligasa de T4 se lleve a cabo de manera eficiente. La enzima utilizada es la DNA polimerasa de T4 que, además de tener actividad de DNA polimerasa, posee actividad 3'→5' exonucleasa. La combinación de estas dos actividades generará extremos romos en el cDNA. La reacción de metilación se llevó a cabo en 100 μ l en las siguientes condiciones: 1 μ g cDNA, 8 mM Tris-acetato pH 8, 10 mM acetato de magnesio, 65 mM acetato de sodio, 0.5 mM DTT, 0.025 mM c/u dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 10 unidades de DNA polimerasa de T4.

La reacción se incubó a 11°C durante 15 minutos. El DNA se extrae una vez con un volumen de fenol, una vez con una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1, y una vez con una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 y se precipita con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto a -20°C por un mínimo de 2 horas. El DNA se centrifuga durante 15 minutos a 12,000 rpm en microcentrifuga Eppendorf, la pastilla se lava dos veces con etanol al 70% y se seca con el tubo abierto sobre la mesa durante 10 minutos.

2.2.4.6 Fosforilación de los adaptadores de EcoRI.

Los adaptadores de EcoRI se fosforilaron en 20 μ l en las siguientes condiciones: 2 μ g de adaptadores de EcoRI, 60 mM Tris-HCl (pH 7.8), 15 mM β -mercaptoetanol, 10 mM $MgCl_2$, 0.6 mM dATP, 10 unidades de la enzima polinucleótido cinasa.

La reacción se incubó a 37°C por 30 minutos y posteriormente a 70°C durante 10 minutos para inactivar la enzima.

2.2.4.7 Ligación de los adaptadores de EcoRI al cDNA.

La reacción se llevó a cabo en un volumen de 50 μ l en las siguientes condiciones: 1 μ g de cDNA (paso 2.2.4.5.), 0.5 μ g de adaptadores de EcoRI (5 μ l del paso 2.2.4.6.), 50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 10 mM $MgCl_2$, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 5% (p/v) PEG 8000, 5 unidades de DNA ligasa.

La reacción se incubó a 16°C durante toda la noche. Posteriormente se calentó a 70°C durante 10 minutos para inactivar la enzima.

2.2.4.8 Digestión de los adaptadores de EcoRI del cDNA con la enzima EcoRI.

La digestión con EcoRI remueve los adaptadores polimerizados y expone los sitios adecuados para la ligación en el vector lambda gt11.

La reacción se llevó a cabo en 160 μ l en las siguientes condiciones: 1 μ g de cDNA (del paso 2.2.4.7.), 62.5 mM Tris-HCl (pH8), 12.5 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl, 40 unidades de EcoRI.

La reacción se incubó a 37°C durante 1 hora, se extrajo con fenol-cloroformo y se precipitó como en el paso 2.2.4.5

2.2.4.9 Eliminación de los adaptadores digeridos de EcoRI.

Después de la digestión con EcoRI, los adaptadores digeridos se remueven por cromatografía de filtración en gel en Sepharose CL-4B. Esta columna también remueve pequeños fragmentos de DNA obtenidos como productos abortados durante la síntesis de la primera cadena de cDNA.

La columna se equilibra con 5 ml de amortiguador TEN (10 mM Tris.HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.1 M NaCl), y se drena completamente. Se coloca la muestra de cDNA en el centro de la columna y se permite que entre a ésta. Se agregan 100 μ l de amortiguador

TEN a la columna y se recoge la primera fracción en un tubo eppendorf. Cuando el flujo de la columna ha cesado, se agregan otros 100 µl de TEN y se recoge la segunda fracción en otro tubo. Se continúa de la misma manera hasta recoger 10 fracciones. Las fracciones que contienen el DNA se localizan por radiación Cerenkov en el contador de centelleo. Se combinan la fracción que contiene el pico de cuentas radiactivas y la inmediatamente anterior. El DNA se precipita con etanol (inciso 2.2.4.5.) y se resuspende en amortiguador TE a una concentración final de 25 ng/µl.

2.2.4.10 Ligación del cDNA en λ gt11.

λ gt11 es un vector de expresión. Las bibliotecas construidas en este vector pueden ser analizadas tanto con sondas de ácidos nucleicos, como con anticuerpos específicos. Este vector contiene un sitio único de clonación cercano al extremo 3' de la region codificadora de β-galactosidasa y puede aceptar insertos de hasta 7.2 kb. Si un cDNA con un marco de lectura abierto se inserta en este sitio en la orientación y marco de lectura correctos, se producirá una proteína de fusión cuando la expresión desde el promotor de *lac* sea inducida con IPTG.

El cDNA de maíz se ligó a los brazos de λ gt11 en 10 µl en las siguientes condiciones de reacción: 100 ng de DNA con adaptadores de EcoRI, 2 µg de DNA del vector lambda gt11, 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM MgCl₂, 1mM ATP, 1 mM DTT, 5% (p/v) PEG 8000, 1 unidad de DNA ligasa.

La reacción se incubó a 4°C durante 16 horas. Se preparó también una reacción control con brazos de lambda sin cDNA.

2.2.4.11 Empaquetamiento del cDNA clonado en λ gt11.

Para empaquetar el DNA clonado en λ gt11 se utilizó un "kit" comercial de BRL (Bethesda Research Laboratories, USA). El DNA se empaquetó en las siguientes condiciones: 5 µl de DNA ligado (del paso 2.2.4.10), 5 µl extracto "A", 7.5 µl extracto "B".

La reacción se incubó a 20°C durante 2 horas y posteriormente se diluyó con 0.25 ml de amortiguador PDB (Tris-HCl 50 mM pH 7.9, NaCl 100 mM, gelatina 0.01%, MgCl₂ 10 mM). A la biblioteca de partículas virales así obtenida se le agregan unas gotas de cloroformo y se guarda a 4°C.

2.2.4.12 Titulación de la biblioteca de cDNA.

La biblioteca de cDNA se tituló en *Escherichia coli* Y1088 siguiendo el protocolo que se describe a continuación (Sambrook *et al.* 1989):

Las células de *E. coli* Y1088 se crecen en TYN [triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.5%, Tris-HCl 10 mM (pH 7.2)] + maltosa al 0.2% hasta una densidad óptica_{550 nm} = 0.5. Las células se centrifugan 10 minutos a 3,000 rpm a 4°C (rotor SS34, Sorvall), se resuspenden en PDB (inciso 2.2.4.11) en 1/4 del volumen original, y se mantienen en hielo.

Se toma una alícuota de 10 µl de la biblioteca de cDNA y se agrega a 90 µl de PDB. De esta dilución se preparan diluciones seriadas en 100 µl de PDB (10⁻², 10⁻⁴, 10⁻⁶, 10⁻⁸). A los 100 µl de cada dilución de fagos se les agregan 200 µl de las células en PDB. Se incuban 15 minutos a temperatura ambiente y se les agregan 3 ml de TYN top (TYN + 7 g de agar/l de medio) a 50°C, adicionando X-gal e IPTG. Esta mezcla se esparce sobre cajas de cultivo con TYN sólido (TYN + 15 g de agar por litro de medio) que deberán estar a temperatura ambiente. Las cajas se incuban a 37°C durante toda la noche. Las placas azules serán las que carecen de inserto de cDNA, mientras que las placas blancas serán las recombinantes.

2.2.4.13 Estimación del tamaño de los insertos de la biblioteca de cDNA.

Para estimar el tamaño de los insertos contenidos en la biblioteca de cDNA se tomaron 12 placas al azar, se resuspendieron en 200 µl de H₂O y los fagos se eluyeron del agar durante 1 hora a 37°C. Los fragmentos clonados se amplificaron por PCR (reacción de polimerización en cadena) en 100 µl de reacción usando las siguientes condiciones: 50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH 8.4), 0.1mM MgCl₂, 0.1 mg/ml de gelatina, 10 mM c/u dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 100 ng de λgt11 reverse primer (Gibco, BRL, USA); 100 ng de λgt11 forward primer (Gibco, BRL, USA); 50 µl de fagos en solución; 2.5 unidades de Taq DNA polimerasa.

La secuencia de los oligonucleótidos es la siguiente:

λgt11 reverse primer: 5'-CAGACCAACTGGTAATGGTAGCG-3'

λgt11 forward primer: 5'-ATTGGTGGCGACGACTCCTGGAG-3'

Estos oligonucleótidos son secuencias adyacentes al sitio de clonación EcoRI del vector λgt11.

La condiciones de amplificación fueron las siguientes:

1º paso.- 1 ciclo: 90°C por 10 minutos

2º paso.- 30 ciclos: 94°C por 1 minuto

58°C por 1 minuto

72°C por 3 minutos

3º paso.- 1 ciclo: 72°C por 15 minutos.

Los productos de PCR se analizaron en un gel de acrilamida al 7% en amortiguador TBE (Tris-boratos 0.089M, ácido bórico 0.089M, 0.002M EDTA).

2.2.5 Hibridación sustractiva de la biblioteca de cDNA y aislamiento de clonas "positivas"

El esquema general de la hibridación sustractiva se presenta en la figura 2.6 (inciso 2.3.2 de resultados).

2.2.5.1. Preparación de la sonda sustraída.

Para sintetizar la sonda de cDNA se utilizaron 5 µg de RNA poliA⁽⁺⁾ extraído de ejes embrionarios de maíz germinados por 5 horas en presencia de Benciladenina, de la manera descrita en el inciso 2.2.4.1, pero agregando 600 µCi de (α³²P)-dCTP en la reacción. Al terminar el tiempo de incubación (1 hora), la reacción se paró agregando 5 µl de EDTA 0.25M. Para hidrolizar el RNA, se adicionaron 15 µl de NaOH 3N y la reacción se incubó durante 30 min a 68°C; posteriormente se neutralizó con 50 µl de Tris 1M (pH 7.4) y 15 µl de HCl 2N. El cDNA se extrajo con fenol-cloroformo y se pasó por una columna de Sephadex G50 para eliminar la marca radiactiva libre. Al cDNA se le agregaron 50 µg de RNA poliA⁺ extraído de ejes embrionarios de maíz germinados por 5 horas en amortiguador control y la mezcla de ácidos nucleicos se precipitó con acetato de amonio y etanol. Los ácidos nucleicos se resuspendieron en 5.8 µl de agua.

La reacción de sustracción del cDNA se llevó a cabo en 8 µl en las siguientes condiciones: 55 µg de ácidos nucleicos (cDNA + mRNA del paso anterior), 0.5 M fosfato de sodio, 6.25 mM EDTA, 0.25 % (p/v) SDS.

La solución se introdujo en un capilar de vidrio y se selló con calor. El capilar se calentó en baño maría a 100°C durante 5 minutos, y luego se incubó a 68°C durante 48 horas para permitir la hibridación de ácidos nucleicos complementarios. Concluido el tiempo de incubación, el capilar se abrió por ambos extremos y la solución se llevó a una concentración final de 0.01M de fosfato de sodio (pH 6.8). Esta solución se prepara inicialmente como un "stock" 1M utilizando una relación 1:1 de NaH₂PO₄ 1M y Na₂HPO₄ 1M.

Para separar los ácidos nucleicos de cadena sencilla se utilizó una columna de hidroxapatita. Los ácidos nucleicos se unen a la hidroxapatita mediante interacciones entre los grupos fosfato de los ácidos nucleicos y los residuos de calcio en la resina, y pueden eluirse con amortiguadores de fosfato a temperatura elevada (60°C). Los ácidos nucleicos de cadena sencilla se unen menos fuertemente a la hidroxapatita que los ácidos nucleicos de cadena doble, por lo que aquellos pueden eluirse a concentraciones menores de fosfato. Por lo tanto, la cromatografía en hidroxapatita puede ser usada para separar DNA de cadena sencilla de DNA de cadena doble, o de híbridos DNA:RNA.

La hidroxapatita (Bio gel HTP, DNA grade, Bio-Rad) se hidrató en fosfato de sodio 0.01 M (pH 6.8). Se preparó una columna con 0.5 ml de resina en una jeringa desechable de 3 ml. A partir de este punto, todos los pasos siguientes se realizaron a 60°C, dentro de una estufa de incubación y las soluciones utilizadas fueron pre-equilibradas a esta temperatura. La columna se equilibró a 60°C y se lavó 5 veces con fosfato de sodio 0.01 M. Se cargó en la columna la muestra de cDNA sustraído (inciso 2.2.5.1) y luego se lavó con 3 ml de fosfato de sodio 0.01 M. La columna se cerró, se le agregó 1 volumen de amortiguador SS (0.15 M fosfato de sodio), se incubó por 5 minutos (60°C), y se colectaron fracciones de 0.5 ml. En esta fracción se recogieron los ácidos nucleicos de cadena sencilla, esto es, el cDNA que fué utilizado posteriormente como sonda para hibridizar la biblioteca de cDNA. Para colectar los ácidos nucleicos de doble cadena que permanecen unidos a la columna, ésta se lavó a continuación con amortiguador DS (fosfato de sodio 0.3 M) de la misma manera que se hizo para obtener los ácidos nucleicos de cadena sencilla.

El DNA obtenido en la fracción de cadena sencilla se extrajo con 2-butanol varias veces hasta que su volumen se redujo a 125 µl. Las sales de esta muestra se extrajeron por centrifugación a través de una pequeña columna de Sefadex G-50 equilibrada con TE (pH 8); luego el DNA se precipitó con etanol y se resuspendió en 50 µl de TE. Esta muestra se utilizó para hacer una hibridación *in situ* de la biblioteca de cDNA de ejes embrionarios de maíz.

2.2.5.2 Hibridación *in situ* de la biblioteca de cDNA de ejes embrionarios de maíz.

Se analizaron 150,000 placas de fagos de la biblioteca mediante el protocolo descrito por Benton and Davis (1977). Los fagos se esparcen en cajas de Petri a una densidad apropiada, y una huella de ellos se obtiene al colocar una membrana de nylon sobre la superficie de la caja. Las partículas virales y el DNA son transferidos hacia el filtro por acción capilar, produciendo una réplica exacta del patrón de placas. Después de la desnaturalización con álcali, el DNA se une de manera irreversible al filtro al ser éste

horneado y luego se hibridiza con la sonda marcada radiactivamente. Las placas que dan señal positiva, identificadas al alinear la placa de rayos X con la caja de Petri original que contiene las placas de virus, se seleccionan y colectan para un análisis posterior.

Se utilizó la cepa de *Escherichia coli* Y1088 para ser infectada por las partículas de fagos λ gt11 de la biblioteca. Las células de *E. coli* se prepararon de la manera descrita en el inciso 2.2.4.12. Se prepararon 10 alicuotas cada una con 15,000 partículas de bacteriófagos y 0.3 ml de bacterias. Las bacterias así infectadas se incubaron por 20 minutos a 37°C, y luego se esparcieron sobre cajas de 150 mm de diámetro con TYN tal como se describió en el inciso 2.2.4.2. Las cajas con las bacterias infectadas se incubaron a 37°C hasta que las placas alcanzaron un diámetro de aproximadamente 1.5 mm (entre 10 y 12 horas de incubación). Es importante que las cajas no muestren confluencia. Las cajas se enfriaron a 4°C por 1 hora. Los fagos se transfirieron a filtros de Nylon-1 (Gibco, BRL) de la siguiente manera: El filtro circular se colocó sobre la superficie de la caja de manera que éste se encontrara en contacto directo con las placas de fagos, y cuidando de que no quedaran burbujas de aire atrapadas. Los filtros se marcaron en 3 o más posiciones asimétricas utilizando una aguja hipodérmica previamente sumergida en tinta china, de tal manera que las marcas fueran visibles tanto en el filtro como en el medio de cultivo. Luego de 1 minuto de estar en contacto con las placas virales en la caja de cultivo, el filtro de nylon se retiró con pinzas, y se sumergió en una charola con solución desnaturizante durante 5 minutos.

Solución desnaturizante:

0.5N NaOH

1.5M NaCl

El filtro se transfirió a otra charola con solución de neutralización por otros 5 minutos.

Solución de neutralización:

1.5M NaCl

0.5M Tris.Cl (pH7.4)

El paso de neutralización se realizó dos veces. Por último, el filtro se enjuagó en 2X SSC y se secó sobre toallas de papel con el DNA hacia arriba

Los filtros se hornearon por 2 horas a 80°C para fijar el DNA y luego se lavaron en 2X SSC para quitar los restos celulares.

Los filtros se prehibridizaron 2 horas a 65°C en 20 ml de: 6X SSC, 0.05X BLOTTO (1X BLOTTO = 5% leche descremada, 0.02% azida de sodio). Se agregó la sonda radiactiva sustraída (inciso 2.2.5.1) y la hibridación se hizo a 65°C durante 72 horas.

Al finalizar la hibridización los filtros se lavaron con agitación ligera en 500 ml de 2X SSC, 0.1% SDS a temperatura ambiente durante 5 minutos. Este paso se repitió 4 veces. A continuación los filtros se lavaron 1 hora en 500 ml de 1X SSC, 0.1% SDS a 45°C y por último 1 hora en 0.5X SSC, 0.1% SDS a 65°C. Los filtros se expusieron a placas de rayos X durante 18 horas a -70°C. Las placas de rayos X que contienen señales positivas se alinean con las cajas de Petri originales para identificar aquellas clonas positivas. Las placas de lisis, que dieron señal positiva se aíslan utilizando la punta de una micropipeta de 1ml y se colocan en 1 ml de PDB (2.2.4.11) con una gota de cloroformo.

Las clonas seleccionadas se someten a una segunda ronda de hibridización, utilizándose el mismo procedimiento descrito para la primera ronda.

2.2.6 Análisis de mRNAs por "Northern blot"

El RNA total de las muestras a analizar se preparó de la manera descrita en el inciso 2.2.3.2. El RNA se desnaturalizó de la siguiente manera: a 15 µg de RNA total (en un volumen de 4.5 µl) se le agregó 2 µl de amortiguador de corrida (5X), 3.5 µl de formaldehído y 10 µl de formamida. Las muestras se incubaron a 65°C durante 15 minutos y luego en hielo por 5 minutos. A cada muestra se le agregó 2 µl de amortiguador de la muestra (glicerol 50%, EDTA 1 mM, azul de bromofenol 0.25%, Xylen cianol 0.25%), y se cargó en el gel.

