

Potenciamiento traduccional mediado por la región líder del gen Sacarosa Fosfato Sintasa de arroz (*sps1*).

Miguel Martínez Trujillo, Yazmín Carreón Abud

Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México.

Correo electrónico: codigogenetico@gmail.com

RESUMEN

El gen *sps1*, que codifica para la Sacarosa Fosfato Sintasa de arroz tiene un 5'UTR (líder) inusualmente largo de 368 nucleótidos, con una estructura secundaria compleja. La eliminación de la región líder del promotor nativo *sps1* disminuye la expresión *in vivo* del gen reportero GUS en 10 veces. La inserción del líder hacia abajo (3') pero no hacia arriba (5') del promotor -46(35S) CaMV en la orientación correcta produce un potenciamiento de la expresión equivalente al conferido en el promotor nativo *sps1*. Este potenciamiento de la expresión es observado usando tanto expresiones transitorias *in vivo* en hojas de tabaco como en plantas establemente transformadas de *Arabidopsis*. El líder *sps1* además incrementa el nivel de expresión del gen reportero en los promotores fuertes 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor y del Virus del Mosaico de la Vena de la Yuca, aunque en un menor nivel con relación a promotores débiles. Estudios de transcripción y de traducción *in vitro* usando transcritos del gen *uidA* con y sin el líder muestran que esta región potencia la traducción por más de tres veces. Análisis de deleciones del líder *sps1* muestran que el potenciamiento *in vivo* se conserva totalmente cuando se eliminan 85 bases del extremo 5' y se reduce a la mitad cuando se eliminan 148 bases de ese extremo; la eliminación de 190 bases del extremo 3' conserva dos terceras partes de la actividad potenciadora del líder. Estos resultados sugieren que existe redundancia en elementos de secuencia o estructurales del líder *sps1* involucrados en la traducción del ARN mensajero.

ABSTRACT

The *sps1* gene, encoding the sucrose phosphate synthase in rice has an unusually long 5' untranslated region (leader) of 368 nt with a complex predicted secondary structure. Elimination of the leader from the native *sps1* promoter diminishes the *in vivo* expression of the GUS reporter gene by 10-fold. Insertion of the leader downstream, but not upstream, of the -46(35S) CaMV promoter in the correct orientation produces an expression enhancement equivalent to that conferred in the *sps1* native promoter. This expression enhancement is observed using both *in vivo* transient expressions in tobacco leaves and in stably transformed *Arabidopsis* plants. The *sps1* leader also enhances the level of reporter gene expression in the strong 35S CaMV and Cassava Vein Mosaic Virus promoters, albeit at a lower level than in weaker promoters. *In vitro* transcription and translation studies using transcripts of the *uidA* gene, with and without the *sps1* leader, show that the *sps1* 5' untranslated region enhances translation over three-fold. Deletion analysis of the *sps1* leader showed that *in vivo* enhancement is totally conserved in the 5' $\Delta 85$ and diminished by half in the 5' $\Delta 148$; the deletion 3' $\Delta 190$ conserves two thirds of the enhancement, suggesting redundancy in sequence elements.

INTRODUCCIÓN

La mayoría de las especies vegetales utilizan la sacarosa como el compuesto central para movilizar foto asimilados de los tejidos fuente a los consumidores, y para movilizar reservas de los tejidos de almacenamiento durante la germinación de las semillas, debido probablemente a sus propiedades de alta solubilidad y baja reactividad (Giaquinta 1980). La sacarosa es sintetizada por la acción de la Sacarosa Fosfato Sintasa (SPS; EC 2.3.1.14) la cual transfiere el grupo glucosil de la UDP-Glucosa a Fructosa-6-P para producir Sacarosa-6-P, la cual es posteriormente desfosforilada por una Sacarosa 6-fosfato Fosfatasa (SPP; EC 3.1.3.00) generando sacarosa como el producto final para hacer la reacción

prácticamente irreversible (Huber y Huber 1996). Se ha demostrado que la actividad de la SPS es altamente regulada tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional. La actividad enzimática de SPS es regulada por modificación covalente, fosforilándose en la oscuridad para producir enzima menos activa y defosforilándose en presencia de luz para generar una enzima más activa (Stitt et al. 1988). La SPS es regulada además por interacciones alostéricas, como ha sido demostrado en maíz, espinaca, arroz, papa y mezquite, donde la glucosa-6-Fosfato activa la enzima y el fosfato inorgánico la inhibe (Amir y Preis 1982, Doehlert y Huber 1983, Kalt-Torres et al. 1987, Salerno et al. 1998, Reimholz et al. 1994, Sinha et al. 1997). Los ADNs

complementarios que codifican para SPS han sido aislados de maíz (Worrell et al. 1991) y otras plantas, permitiendo el estudio de la regulación genética y la utilización de estrategias biotecnológicas.

La regulación de SPS a nivel transcripcional ha sido demostrada en análisis de Northern blot y por fusiones de genes reporteros usando el promotor *sps1* de arroz. Se ha reportado un incremento de los ARN mensajeros de SPS durante el desarrollo de la hoja de espinaca (Klein 1993) y durante la maduración de frutos de mandarina, plátano y kiwi, lo cual se relaciona con la síntesis de sacarosa (Komatsu et al. 1996, Oliveira et al. 1997, Langenkämper et al. 1998). El promotor *sps1* de arroz dirige una expresión en las hojas regulada por luz y limitada a células activas fotosintéticamente, comenzando en los ápices de las hojas en desarrollo y extendiéndose gradualmente a la base, siguiendo la transición del tejido consumidor al tejido fuente. Durante la germinación de las semillas de arroz la actividad del promotor *sps1* de arroz se encuentra restringida al escutelo, donde la síntesis de sacarosa tiene lugar para apoyar el crecimiento del embrión en desarrollo (Chávez-Bárcenas et al. 2000, Martínez-Trujillo 2002).

La región 5' del gen *sps1* de arroz consiste de un promotor atípico sin cajas TATA y CCAAT en la posición usual y un líder largo de 368 nucleótidos (Sakamoto et al. 1995, Valdez-Alarcón et al. 1996, Chávez-Bárcenas et al. 2000). Se ha propuesto que la expresión específica de tejido y

durante el desarrollo, conferida por el promotor *sps1*, es determinada por la presencia de secuencias de ADN que han sido relacionados previamente con respuesta a luz y hormonas. Se desconoce sin embargo, si hay mecanismos que operen a nivel de la estabilidad del ARN mensajero o de la traducción, para regular el nivel de SPS.

Los 5' UTRs (líderes) en genes de plantas y de animales son normalmente cortos y se encuentran en el rango de 20 a 100 nucleótidos (Joshi 1987, Kozac 1987). Regiones líderes largas han sido estudiadas en genes de virus y en algunos genes de plantas y animales, y en varios casos se ha demostrado que tienen una influencia en la expresión de los genes ya sea al nivel transcripcional o traduccional. Los mecanismos por los cuales las secuencias de los líderes 5' funcionan pueden ser agrupados de la siguiente manera: a) Presencia de marcos de lectura cortos (uORFs) en la región líder, los cuales son usualmente inhibitorios, debido a que son traducidos y reducen la iniciación de la traducción en el codón de inicio principal ubicado hacia abajo (3') (Fütterer y Hohn 1996). Ejemplos de este mecanismo incluyen el gen *Opaque-2* (*O2*) que codifica para un factor de transcripción en maíz, el gen *Lc* de maíz implicado en la biosíntesis de antocianina y los genes *pma1* y *pma3*, que codifican para ATPasas que bombean protones en *Nicotiana plumbaginifolia*, (Lohmer et al. 1993, Damiani y Wesler 1993, Michelet et al. 1994, Lukaszewicz et al. 1998); b) Potenciamiento de la traducción

mediada por 5'UTRs, solos o en colaboración por regiones 3', demostrado principalmente en genes virales y en algunos genes de plantas (Fütterer y Hohn 1996). Ejemplos de este mecanismo incluyen el Virus del Mosaico de la Alfalfa (AMV) (Jobling y Gehrke 1987), Virus del Mosaico del Tabaco (TMV) (Gallie et al. 1987, Leathers et al. 1993), Virus del Grabado del Mosaico del tabaco (TEV) (Carrington y Freed 1990, Gallie et al. 1995b), Virus Satélite de la Necrosis de Tabaco (SNTV) (Timmer et al. 1993, Meulewaeter et al. 1998), Virus X de la Papa (PVX) (Zelenina et al. 1992), Potyvirus de mosaico de naciente del chícharo (PsbMv) (Nicolaisen et al. 1992), gen *psaDb* del fotosistema de *Nicotiana sylvestris* (Yamamoto et al. 1995), gen *adh1* de la alcohol deshidrogenasa de maíz (Bailey-Serres y Dawe 1996), gen *lat52* de tomate con expresión en polen (Bate et al. 1996), gen *hsp70* de maíz con expresión durante choque térmico (Pitto et al. 1992) y un gen de α -amilasa (Gallie y Young 1994); c) La presencia de potenciadores transcripcionales o silenciadores ha sido documentada en algunos genes de plantas. Por ejemplo, en los genes *PsaF*, *PetE* and *PetH* (que codifican para la subunidad III del fotosistema I, plastocianina y oxido-reductasa NADP+ de ferredoxina) donde los líderes incrementan la transcripción (Bolle et al. 1994) y el gen *lat59* de tomate en que la transcripción es disminuida (Curie y McCormick 1997) y d) Presencia de elementos en la secuencia del ADN que modifican la estabilidad del ARN mensajero, como

por ejemplo los líderes del gen de ferredoxina-1 (*Fed-1*) de chícharo, el gen *Lhcb1**4 de chícharo y un gen de respuesta a choque térmico de *Daucus carota* (Dickey et al. 1998, Anderson et al. 1999, Gallie et al. 1995a).

Casos complejos donde el líder influencia la estabilización y la eficiencia de traducción se han reportado para el gen *At-P5R* de *Arabidopsis* involucrado en la biosíntesis de prolina, en el gen *ntp303* de tabaco y en el gen *psbD* de *Chlamydomonas reinhardtii*, que codifica para el polipéptido D2 que sirve como centro de reacción en el fotosistema II (Hua et al. 2001, Hultzink et al. 2002, Nickelsen et al. 1999).

Considerando que el líder *sps1* es inusualmente largo y presenta una estructura secundaria compleja (figura 1), se planteó determinar si esta región juega un papel en la regulación del nivel de SPS a nivel transcripcional o post transcripcional. En este trabajo se muestra que el líder *sps1* actúa como un potenciador de la traducción tanto *in vivo* como *in vitro*. Análisis de deleciones del líder *sps1* sugieren que hay secuencias redundantes que están involucradas en esta función.

MATERIALES Y MÉTODOS

Amplificación por PCR de fragmentos del líder *sps1*

Las endonucleasas de restricción y la T4 ADN ligasa fueron de GIBCO-BRL, y se utilizaron siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para la reacción en cadena de la polimerasa se utilizó eLONGase® Enzyme Mix de LIFE TECHNOLOGIES, también

siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las reacciones de amplificación se hicieron en un termociclador Perkin Elmer, GenAmp, PCR System 2400. Todos los productos de PCR fueron clonados inicialmente en el vector pGEMTeasy (PROMEGA) antes de ser subclonados en otros plásmidos.

Plásmidos y construcción de vectores

Los plásmidos pBS46S and pBS90S son derivados de pBluescript (STRATAGENE) y contienen las versiones truncadas -46 y -90 del promotor 35S del virus del Mosaico de la Coliflor, fusionados al gen *uidA* y el terminador *nos* (Argüello 1996). Estas versiones del promotor son mencionadas en este trabajo como -46(35S) y -90(35S). Una fusión traduccional del promotor *spsI*, el líder, primer exón, primer intrón y parte del segundo exón, a la región codificadora del gen *uidA*, se llevó a cabo insertando un fragmento genómico de *spsI* obtenido por *EcoRI* (-2195 to +676) a partir de una clona genómica de plásmido, y un fragmento *EcoRI-BamHI* de pBI101.3 (CLONTECH), conteniendo la secuencia codificadora de *uidA* y el terminador *nos*, en pBluescript II KS plasmid. Este plásmido fue denominado pSPS1. Fusiones transcripcionales del promotor *spsI* con y sin el líder *spsI* fueron fusionadas al gen *uidA* reemplazando el fragmento del promotor -46(35S) presente en pBS46S por los fragmentos -2195 a +368 y -2195 a +20 de *spsI* generados por PCR. Los plásmidos

fueron denominados pSPS2 y pSPS3, respectivamente.

Los plásmidos que contienen el líder *spsI* hacia arriba (5') y hacia abajo (3') del promotor -46(35S) fueron producidos insertando la región líder de 368 bases en los sitios de restricción *KpnI* y *HindIII* ó *BgIII* de pBS46S. Los vectores generados fueron denominados como pUTR46 y p46UTR, respectivamente. Otro vector construido con la región líder en el sentido opuesto y hacia abajo (3') del promotor -46(35S) fue denominado p46UTR-INV. La región líder también se insertó hacia arriba (5') del promotor -90(35S) usando el plásmido pBS90S y los sitios de restricción *KpnI-HindIII*. El vector generado se denominó pUTR90.

Se generaron vectores conteniendo la región líder *spsI* entre el promotor del Virus del Mosaico de la Yuca y el gen *uidA* así como entre el promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor y el gen *uidA*. Los plásmidos fueron producidos insertando la región líder *spsI* de 368 pares de bases en el sitio *BgIII* de pILTAB380 (Verdaguer et al. 1996) o el sitio *XbaI* de pBI121 (Jefferson et al. 1987), respectivamente. Los plásmidos generados se denominaron pCAS-UTR y p35S-UTR, respectivamente.

Deleciones de la región líder *spsI* clonadas entre el promotor -46(35S) y el gen *uidA* y terminador *nos*. Los fragmentos del líder con las deleciones fueron generados por PCR. La versión del líder 5'Δ85 fue obtenida usando los oligonucleótidos
5'GCAGATCTCGTCCACCAAGCC
ACGGACTC-3'

y

5'GCAGATCTCTCTCGATCAGCCG
ATGCTCTC-3'; la delección 5'Δ148
con los oligonucleótidos
5'GCAGATCTTTTGATACGTGGTA
CGTGACGC-3' y
5'GCAGATCTCTCTCGATCAGCCG
ATGCTCTC-3' ; y la delección 3'Δ190
con los oligonucleótidos
5'GCAGATCTCACCCGCCAGCCTC
CCTCTC-3' y
5'GCAGATCTCAAAGCGTCACGT
ACCACGTATC-3' . Los fragmentos
finales fueron clonados en el sitio *Bgl*II
de pBS46S. Los plásmidos fueron
denominados p46UTRΔ85,
p46UTRΔ148 y p46UTRΔ190-3,
respectivamente.

Promotor T7 fusionado al gen *uidA* y terminador *nos*. El gen *uidA* y el terminador *nos* fueron obtenidos de pBI101.3 cortando con *Eco*RI y *Bam*HI y clonando en los mismos sitios en pBluescript KS . La construcción tiene el promotor del virus T7 fusionado al gen *uidA* y terminador *nos*. Entre el sitio de inicio de transcripción y el ATG del gen *uidA* hay 54 pares de bases. El vector generado fue denominado como pT7-GUS

Promotor T7 fusionado al líder *sps1* gen *uidA* y terminador *nos*. El fragmento de ADN con la fusión del líder *sps1*, gen *uidA* y terminador *nos*, fue obtenido de p46UTR (este trabajo), cortando con *Xba*I e insertando en el mismo sitio en pBluescript KS. La construcción con la orientación correcta tiene el promotor T7 fusionado al líder *sps1*, gen *uidA* y terminador *nos*. El vector generado fue denominado pT7UTR-GUS

Vector binario con el promotor -46(35S) fusionado al gen *uidA* y terminador *nos* . El fragmento de ADN con el promotor -46(35S) fusionado al gen *uidA* y terminador *nos* fue obtenido cortando pBS46S con *Hind*III y *Bam*HI e insertando en los sitios *Hind*III-*Bam*HI de pCAMBIA2300 . El vector generado fue denominado p46BIN.

Vector binario con el promotor -46(35S) fusionado al líder *sps1*, gen *uidA* y terminador *nos*. El vector p46UTR fue digerido con *Hind*III y *Bam*HI y el fragmento liberado fue clonado en los sitios *Hind*III-*Bam*HI de pCAMBIA2300. El vector generado fue denominado p46UTR-BIN.

Las secuencias del contexto de los inicios de transcripción, y traducción, así como las secuencias intermedias, para cada uno de los plásmidos utilizados en este trabajo se muestran en la tabla 1.

Secuenciación de ADN

Todas las construcciones con *sps1* fueron verificadas por secuenciación por el método de terminación de cadenas con dideoxinucleótidos (Sanger et al. 1977) usando nucleótidos fluorescentes (ABI) y el secuenciador ABI PRISMTM 374 .

Expresión transitoria de GUS y GFP en hojas de tabaco

Los plásmidos que contienen las diferentes construcciones *sps1* 5' UTR fueron introducidos en hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv *xanthi*) mediante bombardeo con micro partículas. El plásmido, pCKGFPS65C (Reichel et al. 1996),

con el gen que codifica para la proteína verde fluorescente bajo la expresión del promotor 35S del CaMV, fue mezclado con los plásmidos *uidA*, como un estándar interno y así normalizar las diferencias de los experimentos de bombardeo. El área de bombardeo de las hojas de tabaco en cada caja de Petri fue de 4 cm². El procedimiento fue el descrito por Cabrera-Ponce et al. (1995). Las hojas de tabaco en el medio MS fueron bombardeadas usando el aparato BioRad Helium-driven PDS-1000/He, y una presión de 900 psi. Las hojas de tabaco fueron incubadas durante 36 horas a 28 °C en la oscuridad y posteriormente analizadas para la expresión de la proteína verde fluorescente. Las hojas de tabaco fueron transferidas a cajas de Petri para ser teñidas con x-gluc e incubadas a 37 °C por 12 horas. Los puntos azules de la expresión de GUS fueron contados usando un microscopio estereoscópico. Las células con expresión de GFP fueron contadas usando un microscopio Leica DMRE con un filtro I3 (excitador de luz azul BP 450-490 nm; separador de rayos RKP 510 nm; emisor LP 515 nm).

Estandarización y análisis estadístico de la expresión transitoria

Para cada construcción *uidA* se bombardearon 10 muestras de hoja para disminuir el efecto de variación en los bombardeos. La relación de puntos azules/verdes fluorescentes se determinó en cada una de las muestras bombardeadas y para cada bloque de construcciones bombardeadas la construcción con la relación mayor se

consideró como 100%; las otras relaciones fueron ajustadas proporcionalmente. La media y el intervalo de confianza fueron calculados utilizando el software SPSS 10.0 para Windows.

Extracción de ARN y RT-PCR.

Plantas de *Arabidopsis* de 10 días de edad fueron utilizadas para extraer el ARN total usando el método reportado en Schuler et al. (1989), el cual fue tratado con DNaseI. El ARN total (1 µg) fue usado para transcripción reversa usando 200 U del kit Superscript II plus Rnase H⁻ Reverse Transcriptase (Gibco BRL) y 10 µM (dT)₁₅, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Los oligonucleótidos

5'TCAGCGTTGGTGGGAAAGCG3'

y 5'GCGTTGCTTCCGCCAGTGG3'

fueron utilizados para amplificar un fragmento de 1201 pares de bases correspondiente al gen *uidA*. Se realizaron pruebas con 10, 15, 20, 25 y 30 ciclos para determinar el número mínimo de ciclos en que se podían realizar cuantificaciones confiables del fragmento generado y en la etapa final se utilizaron 20 ciclos.

Transcripción y traducción *in vitro*

Los plásmidos pT7-GUS y pT7UTR-GUS fueron linearizados cortando en el extremo del terminador *nos*, con *EcoRI* o *BamHI*, respectivamente. El kit RiboMAXTM (PROMEGA) fue utilizado de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La integridad del ARN se determinó corriendo una muestra en un gel de agarosa al 0.8%, tiñendo con bromuro

de etidio y visualizando en un transiluminador de luz UV. El ARN fue cuantificado en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm.

Los transcritos de *uidA* con y sin el líder *sps1* fueron traducidos *in vitro* utilizando un kit de extracto de germen de trigo (PROMEGA) y [³⁵S] metionina, siguiendo las recomendaciones del fabricante. En todos los casos se observó un solo producto de traducción *in vitro* y mediante el uso de marcadores de peso molecular Benchmark (GIBCO-BRL) se corroboró la migración de la proteína codificada por *uidA*. Para detectar y cuantificar la radioactividad incorporada en la proteína uidA, el gel fue secado y expuesto durante 12 horas en un cassette Phosphorimager (MOLECULAR DYNAMICS). Se utilizó un STORM (MOLECULAR DYNAMICS) para hacer un barrido del cassette con la impresión de la radioactividad y se usó el software ImageQuant™ (MOLECULAR DYNAMICS) para cuantificar la radioactividad incorporada, que se reportó como volúmenes.