El RNA se fraccionó en geles de agarosa y formaldehído (agarosa 1%, formaldehído 2.2 M, MOPS 40 mM pH 7, acetato de sodio 10 mM, EDTA 1 mM), utilizando MOPS como amortiguador de corrida (MOPS 40 mM pH 7, acetato de sodio 10 mM, EDTA 1 mM). El gel se recorrió durante 5 minutos a 5 volts/cm, y se corrió sumergido a 4 volts/cm, con recircularización del amortiguador. Se utilizó un gel de 10 cm de largo para la separación del RNA.

El RNA se tiñó con bromuro de etidio, se fotografió y se transfirió a membranas de nytran (Schleicher & Schuell) utilizando SSC 10X como amortiguador de transferencia.

Para corroborar que cantidades iguales de RNA fueron cargadas en el gel, se tomaron lecturas de densidad óptica (A_{260}) a las muestras de RNA, y se comparó la intensidad de las bandas de RNA ribosomal en los geles teñidos con bromuro de etidio.

Los filtros de RNA se hornearon a 80°C con vacío durante 2 horas.

Los filtros se prehibridizaron durante 2 horas a 42°C en formamida al 50% (v/v), SSC 5X, Tris/HCl 50 mM pH 7.4, Denhardt's 5X, SDS al 1%, 0.1 mg ml⁻¹ de DNA de timo de ternera, y se hibridizaron con la sonda radiactiva en las mismas condiciones durante 48

horas. Los filtros se lavaron 2 veces durante 20 minutos en SSC 2X, SDS al 2% a temperatura ambiente, y dos veces durante 30 minutos en SSC 0.2X, SDS 0.2% a 45°C. Los filtros se envolvieron en película plástica (Kleen-pack) y se expusieron a placas de Rayos X a -70°C.

2.2.7 Marcaje de las sondas radiactivas.

Para la preparación de las sondas radiactivas se utilizó un "kit" comercial de Pharmacia Biotech que utiliza oligonucleótidos como iniciadores al azar. El siguiente protocolo es para marcar 25-50 ng de DNA.

El DNA se disuelve en amortiguador TE, a una concentración tal que 25-50 ng puedan ser añadidos a la reacción en un volumen no mayor de 34 μ l. El DNA se desnatura calentando a ebullición durante 2-3 min. Inmediatamente se coloca el DNA en hielo durante 2 minutos, y se centrifuga brevemente. En un microtubo se agregan 34 μ l de DNA desnaturado, 10 μ l de amortiguador (conteniendo dATP, dGTP, dTTP y hexadeoxyribonucleótidos al azar), 5 μ l (50 μ Ci) de [α -³²P]dCTP (3000Ci/mmol), y 1 μ l de Klenow. Se mezcla suavemente con la punta de la pipeta, y se incuba a 37°C durante 30-60 min.

2.3 Resultados

2.3.1. Construcción de una biblioteca de cDNA de ejes embrionarios de maíz en lambda gt11.

El esquema general para la construcción de la biblioteca de cDNA de ejes embrionarios de maíz se presenta en la figura 2.1

La biblioteca de cDNA se contruyó a partir de RNA poliA⁺ extraído de ejes embrionarios de maíz imbibidos durante 5 horas en amortiguador con benciladenina.

El RNA poliA⁺ se purificó dos veces a través de una columna de oligo-dT celulosa, y se analizó en un gel de agarosa al 1.5% en amortiguador TAE. El resultado se muestra en la figura 2.2. Se puede ver que el doblete característico de los RNA ribosomales no se encuentra presente en la población de RNA poliA⁺.

El DNA complementario se sintetizó a partir de 8 µg de RNA poliA⁺, y se obtuvo un rendimiento del 15%, esto es, 1.12 µg de cDNA de doble cadena. El tamaño de los productos de la primera y segunda cadenas de cDNA se estimó en un gel de agarosa al 1.4% y el resultado se muestra en la figura 2.3. Se puede observar que el tamaño de la mayoría de los fragmentos de cDNA se encuentra entre aproximadamente 500 y 3000 pares de bases, aunque puede observarse un barrido de mayor peso molecular.

El cDNA de doble cadena se metila en los sitios internos de EcoRI, se reparan los extremos para obtener extremos romos y se le adicionan adaptadores de EcoRI. Estos adaptadores deben ser digeridos con EcoRI para generar extremos cohesivos que pueden ser clonados en el sitio de EcoRI del bacteriófago λgt11. Después de la digestión con EcoRI, los adaptadores digeridos se remueven por cromatografía de filtración en gel en Sepharose CL-4B. Las fracciones que contienen el DNA se localizan por radiación Cerenkov en el contador de centelleo. La figura 2.4 muestra el perfil de elución de esta columna.

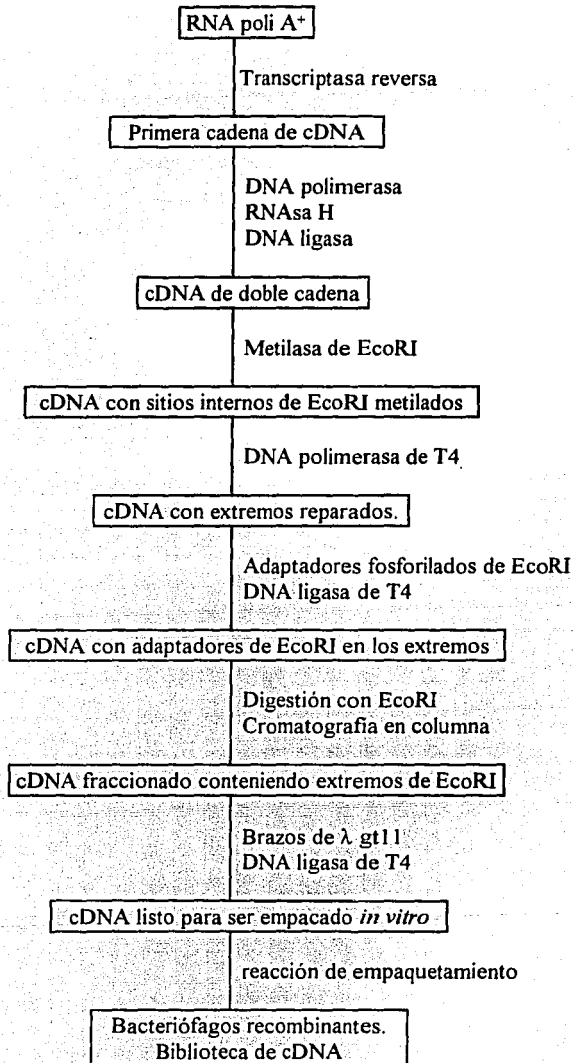


Figura 2.1.- Esquema de la construcción de la biblioteca de cDNA de ejes embrionarios de maíz.

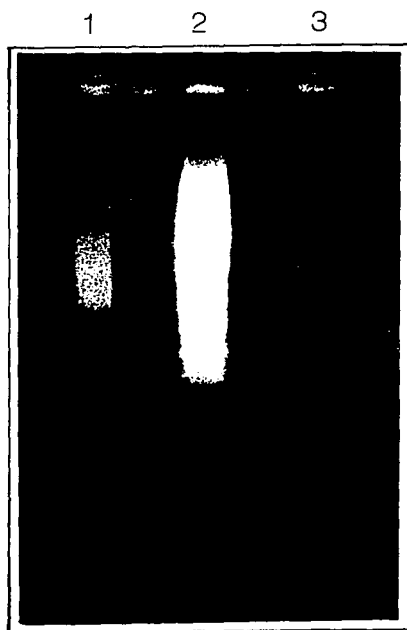


Figura 2.2- RNA poli A⁺ aislado de ejes embrionarios de maíz imbibidos por 5 horas en benciladenina. Carril 1: RNA poli A⁺. Carril 2: RNA no unido a la columna de oligo dT (1° ciclo). Carril 3: RNA no unido a la columna de oligo dT (2° ciclo)

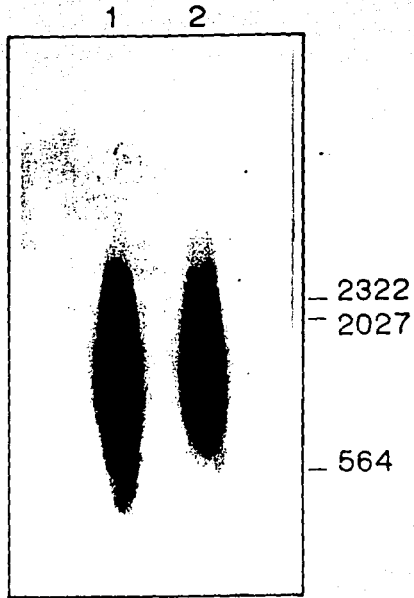


Figura 2.3.- Tamaño de las poblaciones de cDNA. Carril 1: primera cadena de cDNA.
Carril 2: cDNA de doble cadena.

Fracción:	cpm
1	0
2	40
3	50
4	800
5	1400
6	500
7	400
8	250
9	150
10	100

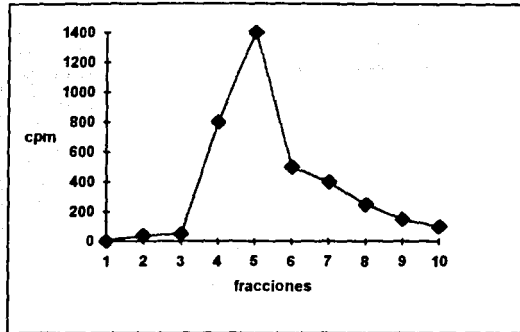


Figura 2.4.- Separación del cDNA de los adaptadores de EcoRI mediante filtración en gel en Sepharose CL-4B.

El pico de cuentas radiactivas se localizó en la fracción #5. Por lo tanto se combinaron ésta y la fracción #4 para clonaras en el bacteriófago λ gt11. Las fracciones 6 y siguientes se desecharon, ya que podrían estar contaminadas con adaptadores de EcoRI.

El bacteriófago λ gt11 es un vector de expresión. Este vector contiene un sitio único de clonación (EcoRI) cercano al extremo 3' de la región codificadora de β -galactosidasa y puede aceptar insertos de hasta 7.2 kb. En cajas de cultivo que contienen IPTG y X-gal, las placas de λ gt11 que carecen de inserto son azules, mientras que las que tienen inserto son incoloras. La relación de placas azules respecto a blancas es una manera de estimar el porcentaje de clones recombinantes en la biblioteca.

2.3.1.1. Título de la biblioteca de cDNA

La biblioteca de cDNA se tituló en *Escherichia coli* Y 1088, y se estimó que contiene un total de 1.13×10^7 pfu (unidades formadoras de placas). De éstas, el 96 % son recombinantes, mientras que el 4% restantes dan un fenotipo azul, lo que indica que no contienen insertos.

2.3.1.2. Estimación del tamaño de los insertos de cDNA de la biblioteca.

De la biblioteca de cDNA de maíz se tomaron 12 placas virales al azar y se determinó el tamaño de los insertos mediante una reacción de amplificación por PCR. Los insertos se analizaron en un gel de acrilamida y el resultado se presenta en la figura 2.5. El tamaño de los insertos de las clonas analizadas va de 100 a 2000 pares de bases.

2.3.2. Hibridación sustractiva de la biblioteca de cDNA y aislamiento de clonas "positivas".

El esquema general para la preparación de una sonda sustraída se presenta en la figura 2.6.

Con el fin de determinar las condiciones óptimas para la separación de ácidos nucleicos de cadena sencilla de los de cadena doble mediante cromatografía en hidroxipatita, se realizaron ensayos control utilizando DNA plasmídico de cadena sencilla y de cadena doble marcado radiactivamente. Se utilizó DNA plasmídico en este ensayo debido a la facilidad para la preparación de este material.

Se probaron dos lotes diferentes de hidroxipatita: hidroxipatita de LKB e hidroxipatita de Bio Gel. Para cada resina, se corrieron dos columnas de manera simultánea y en cada una se cargó respectivamente DNA de cadena sencilla (ssDNA) y DNA de cadena doble (dsDNA), marcados radiactivamente. El experimento se realizó inicialmente a temperatura ambiente. Las columnas fueron lavadas con concentraciones crecientes de fosfato de sodio, las fracciones se recolectaron en tubos eppendorf y se cuantificaron mediante radiación Cerenkov.

La figura 2.7 muestra los resultados obtenidos utilizando la columna de hidroxipatita de LKB.

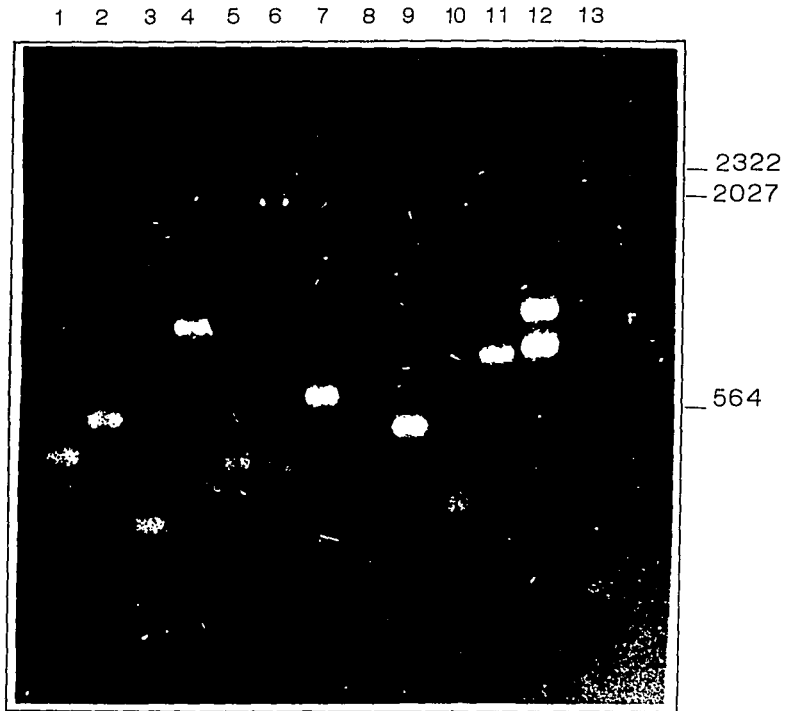


Figura 2.5. Insertos de 12 clonas de la biblioteca de cDNA de ejes embrionarios de maíz. Los insertos se amplificaron por PCR, como se describe en materiales y métodos. Carriles 1-12: insertos de las clonas 1 - 12. Carril 13: Control de la reacción de PCR (sin DNA).

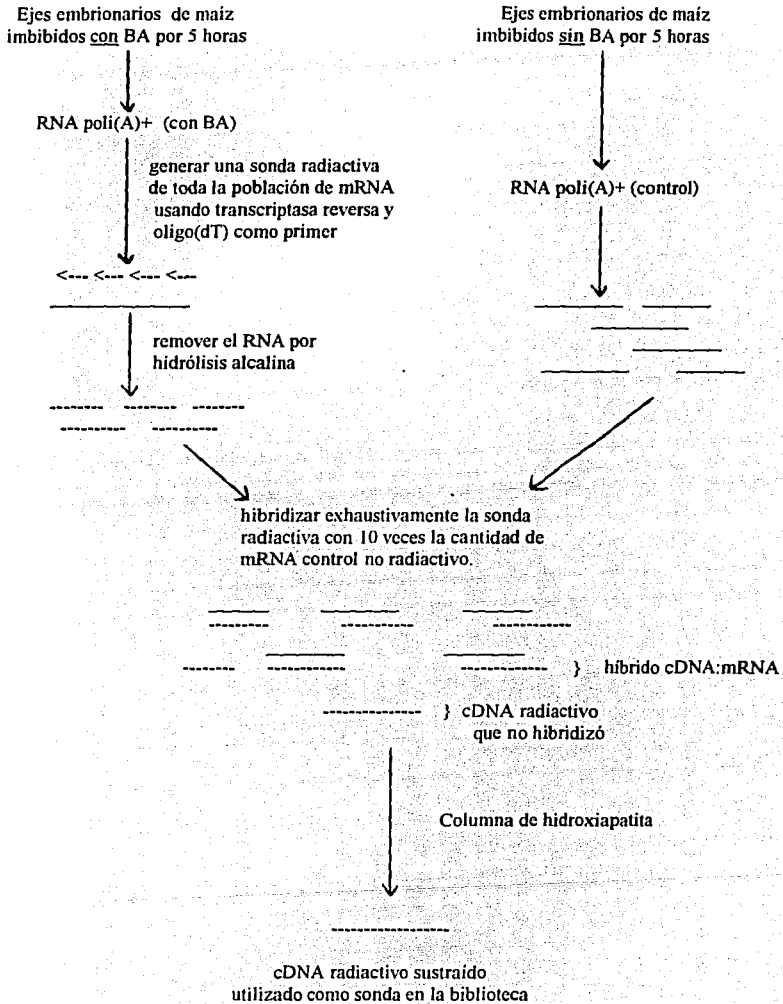


Figura 2.6 Esquema para la preparación de una sonda sustraída.

[fosfato de sodio]	cpm ssDNA	cpm dsDNA
0.01M	500	400
0.12M	16300	9500
0.16M	16500	12200
0.20M	600	650
0.24M	420	200
0.28M	220	180
0.32M	300	200
0.36M	300	250
0.40M	280	250

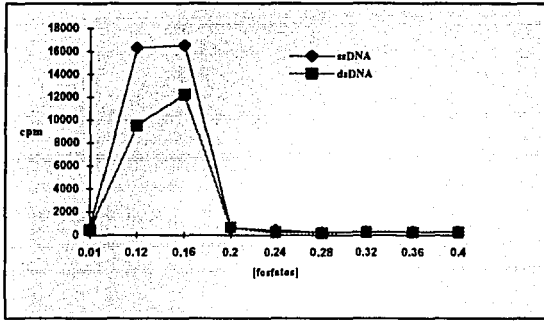


Figura 2.7. Columna de hidroxiapatita (LKB). La separación se hizo a temperatura ambiente

Los resultados obtenidos utilizando la resina de LKB y llevando a cabo la separación a temperatura ambiente no fueron satisfactorios, ya que tanto el ssDNA como el dsDNA eluyen a una misma concentración de fosfato de sodio.

Se repitió el experimento utilizando hidroxiapatita de Bio-Gel y usando las mismas condiciones que para la resina de LKB. El resultado obtenido se presenta en la figura 2.8.

[fosfato de sodio]	cpm ssDNA	cpm dsDNA
0.01M	100	150
0.12M	1000	1500
0.16M	10000	3000
0.20M	4000	12000
0.24M	500	2000
0.28M	500	1000
0.32M	200	250
0.36M	100	150
0.40M	100	100

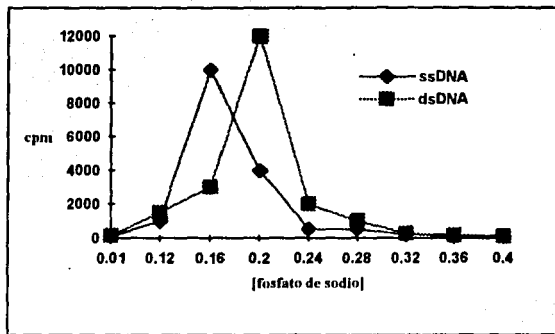


Figura 2.8. Columna de hidroxiapatita Bio-Gel. La separación se hizo a temperatura ambiente

Los resultados muestran que la hidroxiapatita de Bio-Gel es un poco más eficiente que la de LKB, pero aún así la separación que se logra de los ácidos nucleicos no es muy buena. El DNA de cadena sencilla y el DNA de cadena doble eluyen a concentraciones de fosfatos muy similares (0.16M y 0.20M respectivamente), y por lo tanto estas condiciones no son las más adecuadas para separar las dos poblaciones de ácidos nucleicos.

A continuación se probó llevar a cabo la separación de ssDNA y dsDNA a temperatura elevada. Se utilizó la hidroxiapatita de Bio-Gel y todo el procedimiento se hizo a 60°C. En estas condiciones el DNA de cadena sencilla eluye a una concentración de 0.16

M de fosfato de sodio, mientras que el DNA de cadena doble eluye a una concentración de 0.28 M de fosfato de sodio. La figura 2.9 muestra el perfil de elución obtenido.

[fosfato de sodio]	cpm ssDNA	cpm dsDNA
0.01M	400	500
0.12M	650	750
0.16M	8000	400
0.20M	6000	150
0.24M	300	100
0.28M	12000	20000
0.32M	1200	10000
0.36M	150	4000
0.40M	100	150

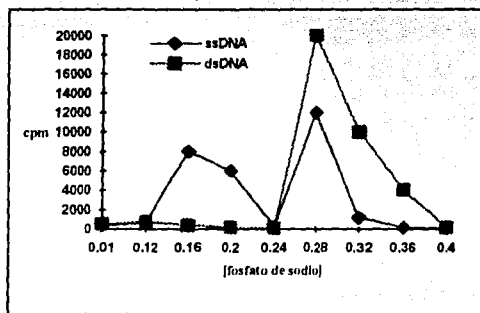


Figura 2.9. Columna de hidroxipatita (Bio-Gel), a 60°C.

Habiendo establecido las condiciones adecuadas para la separación de ácidos nucleicos de cadena sencilla y de cadena doble, se preparó la sonda sustraída como se describe en Materiales y Métodos. El cDNA sustraído fué purificado en una columna de hidroxipatita (Bio-Gel), y se obtuvieron las dos fracciones mostradas en la figura 2.10 al eluir a diferentes concentraciones de fosfato de sodio:

[fosfato de sodio]	cpm
0.15M	8.5×10^6
0.30M	20.75×10^6

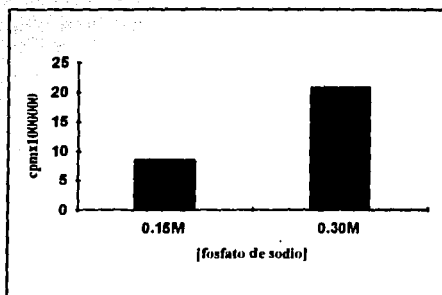


Figura 2.10. Separación del sscDNA (fracción eluida a 0.15M fosfato de sodio) y de los híbridos cDNA:RNA (fracción eluida a 0.3M de fosfato de sodio) producidos por hibridación sustractiva, mediante una columna de hidroxiapatita Bio-Gel, a 60°C.

El cDNA de cadena sencilla, eluido a una concentración de 0.15M de fosfato de sodio, fue utilizado para sondear la biblioteca de cDNA en la búsqueda de clonas que representaran cDNAs de mRNAs que se encontraran presentes en los embriones imbibidos en presencia de benciladenina y ausentes en los embriones control. Estas secuencias probablemente estarían reguladas en su expresión por el fitorregulador.

En el primer sondeo de 125,000 pfus (unidades formadoras de placa) de la biblioteca de cDNA con la sonda sustraída, se identificaron 12 placas positivas. Estas 12 placas se aislaron, de ellas se eluyeron los fagos, y se éstos se esparcieron nuevamente como se describió en el inciso 2.2.4.12 para realizar un segundo sondeo y corroborar en su caso la señal positiva. En el segundo sondeo solamente 6 de las 12 clonas dieron señal positiva, por lo que se decidió continuar trabajando con las 6 clonas. Cabe mencionar que las clonas seleccionadas fueron aquellas que dieron las señales de mayor intensidad.

2.3.3. Caracterización de las clonas "positivas".

Para estimar el tamaño de los fragmentos clonados, los insertos de las clonas positivas se amplificaron por PCR y los productos se analizaron en un gel de agarosa al 1.5%. Los resultados son los siguientes:

<u>Clona No.</u>	<u>Tamaño aprox. (pb)</u>
1	100
2	600
4	350
5	120
8	400
11	700

Los insertos de las clonas 1 y 5 son muy pequeños, por lo que se decidió continuar trabajando únicamente con las clonas 2, 4, 8 y 11. Los insertos de estas clonas se aislaron e hibridaron entre sí; no se encontró señal de hibridación cruzada, lo que sugiere que las clonas son diferentes.

2.3.4. Cinética de expresión de los RNA mensajeros de las clonas 2,4,8 y 11.

Los insertos de las clonas 2,4,8 y 11 se amplificaron por PCR y se purificaron en un gel de agarosa al 1.2%. Estos fragmentos se marcaron radiactivamente por "random primer", y se utilizaron para hibridar filtros conteniendo RNA extraído de ejes embrionarios de maíz sin tratar (tiempo 0) y de ejes embrionarios embebidos con y sin benciladenina durante 5 y 7.5 horas. Los resultados se presentan en la figura 2.11. La intensidad de cada banda se determinó por densitometría de las placas de rayos X; las gráficas de los valores obtenidos se presentan en la figura 2.12.

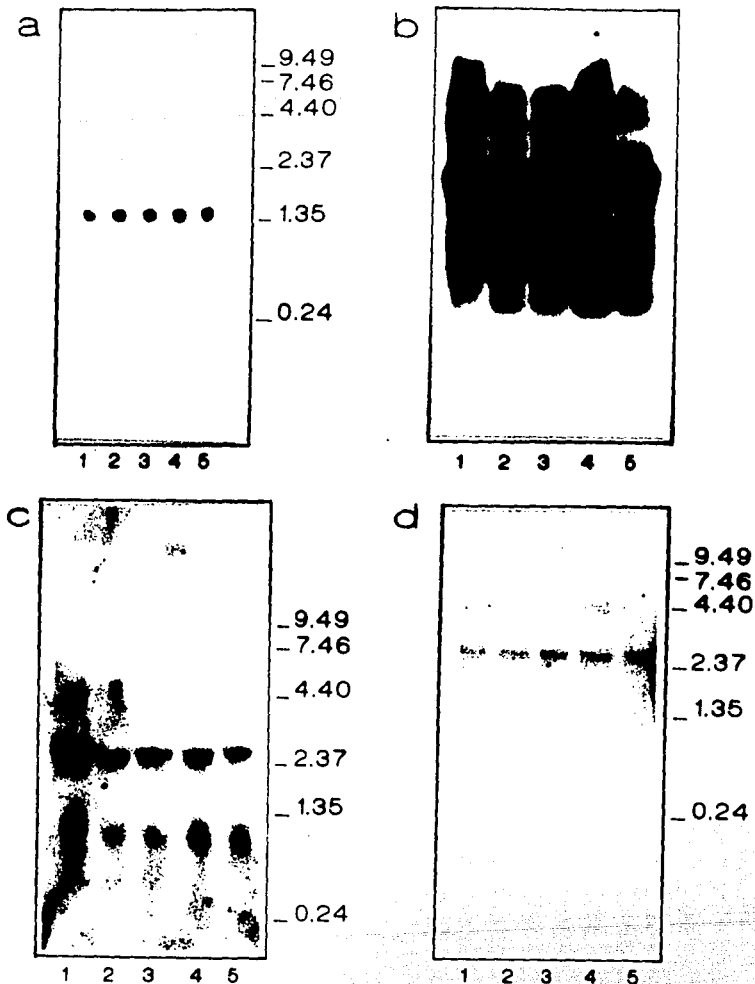


Figura 2.11 Cinética de expresión de los RNA mensajeros de las clonas 2,4,8 y 11. Panel a: clona 2. Panel b: clona 4. Panel c: clona 8. Panel d: clona 11. Carril 1: mRNA aislado de ejes embrionarios de maíz sin tratar (tiempo 0). Carril 2: mRNA aislado de ejes embrionarios embebidos por 5 horas en amortiguador control. Carril 3: mRNA aislado de ejes embrionarios embebidos por 5 horas con BA. Carril 4: mRNA aislado de ejes embrionarios embebidos por 7.5 horas en amortiguador control. Carril 5: mRNA aislado de ejes embrionarios embebidos por 7.5 horas con BA. Los filtros se hibridaron y lavaron como se describe en material y métodos.

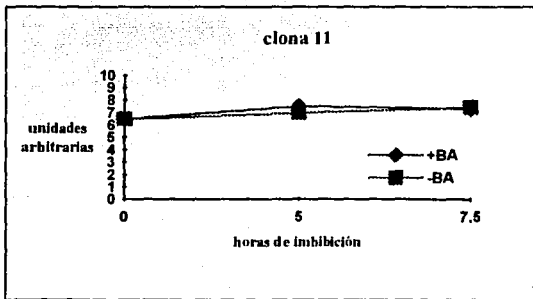
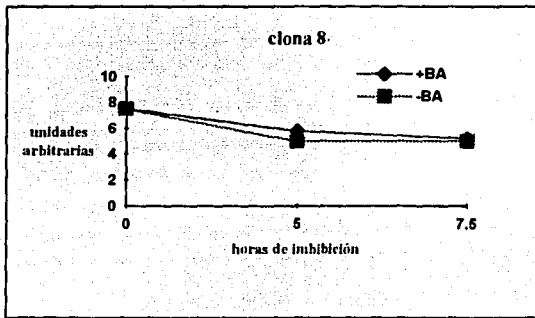
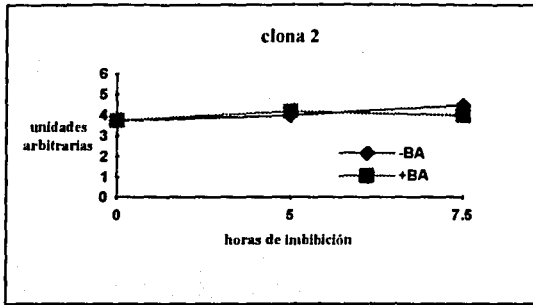


Figura 2.12. Cantidad relativa de los mRNAs de las clonas 2, 8 y 11. Se graficaron los valores densitométricos obtenidos de los Northern de la figura 2.11.

Puede verse que los mRNA de las clonas 2, y 11 se encuentran presentes en el embrión de la semilla seca (tiempo 0) y su abundancia no se modifica de manera significativa durante las primeras 7.5 horas de germinación con y sin benciladenina. Para el caso de el mRNA de la clona 8, su abundancia es similar durante las primeras 7.5 horas de germinación en ejes embebidos con y sin benciladenina, aunque este mensaje se encuentra en mayor abundancia (50% aprox) en la semilla seca. En el caso de la clona 4, se obtuvieron bandas de hibridación de diferentes intensidades a todo lo largo del filtro. Aún cuando este experimento se realizó por duplicado y el filtro se lavó en condiciones más estrictas (0.2X SSC, 0.2% SDS, 65°C) el resultado que se encontró fue el mismo. Por lo tanto, no se realizó una valoración densitométrica de este filtro.

Dado que estas clonas se aislaron por hibridación diferencial a partir de una biblioteca de cDNA construida a partir de ejes embrionarios embebidos por 5 horas en benciladenina, se esperaba encontrar diferencia en la expresión de estos mensajes a las 5 horas de imbibición con y sin benciladenina. Los resultados anteriores muestran que no existen estas diferencias, es decir, la abundancia de los mensajes es la misma, independientemente de que los ejes embrionarios a partir de los cuales se aisló el RNA mensajero se trataran o no con la citocinina benciladenina.

Como se ha mostrado hasta ahora, la estrategia de hibridación sustractiva no nos permitió identificar secuencias reguladas en su expresión por benciladenina a las 5 horas de germinación de ejes embrionarios de maíz. A continuación, en el capítulo III, se presentará la segunda estrategia utilizada para tratar de identificar genes que pudieran estar regulados en su expresión y por lo tanto asociados a la respuesta a benciladenina durante la germinación de maíz.

CAPITULO III

PCNA (ANTIGENO NUCLEAR DE PROLIFERACION CELULAR) COMO MODELO PARA ESTUDIAR EL EFECTO DE BENCILADENINA DURANTE LA GERMINACION DE EJES EMBRIONARIOS DE MAÍZ.

3.1 Introducción

Como se mencionó en la introducción, la segunda alternativa para probar nuestra hipótesis de trabajo es tratar de identificar un gen particular que pudiera estar involucrado en la respuesta a benciladenina, y estudiar su respuesta a este fitorregulador durante la germinación de ejes embrionarios de maíz.

Nuestro grupo de trabajo se ha dedicado a estudiar el metabolismo del DNA durante la germinación de maíz, y el efecto que sobre este proceso tienen las citocininas. Como ya se ha mencionado, BA promueve el metabolismo del DNA durante la germinación de maíz, estimulando la síntesis de DNA de tipo reparativa y replicativa (Zarain *et al.*, 1987; Reyes *et al.*, 1991); BA también estimula la actividad de la DNA polimerasa (Vázquez-Ramos y Reyes, 1990; Reyes *et al.*, 1991). Cabe mencionar que la estimulación de la síntesis de DNA por benciladenina no se lleva a cabo si los ejes embrionarios se incuban en presencia de un inhibidor de la síntesis de RNA (α -amanitina) y un inhibidor de la síntesis de proteínas (cicloheximida) (Vázquez-Ramos y Reyes, 1990). Por lo tanto, es posible que BA pudiera estar promoviendo la expresión de alguno de los productos que participan en la síntesis del DNA.

3.1.1 Consideraciones sobre la replicación del DNA.

La replicación del DNA es un evento complejo que requiere de la intervención de muchas proteínas, entre las que se encuentran DNA polimerasas, DNA primasas, DNA helicasas, proteínas de unión a DNA de cadena sencilla, DNA ligasas, DNA topoisomerasas, y proteínas iniciadoras que catalizan la formación de la horquilla de replicación en los orígenes de replicación (Kornberg and Baker, 1992).

En los últimos años ha aumentado de manera considerable el conocimiento de los mecanismos moleculares y las proteínas involucradas en la síntesis de DNA. El desarrollo de un sistema de replicación *in vitro* utilizando el DNA del virus SV40, el aislamiento y caracterización de las proteínas involucradas en este proceso, así como la clonación de los genes que codifican para estas proteínas, ha permitido conocer y establecer su función e interrelación en tan importante proceso. Las DNA polimerasas han sido las proteínas más extensamente estudiadas del aparato de replicación. En plantas, el estudio de las DNA polimerasas se encuentra en etapas iniciales si se compara con los avances hechos en bacterias y animales. Hasta ahora, en plantas se han caracterizado solamente las DNA polimerasas α y δ .

DNA polimerasa α .

La DNA polimerasa α fue la primera polimerasa aislada de timo de ternera (Bollum, 1960) y evidencias experimentales han mostrado que tiene un papel directo en la replicación del DNA cromosómico. Esta enzima está compuesta por 4 subunidades: una subunidad catalítica, un polipéptido que mantiene la estabilidad de la holoenzima y promueve la formación de un complejo de iniciación y dos polipéptidos asociados con la actividad de DNA primasa (Brooke and Dumas, 1991; Collins *et al.*, 1993; Kagune *et al.*, 1983; Cripps-Wolfman *et al.*, 1989). Debido a la estrecha asociación de las actividades de DNA polimerasa y DNA primasa, a este complejo se le ha llamado DNA polimerasa-primasa.

La DNA polimerasa-primasa es una enzima que tiene una procesividad baja (entre 20-50 nucleótidos por evento de unión a un molde de DNA) (Hohn y Grosse, 1987). Se ha demostrado que el factor de replicación A (RF-A) incrementa la procesividad de esta enzima, permitiendo que pueda sintetizar fragmentos de 100-200 nucleótidos, que se encuentran en el rango de los fragmentos de Okazaki (So and Downey, 1992). Por lo tanto, se cree que esta enzima es responsable de la síntesis de la cadena discontinua en la horquilla de replicación.