Transformación y selección de *Arabidopsis*

Los vectores p46BIN y p46UTR-BIN fueron introducidos en *Agrobacterium tumefaciens*, cepa GV2260 (McBride y Summerfelt 1990) por electroporación usando un electromanipulador BTX600, siguiendo las recomendaciones del fabricante. El fragmento de T-ADN de los vectores binarios se introdujo en *Arabidopsis thaliana* (ecotipo C24)

utilizando el método de floral dip (inmersión floral) (Clough y Bent 1998) optimizado por Martínez-Trujillo et al. (2004). La inoculación de *Arabidopsis* con *Agrobacterium* se repitió 3 veces cada 5 días para incrementar la eficiencia de transformación. La progenie resultante fue seleccionada colocando las semillas durante 7 días en medio MS sólido con sacarosa al 1% y kanamicina a una concentración de 50 µg/ml

Expresión de GUS en plantas de *Arabidopsis* y hojas de tabaco

Plantas de *Arabidopsis* transformadas de 10 días de edad con 4 hojas fueron utilizadas para la tinción histoquímica con x-gluc durante 12 horas a 37 °C de acuerdo a Stomp (1992); se eliminó la clorofila con metanol-acetona (3:1) y se preservaron las muestras en glicerol al 50%. El mismo procedimiento fue utilizado para hojas de tabaco bombardeadas. Hojas de plantas transformadas de *Arabidopsis* de 21 días de edad fueron separadas y las fracciones proteicas fueron obtenidas de acuerdo a Martín et al. (1992); posteriormente se realizaron ensayos fluorométricos para cuantificar la actividad de GUS (Gallagher 1992).

Estructura secundaria del ARN

Para predecir la estructura secundaria del ARN del líder completo y de las versiones deletadas se utilizó el software RNA *mfold version 3.1* de Zuker y Turner de la Universidad de Washington (Zuker et al. 1999).

RESULTADOS

Efecto de la presencia del líder *sps1* en el nivel de expresión dirigido por el promotor *sps1*.

Aunque la región del promotor es la responsable del nivel de expresión en la mayoría de los genes, en algunos casos el líder y la región codificadora pueden influenciar la expresión genética a nivel transcripcional o post transcripcional. Para determinar si el líder o el primer intrón del gen *sps1* de arroz juegan un papel en la determinación del nivel de expresión de este gen, se determinó la expresión dirigida por los vectores pSPS3, pSPS2 y pSPS1, que contienen al promotor solo (-2185 a +20), al promotor y al líder (-2185 a +368) y al promotor, líder y los primeros dos exones con un intrón de por medio (-2185 a +676), fusionados al gen reportero *uidA* y con el terminador *nos*. Los niveles de expresión conferidos por las regiones mencionadas fueron determinados por ensayos de expresión transitoria usando el método de bombardeo con micro partículas. Con el propósito de obtener más información cuantitativa acerca de la expresión conferida por las diferentes construcciones de SPS, los vectores con las fusiones del gen *sps1* fueron mezclados cada uno de ellos con pCKGFPS65C, un plásmido que contiene la región codificadora de la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el control del promotor 35S. La reproducibilidad del sistema fue incrementada utilizando el co-bombardeo, de manera que el intervalo de confianza en 10 muestras bombardeadas se redujo del 25% a la

mitad, cuando el control interno de GFP fue utilizado y la relación de puntos azules/células fluorescentes fue calculada (datos no mostrados). Este procedimiento fue utilizado en todos los experimentos de bombardeo.

Se observó que la remoción de los dos exones y el primer intrón no tienen efecto en la expresión conferida por *sps1* (Figura 2). Sin embargo, la eliminación del líder disminuye el nivel de expresión de GUS conferido por la región *sps1* en aproximadamente 10 veces. Estos resultados indican que la región líder juega un papel importante en la determinación del nivel de expresión conferido por el promotor *sps1*.

Efecto transcripcional del líder *sps1* hacia arriba (5') de promotores heterólogos

El efecto observado en la expresión conferida por el promotor *sps1* al eliminar la región líder sugiere que esta secuencia podría afectar la expresión genética al nivel transcripcional o post transcripcional. Para determinar si el líder *sps1* tiene una actividad de potenciador transcripcional, se clonó esta secuencia hacia arriba (5') de los promotores -46(35S) y -90(35S) en la orientación original (pUTR46 and pUTR90). Estas versiones truncadas del promotor 35S han sido utilizadas por su baja actividad para identificar fragmentos de ADN que contienen elementos potenciadores. Como puede observarse en la figura 3, la inserción del líder hacia arriba (5') de los promotores -46(35S) y -90(35S) no tiene efecto en el nivel de expresión de

GUS. Estos resultados sugieren que el líder *spsI* no presenta una actividad de potenciador transcripcional y que podría actuar al nivel post transcripcional.

El líder *spsI* incrementa la expresión de la versión -46 del promotor 35S

Considerando que el líder *spsI* no tiene una actividad de potenciador transcripcional, es posible que pudiera incrementar la expresión genética actuando al nivel post transcripcional. Para determinar si el líder *spsI* influencia la expresión genética cuando se le coloca en la parte del gen que se transcribe, esta secuencia se insertó hacia abajo (3') del promotor -46(35S) en ambos sentidos. El promotor -46(35S) se escogió para determinar el efecto del líder *spsI* considerando que un efecto al nivel post transcripcional puede ser detectado más fácilmente cuando se utiliza un promotor débil. El análisis del efecto del líder *spsI* mediante ensayos de expresión transitoria, muestra que existe un incremento en la expresión de 10 veces cuando esta región es insertada hacia abajo (3') del promotor-46(35S) en el sentido natural (figura 4A). El líder en el sentido opuesto no tiene efecto en la expresión del promotor -46 (35S).

El efecto del líder *spsI* en el incremento de la expresión del promotor -46(35S) es similar a la reducción de la expresión conferida por el promotor *spsI* cuando esta región es eliminada. Estos resultados y el hecho que el líder *spsI* no puede actuar como potenciador transcripcional, sugiere que el líder

spsI contiene elementos reguladores capaces de incrementar la expresión genética al nivel post transcripcional.

Considerando que el promotor -46(35S) es débil, se analizó si el líder podía además influenciar el nivel de expresión conferido por promotores fuertes. Con este propósito se insertó el líder *spsI* en el sentido original, entre la versión completa (400 pb) del promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor y la región codificadora del gen *uidA* (p35S-UTR); lo mismo se hizo utilizando el promotor del Virus del mosaico de la Vena de la Yuca (CVMV) (pCAS-UTR) (Verdaguer et al. 1996). Se ha reportado que el promotor CVMV tiene una actividad transcripcional fuerte y ensayos en nuestro laboratorio muestran que este promotor confiere un nivel de expresión similar al del promotor 35S (datos no mostrados). Se determinó que el líder *spsI* es capaz de incrementar el nivel de expresión conferido tanto por el promotor 35S como por el promotor CVMV en aproximadamente el 30% (Figuras 4B y 4C). El efecto del líder *spsI* en promotores fuertes fue observado en varios experimentos independientes y es significativo. Estos resultados muestran que el líder *spsI* es capaz de incrementar el nivel de expresión genética conferido tanto por promotores débiles como por promotores fuertes, aunque en diferentes grados de activación.

Para confirmar que los resultados observados usados en ensayos de expresión transitoria verdaderamente reflejan un efecto del líder *spsI* en condiciones fisiológicas, decidimos

analizar el efecto en plantas transformadas. Los vectores binarios p46UTR-BIN y p46BIN, que contienen el promotor -46(35S) fusionado al gen *uidA* con y sin la región líder *sps1* en el sentido correcto, fueron contruidos y usados para producir líneas de *Arabidopsis* transformadas establemente. Los ensayos histoquímicos de GUS mostraron que las líneas transgénicas de *Arabidopsis* transformadas con p46UTR-BIN tuvieron niveles de actividad de GUS mayores con relación a las líneas transformadas con p46BIN que carecen del líder *sps1* (Figura 5A). Para cuantificar el nivel de actividad de GUS en las plantas conteniendo las fusiones génicas con y sin el líder *sps1*, se obtuvieron extractos proteicos de 20 líneas transformadas con cada construcción y se procesaron para realizar ensayos fluorométricos. Se observó que la actividad promedio de GUS en las líneas que contenían la región *sps1* es aproximadamente 13 veces mayor con relación a la actividad observada en las líneas que no llevan la región líder (Figura 5B). Estos resultados son bastante consistentes con los datos obtenidos usando ensayos de expresión transitoria. La variación grande que se observó en los niveles de expresión entre las líneas transformadas con la misma construcción es debida probablemente a efectos de posición en el genoma vegetal, lo cual ha sido reportado previamente en líneas transformadas con promotores débiles y regiones líderes (Curie y McCormick 1997).

El líder *sps1* aumenta la eficiencia de traducción

Nuestros datos muestran que el líder *sps1* puede incrementar la expresión genética tanto en ensayos de expresión transitoria como en plantas transformadas establemente. Para determinar si el líder *sps1* influencia los niveles de transcritos, se determinaron los niveles de ARN del gen *uidA* mediante la técnica de RT-PCR de dos pasos usando ARN total proveniente de plantas de *Arabidopsis* transformadas con p46BIN o p46UTR-BIN. Considerando que cada línea transgénica puede tener diferentes niveles de ARN mensajero del gen *uidA*, se extrajo el ARN total de una mezcla de 40 plantas de 10 días de edad para cada una de las construcciones y así normalizar el ARN mensajero producido. Se cuantificó por espectrofotometría el ADN del fragmento de 1201 nucleótidos generado en las reacciones de 20 ciclos para 4 experimentos diferentes y la relación obtenida de las muestras provenientes de plantas sin líder y plantas con líder fue aproximadamente 1 (Figura 6). Estos resultados muestran que en promedio las construcciones *uidA* con y sin el líder *sps1* producen niveles similares de transcritos *uidA* y por lo tanto esta región no tiene una influencia en la estabilidad a nivel del ARN mensajero en las plantas utilizadas de 10 días de edad.

Para determinar si el líder *sps1* actúa en el nivel de la eficiencia de traducción del ARN mensajero, se llevaron a cabo experimentos de traducción *in vitro*. Con este propósito

se generaron construcciones en las cuales la región codificadora del gen *uidA* se fusionó al promotor viral T7, y en uno de los casos el líder *sps1* se insertó entre el promotor T7 y el gen *uidA* (pT7-GUS and pT7UTR-GUS). Usando estos plásmidos se generaron transcritos del gen *uidA* con y sin la región líder *sps1*, mediante un sistema de transcripción *in vitro* dependiente de T7 (Figura 7A). Para determinar la eficiencia de traducción a partir de estos dos tipos de transcritos se utilizó un sistema de traducción *in vitro* basado en extractos de germen de trigo y ^{35}S metionina; a diferentes muestras de reacción se adicionaron por separado cantidades iguales de cada uno de los transcritos *uidA*. En ambos casos se obtuvo un solo producto de traducción de un peso molecular aproximado al que se ha reportado para la proteína β -glucuronidasa (68 259 Da) (Fig 7B). Se midió la ^{35}S metionina incorporada en el producto de traducción utilizando un cassette Phosphorimager y un STORM. Se observó que la cantidad de ^{35}S metionina incorporada en el producto de traducción *uidA* fue 3 veces mayor en las muestras que contenían el transcrito con el líder *sps1* con relación a las muestras con el transcrito sin el líder *sps1* (Fig 7C). Estos resultados muestran que el líder *sps1* funciona como un potenciador traduccional.

Análisis de deleciones del líder *sps1*

Para determinar si una región específica del líder *sps1* es responsable del efecto potenciador, se generaron las deleciones 85 y 148 del extremo 5' y

190 del extremo 3' y se insertaron en el sentido correcto hacia abajo (3') del promotor -46(35S) (p46UTR Δ 85, p46UTR Δ 148 y p46UTR190-3). Estos plásmidos fueron usados en ensayos de expresión transitoria para determinar el efecto de las diferentes versiones del líder *sps1* en la expresión conferida por el promotor -46(35S). La figura 8 muestra que la eliminación de los primeros 85 nucleótidos del líder no disminuyen el potenciamiento conferido por el líder completo. La eliminación de 148 bases conserva la actividad del líder en aproximadamente el 50% y la eliminación de 190 bases del extremo 3' la conserva en dos terceras partes. Estos resultados sugieren que existe redundancia en elementos de secuencia o estructurales del líder *sps1* involucrados en la traducción del ARN mensajero.

DISCUSIÓN

La presencia de un líder inusualmente largo en el gen *sps1* sugiere un papel en la regulación de la expresión de este gen, como ha sido determinado en algunos genes virales y vegetales. Se ha reportado que las secuencias largas de líderes tienen ya sea un efecto positivo o negativo en la expresión genética, y pueden actuar a nivel transcripcional o post transcripcional. El análisis de la secuencia del líder *sps1* mostró una ausencia de marcos de lectura abiertos lo cual descarta eventos de traducción hacia arriba (5') del codón de iniciación y efectos inhibitorios debido a este proceso. Sin embargo, un análisis de la estructura secundaria del líder *sps1* muestra una estructura

bastante estable de -106.8 Kcal/mol (figure 1B) con varias regiones de tallo y asa. Las estructuras en la región 5' no codificadora usualmente tienen un efecto inhibitorio en la traducción del ARN mensajero. Por ejemplo, la inserción de una estructura de tallo y asa con una estabilidad de -50 Kcal/mol en una región líder sintética reduce la traducción hasta en 20 veces (Kozac 1990), presumiblemente al afectar la migración de la subunidad ribosomal 40S. Además, una reducción en la estabilidad de una horquilla en el líder del ARN mensajero del gen *Lc* gene de maíz, de -15.6 a -5.4 Kcal/mol, incrementó la traducción del gen reportero de luciferasa en 8.3 veces (Wang y Wessler 2001). En este trabajo reportamos que la eliminación del líder *sps1*, bastante estructurado y estable, disminuye la expresión conferida por el promotor *sps1* hasta en 10 veces, lo que demuestra que el líder *sps1* tiene un efecto estimulador y no inhibidor en la expresión.

La observación de que el líder *sps1* es incapaz de activar la transcripción de las versiones truncadas -46 y -90 del promotor 35S, cuando se coloca hacia arriba (5') de estos promotores, sugiere que la actividad potenciadora de esta secuencia no es debida a la presencia de un elemento potenciador transcripcional. Además, el hecho de que el líder *sps1* es capaz de incrementar la expresión genética sólo cuando se coloca en el sentido correcto hacia abajo (3') de un promotor, sugiere que la secuencia del líder *sps1* debe ser parte del ARN mensajero para potenciar la expresión genética al nivel

post transcripcional. Además, demostramos que el efecto del líder *sps1* es similar cuando se evalúa en ensayos de expresión transitoria usando bombardeo con mico partículas como en plantas de *Arabidopsis* transformadas.

El efecto observado en el potenciamiento de la expresión genética mediada por el líder *sps1* *in vivo*, se presenta tanto en promotores débiles como fuertes, aunque en diferentes grados, ya que en el promotor débil $-46(35S)$ el incremento es de 10 a 13 veces, mientras que en los promotores fuertes CaMV 35S y CVMV el incremento es de 0.3 veces. Aunque la diferencia del potenciamiento *in vivo* conferido por el líder *sps1* en promotores débiles con relación a promotores fuertes es muy significativa cuando se considera en términos relativos, el incremento absoluto en la expresión de GUS es aproximadamente el mismo considerando que los promotores fuertes utilizados son al menos 50 veces más fuertes que el promotor $-46(35S)$, como ha sido demostrado previamente (Odell et al. 1985, Fang et al. 1989) y corroborado en nuestro laboratorio utilizando ensayos transitorios (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que el mecanismo mediante el cual el líder *sps1* incrementa la expresión genética depende de uno o más factores presente(s) en cantidades limitadas, lo cual restringe la actividad del líder *sps1* *in vivo* al llegar a cierto nivel. Considerando que el promotor *sps1* confiere un nivel de expresión débil, similar al del promotor $-46(35S)$, la

influencia del líder *sps1* puede tener efectos significativos al regular los niveles de SPS.

Aunque algunos líderes son capaces de incrementar varias veces la expresión de promotores fuertes a nivel traduccional como en el caso del CaMV 35S (Nicolaisen et al. 1992, Day et al. 1993, Poogin y Skryabin 1992), estos 5' UTRs son principalmente de origen viral y de manera natural se encuentran regulando promotores fuertes. Además, estos 5' UTRs deben funcionar en circunstancias donde son producidos altos niveles de transcritos y es necesario que compitan con ARN mensajeros celulares en periodos cortos. Probablemente en estos casos los factores específicos requeridos para potenciar el mecanismo de traducción son diferentes a los que se requieren para la actividad del líder *sps1*. De cualquier manera, la magnitud del incremento en la expresión conferido por el líder *sps1* *in vivo* es suficiente para jugar un papel importante en el contexto del gen *sps1* y sugiere que los mecanismos de regulación post transcripcionales pueden jugar un papel adicional en la acumulación de SPS y síntesis de sacarosa (Chávez-Barcenas et al. 2000, Stitt et al. 1988, Doehlert y Hubber 1983).

La traducción más eficiente (más de 3 veces) conferida por el líder *sps1* en el sistema de traducción *in vitro* demuestra que este elemento actúa al nivel de síntesis de proteínas. Adicionalmente al efecto en la eficiencia de traducción, algunas secuencias de líderes alteran la estabilidad del ARN mensajero, como

es el caso de las secuencias de los líderes del gen *psBD* de *Chlamydomonas reinhardtii* y del gen *At-P5R* de *Arabidopsis* (Nickelsen et al. 1999, Hua et al. 2001). Sin embargo, los experimentos de RT-PCR realizados demuestran que para el caso del líder *sps1* esta secuencia no tiene un efecto importante en la estabilidad del ARN mensajero.

El efecto del líder *sps1* en la expresión genética se observó sólo cuando este elemento fue colocado en su orientación nativa hacia abajo (3') de un promotor y no cuando fue colocado en la orientación inversa. Considerando que la estabilidad de las estructuras secundarias es similar para ambas orientaciones del líder *sps1* (-106 y -108 Kcal/mol), proponemos que elementos específicos de estructura-secuencia y no la estabilidad, son los determinantes de la actividad del líder *sps1* al incrementar la eficiencia de traducción. Análisis de deleciones del líder *sps1* mostraron varias regiones de este elemento capaces de incrementar la expresión dirigida por el promotor -46(35S), sugiriendo que las secuencias importantes en el funcionamiento del líder *sps1* son redundantes y distribuidas a lo largo de esta región. La redundancia de secuencias en regiones líderes ha sido observada en el Virus del Mosaico del Tabaco, donde la secuencia ACAAUUAC(A) se encuentra repetida 2 ó 3 veces (dependiendo de la cepa) y la secuencia (CCA)_n se repite en hilera en una región de 24 nucleótidos; ambas secuencias son esenciales para la actividad del líder Ω del Virus del

Mosaico del Tabaco en el incremento de la eficiencia traduccional (Gallie y Walbot 1992). Otro caso de redundancia de secuencias se encuentra en el líder del gen *ntp303* involucrado en la eficiencia de traducción, donde se encuentran 8 copias de un elemento (GAA)_n (Hulzink et al. 2002). El análisis de la secuencia del líder *sps1* (figura 1A) muestra repetidos (TC) en 5 regiones de esta secuencia. Considerando que en las diferentes versiones del líder *sps1* truncadas existe al menos un repetido (TC), es posible que estos repetidos estén involucrados en el mecanismo que determina un incremento en la eficiencia de traducción. El líder del gen *psaDB* de *Nicotiana sylvestris* que potencia la traducción contiene la secuencia TCTCTC (Yamamoto et al. 1995).

Se ha sugerido que la manera en la cual un líder influencia la eficiencia de traducción puede ser ya sea por una afinidad relativa mayor o por un menor requerimiento de componentes limitantes de la maquinaria traduccional (Jobling y Gehrke 1987, Timmer et al. 1993, Wang et al. 1997). Las secuencias líderes pueden actuar ya sea pasivamente al no presentar barreras para el proceso de barrido de la subunidad ribosomal 40S o bien por un mecanismo activo a través de un factor regulador que actúa en *trans*. Este último mecanismo se ha estudiado en el Virus del Mosaico del Tabaco, donde el líder Ω interacciona con una proteína de 102 kDa (Tanguay y Gallie 1996) que ha sido identificada como la proteína celular HSP101 inducible por choque térmico. HSP101 funciona

como una proteína potenciadora de la traducción y su actividad es regulada negativamente por limitación de nutrientes sin que se afecte su función de tolerancia a altas temperaturas (Wells et al. 1998). La misma proteína HSP101 se une al elemento interno regulado por luz del ARN mensajero de ferredoxina (*Fed-1*), y es responsable en este caso del alto nivel de traducción en condiciones normales de temperatura y permite escapar de la represión traduccional a altas temperaturas (Ling et al. 2000). La posible existencia de un factor que interaccione con el líder *sps1* no ha sido dilucidada y requiere de investigación adicional.

REFERENCIAS

- Amir, J. y J. Preiss. 1982. **Kinetic characterization of spinach leaf sucrose-phosphate synthase.** Plant Physiology 69: 1027-1030.
- Anderson, M.B., K. Folta, K.M. Warpeha, J. Gibbons, J. Gao y L.S. Kaufman. 1999. **Blue light-directed destabilization of the pea *Lhcb1*4* transcript depends on sequences within the 5' untranslated region.** Plant Cell 11:1579-1589.
- Argüello, A.G. 1996. **Delimitación teórica y experimental de módulos de control transcripcional y replicativo en plantas: identificación de unidades mínimas de fotorrespuesta.** Tesis Doctoral, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN. Irapuato, Guanajuato, México.