Las DNA polimerasas tipo α que se han descrito en plantas poseen características similares a las polimerasas de animales (Bryant, 1981; Litvak y Castroviejo, 1985; Coello *et al.*, 1992).

DNA polimerasa δ .

La DNA polimerasa δ (pol δ), fue descubierta en timo de ternera y en reticulocitos de conejo (Byrnes *et al.*, 1976). Tiene la característica de poseer una actividad intrínseca de exonucleasa 3' \rightarrow 5'. Ya que la polimerización del DNA es en dirección 5' \rightarrow 3', la actividad

de exonucleasa da a la DNA polimerasa δ la capacidad de edición, es decir, de remover algún nucleótido que haya sido incorporado erróneamente para mantener la fidelidad durante la replicación.

La DNA polimerasa δ está formada por dos subunidades de 125 y 48 kDa. La subunidad mayor es la que tiene la actividad de polimerasa y exonucleasa y, utilizando anticuerpos monoclonales, se ha visto que es claramente distinta de la DNA polimerasa α (Lee et al. 1984).

Evidencias experimentales muestran que la DNA polimerasa δ está asociada a la replicación del DNA. La replicación del DNA de SV 40 realizada *in vitro* es dependiente de la presencia de la DNA polimerasa α , DNA polimerasa δ , y de PCNA, un factor auxiliar de esta última (ver mas adelante). (Weinberg, 1989; Melendy y Stillman, 1991). En *Saccharomyces cerevisiae*, se encontró que el gen que codifica para la DNA polimerasa δ es esencial para la replicación del DNA (Boulet et al., 1989).

Una característica de la DNA polimerasa δ es que no tiene capacidad para duplicar fragmentos grandes de DNA por sí misma, pudiendo replicar apenas 10-20 nucleótidos. Tan y colaboradores (1986) encontraron que la procesividad de esta enzima aumenta cuando se encuentra presente una proteína auxiliar de 36 kDa; en estas condiciones, la DNA polimerasa δ es capaz de replicar el genoma completo de SV 40 en un solo evento. Esta característica ha permitido suponer que la DNA polimerasa δ es la enzima responsable de llevar a cabo la reacción de polimerización en la cadena continua de la horquilla de replicación, mientras que la DNA polimerasa α es la encargada de la síntesis del DNA en la cadena discontinua.

Recientemente, en extractos de células humanas se ha encontrado que la reparación del DNA depende de la presencia de PCNA, lo que implica que la DNA polimerasa δ está involucrada también en los eventos de reparación del DNA (Shivji et al. 1992).

Hasta ahora, se ha reportado una DNA polimerasa tipo δ en plantas (Richard *et al.*, 1991), que proviene de estudios en embriones de trigo. Esta polimerasa fue clasificada inicialmente como tipo α (Castroviejo *et al.* 1975), pero estudios posteriores demostraron que PCNA de timo de ternera incrementa la procesividad de esta enzima, lo que indica que se trata en realidad de una DNA polimerasa tipo δ .

3.1.2. El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA).

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA por sus siglas en inglés), fue descrito originalmente como una proteína nuclear reconocida por autoanticuerpos de

pacientes con lupus eritematoso sistémico y cuya síntesis estaba relacionada con el estado proliferativo de la célula (Miyashi *et al.*, 1978; Takasaki *et al.*, 1981). Bravo y cols. (1981) describieron de manera independiente una proteína, llamada ciclina, cuya aparición también correlacionaba con el estado proliferativo de la célula. Posteriormente se demostró que ambas proteínas eran la misma (Mathews *et al.* 1984).

PCNA es un factor auxiliar de la DNA polimerasa δ y su función es incrementar tanto la actividad como la procesividad de la polimerasa (Tan *et al.*, 1986; Tsurimoto *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1990). Recientemente, se ha encontrado que también se requiere PCNA para que se lleve a cabo la síntesis reparativa del DNA (Shivji *et al.*, 1992). Se han clonado los genes que codifican para PCNA de especies diversas (Almendral *et al.*, 1987; Waseem *et al.*, 1992; Kilbey *et al.*, 1993), incluyendo algunas plantas (Kodama *et al.*, 1991; Suzuka *et al.*, 1991; Hata *et al.*, 1992; Markley *et al.*, 1993). Esta proteína está muy conservada y puede complementar especies diferentes (Waseem *et al.*, 1992; Laquel *et al.*, 1993).

Estudios realizados en fibroblastos han mostrado que la expresión del mensaje para PCNA se induce por factores de crecimiento tal como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF por sus siglas en inglés) (Jaskulski *et al.*, 1988) y que esta inducción requiere de un receptor funcional para el factor de crecimiento I semejante a insulina (Miura *et al.*, 1994). En plantas, Kosugi y cols. (1991) encontraron que la región promotora de PCNA de arroz es capaz de mediar la expresión del gene quimérico PCNA-GUS en meristemas de plantas transgénicas de tabaco; esta expresión aumenta 11 veces en presencia de una mezcla de auxinas y citocininas (ácido naftalenacético y benciladenina).

Las características anteriores de PCNA (proteína activadora de la DNA polimerasa tanto en replicación como en reparación, inducción del mRNA de PCNA por factores de crecimiento en animales y posiblemente por fitorreguladores en plantas) hacen de esta una molécula muy interesante para nuestra área de estudio. Debido a que durante la germinación de ejes embrionarios de maíz hemos observado que BA incrementa la actividad (pero no la cantidad) de DNA polimerasa, cabe pensar en la posibilidad de que PCNA fuera un mediador de el efecto de BA sobre la actividad de DNA polimerasa.

Por lo tanto, en esta segunda parte del proyecto de investigación nos dedicamos a caracterizar al antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) de maíz e investigar si la transcripción del mRNA de PCNA está modulada por benciladenina durante la germinación.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Clonar el cDNA del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) de maíz.
- 2.- Caracterizar la clona de cDNA.
- 3.- Estudiar la expresión del mRNA de PCNA en diferentes tejidos de la planta de maíz.
- 4.- Determinar si la expresión de PCNA está regulada por benciladenina durante las primeras horas de germinación de ejes embrionarios de maíz.

3.3 MÉTODOS.

La metodología utilizada se incluye tanto en el artículo publicado como en el manuscrito en revisión, que se anexan a continuación.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Artículo 1:

Imelda López, Safina Khan, Jorge Vázquez-Ramos and Patrick J. Hussey. (1995). "Molecular cloning of a maize cDNA clone encoding a putative proliferating cell nuclear antigen". *Biochimica et Biophysica Acta* 1260, 119-121.

En este artículo se describe la clonación y la secuencia de un cDNA que codifica para el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) de maíz.

Short Sequence-Paper

Molecular cloning of a maize cDNA clone encoding a putative proliferating cell nuclear antigen [☆]

Imelda López ^{a,b}, Safina Khan ^a, Jorge Vázquez-Ramos ^b, Patrick J. Hussey ^{a,*}

^a Department of Biochemistry, Royal Holloway, University of London, Egham, Surrey TW20 0EX, UK

^b Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D.F., México

Received 27 July 1994; accepted 6 October 1994

Abstract

We report the isolation and sequence of a maize cDNA clone which encodes a protein homologous to proliferating cell nuclear antigen (PCNA). The deduced amino acid sequence predicts a protein of 263 amino acids in length. The amino acid sequence shares 62% identity with the human PCNA and 95% identity with the rice homologue of PCNA.

Keywords: PCNA; DNA binding region; Cyclin binding region; (Maize)

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is an auxiliary factor for DNA polymerase δ (pol δ) which stimulates processivity (see [1]). Pol δ is part of a dimeric DNA polymerase complex functioning at the replication fork and is responsible for the synthesis of the leading strand [2]. PCNA is also required for DNA excision repair [3]. The expression of the PCNA gene is controlled at both the transcriptional and post-transcriptional levels. In particular, sequences in the 5' upstream region of mouse PCNA [4] and sequences within intron 1 [5] and intron 4 [6] of the human PCNA gene have negative regulatory effects. In addition, a homeobox gene has been reported to be a negative regulator of PCNA gene transcription [7]. In mammalian cells, various growth signals stimulate the expression of the PCNA mRNA (e.g., [8]) and it has been reported that the stability of mouse PCNA mRNA is modulated in the cell cycle [9].

Genes/cDNAs encoding PCNA and homologues of PCNA have been isolated from a range of taxonomically diverse species, e.g., [10–12] including a few plants [13–16]. The deduced amino acid sequences of the PCNA

genes/cDNA clones are highly conserved. Mammalian PCNA has been shown to stimulate the activity and processivity of pol δ -like DNA polymerases from wheat embryo which would suggest a conserved function for PCNA in animals and plants [17].

For this study, we have isolated a full-length maize cDNA clone encoding a homologue of PCNA. The maize cDNA clone was isolated from a rapidly dividing Black Mexican Sweetcorn suspension culture cell cDNA library. The library was constructed from mRNA in the vector pUC13 (J. Hunsperger, unpublished data) by priming cDNA synthesis with an oligo(dT) tailed vector using a modification of the Okayama and Berg [18] procedure. The library was screened using a random prime labelled [19] *Xba*I fragment of the rice PCNA genomic clone [14]. This fragment corresponds to the nucleotide region –422 to +2436 of the genomic clone and includes the full coding region. The Zetaprobe (Bio-Rad, UK) colony hybridisation procedure was followed. Hybridisation was for 48 h at 37°C in 50% (v/v) formamide, 5 × SSC, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 × Denhardt's solution, 1% (w/v) SDS, 0.1 mg/ml calf thymus DNA and 50 μ g/ml poly(A). The final wash of the nylon membranes was for 30 min at 52°C with 0.2 × SSC containing 0.2% (w/v) SDS. From a screen of 120 000 colonies, 11 positives were picked and the largest clone was sequenced on both strands by dideoxy sequencing [20].

The nucleotide and deduced amino acid sequence of the putative maize PCNA is shown in Fig. 1. The open reading

Abbreviations: PCNA, proliferating cell nuclear antigen; pol δ , DNA polymerase δ .

The sequence data reported in this paper have been submitted to the EMBL/GenBank Data Libraries under the accession number X79065.

* Corresponding author. E-mail: p.hussey@rhnbc.ac.uk. Fax: +44 784 434326.

frame was identified by comparison with published PCNA sequences. The maize cDNA encodes a protein of 263 amino acids in length, has a predicted molecular mass of 29 342 Da and an isoelectric point of 4.46. The amino acid sequence shares 95% identity and 99% similarity with the rice sequence [14] and 62% identity and 91% similarity with the human sequence [10]. Like all other PCNAs, the maize PCNA contains a possible DNA binding domain consisting of an α -helix-turn- α -helix [10], Arg-61 to Arg-80 which shares 65% identity and 100% similarity with the equivalent region in the human sequence. The importance of this domain to PCNA function is unknown. So far, it has been shown that PCNA alone cannot bind single-

stranded DNA but it has been suggested that after an initial interaction between PCNA and pol δ , the potential PCNA DNA binding domain may become functional [21].

Recently, it has been shown that cyclins D1 and D3 form complexes with PCNA [22]. It has been suggested that the interaction with cyclin D1 may prevent PCNA from binding to the replication complex; cyclin D1 might serve to regulate the activity of PCNA. Two regions, amino acids 2–64 and 197–228 in mouse PCNA, are necessary for the association of PCNA with the D type cyclins [23]. These regions, which are again highly conserved in the plant amino acid sequences (Fig. 1), show between 62–67% identity (90% similarity), and between

```

ttgccctcgccctctcaaacctcgcgctcccgccagctagggttccccgatctcc 60
                                     M L E L R L V 7
cctctctctcaaccgcccgtctccgagagcgcgcccagatgttgagactcggcttg 120
Q G S L L K K V L E A I R E L V N D A N 27
tcgagggagcctcctcaagaaggtcctggagcggatcccgagctggtcaacgaccca 180
F D C S G T G F S L Q A M D S S H V A L 47
actcgaactgctcccgccaccgggttctcgctcgagccatcgagcccaactcgccc 240
V A L L L R A E G F E H Y R C D R N L S 67
tcgtcggctgctcctccgcccaggggttctgagcactaccgctcgaccccaacctct 300
M G M N L M N M A K N L R C A G N D D I 87
ccatggycatgaacctcaacaacatggccaagatgctccggtgcccggtaacgcgaca 360
I T I K A D D G S D T V T F M F E S P K 107
tcataccataaaggccgatgacggttctgacaccgctcacccttatgttcgagtcgcca 420
Q D K I A D F E M K L M D I D S E H L G 127
agcaagataaagattcggtatctcgagatgaaactgatggatattgatagcagcacctcg 480
I P D S E Y Q A I V R M P S S E F P M R I 147
gaatccggatccgagatccagggccatcgctccgcatgctctctctgagtttatgagga 540
C K D L S S I G D T V V I S V T K E G V 167
ctgcaaggaccttagcagcatcggagacactgctgttatctcggtaaccaaggagggcg 600
K F S T S G E I G S A N I V C R Q A N Q T 187
tgaagttctccacatctggagaaattgggagtgccaacattgttcgacggagaccaaa 660
I D K P E E A T I I E M Q E P V S L T P 207
ctattgacaagccagaagggtaccatttatagagatgcaagagccgcttccctgacct 720
A L R Y M N S F T K A S S L S E Q V T I 227
ttgcccgaagctacatgaactcgtccaccagcgtctcactgcccgaacaaactcaga 780
S L S E L P V V V E Y K I A E M G Y I 247
tcagcctgctcgtccgagctaccagtggtggtcgagtcacaagatcgctgagatgggttaca 840
R F Y L A P K I E D D E E M K P * 263
ttagattttacctggcccacaagatcgaggacgatgaggagatgaagccatgattgccat 900
cagtgctcgtcgtccgactttttctcgtcttccatccatgggttgccttattagctatta 960
tttcacgcaaaagggaaaaaaagatggttatgttttatcttaggccagactgctttagc 1020
tacttatttgtagctgctgtgtgctccatggatttatagtgatctagattagtgggcttg 1080
tgctttgtgcatgcgctgctgtctgcccattttctattcagacatgaaattctttggt 1140
gggatc 1146

```

Fig. 1. The nucleotide and deduced amino acid sequences of the maize homologue of PCNA. The Arg-61 to Arg-80 sequence referred to in the text is indicated by bold print. The putative cyclin binding regions are underlined.

72–84% identity (87–94% similarity) with the same regions in mouse PCNA, respectively. This suggests that plant cyclins might exert similar regulatory effects on plant PCNA.

The isolation of PCNA related sequences from plants provides a foundation for the investigation of the signals that promote DNA replication and cell proliferation in plant cells. Bearing in mind that the growth signals in plants and animals are different, the response of plant PCNA gene expression to environmental factors and plant growth regulators may prove interesting.

This work was supported by scholarships to I. Lopez from the British Council and the DGAPA, UNAM. We thank Dr. J. Hunsperger for the maize BMS library and Dr. I. Suzuka for providing the rice genomic clone used in this study.

References

- [1] Prelich, G., Tan, C.K., Kostura, M., Mathews, M.B., So, A.G., Downey, K.M. and Stillman, B. (1987) *Nature* 326, 517–520.
- [2] Tsurimoto, T. and Stillman, B. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 1961–1968.
- [3] Shivji, M.K.K., Kenny, M.K. and Wood, R.D. (1992) *Cell* 69, 367–374.
- [4] Matsuoka, S., Yamaguchi, M., Hayashi, Y. and Matsukage, A. (1993) *Eur. J. Biochem.* 218, 173–181.
- [5] Alder, H., Yoshinouchi, M., Prystowsky, M.B., Appasamy, P. and Baserga, R. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20, 1769–1775.
- [6] Ottavio, L., Chang, C.-D., Rizzo, M.-G., Travali, S., Casadevall, C. and Baserga, R. (1990) *Mol. Cell Biol.* 10, 303–309.
- [7] Yamaguchi, M., Hirose, F., Nishida, Y. and Matsukage, A. (1991) *Mol. Cell Biol.* 11, 4909–4917.
- [8] Jaskulski, D., Gatti, C., Travali, S., Calabretta, B. and Baserga, R. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 10175–10179.
- [9] Shipman-Appasamy, P., Cohen, K.S. and Prystowsky, M.B. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 19180–19184.
- [10] Almendral, J.M., Huebsch, D., Blundel, P.A., MacDonald-Bravo, H. and Bravo, D. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1575–1579.
- [11] Waseem, N.H., Lubb, K., Nurse, P. and Lane D.P. (1992) *EMBO J.* 11, 5111–5120.
- [12] Kibbey, B.J., Fraser, I., McAleese, S., Goman, M. and Ridley, R.G. (1993) *Nucleic Acids Res.* 21, 239–243.
- [13] Kodama, H., Ito, M., Ohnishi, N., Suzuka, I. and Komamine, A. (1991) *Eur. J. Biochem.* 197, 495–503.
- [14] Suzuka, I., Hata, S., Matsuoka, M., Kosugi, S., Hashimoto, J. (1991) *Eur. J. Biochem.* 195, 571–575.
- [15] Hata, S., Kouchi, H., Tanaka, Y., Minami, E., Matsumoto, T., Suzuka, I. and Hashimoto, J. (1992) *Eur. J. Biochem.* 203, 367–371.
- [16] Markley, N.A., Bonhamsmith, P.C. and Moloney, M.M. (1993) *Genome* 36, 459–466.
- [17] Laquel, P., Litvak, S. and Castroviejo, M. (1993) *Plant Physiol.* 102, 107–114.
- [18] Okayama, H. and Berg, P. (1982) *Mol. Cell Biol.* 2, 161–170.
- [19] Fienberg, A.P. and Vogelstein, B. (1983) *Anal. Biochem.* 132, 6–13.
- [20] Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 1468–1472.
- [21] Ng, L., McConnell, M., Tan, C.-K., Downey, K. and Fisher, P.A. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 13571–13576.
- [22] Baldin, V., Lukas, J., Marcote, M.J., Pagano, M. and Draetta, G. (1993) *Genes Dev.* 7, 812–821.
- [23] Matsuoka, S., Yamaguchi, M. and Matsukage, A. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 11030–11036.