- Bailey-Serres, J. y R.K. Dawe. 1996. **Both 5' and 3' sequences of maize *adh1* mRNA requires both enhanced translation under low-oxygen conditions.** Plant Physiology 112:685-695.
- Bate, N., C. Spurr, G.D. Foster, y D. Twell. 1996. **Maturation-specific translational enhancement mediated by the 5'-UTR of a late pollen transcript.** Plant J. 104: 613-623.
- Bolle, C., S. Sopory, T. Lübbersedt, R.G. Herrmann y R. Oelmüller. 1994. **Segments encoding 5'-untranslated leaders of genes for thylakoid proteins contains cis-elements essential for transcription.** Plant J. 6: 513-523.
- Cabrera-Ponce, J.L., A. Vegas-García y L. Herrera-Estrella. 1995. **Herbicide resistant transgenic papaya plants produced by an efficient particle bombardment transformation method.** Plant Cell Reports 15: 1-7.
- Carrington, J.C. y D. D. Freed. 1990. **Cap-independent enhancement of translation by a plant potyvirus 5' nontranslated region.** J. Virol. 64:1590-1597.
- Chávez-Bárcenas, A.T., J.J. Valdez-Alarcón, M. Martínez-Trujillo, L. Chen, B. Xoconostle-Cázares, W.J. Lucas y L. Herrera-Estrella. 2000. **Tissue-specific and developmental pattern of expression of the rice *sp51* gene.** Plant Physiology 124: 641-653.
- Clough, S. y A.F. Bent. 1998. **Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*.** Plant J. 16: 735-743.
- Curie, C. y S. McCormick. 1997. **A strong inhibitor of gene expression in the 5' untranslated region of the pollen-specific *LAT59* gene of tomato.** Plant Cell 9: 2025-2036.
- Damiani, R.D. y S. Wessler. 1993. **An upstream open reading frame represses expression of *Lc*, a member of the R/B family of maize transcriptional activators.** PNAS USA 90: 8244-8248.
- Day, M.J.D., J.L. Ashurst, S.F. Mathias, J.W. Watts, T.M.A. Wilson y R.A. Dixon. 1993. **Plant viral leaders influence expression of a reporter gene in tobacco.** Plant Mol. Biol. 23: 97-109.
- Dickey, L.F., M.E. Petracek, T.T. Nguyen, E.R. Hansen y W.F. Thompson. 1998. **Light regulated *Fed-1* mRNA requires an element in the 5' untranslated region and correlates with differential polyribosome association.** Plant Cell 10: 475-484.
- DOEHLERT, D.C. y S.C. HUBER. 1983. **Spinach leaf sucrose phosphate synthase. Activation by glucose 6-phosphate and interaction with inorganic phosphate.** FEBS 153: 293-297.
- FANG, R.X., F. NAGY, S. SIVASUBRAMANIAM y N.H. CHUA. 1989. **Multiple cis regulatory elements for maximal expression of the cauliflower mosaic virus 35S**

- promoter in transgenic plants.** Plant Cell 1: 141-150.
- Fütterer, J. y T. Hohn. 1996. **Translation in plants-rules and exceptions.** Plant Mol. Biol. 32:158-189.
- Gallagher, S. R. 1992. **Quantitation of GUS activity by fluorometry.** In S.R. Gallagher (Ed), GUS protocols: using the GUS gene as a reporter of gene expression, Academic Press, San Diego CA, pp 103-113.
- GALLIE, D.R. y V. WALBOT. 1992. **Identification of the motifs within the tobacco mosaic virus 5' -leader responsible for enhancing translation.** Nucl. Acids Res. 20: 4631-4638.
- GALLIE, D.R. y T.E. YOUNG. 1994. **The regulation of gene expression in transformed maize aleurone and endosperm protoplasts. Analysis of promoter activity, intron enhancement, and mRNA untranslated region on expression.** Plant Physiology 106: 929-939.
- Gallie, D. R., C. Caldwell y L. Pitto. 1995a. **Heat shock disrupts cap and poly (A) tail function during translation and increases mRNA stability of introduced reporter mRNA.** Plant Physiology 108:1703-1709.
- Gallie, D.R., D. E. Sleat, J. W. Watts, P.C. Turner y A. Wilson. 1987. **The 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA enhances the expression of foreign gene transcripts *in vitro* and *in vivo*.** Nucl. Acids Res. 15: 3257-3273.
- Gallie, D. R., R. L. Tanguay y V. Leathers. 1995b. **The tobacco etch viral 5' leader and poly (A) tail are functionally synergistic regulators of translation.** Gene 165: 233-238.
- Giaquinta, R. T. 1980. **Translocation of sucrose and oligosaccharides.** In RT Giaquinta (Ed), The Biochemistry of Plants, Academic Press, San Diego, CA. pp 271-317.
- Hua, X. J., B. Van De Cotte, M.V. Montagu y N. Verbruggen. 2001. **The 5' untranslated region of the *At-P5R* gene is involved in both transcriptional and post-transcriptional regulation.** Plant J. 26:157-169.
- Huber, S. C. y J. L. Huber. 1996. **Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants.** Annu. Rev. Plant Physiol. & Plant Mol. Biol. 47: 431-444.
- Hulzink, R. J. M., P. F. M. De Groot, A. F. Croes, W. Quaaddvlieg, D. Twell, G.J. Wullems y M.A. Van Herpen. 2002. **The 5' untranslated region of the ntp303 gene strongly enhances translation during pollen tube growth, but not during pollen maturation.** Plant Physiology 129:1-12.
- Jefferson, R. A., T. A. Kavanagh y M. W. Bevan. 1987. **GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants.** EMBO J. 6: 3901-3907.

- Jobling, S. A. y L. Gehrke. 1987. **Enhanced translation of chimaeric messenger RNAs containing a plant viral untranslated leader sequence.** Nature 325: 622-625.
- Joshi, C. P. 1987. **An inspection of the domain between putative TATA box and translation start site in 79 plant genes.** Nucl. Acids Res. 15: 6643-6653.
- Kalt-Torres, W., P. S. Kerr y S. C. Huber. 1987. **Isolation and characterization of multiple forms of maize leaf sucrose-phosphate synthase.** Physiologia Plantarum 70: 653-658.
- Klein, R. R., J. Crafts-Brandner y M. E. Salvucci. 1993. **Cloning and developmental expression of the sucrose-phosphate synthase gene from spinach.** Planta 190: 498-510.
- Komatsu, A., Y. Takanokura, M. Omura y T. Akiham. 1996. **Cloning and molecular analysis of cDNAs encoding three sucrose phosphate synthase isoforms from citrus fruit (*Citrus unshiu* Marc.).** Planta 189: 329-339.
- Kozak, M. 1987. **An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs.** Nucl Acids Res 15: 8125-8132.
- Kozac, M. 1990. **Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eucariotic ribosomes.** PNAS USA 87: 8301-8305.
- Langerkämper, G., R. Mchale, R.C. Gardner y E. Macrae. 1998. **Sucrose-phosphate synthase steady-state mRNA increases in ripening kiwifruit.** Plant Mol. Biol. 36: 857-869.
- Leathers, V., R. Tanguay, M. Kobayashi y D. R. Gallie. 1993. **A phylogenetically conserved sequence within viral 3' untranslated RNA pseudoknots regulates translation.** Mol. Cell Biol. 13: 5331-5347.
- Ling, J., D. R. Wells, R. T. Tanguay, L. F. Dickey, W. F. Thompson y D. Gallie. 2000. **Heat shock protein HSP101 binds to the *Fed-1* internal light regulatory element and mediates its high translational activity.** Plant Cell 12: 1213-1227.
- Lohmer, S., M. Maddaloni, M. Motto, F. Salamini y R. Thompson. 1993. **Translation of the mRNA of the maize transcriptional activator *Opaque-2* is inhibited by upstream open reading frames present in the leader sequence.** Plant Cell 5: 65-73.
- Lukaszewicz, M. B. Jérrouville y M. Boutry. 1998. **Signs of translational regulation within the transcript leader of a plasma membrane H⁺-ATPase gene.** Plant J. 14: 413-423.
- Martín, T., R.V. Wöhner, S. Hummel, L. Willmitzer y W.B. Frommer. 1992. **The GUS reporter system as a tool to study gene expression.** In Gallagher (Ed), **GUS protocols: using the GUS gene as a reporter of gene expression**, Academic Press, San Diego CA, pp 103-113.
- Martínez-Trujillo, M. 2002. **Análisis funcional de regiones**

- involucradas en la expresión del gen Sacarosa-Fosfato Sintasa de arroz (*Oryza sativa* L.).** Tesis de Doctorado. CINVESTAV-IPN, Unidad Irapuato. Irapuato, Guanajuato, México.
- Martínez-Trujillo, M. V. Limones-Briones, J. L. Cabrera-Ponce y L. Herrera-Estrella. 2004. **Improving transformation efficiency of *Arabidopsis thaliana* by modifying the floral dip method.** Plant Mol. Biol. Rep. 2: 63-70.
- Mcbride, K.E. y K.R. Summerfelt. 1990. **Improved binary vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation.** Plant Mol. Biol. 14: 269-276.
- Meulewaeter, F., M.V. Van Montagu y M. Cornelissen. 1998. **Features of the autonomous function of the translational enhancer domain of satellite tobacco necrosis virus.** RNA 4: 1347-1356.
- Michelet, B., M. Lukaszewicz, V. Dupriez y M. Boutry. 1994. **A plant plasma membrane proton-ATPase gene is regulated by development and environment and shows signs of a translational regulation.** Plant Cell 6: 1375-1389.
- Nickelsen, J., M. Fleischmann, E. Boudreau, M. Rahire y J.D. Rochaix. 1999. **Identification of cis-acting RNA leader elements required for chloroplast *psbD* gene expression in *Chlamydomonas*.** Plant Cell 11: 957-970.
- Nicolaisen, M., E. Johansen, G.B. Poulsen y B. Borkhardt. 1992. **The 5' untranslated region of pea seedborne mosaic potyvirus RNA as a translational enhancer in pea and tobacco protoplasts.** FEBS 303:169-172.
- Odell, J. T., F. Nagy Y N. H. Chua. 1985. **Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter.** Nature 313: 810-812.
- Oliveira Do Nascimento, J. R., B. R. Cordenunsi, F. M. Lajolo y M. J. C. Alcocer. 1997. **Banana sucrose phosphate synthase gene expression during fruit ripening.** Planta 203: 283-288.
- Pitto, L., D. R. Gallie y V. Walbot. 1992. **Role of the leader sequence during thermal repression of translation in maize, tobacco and carrot protoplasts.** Plant Physiology 100:1827-1833.
- Poggin, M. M. y K. G. Skryabin. 1992. **The 5'-untranslated leader sequence of potato virus X RNA enhances the expression of a heterologous gene *in vivo*.** MGG 234: 329-331.
- Reichel, C., J. Mathur, P. Eckes, K. Langenkemper, C. Koncz, J. Schell, B. Reiss y C. Maas. 1996. **Enhanced green fluorescence by the expression of an *Aequorea victoria* green fluorescent protein mutant in mono and dicotyledonous plant cells.** PNAS USA 93: 5888-5893.
- Reimholz, R., P. Geigenberger y M. Sttit. 1994. **Sucrose-phosphate**