3.4.2 Artículo 2:

Imelda López, Safina Khan, Jorge Vázquez-Ramos and Patrick J. Hussey. (1995).
"Characterization of the maize Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) gene family; the response of PCNA gene expression to cytokinins".

En este artículo se describe el aislamiento de un segundo miembro de la familia de PCNA en maíz y la expresión de PCNA en diferentes tejidos de la planta. También se estudia el efecto que tiene benciladenina en la expresión de PCNA durante la germinación de ejes embrionarios de maíz.

TITLE: Characterization of the maize Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) gene family; the response of PCNA gene expression to cytokinins.

AUTHORS: Imelda López^{1,2,3}, Safina Khan¹, Jorge Vázquez-Ramos² and Patrick J. Hussey^{1*}.

1: School of Biological Sciences, Royal Holloway, University of London, Egham, Surrey TW20 0EX, UK.

2: Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D.F., México.

3: Present Address: Departamento de Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 70228. México 04510 D.F. México.

* Address for correspondence.

Tel: 0784 443539

Fax: 0784 434326

e-mail: p.hussey@rhbnc.ac.uk

Key words: PCNA, maize, cytokinins.

INTRODUCTION

PCNA, the proliferating cell nuclear antigen, was originally described as a nuclear protein recognized by an autoantibody from patients with systemic *lupus erythematosus* and whose synthesis correlated with the proliferative state of the cell [Miyashi *et al.* 1978, Takasaki *et al.* 1981]. Bravo *et al.* [1981] independently described a protein, called cyclin, whose appearance also correlated with the proliferative state of the cell. The two proteins were shown later to be identical [Mathews *et al.*, 1984].

DNA polymerase δ (Pol δ) is part of the DNA-synthesizing machinery, functioning at the replication fork in the synthesis of the leading strand [Tsurimoto *et al.* 1991]. PCNA is an auxiliary protein for polymerase δ whose function is to increase both polymerase activity and processivity [Tan *et al.* 1986, Tsurimoto *et al.* 1990, Lee *et al.* 1990]. More recent studies have shown that PCNA is involved in repair DNA synthesis [Shivji *et al.* 1992].

Genes encoding PCNA have been cloned from widely divergent species [Almendral *et al.*, 1987; Wasee *et al.*, 1992; Kilbey *et al.*, 1993], including several plants [Kodama *et al.*, 1991; Suzuka *et al.*, 1991; Hata *et al.*, 1992; Markley *et al.*, 1993]. This protein is highly conserved and is able to complement taxonomically diverse species: human PCNA can complement a

transcriptional levels. A conserved region in intron 1 exerts a negative regulatory effect on the expression of the PCNA gene [Alder *et al.*, 1992], and deletion of intron 4 increases the PCNA mRNA levels in serum-deprived human cells [Ottavio *et al.*, 1990]. Another negative regulatory region has been identified on the 5' upstream region of the mouse PCNA gene, and this might consist of multiple elements with weak repressing activities [Matsuoka *et al.*, 1993].

Some of the enzymes of the DNA synthesizing machinery constitute a group of gene products that are generally coordinately expressed at the G1/S boundary of the cell cycle. In fibroblasts, it has been shown that the mRNA of the PCNA gene is induced by growth factors like the platelet-derived growth factor (PDGF) [Jaskulski *et al.*, 1988], and that this induction requires a functional receptor for the insulin-like growth factor I [Miura *et al.*, 1994].

Studies on DNA metabolism in plants lag far behind those in other eukaryotic cells. Only a few DNA polymerases have been extensively purified and the role of the different enzymes is still a matter of speculation [Coello *et al.*, 1992, Castroviejo *et al.*, 1990; Heinhorst *et al.*, 1990]. In the recent years, a δ -type DNA polymerase has been identified in wheat embryos mainly due to the response of this enzyme to mammalian PCNA [Laquel *et al.*, 1993]. The PCNA protein has not been characterized in plants. Some circumstantial evidence would indicate that, as in animal cells, PCNA gene expression might be modulated by growth factors (phytohormones) [Kosugi *et al.*, 1991].

A maize PCNA gene has been recently cloned and sequenced [López *et al.*, 1995]. In this paper we report the identification of a second putative maize PCNA gene. Our results show that both genes are equally expressed in proliferating tissues, and that a synthetic cytokinin

(benzyladenine) temporally induces the expression of PCNA during a developmental process like seed germination.

EXPERIMENTAL PROCEDURES.

Plant Material.

mRNA isolated from suspension culture cells of Black Mexican Sweetcorn was used to construct the cDNA library in the vector pUC13 [J. Hunsperger, unpublished data]. *Zea mays* inbred line A188 was used for the preparation of DNA used in the Southern assays and for the preparation of tissue-specific RNAs used in the tissue-specific Northern assays. Roots and shoots were harvested from 4-7 days old germinated seedlings. Leaves were from greenhouse or field-grown mature plants. Staged spiklets were harvested from greenhouse-grown plants. Pollen was germinated at room temperature for 45 min on solid medium containing 17% (w/v) sucrose, 0.3 g l⁻¹ Ca Cl₂, 0.1 g l⁻¹ H₃BO₃, 1% (w/v) agarose (Sigma, UK). Embryonic axes from *Zea mays* "chalqueño" variety seeds were used for the germination experiments. Embryonic axes were isolated by hand, washed with sterile distilled water, and germinated for different periods of time in 50 mM Tris/HCl pH7.6, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 2% sucrose and 10 mg/ml chloramphenicol with or without 10⁻⁵ M Benzyladenine (Sigma).

Isolation of cDNA clones.

We have previously reported the isolation of a full-length maize cDNA clone (ZmPCNA 1) encoding a homologue of PCNA [López et al., 1995].

Briefly, maize cDNA clones were isolated from a rapidly dividing Black Mexican Sweetcorn suspension culture cell cDNA library. The library was constructed from mRNA in the vector pUC13 by priming cDNA synthesis with an oligo(dT) tailed vector using a modification of the Okayama and Berg procedure [Okayama *et al.* 1982]. A total of 120 000 clones were transferred to nylon Zeta probe (Bio Rad, UK) and screened using a random primer labelled XbaI fragment of the rice PCNA genomic clone [Suzuka *et al.*, 1991]. This fragment corresponds to the nucleotide region -422 to +2436 of the genomic clone and includes the full coding region. The Zetaprobe colony hybridization procedure was followed as indicated by the manufacturer. Hybridization was for 48 h at 37°C in 50% (v/v) formamide, 5X SSC, 50mM Tris/HCl pH 7.4, 5X Denhardt's solution, 1% SDS, 0.1 mg ml⁻¹ calf thymus DNA, and 50 µg ml⁻¹ poly(A). The filters were washed two times for 20 min in 2X SSC, 0.2% SDS at room temperature, and two times for 30 min in 0.2X SSC, 0.2% (w/v) SDS at 52°C. A total of 22 positive clones were picked from the primary screen. A secondary screen was performed as above and 11 positive clones were obtained. The largest clone was sequenced on both strands by the dideoxy sequencing method and the complete sequence was reported [López *et al.*, 1995]. The first 200 nucleotides from the 5' end of the 10 remaining clones were sequenced and compared using the DNASIS package (LKB, Sweden).

DNA sequencing.

All sequencing was done using the dideoxy sequencing method [Sanger *et al.*, 1977] and an adaptation thereof for double-stranded templates [Murphy and Kavanagh, 1988]. The M13 reverse primer (Amersham) was used to sequence the 5' end of the clones, and appropriate oligonucleotides from the read

sequence were synthesized. DNA sequences were analyzed using the DNASIS package (LKB, Sweden).

Southern blotting.

Maize genomic DNA was isolated as described by Larkin *et al.*, [1989]. DNA (15 mg) was digested with either *EcoRI*, *HindIII* or *BamHI* and the restriction fragments separated on a 0.8% (w/v) agarose gel. Transfer of DNA from the gel to nylon Zetaprobe was as described by Southern [1975] except that ammonium acetate buffer was used as described by Rigaud *et al.*, [1987]. The Southern blot was prehybridized and hybridized at 42°C as described for the colony hybridizations. When the PCNA coding regions were used as a probe, the filters were washed two times for 30 minutes in 0.2X SSC, 0.2% (w/v) SDS, at 45°C. When the 5' or 3' (see PCR reaction) gene specific fragments were used as a probe, the hybridization was carried out under the same conditions, but the filter was washed for 30 minutes in 2XSSC, 0.2%SDS (w/v), at 37°C. The filter was stripped between probings by incubation at 75-80°C for 15 min in 5 mM Tris/HCl pH 7.5, 0.2 mM EDTA and 0.1% (w/v) SDS.

Northern blotting.

Total RNA was prepared as described in Hussey *et al.* [1990]. 15 µg of total RNA were fractionated on formaldehyde agarose gels (1% agarose, 2.2M formaldehyde, 40 mM MOPS pH 7, 10 mM sodium acetate, 5 mM EDTA) and transferred to nytran (Schleicher & Schuell) membranes using 10X SSC as the transfer buffer. The filters were prehybridized, hybridized and washed as described for the Southern hybridizations. Equal loading in the lanes was tested by spectrophotometric

measurements (A_{260}) of the RNA supplemented by comparison of ribosomal RNAs on ethidium bromide stained agarose gels.

Preparation of radioactive probes.

Both the rice PCNA XbaI genomic fragment used to screen the library, and the maize PCNA cDNA fragments were labelled by random priming, using an oligolabelling kit (Pharmacia).

The 3' noncoding region probe used for the Southern analysis was labelled from gel-purified PCR products using a primer extension method. Fifty nanograms of DNA were denatured by heating 5 min at 90°C in the presence of the appropriate oligonucleotides and 1X medium salt buffer (50 mM NaCl, 10mM Tris/HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT) and cooled slowly to 37°C. Labelling was performed with 5 u of Klenow fragment at 37°C with 12 mM DTT, 30 μM each of dATP, dTTP and dGTP and 50 μCi of [α^{32} P]dCTP (3000 Ci mmol⁻¹, Amersham, UK) for 1 hr. Approximate specific activities for all the probes were 1x10⁸ cpm μg⁻¹.

The single stranded probe used for the Northern analysis was made by cloning the PCR amplified 3' region from the PCNA clones into the PGEM-T (Promega) vector. The recombinant plasmids were digested with EcoRI and BamHI and the inserts were subcloned in the EcoRI and BamHI sites of the pIBI25 (IBI) vector. ssDNA was prepared from the pIBI recombinant clones with the aid of the VCS-M13 Interference Resistant Helper Phage (Stratagene), and was labelled using the M13 hybridization primer (Amersham).

Polymerase chain reaction.

For the production of gene-specific probes, the 3' and 5' transcribed but non-translated regions of the ZmPCNA clones were amplified by the polymerase chain reaction using the following primers: 5'ATTGCCATCAGTGTCTCGTGCT3' and 5'TCCCAACAAGAATTTTCATGT3' for the ZmPCNA1 3' gene-specific probe; 5'TGGCCTGTGACGACATAATGCT3' and 5'CCATGGATTCATGAAAGCAGT3' for the ZmPCNA2 3' gene specific probe; 5'CGTGGCGGCGCTCTCGGAGAC3' and the M13 reverse primer for the ZmPCNA1 5' gene-specific probe; 5'CGTGGCGGCGCTGTCTCGT3' and the M13 reverse primer for the ZmPCNA2 5' gene-specific probe. Ten ng of DNA were amplified in the presence of 300 ng of primer, 0.5 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris/HCl pH 8.3, 0.01% (w/v) gelatine, 2.5 u Taq DNA polymerase for 30 cycles at 60°C using a Hybaid omnigene(?) thermocycling apparatus. PCR products to be used for radioactive labelling were purified through 1.5% (w/v) agarose gels.

RESULTS

Isolation and sequence analysis of *Zea mays* PCNA cDNA clones.

To isolate maize PCNA sequences, a rice PCNA genomic fragment containing the complete coding sequence was used to screen a cDNA library derived from mRNA isolated from *Zea mays* BMS-3 suspension culture cells. After a secondary screen, 11 positive clones were identified. The largest clone was chosen for further analysis and the complete sequence of clone ZmPCNA1 has already been published [López et al., 1995]. The 5' noncoding and coding regions of the other 10 clones were sequenced and analyzed. The clones were found to fall into two groups: one with identical sequence

to ZmPCNA1 and the other which we designated as ZmPCNA2. The largest clone from the latter group was chosen for further analysis. Both strands of the cDNA were sequenced at least once.

The nucleotide sequence of ZmPCNA2 is presented in figure 1. Its deduced amino acid sequence is compared with that of the previously reported ZmPCNA1. The overall identity at the nucleotide level is 88% between the two PCNA clones. This identity is much higher in the coding region (94%) while in the non-coding regions it is only 65%. It is worth noting that the 3' non-coding region of ZmPCNA2 is 105 nt (41%) shorter than the same region from ZmPCNA1. The significance of this difference is not known.

The ZmPCNA2 cDNA encodes a protein of 263 amino acids in length and has a predicted molecular mass of 29313 Da. The amino acid sequence shares 98.5% identity and 99.6% similarity with the ZmPCNA1 sequence. Both sequences contain a putative DNA-binding domain consisting of an α -helix-turn- α -helix [Almendral et al., 1987] and the two regions described in mouse PCNA necessary for the association with D-type cyclins [Matsuoka et al., 1994].

Estimation of gene copy number. Southern analysis.

Maize genomic Southern blots were probed with DNA probes designed to specifically distinguish between the two PCNA genes. Oligonucleotide primers were synthesized to the 5' and 3' ends of the 3' noncoding regions of both PCNA clones and used to amplify these regions by PCR. The fragments generated were used to probe maize genomic Southern blots. Fig 2b shows a blot hybridized with the ZmPCNA1 3' noncoding region probe, where one band can be seen in each of the lanes. The Southern blot was stripped and reprobed with the

ZmPCNA2 3' noncoding region probe (Fig 2c), where single different bands are detected in the 3 lanes. When the Southern blot was stripped and reprobred with a mixture of the complete cDNAs of ZmPCNA1 and ZmPCNA2, the six previous bands were revealed plus two additional ones in the *EcoRI* lane (marked with arrows, Fig. 2a). Since there is no internal *EcoRI* site in the cDNA clones, this result suggested that either there is an *EcoRI* site within an intron or there could be a third gene in the PCNA gene family in maize. To determine the significance of these two additional bands, the Southern blot was stripped and reprobred with a 120 bp fragment amplified by PCR from the 5' end of the coding regions. The two additional bands were detected in the *EcoRI* lane only (data not shown). These results showed that in the maize genome there are at least two different PCNA genes, and that there is an *EcoRI* site within an intron of the transcribed region.

Abundance of the two PCNA gene transcripts in different tissues.

Northern blots containing RNA from various maize tissues were probed with the ZmPCNA1 and ZmPCNA2 3' non-coding regions, and with a coding sequence probe prepared from a cocktail of ZmPCNA1 and ZmPCNA2 cDNA clones. Fig. 3a shows a Northern blot containing 15 mg of total RNA from 2.5, 5, 7 and 10 mm spiklets, pollen, germinating pollen, root, shoot, leaf, cob and embryo probed with the cocktail of ZmPCNA1 and ZmPCNA2 cDNA clones. The 2.5 mm spiklet anthers contained premeiotic sporogenous cells, the 3 mm contained cells at mid-prophase 1, the 7 mm spiklet anthers contained cells at the tetrad stage in meiosis and the 10 mm spiklet anthers contained maturing pollen grains. A densitometric analysis performed on the autorradiography and the relative amount of transcripts in the different tissues are shown in figure 4.

These results show that PCNA transcripts are abundant in proliferating tissues, being the 2.5 mm spiklets the tissue where the message is most abundant.

To determine the pattern of expression of ZmPCNA1 and ZmPCNA2, two Northern blots similar to that in fig. 3a were probed with the 3' noncoding regions from ZmPCNA1 (Fig. 3b) and ZmPCNA2 (Fig. 3c). The results show that the pattern of expression for both PCNA clones is the same in the tissues studied.

Expression of PCNA during germination of maize embryonic axes.

DNA replication during maize germination has been shown to start 15 hours after seed imbibition [Baiza *et al.*, 1989; Zlatanova *et al.*, 1989, Georgieva *et al.*, 1994]. It has also been shown that addition of benzyladenine (a synthetic cytokinin) to germinating maize increases DNA polymerase activity and reduces the time at which DNA replication and mitosis takes place during germination [Vázquez-Ramos *et al.*, 1990; Reyes *et al.*, 1991].

To determine whether the levels of PCNA mRNA responded to the presence of benzyladenine, we germinated maize embryonic axes for different lengths of time. Northern blots containing RNA from control and BA treated axes were probed with a mixture of the complete ZmPCNA1 and ZmPCNA2 cDNAs (Fig. 5). It can be seen that there is no detectable PCNA transcript in the dry embryo, and that it appears in a cyclic manner and in approximately equal amounts in both control and hormone treated embryonic axes at 5, 10 and 15 h of germination; the mRNA levels at the later time are very much reduced. Interestingly, by 24 hours of germination, BA stimulated up to 17 times the amount of PCNA message compared

with the amount present in non BA-stimulated embryo axes, as shown by densitometric analysis of the X-ray films (fig. 6).

DISCUSSION

We have identified two maize cDNAs encoding putative PCNA homologs: ZmPCNA1 and ZmPCNA2. Both cDNAs encode a protein of 263 aminoacids in length and share 98.5% identity and 99.6% similarity. The difference among the two cDNAs is greater at the nucleotide level, specially when the 5' and 3' transcribed but non-translated sequences were compared: the identity among these regions is 65%, and the 3' region of ZmPCNA2 is 105 nucleotides (45%) shorter than that of ZmPCNA1. The physiological significance of this difference is not known. In carrot, two members of the PCNA gene family have been described, one having an extra C-terminal domain of 11 kDA and both homologs were apparently coexpressed in somatic embryogenesis [Hata et. al. 1992].