- synthase is regulated via metabolites and protein phosphorylation in potato tubers, in manner analogous to the enzyme in leaves.** *Planta* 192: 480-488.
- Sakamoto, M., T. Satozawa, N. Kishimoto, K. I. Higo, H. Shimada y T. Fujimura. 1995. **Structure and RFLP mapping of a rice sucrose phosphate synthase (SPS) gene that is specifically expressed in the source organ.** *Plant Science* 112: 207-217.
- Salerno, G., G. Pagnussat y H. Pontis. 1998. **Studies on sucrose phosphate synthase from rice leaves.** *Cell Mol. Biol.* 44: 407-416.
- Sanger, F., S. Niclen y A. R. Coulson. 1977. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** *PNAS USA* 74: 5463-5467.
- Schuler, M.A. y R.E. Zielinski. 1989. **Methods in Plant Molecular Biology.** Academic Press Inc., San Diego CA.
- Sinha, A.K., U. Pathre y P.V. Sane. 1997. **Purification and characterization of sucrose phosphate synthase from *Prosopis juliflora*.** *Phytochemistry*. 46: 441-447.
- Stitt, M., I. Wilke, R. Feil y W. Heldt. 1988. **Coarse control of sucrose phosphate synthase in leaves: Alterations of the kinetic properties in response to the rate of photosynthesis and the accumulation of sucrose.** *Planta* 174: 217-230.
- Stomp, A. M. 1992. **Histochemical localization of β -glucuronidase.** In S.R. Gallagher (Ed), *GUS protocols: using the GUS gene as a reporter of gene expression.* Academic Press, San Diego CA, pp 103-113.
- Tanguay, R. y D. Gallie. 1996. **Isolation and characterization of the 102-Kilodalton RNA-binding protein that binds to the 5' and 3' translational enhancers of Tobacco Mosaic Virus RNA.** *J. Biol. Chem.* 271:14316-14332.
- Timmer, R.T., L.A. Benkowski, D. Schodin, S.R. Lax, A.M. Metz, J.M. Ravel y K.S. Browning. 1993. **The 5' and 3' untranslated regions of satellite tobacco necrosis virus RNA affect translational efficiency and dependence on a 5' cap structure.** *J. Biol. Chem.* 268: 9504-9510.
- Valdéz-Alarcón, J. J., M. Ferrando, G. Salerno, B. Jiménez-Moraila y L. Herrera Estrella. 1996. **Characterization of a rice sucrose-phosphate synthase-encoding gene.** *Gene* 170: 217-222.
- Verdaguer, B. A. De Kochko, R.N. Beachy y C. Fauquet. 1996. **Isolation and expresión in transgenic tobacco and rice plants, of the cassava vein mosaic virus (CVMV) promoter.** *Plant Mol. Biol.* 31:1129-1139.
- Wang, L. y S. Wessler. 2001. **Role of mRNA secondary structure in translational repression of the**

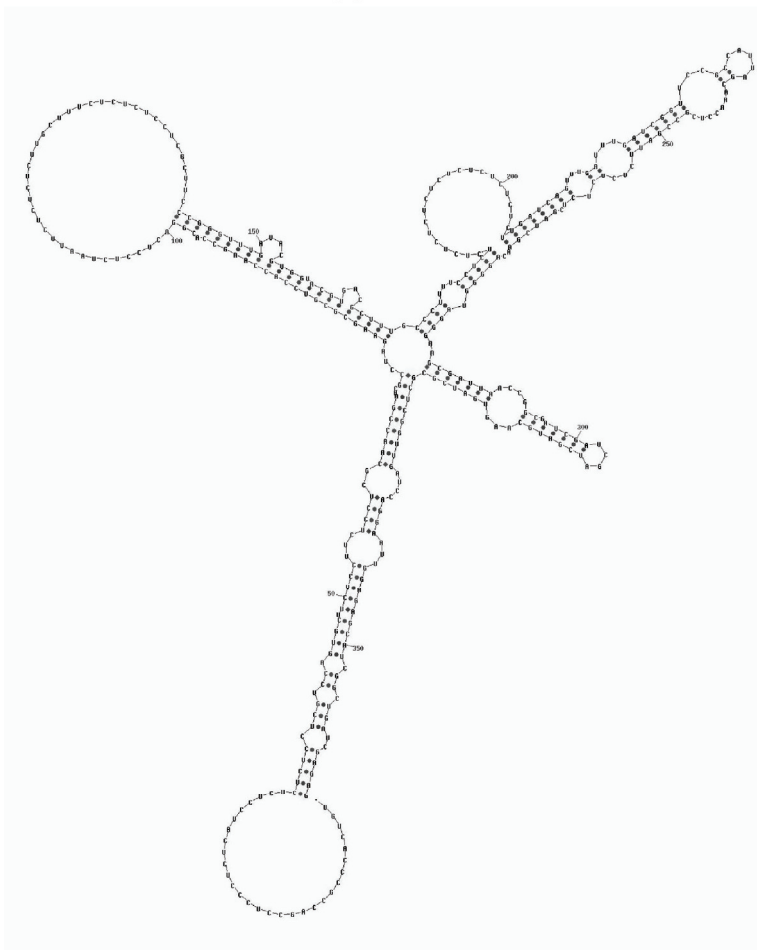
- maize transcriptional activator**
Lc. Plant Physiology 125: 1380-1387.
- Wang, S., K. S. Browning y W.A. Miller. 1997. **A viral sequence in the 3'-untranslated region mimics a 5' cap in facilitating translation of uncapped mRNA.** EMBO J. 16:4107-4116.
- Wells, D. R., R. L. Tanguay, H. Le y D. R. Gallie. 1998. **HSP101 functions as a specific translational regulatory protein whose activity is regulated by nutrient status.** Genes & Dev. 12: 3236-3251.
- Worrell, A. C., J. M. Bruneau, K. Summerfelt, M. Boersig y T.A. Voelker. 1991. **Expression of a maize sucrose phosphate synthase in tomato alters leaf carbohydrate partitioning.** Plant Cell 3: 1121-1130.
- Yamamoto, Y., H. Tsuji y J. Obokata. 1995. **5'-leader of a photosystem I gene in *Nicotiana sylvestris*, *psaDb*, contains a translational enhancer.** J. Biol. Chem. 270: 12466-12470.
- Zelenina, D. A., O. I. Kulaeva, E. V. Smirnyagina, A. G. Solovyev, N. A. Miroshnichenko, O. N. Fedorkin, N. P. Rodionova, S. Y. Morozov y J. G. Atabekov. 1992. **Translation enhancing properties of the 5'-leader of potato virus X genomic RNA.** FEBS 3: 267-270.
- Zuker, M., D. H. Mathews y D. H. Turner. 1999. **Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide.** In J. Barciszewski, J. and B.F.C. Clark, B.F.C. (Eds), *RNA Biochemistry and Biotechnology*, Kluwer Academic Publishers pp. 11-43.

Tabla 1. Secuencias de las diferentes construcciones utilizadas en la región de iniciación de transcripción y traducción, así como secuencias intermedias. En la secuencia de iniciación de transcripción el nucleótido de inicio +1 se representa en negritas, y en la secuencia de inicio de traducción el codón de inicio AUG también se representa en negritas. En la secuencia intermedia los nucleótidos entre paréntesis y en negritas corresponden a la secuencia del líder. La secuencia con un asterisco representa el único caso donde el contexto del codón de iniciación del gen *sps1* fue utilizado, puesto que esta construcción consiste en una fusión traduccional.

Construcciones plásmidos	Contexto del inicio de transcripción	Secuencia intermedia	Contexto del sitio de inicio de traducción
pBS46S	AGAGGACGAC C	tgcagatctctagaagctgactctagaggatccccgggtaggtcagtc c	CTTATGTTACGT
pBS90S	AGAGGACGAC C	tgcagatctctagaagctgactctagaggatccccgggtaggtcagtc c	CTTATGTTACGT
pUTR46	AGAGGACGAC C	tgcagatctctagaagctgactctagaggatccccgggtaggtcagtc c	CTTATGTTACGT
pUTR90	AGAGGACGAC C	tgcagatctctagaagctgactctagaggatccccgggtaggtcagtc c	CTTATGTTACGT
p46UTR	AGAGGACGAC C	tgcagatct [Líder of 368 nt] agatctctagaagctgactctagaggatccccgggtaggtcagtc	CTTATGTTACGT
p46UTR-INV	AGAGGACGAC C	tgcagatct [Líder of 368 nt invertido] agatctctagaagctgactctagaggatccccgggtaggtcagtc	CTTATGTTACGT
p46UTRΔ85	AGAGGACGAC C	tgcagatct [Líder Δ85 of 273 nt] agatctctagaagctgactctagaggatccccgggtaggtcagtc	CTTATGTTACGT
p46UTRΔ148	AGAGGACGAC C	tgcagatct [Líder Δ148 of 220 nt] agatctctagaagctgactctagaggatccccgggtaggtcagtc	CTTATGTTACGT
p46UTRΔ190-3	AGAGGACGAC C	tgcagatct [Líder Δ190-3 of 178 nt] agatctctagaagctgactctagaggatccccgggtaggtcagtc	CTTATGTTACGT
p46BIN	AGAGGACGAC C	tgcagatctctagaagctgactctagaggatccccgggtaggtcagtc c	CTTATGTTACGT
p46UTR-BIN	AGAGGACGAC C	tgcagatct [Líder of 368 nt] agatctctagaagctgactctagaggatccccgggtaggtcagtc	CTTATGTTACGT
pBI121	AGAGGACTCTA	gaggatccccgggtggtcagtc	CTTATGTTACGT
p35S-UTR	AGAGGACTCTA	ga [Líder of 368 nt] tctagaggatccccgggtggtcagtc	CTTATGTTACGT
pILTAB380	GTTTGTAGATC	No sequence	TCCATGGTCCGT
pCAS-UTR	GTTTGTAGATC	t [Líder of 368 nt] agatc	TCCATGGTCCGT
pT7-GUS	TCGAGGTGGC	cggtgccggccgctctagaactagtggatccccgggtggtcagtc	CTTATGTTACGT
pT7UTR-GUS	TCGAGGTGGC	cggtgccggccgctctaga [Líder of 368 nt] tctagaggatccccgggtggtcagtc	CTTATGTTACGT
pSPS1	GCCACGTGT	[Líder of 368 nt]	GAGATGGCGGG G *
pSPS2	GCCACGTGT	[Líder of 368 nt] agatctctagaagctgactctagaggatccccgggtaggtcagtc	CTTATGTTACGT
pSPS3	GCCACGTGT	[caccgccagctcc] agatctctagaagctgactctagaggatccccgggtaggtcagtc	CTTATGTTACGT

1
 CGTGTCAACCCGCCAGCCTCCCTCTCATCCTCTCTCTCTCTCTCGTCCAGTGCTTCT
 CCTTCTCCTCGCAACCGAAGCGCTAGAACGCGCTCCACCAAGCCACGGACTC
 CTCTAATTCTCTCTCTCTGCTTTCTCTCTCTCTCTCGCTTCCCGGGTTTGATACGTGG
 TACGTGACGCTTTGCCCTTTTCCCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTGATCA
 GTTTGATTTGATCGGTTCCGCCATTAGCAAACCTCGCCGATCTCTCTCTCTCTCGA
 TCGAACAGGGGTAGGGAAGCGATTAAACGGCGATCGATCGATCGATGCAAGT
 GATCGCGCTCGGTTGATCCAGGAATTGGAGAGCATCGGCTGATCGAGAG 368

A



(B)

Figura 1. Secuencia del líder *sps1* y predicción de la estructura secundaria. A) El líder *sps1* tiene 368 nucleótidos y se secuenció de acuerdo a como se describe en materiales y métodos. Existen varias secuencias repetidas (TC) que pueden ser elementos potenciales que intervienen en la función del líder. B) La estructura secundaria del líder *sps1* conforma una estructura estable (-106.6 Kcal/mol) con varias regiones de tallo y asa. La estructura secundaria y la estabilidad fue determinada de acuerdo a Zuker et al. (1999).

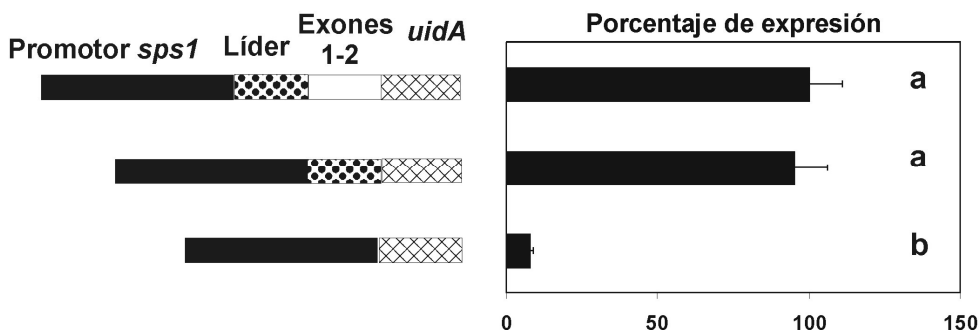


Figura 2. Efecto del líder y exones en la expresión de *sps1*. Los plásmidos con las construcciones *uidA* se muestran en la parte izquierda de la figura y representan lo siguiente: la construcción superior (pSPS1) contiene el fragmento -2195 a +676 con el promotor, líder, un intrón y dos exones; la construcción intermedia (pSPS2) contiene al promotor y al líder (-2195 a +368); la construcción inferior (pSPS3) tiene sólo al promotor más 20 bases hacia adelante (-2195 a +20). El porcentaje de expresión fue determinado de acuerdo a materiales y métodos y se muestra en la gráfica derecha con el intervalo de confianza.

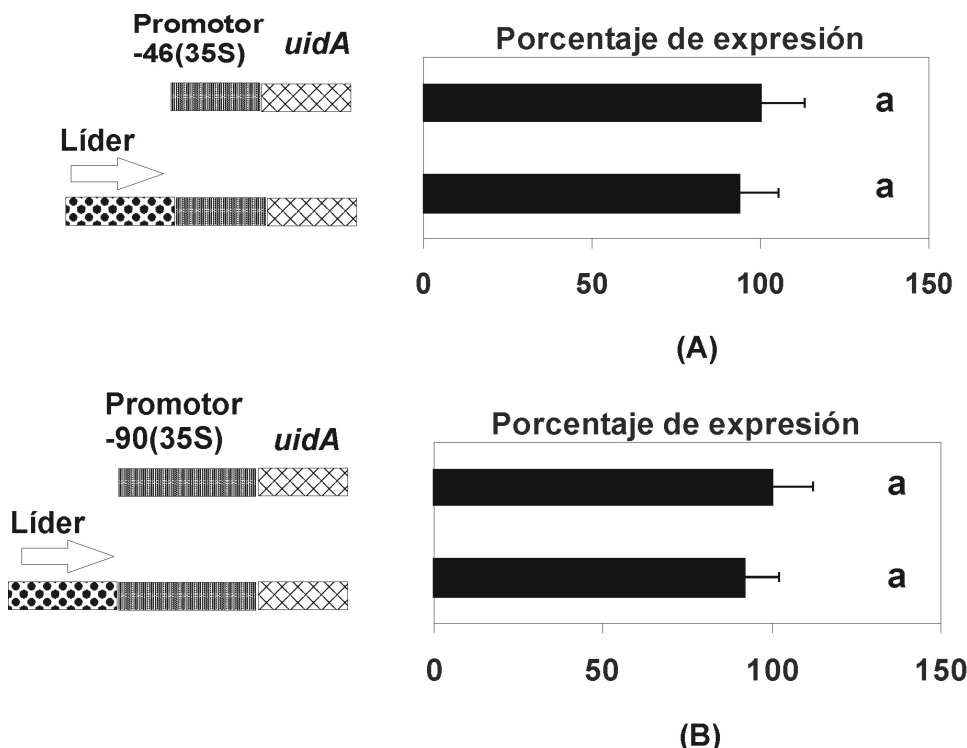


Figura 3. Análisis del efecto del líder *sps1* ubicado hacia arriba (5') de promotores heterólogos. A) El líder de 368 nucleótidos fue insertado hacia arriba (5') del promotor -46(35S) que se encuentra fusionado al gen *uidA* (pUTR46). El porcentaje de expresión fue determinado de acuerdo a materiales y métodos y se muestra en la gráfica derecha con el intervalo de confianza. B) Lo mismo que en A pero insertando el líder *sps1* hacia arriba (5') del promotor -90(35S) (pUTR90).

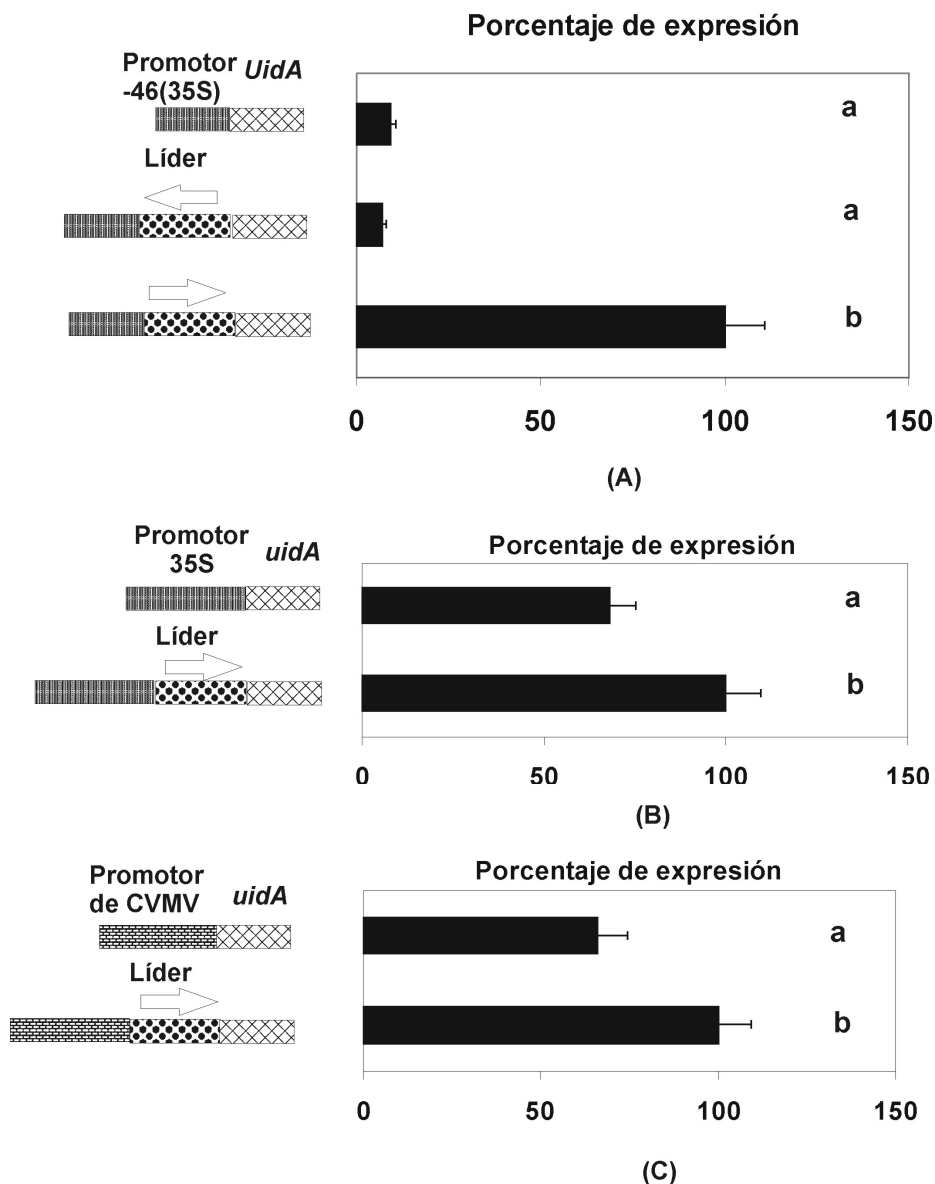


Figura 4. Efecto del líder *sps1* colocado hacia abajo (3') de promotores heterólogos. A) Los plásmidos con fusiones del gen *uidA* se muestran en la parte izquierda de la figura. La construcción superior (pBS46) contiene al promotor -46(35S) fusionado al gen *uidA*. En la parte media la construcción p46UTR-INV contiene al líder *sps1* colocado entre el promotor -46(35S) y el gen *uidA*, en la orientación inversa. En la parte inferior el vector p46UTR contiene al líder *sps1* insertado entre el promotor -46(35S) y el gen *uidA*, en la orientación correcta. El porcentaje de expresión fue determinado de acuerdo a materiales y métodos y se muestra en la gráfica derecha con el intervalo de confianza. B) Similar a lo descrito en A utilizando el promotor completo CaMV 35S fusionado al líder *sps1* y al gen *uidA* (p35S-UTR). C) Similar a lo descrito en A utilizando el promotor del Virus del Mosaico de la Vena de la Yuca fusionado al líder *sps1* y al gen *uidA* (pCAS-UTR).