Southern analysis using probes prepared as gene-specific probes for ZmPCNA1 and ZmPCNA2 revealed that the maize PCNA family consists of at least two members. In an attempt to identify more members of this family in maize, blots were exposed for longer periods; however, under our conditions we were not able to identify further bands (data not shown). If there were more than two members of this family in maize, their degree of similarity must be lower.

Although for a long time PCNA was considered a protein acting exclusively during DNA replication in mammalian cells, recently a role in DNA repair has been documented [Shivji et. al. 1992]. Our results using northern analysis have shown that PCNA is expressed mainly in proliferating tissues, but we found no difference in the levels and pattern of

expression between ZmPCNA1 and ZmPCNA2. Since the amino acid sequence of ZmPCNA1 and ZmPCNA2 is almost identical, the function and physiological significance of the expression of the two PCNA proteins in maize is still unknown. It remains to be determined if the different PCNA forms would have distinct roles.

Earlier work carried out by Vazquez-Ramos and colleagues established that during early germination there is no evidence of DNA replication and that DNA synthesis taking place at this time is both of repair and organellar nature [Zarain, 1987; Baiza, 1989; Zlatanova, 1987]. DNA replication starts by 15 h after imbibition. Benzyladenine stimulates DNA metabolism by increasing nuclear DNA polymerase activity [Vázquez-Ramos et al., 1990] and by shortening the time at which S and M phases occur during germination [Reyes et al., 1991]. The effect that BA has on the expression of the PCNA genes is therefore very interesting: there seems to be no effect during the early hours of germination where DNA repair might predominate: the message, virtually absent in dry seeds notably accumulates by 10 hours of germination decreasing 6-8 fold by 15 h. This behaviour occurs regardless of the presence of BA. However, by 24 h germination, embryo axes imbibed in the presence of the phytohormone accumulate 17 fold more PCNA message than that present in those axes which received no BA. This result is indicative of an active DNA replication taking place between 15 and 24 h in axes imbibed with BA. However, it remains to be determined if there is a direct correlation between accumulation of the message and the presence of the PCNA protein. Recent results using an heterologous antibody indicate that a putative PCNA protein is present in dry maize seeds and that it reaches a peak at 24 h of germination [Georgieva et al., 1994]. Of interest would be to demonstrate the fluctuation of the maize PCNA protein using

an homologous antibody and determine if its levels are modified by BA.

In human cells in culture, PCNA expression is dependent on the previous expression of growth factor-inducible gene(s). It is not known how cytokinins induce plant cells to proliferate. However, it is interesting that this growth factor-like from plants can trigger, directly or indirectly, PCNA expression, suggesting that similar mechanisms for induction of proliferating genes may exist in eukaryotes.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

FIGURE LEGENDS.

Figure 1.- Nucleotide and deduced aminoacid sequence of maize ZmPCNA2. Aminoacid changes in the sequence of ZmPCNA2 are shown.

Figure 2. Identification of PCNA gene families.

A Southern blot containing 15 mg of maize genomic DNA digested with EcoRI (lane 1), HindIII (lane 2) and BamHI (lane 3) was probed with the 3' transcribed but non-translated regions of ZmPCNA1 (panel b) and ZmPCNA2 (panel c). Panel a shows the same filter probed with a mixture of the complete ZmPCNA1 and ZmPCNA2 clones. The arrows indicate the bands that appeared when the filter was probed with the 5' translated but non-transcribed regions of ZmPCNA1 and ZmPCNA2.

Figure 3. Changes in PCNA transcript abundance in different maize tissues.

Northern blots containing 15 mg of total RNA from the following maize organs: lane 1: 2.5 mm spiklets; lane 2: 5 mm spiklets; lane 3: 7 mm spiklets; lane 4: 10 mm spiklets; lane 5: pollen; lane 6: germinated pollen; lane 7: root; lane 8: shoot; lane 9: leaf; lane 10: cob; lane 11: embryo. The figure in (A) shows the ethidium bromide staining of the gel. The Northern blot in (B) was probed with a mixture of the complete ZmPCNA1 and ZmPCNA2 sequences. The Northern blots in (C) and (D) were probed with the 3' transcribed but non-translated regions of PCNA1 and PCNA2 respectively.

Figure 4. Relative amounts (in arbitrary units) of PCNA transcripts in different maize tissues.

Figure 5. Expression of PCNA during maize germination in the presence of Benzyladenine.

The ethidium bromide staining of the gel is shown in fig (A). Fig. (B) shows the Northern blot containing 15mg of total RNA from maize embryonic axes germinated with (+BA) or without (-BA) benzyladenine for the following lengths of time: lane 1: 0 hours; lane 2: 5 hours (-); lane 3: 5 hours (+BA); lane 4: 10 hours (-BA); lane 5: 10 hours (+BA); lane 6: 15 hours (-BA); lane 7: 15 hours (+BA); lane 8: 24 hours (-BA); lane 9: 24 hours (+BA). The Northern blot was probed with a mixture of ZmPCNA1 and ZmPCNA2.

Figure 6. Relative amounts (in arbitrary units) of PCNA transcripts in maize embryonic axes treated with (+BA) or without Benzyladenine (-BA).

ccctcccaagctcgccccgctcccagctagggttcctcttcccaaccacagccgcg 60

agcgccgcccagaggacagcgccgccacgatgttgagggtgcgtctggtgcaggggagc 120
M L E L R L V Q G S
ZmPCNA2
ZmPCNA1

ctcctcaagaaggtcttgaggcgatcccgagactggtcacggagccaaacttcgactgc 180
L L K K V L E A I R E L V T D A N F D C
ZmPCNA2
ZmPCNA1

tccgggaccgggttctcgctcgaggccatggactcgagccacgtcgcctcgctcgcgctg 240
S G T G F S L Q A M D S S H V A L V A L
ZmPCNA2
ZmPCNA1

ctccttcgcgccgagggcttcgagcactaccgctcgacccgcaacctctccatgggcatg 300
L L R A E G F E H Y R C D R N L S M G M
ZmPCNA2
ZmPCNA1

aacctcaacaacatggccaagatgctccgctcgccggcaacgaggacatcatcaccatc 360
N L N N M A K M L R C A G N E D I I T I
ZmPCNA2
ZmPCNA1

aaggccgacgacggctccgacacgctcactttcatgttcgagtcgccaagcaagataag 420
K A D D G S D T V T F I F E S P K Q D K
ZmPCNA2
ZmPCNA1

atcgcggatttcgagatgaaactgatggacattgatagcgagcacctcggaaatcccgat 480
I A D F E M K L M D I D S E H L G I P D
ZmPCNA2
ZmPCNA1

tccgagtacccaggccatcgctccgcatgccttctgctgagtttatgaggatctgcaaagat 540
S E Y Q A I V R M P S A E F M R I C K D
ZmPCNA2
ZmPCNA1

cttagcagcatcggagacacagtcgctcatctcggtgactaaggagggcgatgaagtctcc 600
L S S I G D T V V I S V T K E G V K F S
ZmPCNA2
ZmPCNA1

acatctggagaaattgggagtgcaaacattgtctgcaggcagaaccaaactattgacaag 660
T S G E I G S A N I V C R Q N Q T I D K
ZmPCNA2
ZmPCNA1

ccagaagaggctaccattatagagatgcaggagccggtttccctgacctttgcccctcgcg 720
P E E A T I I E M Q E P V S L T F A L R
ZmPCNA2
ZmPCNA1

tacatgaactcctttaccaaggcgtcttcaactgctgagcaagtcaactacagcctgtcg 780
Y M N S F T K A S S L S E Q V T I S L S
ZmPCNA2
ZmPCNA1

tccgagcttcagtggtggtcgagtaacaagatcgctgagatgggttacattagattttac 840
S E L P V V V E Y K I S E M G Y I R F Y
ZmPCNA2
ZmPCNA1

ctggcccccaagatcgacgatgacgaggagatgaagccctgatggcctgtgacgacataa 900
L A P K I D D D E E M K P
ZmPCNA2
ZmPCNA1

tgctcgtgttgctgctcttctccagccgttgtttgcttagctactctttgcaagcga 960

agggatgtgatgttatctcttaggttagactgcttcaactagttttctgtgactgcttc 1020

atgaatccatggattactgattt

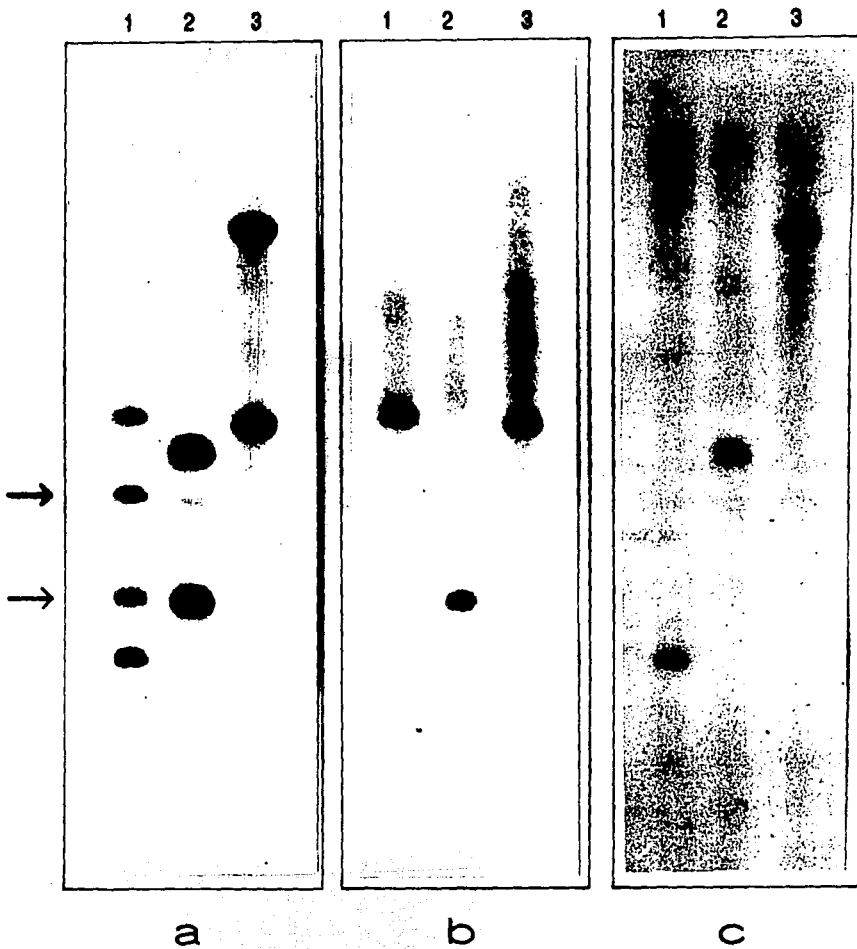


Figure 2

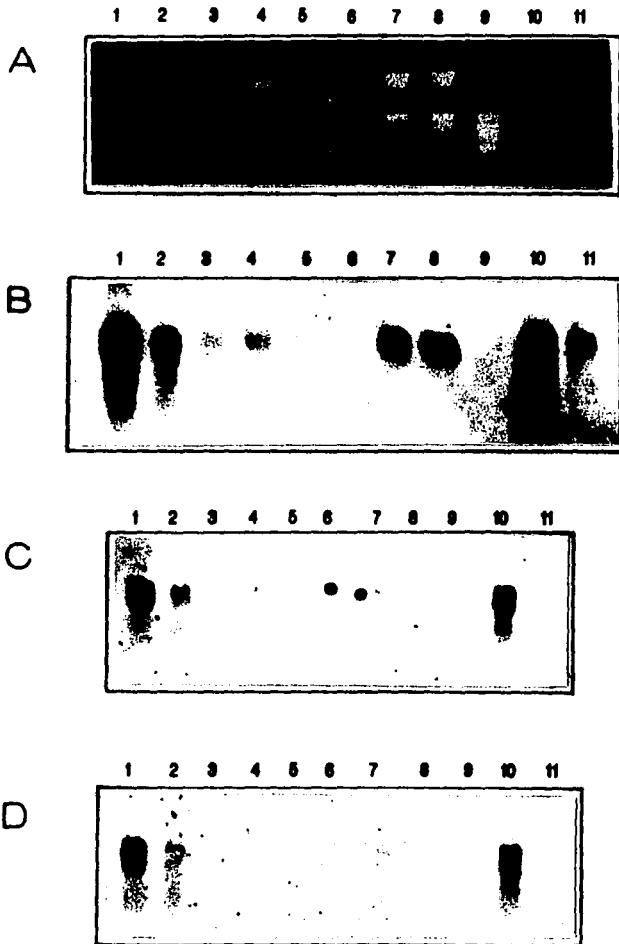


Figure 3

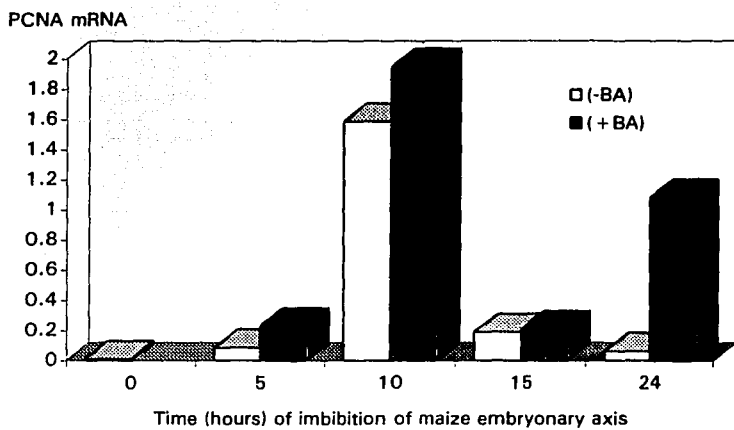


Figure 4

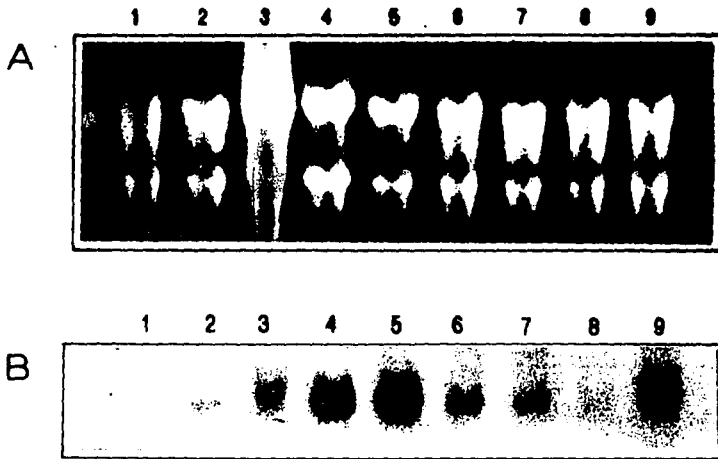


Figure 5

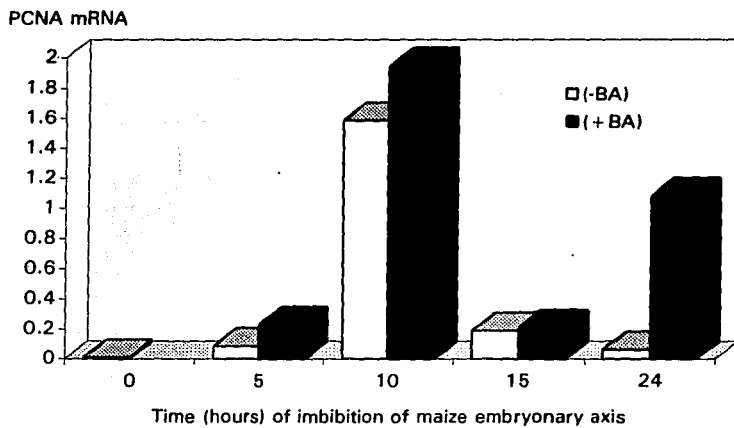


Figure 6

REFERENCES

- Alder, H., Yoshinouchi, M., Prystowsky, M.B., Appasamy, P. and Baserga, R. (1992). A conserved region in intron 1 negatively regulates the expression of the PCNA gene. *Nucleic Acids Res.* 20, 1769-1775.
- Almendral, J.M., Huebsch, D., Blundel, P.A., MacDonald-Bravo, H. and Bravo, D. (1987). Cloning and sequencing of the human nuclear protein cyclin; homology with DNA-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1575-1579.
- Baiza, A.M., Vázquez-Ramos, J.M. and Sánchez de Jiménez, E. (1989). DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *J. Plant Physiol.* 135, 416-421.
- Bravo, R., and Celis, J. E. (1980). A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of HeLa cells. *J. Cell Biol.* 84, 795-802.
- Castroviejo, M., Gatus, M.T., Litvak, S. (1990). A low molecular weight DNA polymerase from wheat embryos. *Plant Mol. Biol.* 15, 383-397.
- Coello, P., Rodríguez, R., García E. and Vázquez-Ramos, J.M. (1992). A DNA polymerase from maize axes: its purification and possible role. *Plant Mol. Biol.* 20, 1159-1168.
- Georgieva, E. I., López-Rodas, G., Hittmair, A., Feichtinger, H., Brosch, G., Loidl, P. (1994). Maize embryo germination. I. Cell cycle analysis. *Planta* 192, 118-124.
- Hata, S., Kouchi, H., Tanaka, Y., Minami, E., Matsumoto, T., Suzuka, I., and Hashimoto, J. (1992). Identification of carrot cDNA clones encoding a second putative proliferating cell-nuclear antigen, DNA polymerase δ auxiliary protein. *Eur. J. Biochem.* 203, 367-371.
- Heinhorst, S., Cannon, G., Weissbach, A. (1990). Chloroplast and mitochondrial DNA Polymerases from cultured soybean cells. *Plant Physiol.* 92, 939-945.
- Hussey, P.J., Haas, N., Hunsperger, J., Larkin, J., Snustad, D.P. and Silflow, C.D. (1990). The β -tubulin gene family in *Zea mays*: two differentially expressed β -tubulin genes. *Plant Mol. Biol.* 15, 957-972.
- Jaskulski, D., Gatti, C., Travali, S., Calabretta, B. and Baserga, R. (1988). Regulation of the Proliferating Cell

Nuclear Antigen Cyclin and Thymidine Kinase mRNA Levels by Growth Factors. *J. Biol. Chem.* 263, 10175-10179.