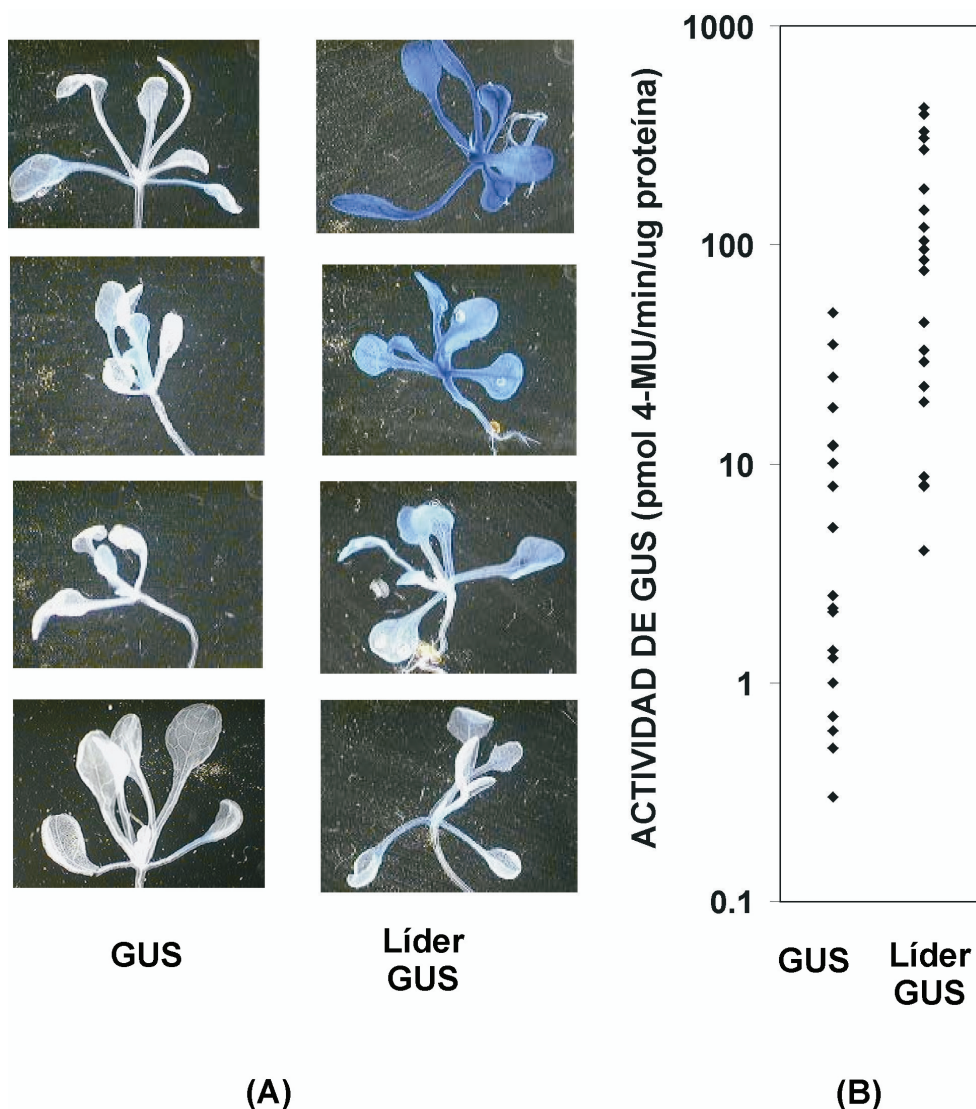


Figura 5. Actividad de GUS en plantas de *Arabidopsis thaliana*. Plantas de *Arabidopsis* fueron transformadas con el promotor -46(35S) fusionado al gen *uidA*, con y sin el líder *sps1* usando los vectores binarios p46BIN-UTR y p46BIN descritos en materiales y métodos. A) Plantas transformadas de 10 días de edad fueron analizadas mediante ensayos de expresión de GUS, tiñendo con x-gluc. Se representan 4 plantas representativas transformadas con cada construcción. B) Veinte plantas de 2 semanas de edad transformadas con cada construcción fueron analizadas para determinar la actividad de GUS en las hojas, utilizando el método fluorométrico (Martin 1992, Gallagher 1992). Cada punto en la gráfica representa el valor individual de una planta.

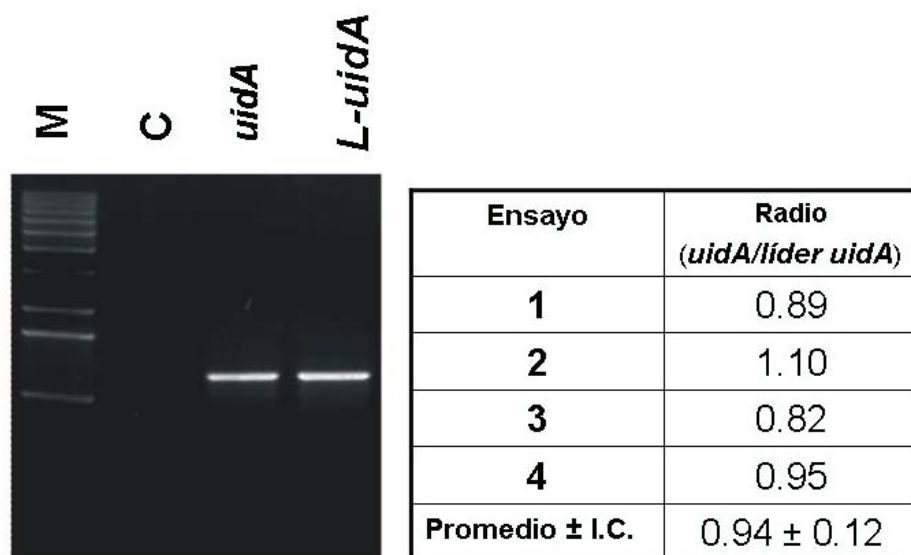


Figura 6. Análisis de los niveles de transcritos *uidA* por RT-PCR. El ARN total de plantas de *Arabidopsis* transformadas y silvestres fue extraído y tratado con Dnasa I. Cuarenta plantas de *Arabidopsis* silvestres y transformadas con p46BIN y p46UTR-BIN fueron utilizadas para cada uno de los casos y fueron mezcladas por separado para tener una muestra representativa de cada población. Se extrajo el ARN total de acuerdo a como se menciona en materiales y métodos y utilizando la técnica de RT-PCR de dos pasos y 20 ciclos se amplificó un fragmento de 1201 nucleótidos del gen *uidA*. En la tabla derecha se presenta el radio de las concentraciones de ADN obtenido de 4 muestras provenientes de plantas transformadas sin y con la región líder *sps1*. M= Marcadores de peso molecular, C= control sin ADN, *uidA*= Con ADN aislado de plantas transformadas con p46BIN, *L-uidA*= Con ADN aislado de plantas transformadas con p46UTR-BIN.

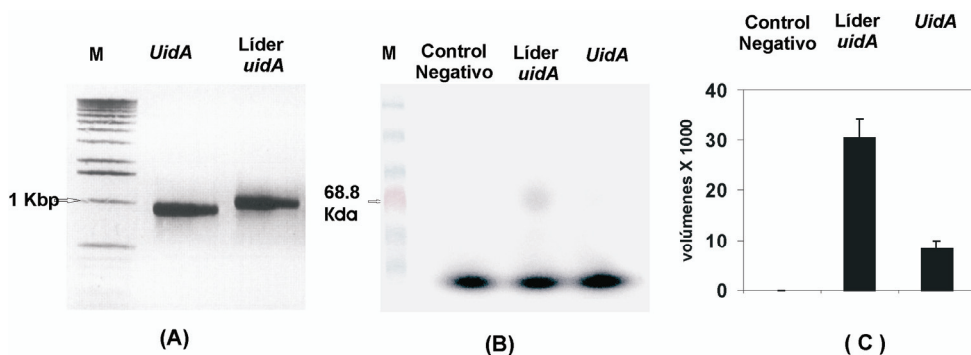


Figura 7. Transcripción y traducción *in vitro*. (A) A partir de los vectores pT7UTR-GUS y pT7-GUS se generaron transcritos del gen *uidA* con y sin la region líder *sps1* usando un sistema de transcripción *in vitro* de acuerdo a como se describe en materiales y métodos. Los transcritos fueron separados en un gel de agarosa al 0.8% y visualizados mediante tinción con bromuro de etidio. Se utilizó como referencia el marcador de peso molecular de ADN de 1 Kbp de GIBCO-BRL. B) La traducción *in vitro* se llevó a cabo mediante un sistema de extractos de germen de trigo, 35 S metionina y los transcritos *uidA* con y sin la región líder *sps1*, de acuerdo a como se describe en materiales y métodos. Las muestras de reacción fueron cargadas, movilizadas en un gel de poliácridamida al 8% y la radioactividad fue visualizada en un Phosphoimager C) La radioactividad fue cuantificada exponiendo los geles secos en un cassette Phosphoimager por 12 horas y escaneando el cassette en un STORM (Molecular Dynamics). Finalmente se calcularon las áreas de radioactividad mediante el software ImageQuant (Molecular Dynamics). La gráfica muestra la media y el intervalo de confianza de 4 experimentos.

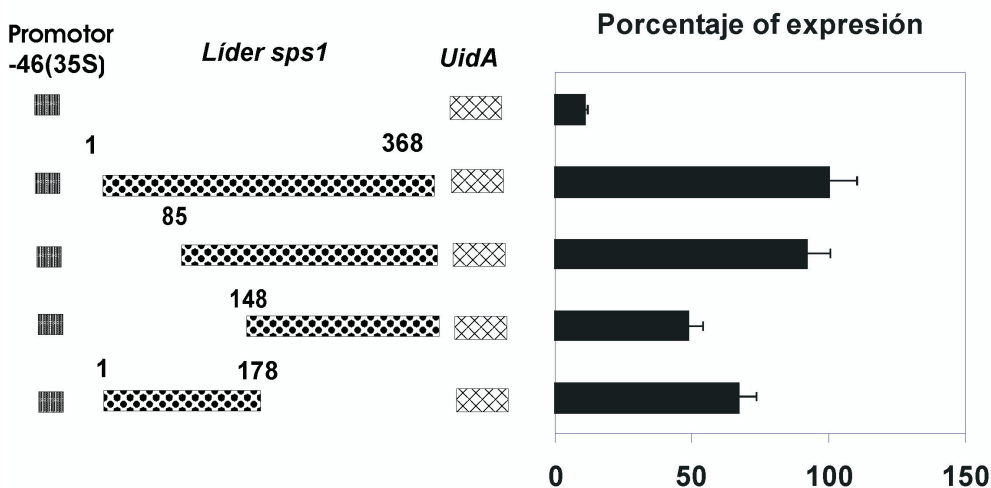


Figura 8. Análisis de delecciones de la región líder *sps1*. Se generaron diferentes delecciones del líder *sps1* y se insertaron entre el promotor -46(35S) y el gen *uidA*. Los plásmidos pBS46, p46UTRΔ85, p46UTRΔ148 y p46UTRΔ190-3 fueron ensayados en hojas de tabaco determinado la expresión transitoria. Se muestra el porcentaje de expresión de 10 muestras analizadas para cada construcción y el intervalo de confianza.