Kilbey, B.J., Fraser, I., McAleese, S., Goman, M. and Ridley, R.G. (1993). Molecular characterisation and stage-specific expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) from the malarial parasite, *Plasmodium falciparum*. *Nucleic Acids Res.* 21, 239-243.

Kodama, H., Ito, M., Ohnishi, N., Suzuka, I. and Komamine, A. (1991). Molecular cloning of the gene for plant proliferating-cell nuclear antigen and expression of this gene during the cell cycle in synchronized cultures of *Catharanthus roseus* cells. *Eur. J. Biochem.* 197, 495-503.

Kosugi, S., Suzuka, I., Ohashi, Y., Murakami, T., Arai, Y. (1991). Upstream sequences of rice proliferating cell nuclear antigen (PCNA) gene mediate expression of PCNA-GUS chimeric gene in meristems of transgenic tobacco plants. *Nucl. Ac. Res.* 19, 1571-1576.

Laquel, P., Litvak, S. and Castroviejo, M. Mammalian proliferating cell nuclear antigen stimulates the processivity of two wheat embryo DNA polymerases. (1993) *Plant Physiol.* 102, 107-114.

Larkin, J.C., Hunsperger, J.P., Culley, D., Rubinstein, I. and Silflow, C.D. (1989). The organisation and expression of maize ribosomal protein gene family. *Genes Devel.* 3, 500-509.

Lee, S.-H. and Hurwitz, J. (1990). Mechanism of elongation of primed DNA by DNA polymerase δ , proliferating cell nuclear antigen, and activator 1. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 87, 5672-5676.

López, I., Khan, S., Vázquez-Ramos, J. and Hussey, P.J. (1995). Molecular cloning of a maize cDNA clone encoding a putative proliferating cell nuclear antigen. *BBActa* in press.

Markley, N.A., Bonhamsmith, P.C. and Moloney, M.M. (1993). *Genome* 36, 459-466.

Mathews, M.B., Bernstein, R.M., Franza, B.R. and Garrels, J.T. (1984). The identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature* 309, 374-376.

Matsumoto, T., Hata, S., Suzuka, I. and Hashimoto J. Expression of functional proliferating-cell nuclear antigen

from rice (*Oryza sativa*) in *Escherichia coli*. Activity in association with human DNA polymerase δ . (1994) Eur. J. Biochem. 223, 179-187.

Matsuoka, S., Yamaguchi, M., Hayashi, Y. and Matsukage, A. (1993). Nucleotide sequence and promoter-specific effect of a negative regulatory region located upstream of the mouse proliferating cell nuclear antigen gene. Eur. J. Biochem. 218, 173-181.

Matsuoka, S., Yamaguchi, M. and Matsukage, A. (1994). D-type cyclin-binding regions of proliferating cell nuclear antigen. The Journal of Biological Chemistry 269, 11030-11036.

Miura, M., Li, S.-W., Dumenil, G. and Baserga, R. (1994). Platelet-derived growth factor-induced expression of messenger RNA for the proliferating cell nuclear antigen requires a functional receptor for the insulin-like growth factor I. Cancer Research 54, 2472-2477.

Miyachi, K., Fritzler, M.J. and Tan, E.M. (1978). An autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. J. Immunol. 121, 2228-2234.

Murphy, G. and Kavanagh, T.A. (1988). Speeding up the sequencing of double-stranded DNA. Nucl. Acids Res. 16, 5198.

Okayama, H., and Berg, P. (1982). High-efficiency cloning of full-length cDNA. Mol. Cell. Biol. 2, 161-170.

Ottavio, L., Chang, C.D., Rizzo, M.-G., Travali, S., Casadevall, C. and Baserga, R. (1990). Importance of Introns in the Growth Regulation of mRNA Levels of the Proliferating Cell Nuclear Antigen Gene. Mol. Cell. Biol. 10, 303-309.

Reyes, J., Jiménez-García, L.F., González, M.A., and Vázquez-Ramos, J.M. (1991). Benzyladenine-stimulation of nuclear synthesis and cell division in germinating maize. Seed Sci. Res. 1, 113-117.

Rigaud, G.F., Grange, T. and Pictet, R. (1987). The use of NaOH as transfer solution of DNA on to nylon membranes decreases the hybridisation efficiency. Nucl. Acids Res. 15, 857.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467.

Shivji, M.K.K., Kenny, M.K. and Wood, R.D. (1992). Proliferating Cell Nuclear Antigen is Required for DNA Excision Repair. *Cell* 69, 367-374.

Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.

Suzuka, I., Hata, S., Matsuoka, M., Kosugi, S., Hashimoto, J. (1991). Highly conserved structure of proliferating cell nuclear antigen (DNA polymerase δ auxiliary protein) gene in plants. *Eur. J. Biochem.* 195, 571-575.

Takasaki, Y., Deng, J.-S. and Tan, E.M. (1981). A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation. *J. Exptl. Med.*, 154, 1899-1909.

Tan, C.-K., Castillo, C., So, A.G. and Downey, K.M. (1986). An auxiliary protein for DNA polymerase- δ from fetal calf thymus, *J. Biol. Chem.* 261, 12310-12316.

Tsurimoto, T. and Stillman, B. (1990). Functions of replication factor C and proliferating cell nuclear antigen: functional similarity of DNA polymerase accessory proteins from human cells and bacteriophage T4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1023-1027.

Tsurimoto, T. and Stillman, B. (1991). Replication factors required for SV40 replication *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 266, 1961-1968.

Waseem, N.H., Labib, K., Nurse, P. and Lane, D.P. Isolation and analysis of the fission yeast gene encoding polymerase δ accessory protein PCNA. (1992). *The EMBO Journal* 11, 5111-5120.

Zarain, M., Bernal-Lugo, I., and Vázquez-Ramos, J.M. (1987). Effect of benzyladenine on the DNA synthesis during early germination of maize embryo axes. *Mut. Res.* 181, 103-110.

Zlatanova, S., Ivanov, P.V., Stoilov, L.M., Chimishirova, K.V., and Stanchev, B.S. (1987). DNA repair precedes replicative synthesis during early germination in maize. *Plant Mol. Biol.* 10, 139-144.

CAPITULO IV

4.1 DISCUSION

El interés de nuestro laboratorio desde hace ya varios años ha sido el estudio del metabolismo del DNA durante la germinación de ejes embrionarios de maíz y el efecto que tiene la citocinina sintética benciladenina (BA) sobre este proceso. El trabajo realizado se encaminó a tratar de entender el mecanismo molecular por medio del cual la benciladenina adelanta algunos eventos durante la germinación de ejes embrionarios de maíz. Con base en los datos obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio (Cap. 1.4), propusimos que benciladenina podría regular la expresión génica durante la germinación de ejes embrionarios de maíz. Nuestro trabajo se enfocó en tratar de identificar algunos de estos genes, utilizando para esto dos estrategias diferentes.

Como primera estrategia, decidimos utilizar la metodología de hibridación sustractiva, que nos permitiría identificar secuencias de mRNAs que estuvieran presentes en una población de ejes embrionarios germinados en presencia de benciladenina, y ausentes en una población de ejes control. Para ello se construyó una biblioteca de cDNA en el vector λ gt11 a partir de ejes embrionarios de maíz imbibidos por 5 horas en benciladenina. Esta biblioteca se hibridizó con una sonda sustraída y se aislaron 4 posibles clonas de DNA complementarios a RNA mensajeros que podrían estar inducidos en su expresión por el fitorregulador durante las primeras horas de la germinación. El análisis (por ensayos tipo Northern) de los RNA mensajeros de las primeras horas de germinación de ejes embrionarios imbibidos con y sin benciladenina, no mostró diferencias significativas en el patrón de expresión de los cDNAs clonados. Por lo tanto se concluye que las clonas aisladas como "diferenciales" fueron artefactos experimentales.

El resultado anterior fue sorprendente, ya que teóricamente la metodología utilizada permite identificar aquellos mensajes que se encuentran presentes en una población celular y ausentes en otra. Las causas posibles de no haber obtenido el resultado esperado podrían ser las siguientes:

1. Que los mRNAs clonados fueran muy abundantes durante la germinación.

Dado que durante la preparación de la sonda por hibridación sustractiva la sustracción no se lleva a cabo con una eficiencia del 100%, es posible que en la sonda

queden presentes cDNAs de mRNAs muy abundantes. Durante la hibridación de la biblioteca de cDNA, estas secuencias podrían haber hibridado dando señales positivas falsas.

2. Que el RNA mensajero de las secuencias reguladas por benciladenina fuera muy poco abundante.

Como se señaló en el capítulo 2.3, las clonas seleccionadas en la hibridación sustractiva de la biblioteca de cDNA fueron aquellas que dieron las señales radiactivas mas intensas. Asumiendo que las causas contempladas en el punto 1 fueran correctas, las verdaderas clonas positivas podrían ser algunas de aquellas que dieron señal débil en la hibridación, que se consideraron como "fondo" y por lo tanto no fueron seleccionadas.

3. Existe también la posibilidad de que el efecto de benciladenina durante la germinación de ejes embrionarios de maíz no fuera a nivel de regulación de la transcripción, sino a niveles post-transcripcionales o de transducción de señales.

4. Otra posibilidad que se contempla es que el (o uno de los) efectos de benciladenina si sea a nivel de regulación de la transcripción, pero que este efecto no sea precisamente a las 5 horas de imbibición, sino a tiempos posteriores (o anteriores). Por lo tanto, el protocolo utilizado no nos habría permitido identificar las secuencias de nuestro interés.

5. Cabe también la posibilidad de que el efecto de benciladenina sobre la transcripción no produzca una respuesta tan radical como de "todo" y "nada". Podría suceder que el fitorregulador module la expresión génica, aumentando o disminuyendo la cantidad de transcritos involucrados en la respuesta al mismo. En este caso, la estrategia utilizada tampoco nos permitiría identificar estas secuencias "moduladas", puesto que la sustracción de la sonda se realiza con un exceso de mRNA control, que secuestraría por completo a aquellos mensajeros cuya concentración variara de manera sutil entre ambas poblaciones.

La segunda estrategia utilizada para cumplir con los objetivos planteados fue la de identificar una función específica que pudiera ser blanco del efecto producido por el fitorregulador y que pudiera estar involucrada en la respuesta al mismo.

Como se mencionó anteriormente, se ha reportado que benciladenina estimula la síntesis de DNA tanto reparativa (Zarain *et al.*, 1987) como replicativa (Reyes *et al.*, 1991), así como la actividad de la DNA polimerasa (Vázquez-Ramos *et al.*, 1990) durante la germinación de ejes embrionarios de maíz. Los efectos observados son dependientes de transcripción y/o traducción. Con base en estos datos, se planteó la posibilidad de que benciladenina pudiera estar actuando ya fuera sobre la DNA polimerasa o sobre alguno de los factores que estimulan su actividad.

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), es un factor auxiliar de la DNA polimerasa δ cuya función es aumentar tanto la actividad como la procesividad de esta polimerasa durante la replicación de la cadena continua del DNA. Recientemente se encontró que tanto PCNA como la DNA polimerasa δ están implicadas también en la reparación del DNA (Shivji *et al.* 1992). Tomando en cuenta la estrecha relación que tiene PCNA con el metabolismo del DNA, se decidió estudiar esta proteína en maíz e investigar si la respuesta de ejes embrionarios a benciladenina está relacionada con cambios en la transcripción de el (o los) gene(s) que la codifica(n).

La segunda estrategia de este trabajo se encaminó inicialmente hacia la clonación del gene de PCNA de maíz. Identificamos dos clones diferentes de cDNA que codifican para proteínas homólogas a PCNA y que se denominaron ZmPCNA1 y ZmPCNA2. El tamaño de ZmPCNA1 es de 1146 nucleótidos y el de ZmPCNA2 es de 1043 nucleótidos. La comparación de ambas secuencias muestra que tienen 88% de identidad. Este valor cambia de manera dramática cuando se comparan las regiones codificadoras y las no codificadoras: en la región codificadora, las clonas muestran un 94% de similitud, mientras que en las regiones no traducidas esta similitud es de solamente el 65%. Cabe mencionar que la región 3' no traducida de ZmPCNA2 es 105 (45%) nucleótidos más corta que la de ZmPCNA1. El significado fisiológico de esta diferencia no se conoce. La secuencia deducida de aminoácidos muestra que ambas proteínas tienen 263 aminoácidos y comparten un 98.5% de aminoácidos idénticos y un 99.6% de similitud (tomando en cuenta cambios conservativos).

El análisis genómico por hibridación tipo Southern sugiere que en maíz, la familia de PCNA esta compuesta por los dos miembros aquí descritos. No se excluye la posibilidad de

que existan otros miembros de esta familia, pero de ser así tendrían un grado menor de similitud.

El análisis por ensayos tipo Northern de la expresión de PCNA en diferentes tejidos de maíz, mostró que PCNA se expresa principalmente en tejidos en proliferación. No encontramos diferencias en el nivel y patrón de expresión entre ZmPCNA1 y ZmPCNA2. Cabe mencionar que los experimentos se realizaron con RNA extraído de diferentes órganos o tejidos de la planta, pero el material analizado está compuesto de diferentes poblaciones celulares. Por lo tanto, la metodología utilizada no nos permite descartar la posibilidad de que sí exista una expresión diferencial de los dos genes en diferentes tipos celulares constitutivos de un órgano o tejido. El patrón de expresión de estos genes a un nivel más fino podría determinarse mediante ensayos de hibridación *in situ*. Por otra parte, si bien sabemos que la abundancia de ambos mensajes es la misma, no sabemos si la abundancia de las dos proteínas es la misma, pues no conocemos la eficiencia de traducción de cada uno de los mensajes.

No sabemos tampoco el significado fisiológico o la función de dos proteínas tan similares de PCNA en maíz, y que poseen el mismo patrón de expresión. Podría darse el caso que ambas proteínas tuvieran funciones idénticas en el proceso de replicación del DNA, o bien, que sus funciones fueran ligeramente diferentes. En células de mamíferos, se ha descrito que el daño al DNA provoca un incremento en los niveles de la proteína supresora p53, y esto induce la síntesis de p21 (un inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas, CDK) (El-Deiry *et al.*, 1993; Gu *et al.*, 1993; Dulic *et al.*, 1994). En células normales, p21 forma un complejo cuaternario con una ciclina, una cinasa dependiente de ciclina (CDK) y PCNA. Waga y cols. (1994) han demostrado que p21 interactúa directamente con PCNA e inhibe su capacidad para estimular a la DNA polimerasa δ que actúa en la replicación del DNA. Sin embargo, p21 es incapaz de inhibir la síntesis de DNA de tipo reparativo dependiente de PCNA (Li *et al.*, 1994). Estos datos podrían sugerir la existencia de formas diferentes (isoformas) de PCNA involucradas en replicación y reparación.

El efecto de BA sobre la expresión de PCNA durante la germinación de ejes embrionarios de maíz se determinó mediante ensayos tipo Northern de mRNA obtenido a intervalos durante las primeras 24 horas de germinación en presencia o ausencia de BA. Se encontró un patrón de expresión cíclico: la expresión de PCNA durante las primeras horas de germinación (en donde predomina la síntesis de tipo reparativo) parece no verse afectada por la presencia de BA; prácticamente no existe mensaje en la semilla seca, pero éste se

acumula gradualmente hasta alcanzar un pico a las 10 horas de germinación y disminuye nuevamente hacia las 15 horas. Este comportamiento es similar en semillas tratadas y no tratadas con BA. Sin embargo, hacia las 24 h de germinación, los ejes embrionarios que fueron embebidos en presencia de BA acumulan 17 veces más mRNA de PCNA que aquellos que no recibieron el fitorregulador.

Resultados anteriores de nuestro grupo y de otros, han permitido establecer que durante las primeras horas de germinación no hay evidencia de una síntesis de DNA de tipo replicativo; la síntesis que tiene lugar en esta etapa inicial es de tipo reparativo y organelar (Zarain *et al.*, 1987; Baiza *et al.*, 1989; Zlatanova *et al.*, 1987) y no es sino hasta después de las 15 horas de imbibición que comienza la replicación del DNA.

Los datos obtenidos en este trabajo sugieren que la benciladenina no tiene un efecto específico en la expresión inicial de PCNA durante la etapa de síntesis reparativa, ya que la abundancia del mensaje de esta proteína es la misma en ejes control y en ejes germinados en presencia de BA. Sin embargo, nuestros datos sugieren que BA adelanta la expresión de PCNA necesario para la primera síntesis replicativa que se lleva a cabo después de 15 horas de germinación. No podemos decir si el efecto de BA es directo sobre la estimulación de la transcripción, o si actúa de manera indirecta a través de una cascada de transducción de señales que finalmente modifiquen factores de transcripción. Es importante sin embargo determinar si existe una correlación directa entre la acumulación del mensaje de PCNA y la presencia de la proteína.

Georgieva y cols. (1994), utilizando anticuerpos contra PCNA de células humanas, encontraron que una proteína semejante a PCNA se encuentra presente en la semilla seca de maíz, y su cantidad aumenta de manera gradual durante las primeras horas de germinación, encontrando un máximo a las 24 horas. Después de este tiempo, la cantidad de proteína cae abruptamente para reaparecer a las 72 h de germinación. Estos datos fueron obtenidos utilizando condiciones diferentes a las nuestras en cuanto a tipo de semillas, condiciones de almacenaje y temperatura de incubación, lo que podría estar afectando el tiempo de germinación de las mismas. Claramente, es necesario estudiar la aparición tanto de la proteína como del mensaje de PCNA en experimentos simultáneos y en condiciones idénticas para poder establecer la relación entre la transcripción del mRNA de PCNA y la presencia de esta proteína, y la posible influencia que BA tuviera en su expresión. Los resultados serían más consistentes si el anticuerpo utilizado fuera homólogo.

No se conoce el mecanismo por el cual las citocininas inducen en las plantas la proliferación celular. Se ha encontrado que en células humanas la expresión de PCNA está bajo la influencia de factores de crecimiento y que requiere de la expresión de otros genes inducidos por estos factores (Jaskulski *et al.*, 1988). Teniendo en mente que los factores de crecimiento de plantas y animales son diferentes, el haber encontrado que BA estimula de manera directa o indirecta la expresión de PCNA sugiere que pueden existir mecanismos similares de respuesta a factores de crecimiento en plantas y animales.

4.2 CONCLUSIONES

1. No se logró el aislamiento de clonas de cDNA de genes cuya expresión fuera regulada directamente por benciladenina a las 5 horas de germinación de ejes embrionarios de maíz.
2. Se clonaron y secuenciaron 2 miembros de la familia del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) de maíz, denominados ZmPCNA1 y ZmPCNA2.
3. El análisis tipo Southern mostró que en maíz, la familia de PCNA está compuesta por los dos genes anteriores. No puede descartarse que existan otros miembros de esta familia que posean un menor grado de similitud a los encontrados en este trabajo.
4. Análisis tipo Northern mostraron que el mRNA de PCNA se expresa preferencialmente en tejidos en proliferación.
5. Análisis tipo Northern de ejes embrionarios de maíz imbibidos con y sin BA mostraron un patrón diferente en la expresión de PCNA: las dos poblaciones de ejes embrionarios presentan un pico de expresión de PCNA a las 10 horas de imbibición. Sin embargo, a las 24 horas de imbibición, la expresión PCNA en la población de ejes embrionarios imbibidos con benciladenina se incrementa 17 veces comparada con la cantidad de mensaje presente en los ejes embrionarios control.
6. De manera directa o indirecta, benciladenina estimula la transcripción del gene de PCNA
7. De manera general, no se encontró diferencia entre el patrón de expresión de ZmPCNA1 y el de ZmPCNA2.

BIBLIOGRAFIA

- Almendral, J.M., Huebsch, D., Blundel, P.A., McDonald-Bravo, H. and Bravo, D. (1987). Cloning and sequencing of the human nuclear protein cyclin; homology with DNA-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1575-1579.
- Baiza, A.M., Vázquez-Ramos, J.M. and Sánchez de Jiménez, E. (1989). DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *Plant Physiol.* 135, 416-421.
- Benton, W.D., and Davis, R.W. (1977). Screening λ gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. *Science* 196, 180.
- Bewley, J.D. and Black, M. (1994). SEEDS. *Physiology of Development and Germination*. Second Edition. Plenum Press, New York USA.
- Bollum, F.J. (1960). Calf thymus polymerase. *J. Biol. Chem.* 235, 2399-2404.
- Bravo, R., and Celis, J.E. (1980). A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of HeLa cells. *J. Cell Biol.* 84, 795-802.
- Brooke, R.G., and Dumas, L.B. (1991). Reconstitution of the *Saccharomyces cerevisiae* DNA primase-DNA polymerase protein complex *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 266, 10093-10098.
- Bryant, J.A., Jenns, S.M., and Francis, D. (1981). DNA polymerase activity and DNA synthesis in root of pea (*Pisum sativum* L.). *Phytochemistry* 20, 13-15.
- Byrnes, J.J., Downey, K.M., Black, V.L., and So, A.G. (1976). A new mammalian DNA polymerase with 3' to 5' exonuclease activity. DNA polymerase delta. *Biochemistry* 15, 2817-2822.
- Castroviejo, M., Tarrago-Litvak, L., and Litvak, S. (1979). Multiple DNA polymerases from quiescent wheat embryos. Purification and characterization of three enzymes from the soluble cytoplasm and one from purified mitochondria. *Biochem. J.* 181, 183-191.
- Chen, C-M., Ertl, J., Yang, M-S and Chang, C-C (1987). Cytokinin-induced changes in the population of translatable mRNA in excised pumpkin cotyledons. *Plant Sci* 52, 169-174.
- Coello, P., Rodríguez, R., García, E. and Vázquez-Ramos, J.M. (1992). A DNA polymerase from maize axes: its purification and possible role. *Plant Molecular Biology* 20, 1159-1168.
- Collins, K.L., Russo, A., Tseng, B.Y., and Kelly, T.J. (1993). The role of the 70 kDa subunit of human DNA polymerase α in DNA replication. *EMBO J.* 12, 4555-4566.

Conger, B.V. and Carabia, J.V. (1976). Microspectrophotometric determination of the 2C and 4C nuclear complement in the root and shoot of the dormant maize embryo. *Environ. Exp. Bot.* 16, 171-175.

Cripps-Wolfman, J., Henshaw, E.C., and Bambara, R.A. (1989). Alterations in the phosphorylation and activity of DNA polymerase α correlate with the change in replicative DNA synthesis as quiescent cells re-enter the cell cycle. *J. Biol. Chem.* 264, 19478-19486.

Deltour, R., Jacqumard, A. (1974). Relation between water stress and DNA synthesis during germination of *Zea mays* L. *Ann. Bot.* 38, 329-334.

Deltour, R. (1985). Nuclear activation during early germination of the higher plant embryo. *J. Cell Sci.* 75, 43-83.

Dobrzanska, H., Tomaszewski, M., Grzelczak, Z., Rejman, E., Buchowicz, J. (1973). Cascade activation of genome transcription in wheat. *Nature* 244, 507-509.

Dulic, V., Kaufmann, W.K., Wilson, S.J., Tlsty, T.D., Lees, E., Harper, J.W., Elledge, S.J., Reed, S.I. (1994). p53-Dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell* 76, 1013-1023.

El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trant, D.B., Lin, D., Mercer, W.E., Kinsler, K.W., Vogelstein, B. (1993). *Waf1*, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-825.

Fletcher, R.A. (1969). Retardation of leaf senescence by BA in intact bean plants. *Planta* 89, 1-8.

Georgieva, E.I., López-Rodas, G. Hittmair, A., Feichtinger, H., Brosch, G. and Loidl, P. (1994). Maize embryo germination. I. Cell cycle analysis. *Planta* 192, 118-124.

Gu, Y., Turck, C.W. and Morgan, D.O. (1993). Inhibition of CDK2 activity *in vivo* by an associated 20K regulatory subunit. *Nature* 366, 707-710.

Harper, J.W., Adami, G.R., Well, N., Keyomarsi, K and Elledge, S.J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805-816.

Hata, S., Kouchi, H., Tanaka, Y., Minami, E., Matsumoto, T., Suzuka, I., and Hashimoto, J. (1992). Identification of carrot cDNA clones encoding a second putative proliferating cell-nuclear antigen, DNA polymerase δ auxiliary protein. *Eur. J. Biochem.* 203, 367-371.

Hohn, K.-T., and Grosse, F. (1987). Processivity of the DNA polymerase α -primase complex from calf thymus. *Biochemistry* 26, 2870-2878.

Jaskulski, D., Gatti, C., Travali, S., Calabretta, B. and Baserga, R. (1988). Regulation of the Proliferating Cell Nuclear Antigen Cyclin and Thymidine Kinase mRNA Levels by Growth Factors. *J. Biol. Chem.* 263, 10175-10179.

Kaguni, L.S., Rossignol, J.M., Conaway, R.C., and Lehman, I.R. (1983). Association of DNA primase with the beta/gamma subunits of DNA polymerase alpha from *Drosophila melanogaster* embryos. *J. Biol. Chem.* 258, 9037-9041.

Karavaiko, N.N., Krawiarz, K., Khokhlova, V.A. and Kulaeva, O.N. (1978). *Fiziol. Rast.* 25:803.

Kilbey, B.J., Fraser, I., McAleese, S., Goman, M. and Ridley, R.G. (1993). Molecular characterisation and stage-specific expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) from the malarial parasite, *Plasmodium falciparum*. *Nucleic Acids Res.* 21, 239-243.

Kodama, H., Ito, M., Ohnishi, N., Suzuka, I. and Komamine, A. (1991). Molecular cloning of the gene for plant proliferating-cell nuclear antigen and expression of this gene during the cell cycle in synchronized cultures of *Catharanthus roseus* cells. *Eur. J. Biochem.* 197-495-503.

Kornberg, A., and Baker, J. (1992). DNA replication. W.H. Freeman and Company. USA.

Kosugi, S., Suzuka, I., Ohashi, Y., Murakami, T., and Arai, Y. (1991). Upstream sequences of rice proliferating cell nuclear antigen (PCNA) gene mediate expression of PCNA-GUS chimeric gene in meristems of transgenic tobacco plants. *Nucleic Acids Res.* 19, 1571-1576.

Kulaeva, O.N. (1981). Cytokinin action on transcription and translation in plants. In: *Metabolism and molecular activities of cytokinins*. ed. by J. Guern and C. Péaud Lenoël. Spring-Verlag, Berlin-Heidelberg.

Laquel, P., Litvak, S. and Castroviejo, M. Mammalian proliferating cell nuclear antigen stimulates the processivity of two wheat embryo DNA polymerases. (1993). *Plant Physiol.* 102, 107-114.

Lee, M.Y.M.Y., Alejandr, R., and Toomey, N.L. (1989). Immunochemical studies of DNA polymerase δ : relationship with DNA polymerase α . *Arch. Biochem. Biophys.* 272, 1-9.

Lee, S.-H. and Hurwitz, J. (1990). Mechanism of elongation of primed DNA by DNA polymerase δ , proliferating cell nuclear antigen, and activator 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 5672-5676.

Letham, D.S. (1963). Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. Life Sci. 2, 569-573.

Li, R., Waga, S., Hannon, G.J., Beach, D. and Stillman, B. (1994). Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. Nature 371, 534-537.

Litvak, S., and Castroviejo, M. (1985) Plant DNA polymerases. Plant Mol.Biol. 4, 311-314.

Longo, G.P., Pedrett, M., Rossi, G., and Longo, C.P. (1979). Effect of BA on the development of plastids and microbodies in excised watermelon cotyledons. Planta 145, 209-217.

Lu, J-L., Ertl, J.R. and Chen, Ch-M. (1992). Transcriptional regulation of nitrate reductase mRNA levels by cytokinin-abscisic acid interactions in etiolated barley leaves. Plant Physiol. 98, 1255-1260.

Markley, N.A., Bonhamsmith, P.C. and Moloney, M.M. (1993). Genome 36, 459-466.

Mayer, A.M. and Poljakoff-Mayber, A. 1989. The germination of seeds. 4th edition. Ed. Pergamon Press. Exeter, G.B. pp19-21 y 179-180.

Melendy, T., and Stillman, B. (1991). Purification of DNA polymerase δ as an essential simian virus 40 DNA replication factor. J. Biol. Chem. 266, 1942-1949.

Miller, D.O., Skoog F., Okemura F.S., Saltz M.H., von and Strong F.M. (1956). Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. J. Am. Chem. Soc. 78, 1345-1350.

Miura, M., Li, S-W, Dumenil, G. and Baserga, R. (1994). Platelet-derived growth factor-induced expression fo messenger RNA for the proliferating cell nuclear antigen requires a functional receptor for the insulin-like growth factor I. Cancer Research 54, 2472-2477.

Miyashi, K., Fritzler, M.J. and Tan, E.M. (1978). An autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. J. Immunol. 121, 2228-2234

Noda, A.F., Ning, Y., Venable, S., Pereira-Smith, O.M. and Smith, J. (1994). J. R. Expl Cell Res. 211, 90-98.

Raven, P.H., Evert, R.F. and Eichhorn S.E. (1986) Biology of Plants. 4th edition, Worth publishers, inc. New York, N.Y.

Reddy, A.S.N., P.K. Jena, S.K. Mukherjee and B.W. Poovaiah. (1990). Molecular cloning of cDNAs for auxin-induced mRNAs and developmental expression of the auxin-inducible genes. *Plant Molecular Biology* 14, 643-653.

Rejman, L., Buchowicz, J. (1971). The sequence of initiation of RNA, DNA and protein synthesis in the wheat grains during germination. *Phytochemistry* 10, 2951-2957.

Reyes Jiménez, J., Jiménez García, L.F., González, M.A. and Vázquez-Ramos, J.M. (1991). Benzyladenine stimulation of nuclear DNA synthesis and cell division in germinating maize. *Seed Science Research* 1, 113-117.

Reyes Jiménez, J. (1991). Estudio sobre el posible mecanismo de acción de la benciladenina en la estimulación de la síntesis de ADN y la división celular, durante la germinación de ejes embrionarios de maíz. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM.

Richard, M.C., Litvak, S., and Castroviejo, M. (1991). DNA polimerase B from wheat embryos: A plant δ -like DNA polimerase. *Arch. Biochem. Biophys.* 287, 141-150.

Roberts, J.A. and R. Hooley. (1988). *Plant Growth Regulators*. Chapman and Hall, inc, New York, USA.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor. USA

Shivji, M.K.K., Kenny, M.K. and Wood, R.D. (1992). Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell* 69, 367-374.

Simon, E.W. (1984) Early events in germination. In: *Seed Physiology Vol 2*, 77-115

Skoog, F., Strong, F.M., Miller, C.O. (1965). Cytokinins. *Science* 148, 532-533.

So, A.G., and Downey, K.M. (1992). Eukaryotic DNA replication. *Crit. Rev. Biochem. and Mol. Biol.* 27, 129-155.

Sugiharto, S., Burnell, J.N. and Sugiyama, T. (1992). Cytokinin is required to induce the nitrogen-dependent accumulation of mRNAs for phosphoenolpyruvate carboxylase and carbonic anhydrase in detached maize leaves. *Plant Physiol.* 100, 153-156.

Suzuka, I., Hata, S., Matsuoka, M., Kosugi, S., Hashimoto, J. (1991). Highly conserved structure of proliferating cell nuclear antigen (DNA polymerase δ auxiliary protein) gene in plants. *Eur. J. Biochem.* 195, 571-575.

Takasaki, Y., Deng, J.-S. and Tan, E.M. (1981). A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation. *J. Exptl. Med.* 154, 1899-1909.

Tan, C.K., Castillo, C., So, A.G., and Downey, K.M. (1986). An auxiliary protein for DNA polymerase delta from calf thymus. *J. Biol. Chem.* 261, 12319-12316.

Tepper D.A. and Foslet D.E. (1978). Hormone-mediated translational control of protein synthesis in cultured cells of *Glycine max*. *Devel. Biol.* 62:486-497.

Tetley R.N., and Thimann K.V. (1974). The metabolism of the oat leaves during senescence. I. Respiration, carbohydrate metabolism and the action of cytokinins. *Plant Physiol.* 45:742-751.

Trewavas, (1981). How do plant growth substances work? *Plant Cell and Environment* 4:203-228.

Tsurimoto, T. and Stillman, B. (1990). Functions of replication factor C and proliferating cell nuclear antigen: functional similarity of DNA polymerase accessory proteins from human cells and bacteriophage T4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 1023-1027.

Varnell R.J. and Vasil I.K. (1978). Experimental studies of the shoot apical meristem of seed plants. II. Morphological and cytochemical effects of kinetin applied to the exposed meristems of *Pinus elliotti*. *Amer. J. Bot.*

Vázquez-Ramos, J.M. and Reyes, J. (1990). Stimulation of DNA synthesis and DNA polymerase activity by benziladenine during early germination of maize axes. *Can. J. Bot.* 68:2590-2594.

Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D. and Stillman, B. (1994). The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 369, 574-578.

Wallace, R.A., King, J.L. and Sanders G.P. (1981). *Biology the science of life*. 2nd edition, Scott, Foresman and Company eds. USA.

Waseem, N.H., Labib, K., Nurse, P. and Lane D.P. (1992). Isolation and analysis of the fission yeast gene encoding polymerase δ accessory protein PCNA. *EMBO J.* 11, 5111-5120.

Weinberg, D.H., Collins, K.L., Simancek, P., Russo, A., Wold, M.S. Virship, D.M. and Kelly, T.J. (1990). Reconstitution of SV 40 DNA replication with purified enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 8692-8704.

Yokoyama, M., Naito K. and Suzuki H. (1980). Effects of BA on chlorophyll, DNA, RNA and protein content of attached young bean (*Phaseolus vulgaris* L.) leaves. *Ann. Bot.* 45:649-653.

Zarain, M., Bernal-Lugo, I., and Vázquez-Ramos, J.M. (1987). Effect of benzyladenine on the DNA synthesis during early germination of maize embryo axes. *Mut. Res.* 181, 103-110.

Zúñiga, J.J. (1991). Efecto de benciladenina sobre la población de RNA mensajero presente durante la germinación de maíz. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO - DIRECCION GENERAL DE BIBLIOTECAS
SUBDIRECCION DE SERVICIOS BIBLIOTECARIOS. DEPARTAMENTO DE TESIS
RELACION TESIS DEL AÑO: 1 9 9 5

CLAVE: 00561

UNIVERSIDAD:

Página 1

Facultad: Facultad de Química
Carrera: Doctorado en Ciencias Químicas (Bioquímica)

A U T O R

T I T U L O

- | | |
|-----------------------------------|--|
| 1.-Calera Medina, Monica Raquel | Efecto de algunos aleloquímicos (lactonas sesquiterpénicos y 4-fenilcumarinas) sobre |
| 2.-Lopez Villasenor, Maria Imelda | En busca de genes regulados por benciladenina durante la germinación de maíz : PCNA |